

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

***PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES  
UTILIZANDO Escherichia coli EM CULTIVOS EM ALTA  
DENSIDADE CELULAR.***

*Autor: Eng<sup>o</sup>. William James Nogueira Lima, M.Sc.*

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana*

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

*Campinas – São Paulo  
Dezembro de 2004.*

JNIDADE BC

Nº CHAMADA \_\_\_\_\_

V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_

TOMBO BC/ 6369f

PROC 16.P. 00086-05

C \_\_\_\_\_ \*

PREÇO 11,00

DATA 12/05/05

Vº CPD \_\_\_\_\_

Bahia 349329

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

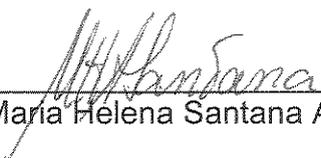
L628p

Lima, William James Nogueira  
Produção de proteínas recombinantes utilizando  
Escherichia coli em cultivos em alta densidade celular /  
William James Nogueira Lima. --Campinas, SP: [s.n.],  
2004.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Engenharia Química.

1. Biotecnologia - Microbiologia. 2. Fermentação. 3.  
Membranas (Tecnologia). 4. DNA recombinante. 5.  
Microbiologia industrial. I. Santana, Maria Helena  
Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

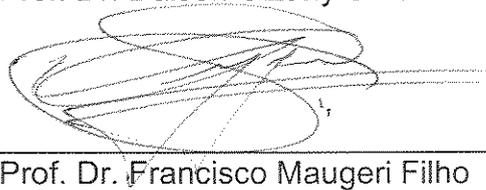
Tese de Doutorado defendida por William James Nogueira Lima e aprovada no dia 06 de Dezembro de 2004 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Helena Santana Andrade

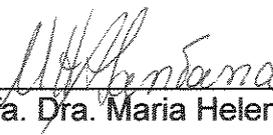
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradetta

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Daison Olzany Silva

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Este exemplar corresponde a versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida pelo Engenheiro Químico William James Nogueira Lima e aprovada pela banca examinadora no dia 06 de dezembro de 2004.



---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Santana

*Aos meus pais, Maria Helena e Geraldino,  
e a minha esposa, Izabella.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Biommm S/A que viabilizou a execução deste trabalho.

Ao Luciano Vilela, diretor de tecnologia da Biommm S/A, pelo constante apoio e confiança depositados em mim.

À Dra. Maria Helena Santana, pelo apoio e orientação neste trabalho.

Ao Dr. Josef Ernest Thiemann, pela inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelas dicas e, principalmente pela amizade que brotou do convívio cotidiano.

À Vilcimar Pereira Rocha e José Domingos, pela incansável ajuda na realização dos ensaios.

A todos os colegas de trabalho que participaram na preparação dos ensaios e nas análises: Renato, João Cláudio, José Aparecido, George, Fatinha, Patrick, Catarino, Quirino, Carla, Bete e Malu, pelo apoio e compreensão durante todo este tempo.

À Edna, pela ajuda na revisão e formatação da tese.

Aos meus pais, Geraldino e Maria Helena, pelo incentivo e confiança.

Aos meus irmãos, Denis, Jane, Glênio e Sarah, por existirem.

À Izabella, pela compressão e companheirismo nesta longa empreitada.

## Resumo

Neste trabalho foi possível estudar o cultivo em altas densidades celulares de *E. coli* recombinante em bioreatores identificando importantes parâmetros cinéticos para as fases de crescimento celular e indução da proteína recombinante. Foram estudadas diversas estratégias de cultivo para obtenção de elevadas densidades celulares, no intuito de desenvolver uma tecnologia de fermentação robusta que permitisse: Elevados níveis de biomassa em peso seco de células por litro; determinar as condições nutricionais que permitem expressão da proteína de fusão da ordem de 20% ou mais em fermentações com alta concentração de biomassa e determinar a melhor estratégia de fermentação para atingir elevadas concentrações celulares, entre as quais, batelada-alimentada com cortes, batelada-alimentada cíclica em dois estágios e fermentações com reciclo e microfiltração. A cepa utilizada neste estudo foi a *E. coli* N-4830-1 transformada com o plasmídeo pHis. As fermentações foram realizadas em bioreatores de bancada de capacidade útil de 4,0 L e 12,0 L (NBS e Inceltech). Foram medidas as concentrações de biomassa, glicose, acetato e proteína recombinante. Os estudos cinéticos das diferentes estratégias mostraram incrementos em biomassa e em proteína de fusão, sendo que o melhor resultado foi obtido para fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes, as quais obtiveram produtividade celular igual a  $P_R = 6,437$  g/L/h. A concentração final em peso seco de células foi 173,8 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,8%. Os incrementos obtidos em biomassa e em proteína de fusão, em relação à batelada-alimentada tradicional, foram respectivamente 341 % e 328 %. A técnica mostrou-se adequada para remoção de inibidores no meio de cultura permitindo maior produtividade e, conseqüentemente, maior crescimento celular, sendo até 3,5 vezes superiores aos cultivos em batelada-alimentada tradicional.

Palavras-chave: cultivo em alta densidade celular; microfiltração, reciclo de células, *E. coli* recombinante.

## Abstract

This thesis studied submerged high cell-density cultures (HCDC) of recombinant *Escherichia coli* identifying important kinetic parameters on growth and production phases. Several strategies to obtain HCDC were studied aiming to develop a robust fermentation process that allowed: High cell dry weight per liter; to determine the nutritional conditions to express the fusion protein in levels up to 20% of total protein, and to determine the best fermentation technique to reach dry biomass concentration higher than 100,0 g/L. The strain used in this work was *E. coli* N-4830-1 transformed with the plasmid pHis. The fermentations were ran out in 4.0 L and 12.0 L bench-top bioreactors (NBS e Inceltech). Total protein concentration, recombinant protein concentration, cell concentration, glucose concentration and acetate concentration were analyzed. The kinetics studies demonstrated that biomass and fusion protein were increased, however the best results were performed on a continuous fermentation with microfiltration, total cell recycle and exponential feeding. The cell productivity was  $P_R = 6,437$  g/L/h, the final cell dry weight was 173,8 g/L and the percentage of fusion protein was 17,8 % of total protein. The biomass and fusion protein increase obtained were, respectively, 341 % and 328 %, comparing with traditional fed-batch fermentation. This technique showed appropriated to remove inhibitors of the broth allowing higher cell concentration and, consequently, higher productivity. In this type of culture strategy, the final cell concentration was 3.5 fold than one obtained in traditional fed-batch.

Key words: High-cell-density cultivations, microfiltration, cell recycle, recombinant *E. coli*

## ÍNDICE

I – Introdução	1
II – Objetivos	4
III - Fundamentação teórica	6
III.1 – <u>Escherichia coli</u>	6
III.1.1 – Estabilidade do plasmídeo	6
III.1.2 – Principais aspectos para expressão de genes recombinantes em <u>E. coli</u>	7
III.1.3 – Formação de ácido acético em <u>E. coli</u>	8
III.2 – Insulina Humana	10
III.3 – Cultivo microbiano em altas densidades celulares	11
III.4 – Fermentação batelada-alimentada	13
III.4.1 – Desenvolvimento de meios de cultura para fermentações batelada-alimentada	15
III.4.2 – Concentração celular máxima para o cultivo de <u>E. coli</u>	16
III.4.3 – Principais problemas para o cultivo em fermentações batelada-alimentada de <u>Escherichia coli</u>	17
III.4.4 – Estratégias para o cultivo de <u>Escherichia coli</u> em fermentações batelada-alimentada	21
III.5 – Fermentação batelada-alimentada repetida	26
III.6 – Fermentação batelada-alimentada cíclica	29
III.7 – Fermentação com reciclo de células e microfiltração tangencial	32
III.7.1 – Representação matemática de um sistema de reciclo de células	36
III.7.2 – Sistemas de filtração tangencial	37

IV – Materiais e métodos	41
IV.1 – Cepas e plasmídeo	41
IV.1.1 – Cepas	41
IV.1.2 – Plasmídeo	41
IV.2 – Meios de cultivo	43
IV.2.1 – Meio agar - LBA	43
IV.2.2 – Meio “Feed 1” – Extrato de levedura 20 %	43
IV.2.3 – Meio “Feed 2” – Glicose 70 %	44
IV.2.4 – Meio de cultura inicial para fermentadores (Meio Jung modificado)	44
IV.2.5 – Meio Jung modificado com 40,0 g/L de peptona de caseína	44
IV.2.6 – Solução anti-espuma 40 %	45
IV.2.7 – Solução NH <sub>4</sub> OH (5N)	45
IV.2.8 – Solução oligodinâmica	45
IV.2.9 – Solução Aminoácidos	45
IV.2.10 – Solução Tetraciclina	46
IV.2.11 – Meio de alimentação por gradiente diluído	46
IV.2.8 – Meio de alimentação por gradiente concentrado	46
IV.2.9 – Meio de alimentação do reciclo por pH-Stat	47
IV.3 – Equipamentos	48
IV.3.1 – Fermentadores	48
IV.3.2 – Sistemas de microfiltração tangencial	48
IV.4 – Métodos	49
IV.4.1 – Concentração celular	49
IV.4.2 – Estabilidade do Plasmídeo	49
IV.4.3 – Análise de componentes do meio de cultura	50
IV.4.3.1 – Concentração de glicose	50
IV.4.3.2 – Concentração de acetato	50
IV.4.4 – Medidas em-linha	50
IV.4.4.1 – Análise de pH	50
IV.4.4.2 – Análise de oxigênio dissolvido	50

IV.4.5 – Quantificação da proteína de fusão em géis SDS-PAGE	51
IV.4.6 – Quantificação da proteína total	51
IV.4.7– Determinação da concentração da proteína de fusão	52
IV.4.8 – Parâmetros cinéticos	52
IV.4.8.1 – Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ ) e velocidade de crescimento ( $dx/dt$ ) (g/L.h)	52
IV.4.8.2 – Produtividade celular	53
IV.4.8.3 – Fator de conversão	53
IV.4.8.4 – Balanço de volume da fermentação	54
IV.4.8.5 – Taxa específica de consumo de glicose	55
IV.5 – Metodologia de condução das fermentações	56
IV.5.1 – Preparo do inóculo	56
IV.5.2 – Condições de cultivo da fermentação	56
IV.5.2.1 – Limpeza do fermentador	56
IV.5.2.2– Preparo de eletrodo de medição do oxigênio dissolvido	56
IV.5.2.3 – Calibração do eletrodo de pH	57
IV.5.2.4 – Esterilização do fermentador e meio de fermentação	57
IV.5.2.5 – Preparo para início da fermentação	57
IV.5.2.6 – Inoculação	57
IV.5.2.7 – Acompanhamento da fermentação	57
IV.5.2.8 – Finalização da fermentação	58
V – Fermentação batelada-alimentada	59
V.1 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada	59
V.2 – Resultados	62
V.2.1 – Efeito da temperatura de crescimento	66
V.2.2 – Efeito das oscilações na concentração de glicose no meio de fermentação	76
V.2.3 – Efeito das oscilações na concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação	80
V.2.4 – Efeito do tipo do impelidor	83
V.2.5 – Efeito da pressão interna do fermentador	85

VI – Fermentação batelada-alimentada repetida	88
VI.1 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada repetida	88
VI.2 – Resultados	89
VI.2.1 – Efeito da fase de indução	91
VII – Fermentação batelada-alimentada cíclica	100
VII.1 – Fermentação em batelada-alimentada cíclica em dois estágios	100
VII.2 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada cíclica em dois estágios	101
VII.3 – Resultados	104
VIII – Fermentação com reciclo de células e microfiltração tangencial	111
VIII.1 – Resultados	111
VIII.1.1 – Estratégia de cultivo das fermentações com reciclo total de células e microfiltração tangencial – Experimentos preliminares	111
VIII.1.2 – Estratégia de cultivo das fermentações com reciclo total de células e microfiltração tangencial e alimentação por gradiente linear	114
VIII.1.3 – Estratégia de cultivo das fermentações com reciclo total de células e microfiltração tangencial e alimentação por pH-Stat	126
VIII.1.4 – Estratégia de cultivo das fermentações com reciclo total de células e microfiltração tangencial e alimentação por pH-Stat. Avaliação da fase de indução da proteína de fusão	129
VIII.1.5 – Análise do processo de microfiltração tangencial	136
IX – Discussão dos resultados	138
X - Conclusões	145
XI – Sugestões para trabalhos futuros	147
XII – Referências bibliográficas	148

## Índice de Figuras

Figura III.1 – Molécula de pró-insulina Humana .....	11
Figura III.2 – Gráfico de concentração celular e volume de cultura versus tempo para uma fermentação em batelada alimentada com cortes.....	28
Figura III.3 – Bioreator de membrana de diálise, proposto por Märkl et al (1990) para cultivo de células suspensas com agitadores.. ..	36
Figura III.4 – Diagrama esquemático de sistema de reciclo com microfiltração.....	37
Figura IV.1 – Mapa da construção do Plasmídeo Phis.....	42
Figura V.1 Esquema de montagem dos experimentos em batelada alimentada (Fermentações tradicional .....	61
Figura V.2 Curvas características de fermentações batelada alimentada. A – Concentração celular versus tempo. B – Volume da cultura versus tempo.....	61
Figura V.3 – (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se <i>E. coli</i> . (B) Peso seco (g/l) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h) (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).....	65
Figura V.4 – (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se <i>E. coli</i> . (B) Peso seco (g/l) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus EFT (h). .....	69
Figura V.5 – Fermentação com crescimento a 30 °C por 10 horas e indução a 36°C por 14 horas. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se <i>E. coli</i> . (B) Peso seco (g/l) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).....	72
Figura V.6 – Fermentação com crescimento a 30 °C por 2 horas e indução a 38 °C por 23 horas. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se <i>E. coli</i> . (B) Peso seco (g/l) e	

biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h)..... 74

Figura V.7 – Perfil de cultivo em batelada alimentada para altas densidades celulares de *E. coli* recombinante. Crescimento a 30 °C por 17 horas adicionando glicose por pulsos e indução térmica a 40 °C por 8 horas com adição de glicose limitante. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h)..... 77

Figura V.8 – Perfil de cultivo em batelada alimentada de *E. coli* recombinante. Crescimento a 30 °C por 12 horas e termo indução a 42 °C por 8 horas adicionando glicose por pulsos. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h)... .. 79

Figura V.9 – Cultivo batelada alimentada em alta densidade celular de *E. coli* recombinante com adição limitante de glicose e oscilações na concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h). ..... 81

Figura V.10 – Perfil de concentração de oxigênio dissolvido em cultivo batelada alimentada de *E. coli* recombinante, adição limitante de glicose. Fermentação B4005 ..... 82

Figura V.11 – Tipos de turbinas .....83

Figura V.12 – Efeito do enriquecimento do ar com oxigênio puro e P = 0,0 bar. Exp6 – V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 7 e 8 – V<sub>AR</sub> = 0,25 L/L/min e V<sub>O2</sub> = 0,25 L/L/min..... 85

Figura V.13 - Efeito do aumento da pressão em cúpula sobre a transferência de oxigênio. Exp10 P = 0,0 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 11 P = 0,2 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 12 P = 0,4 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min e Exp 13 – P = 0,8 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. ....86

Figura VI.1– (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo (h) em fermentação com cortes, apenas com adição de glicose 70% e 10,0 g/l de YE inicial. (sem indução). (B) Peso seco (g/l) versus tempo (h). ..... 90

Figura VI.2– Fermentação. com cortes sendo 7 horas de crescimento e 5 horas de indução. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Volume no fermentador (L) e expressão da proteína de fusão (%) versus tempo (h) e

(C) Peso seco (g/l) e biomassa formada (g) versus EFT (h).....96

Figura VI.3– Fermentação com cortes sendo 10 horas de crescimento e 7 horas de indução. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Volume no fermentador (L) e expressão da proteína de fusão (%) versus tempo (h), (C) Peso seco (g/l) e biomassa formada (g) versus tempo (h). e

(D) Estabilidade do plasmídeo (%) versus tempo (h).....99

Figura VII.1 – Estratégia utilizada para cultivo em fermentações batelada alimentada cíclicas com dois estágios ..... 103

Figura VII.2 – Cinéticas de crescimento celular (g/L), consumo de glicose (g/L) e formação de acetato (g/L) versus tempo (h) das fermentações batelada alimentada cíclicas em dois estágios F678 (A) e B3082 (B) .....105

Figura VII.3– Curvas de peso seco de células (g/L) e biomassa formada (g) versus tempo (h) das fermentações batelada alimentada cíclicas em dois estágios F678 (A) e B3082(B) .....106

Figura VII.4–Cinéticas de produção da pró insulina (g/L) e volume no fermentador (L) versus tempo (h) das fermentações batelada alimentada cíclicas em dois estágios F678 e B3082.....107

Figura VIII.1 – Fermentador com filtração tangencial e reciclo total de células .....112

Figura VIII.2 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração. Alimentação única com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 3,0 g/L, peptona de caseína 4,8 g/L, sais de fosfato,  $MgSO_4$  2,8 g/l e glicose 35,0 g/L. (A) Concentração de glicose (g/L), concentração de acetato (g/L) e peso seco de células (g/L) versus tempo de fermentação (h), (B) Peso seco (g/L) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h). .....112

Figura VIII.3 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração. Alimentação com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 12,0 g/L, peptona de caseína 12,0 g/L, sais de fosfato e magnésio e glicose 35,0 g/L. Feed2 – glicose 70% (glucose loop) (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) (com indução), (B) Peso seco (g/L) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h). ..... 113

Figura VIII.4 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a

sistema de microfiltração. Alimentação com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 12,0 g/L, peptona de caseína 12,0 g/L, ác. cítrico, sais de fosfato e magnésio e glicose 35,0 g/L. Feed2 – glicose 70% (glucose loop) (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) (com indução), (B) Peso seco (g/L) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h). .....113

Figura VIII.5 – Representação esquemática do sistema de alimentação por gradiente linear. ....115

Figura VIII.6 – Esquema do sistema de fermentação utilizado com microfiltração, reciclo total de células e alimentação de nutrientes por gradientes linear. ....118

Figura VIII.7 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de Leveduras = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de Leveduras = 39,5 g/L e glicose = 117,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h) e (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g). ..... 120

Figura VIII.8 — Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de Leveduras = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concertada: Extrato de Leveduras = 118,5 g/L e glicose = 117,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h) e (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g). .... 121

Figura VIII.9 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de levedura = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de levedura = 118.53 g/L e glicose = 118,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo (h)

em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose (g/L) no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h), (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g), (E) Peso seco (g/L) e expressão (%) e Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) .....122

Figura VIII.10 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de levedura = 15,4 g/L e glicose = 2,63 g/L.. Alimentação concentrada: Extrato de levedura = 120,0 g/L e glicose = 166,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/l) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/L) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h), (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g), (E) Peso seco (g/L) e expressão (%) e Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).....123

Figura VIII.11 Cinéticas de crescimento celular (g/L), de consumo de glicose (g/L), de formação de acetato (g/L) e concentração de glicose no filtrado versus tempo (h). Fermentação com solução de nutrientes composta por glicose 10% e extrato de levedura 12%. .....128

Figura VIII.12 Cinéticas de crescimento celular (g/L), de consumo de glicose (g/L), de formação de acetato (g/L) e concentração de glicose no filtrado versus tempo (h). Fermentação com solução de nutrientes composta por glicose 10% e extrato de levedura 12%.....129

Figura VIII.13 – (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se *E. coli*. (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Velocidade específica de crescimento versus tempo (h). (E) Fator de conversão  $Y_{X/S}$  (g células/g glicose). (F) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h) .....135

## Índice de Tabelas

Tabela III.1 – Métodos de adição de nutrientes para culturas em fermentações batelada-alimentada.....	24
Tabela IV.1 – Características da cepa N-4830-1.....	41
Tabela IV.2 – Características do plasmídeo pHis .....	43
Tabela IV.3 – Composição do meio LBA.....	43
Tabela IV.4 – Composição do meio Feed1.....	44
Tabela IV.5 – Composição do meio Feed2.....	44
Tabela IV.6 – Composição da solução oligodinâmica .....	45
Tabela IV.7 – Composição da solução de aminoácidos.....	46
Tabela IV.8 – Composição da solução de tetraciclina .....	46
Tabela V.1 – Média dos dados finais obtidos em fermentações batelada-alimentada tradicional.....	66
Tabela V.2 – Resultado médio do efeito da disposição das turbinas sobre o crescimento celular e a expressão da proteína de fusão.....	84
Tabela V.3 - Efeito da pressão em cúpula e aeração com e sem adição de oxigênio puro sobre o crescimento celular e a expressão da proteína de fusão.....	86
Tabela VI.1 – Vazões do meio de alimentação designado como “feed1” para os diferentes fermentadores.....	88
Tabela VI.2 - Dados experimentais da fermentação com cortes à 30°C.....	91
Tabela VI.3 - Resultados experimentais das fermentações com cortes parciais (1º corte).....	92
Tabela VI.4 - Resultados experimentais das fermentações com cortes parciais (2º corte).....	93
Tabela VI.5 - Resumo dos resultados experimentais das fermentações com cortes parciais.....	93
Tabela VII.1 – Vazões do meio de alimentação designado como “feed1” para os diferentes fermentadores.....	101
Tabela VII.2 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios.....	108

Tabela VII.3 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios.....	109
Tabela VII.4 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios.....	109
Tabela VII.5 – Produtividade volumétrica das fermentações batelada alimentada em dois estágio.....	110
Tabela VIII.1 – Condições das fermentações com reciclo total de células por filtração tangencial e alimentação por gradiente linear.....	119
Tabela VIII.2 – Dados finais para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por gradiente linear com taxas de diluição $D = 0,100 \text{ h}^{-1}$ . Análise do crescimento celular em diferentes composições do meio de alimentação.....	125
Tabela VIII.3 – Dados finais para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH stat. Análise do crescimento celular em diferentes composições do meio de alimentação.....	127
Tabela VIII.4 – Dados finais para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH stat. Análise do crescimento celular e expressão da proteína de fusão em diferentes composições do meio de alimentação.....	130
Tabela VIII.5 – Dados obtidos para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH stat. Análise das fases de crescimento celular e de indução da proteína de fusão.....	131
Tabela IX.1 – Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares.....	144
Tabela IX.2 – Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares. ....	144

## Nomenclatura

B: taxa de sangria

CFB: fermentação batelada-alimentada cíclica

D: taxa de diluição ( $\text{h}^{-1}$ )

F: taxa de alimentação ( $\text{Lh}^{-1}$ )

FB: fermentação batelada-alimentada

M: coeficiente de manutenção ( $\text{g}_{\text{subst}}/\text{g}_{\text{célula}}\text{h}^{-1}$ )

$M_s$ : taxa mássica de alimentação da fonte de carbono ( $\text{gh}^{-1}$ )

O.D.: densidade ótica (540 nm)

PF: concentração da proteína de fusão ( $\text{gL}^{-1}$ )

P.S.: peso seco de células ( $\text{gL}^{-1}$ )

PT: concentração de proteína de total ( $\text{gL}^{-1}$ )

$P_{\text{CFB}}$ : produtividade volumétrica para fermentação batelada-alimentada cíclica ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$P_{\text{FB}}$ : produtividade volumétrica para fermentações batelada-alimentada ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$P_{\text{R}}$ : produtividade volumétrica para fermentações com reciclo total de células e microfiltração ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$P_{\text{RFB}}$ : produtividade volumétrica para fermentações batelada-alimentada repetida ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$P_{\text{V}}$ : produtividade volumétrica ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ )

$q_s$ : taxa específica de consumo de substrato ( $\text{gh}^{-1}$ )

RFB: fermentação batelada-alimentada repetida

r-IH - Insulina humana recombinante

$S_0$ : concentração inicial do substrato ( $\text{gL}^{-1}$ )

$S_{\text{F}}$ : concentração da solução de alimentação ( $\text{gL}^{-1}$ )

t: tempo de cultura (h)

$t_p$ : tempo de preparo e esterilização do fermentador (h),

$t_f$ : tempo de cultura final em cada ciclo para fermentações batelada-alimentada repetida (h)

V: volume da cultura (L)

$V_f$ : volume final de cultura em cada ciclo para fermentações batelada-alimentada repetida (L)

$V_{in}$ : volume de meio de cultivo adicionado a cada ciclo para fermentações batelada-alimentada repetida (L)

$V_{out}$ : volume de cultura retirado em cada ciclo para fermentações batelada-alimentada repetida (L)

$V_r$ : volume de cultura no início dos ciclos para fermentações batelada-alimentada repetida (L)

X: Biomassa formada (g)

x: concentração celular ( $g_{célula}L^{-1}$ )

$x_t$ : concentração celular no tempo t (g/L)

$x_f$ : concentração celular final dos ciclos para fermentações batelada-alimentada repetida ( $gL^{-1}$ )

$x_r$ : concentração celular no início dos ciclos para fermentações batelada-alimentada repetida ( $gL^{-1}$ )

$Y_{X/S}$ : rendimento celular com base na fonte de carbono ( $g_{célula}/g_{subst}$ )

$Y_{X/S \text{ cresc}}$ : rendimento celular com base na fonte de carbono na fase de crescimento celular ( $g_{célula}/g_{subst}$ )

$Y_{X/S \text{ ind}}$ : rendimento celular com base na fonte de carbono na fase de indução da proteína de fusão ( $g_{célula}/g_{subst}$ )

$\mu$ : velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$\mu_{\text{cresc}}$ : velocidade específica de crescimento na fase de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

$\mu_{ind}$ : velocidade específica de crescimento na fase de indução da proteína de fusão( $h^{-1}$ ).

## **Subscrito**

b - batelada

c - concentrado

CFB - fermentação batelada-alimentada cíclica

crec – fase de crescimento

d - diluído

f - final

ind – fase de indução

r - reservatório

t - tempo

0 - inicial

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Os progressos recentes em engenharia genética e biotecnologia permitem a produção de proteínas recombinantes de alto valor agregado utilizando sistemas de expressão microbianos. No entanto, para produzir proteínas recombinantes satisfatoriamente é preciso estabelecer uma integração efetiva entre diversas linhas de conhecimento, entre elas a informação genética do microrganismo hospedeiro, fisiologia, características físico-químicas da proteína e dos ácidos nucléicos, da engenharia bioquímica entre outros (Georgiou e Valax, 1996).

Para um processo industrial recombinante, no qual o produto de interesse encontra-se na forma de corpos de inclusão, é preciso a obtenção de altas densidades celulares. Usualmente utilizam-se estratégias de alimentação de nutrientes para alcançar elevadas concentrações celulares em fermentações (Riesenberg e Guttke, 1999). A estratégia mais utilizada para alcançar altas densidades celulares é a utilização do processo fermentativo em batelada-alimentada.

Essa tese de doutoramento foi realizada nas dependências da BIOMM S/A, empresa de biotecnologia localizada em Montes Claros no estado de Minas Gerais, em parceria com o Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (DPB/FEQ/UNICAMP) e teve o objetivo de estudar e desenvolver um processo robusto para obtenção de elevadas densidades celulares em fermentações realizadas com *Escherichia coli* recombinante utilizando como modelo para proteína recombinante, a pró-insulina humana (r-IH). Atualmente, o processo para obtenção de proteínas recombinantes no centro de pesquisas da BIOMM S/A utiliza a técnica de fermentação batelada-alimentada ou "fed-batch fermentation".

Apesar da técnica de fermentação em batelada alimentada conduzir a um crescimento celular relativamente alto, situado entre 40-50 g/L. Este valor ainda

está aquém do crescimento máximo para culturas de *E. coli*, situado entre 180-190 g/l (Nakano et al., 1997; Riesenbergl e Guttke, 1999). A limitação no crescimento em fermentações batelada-alimentada pode ser resultado de diversos fatores, dentre eles: a construção do plasmídeo, a cepa hospedeira utilizada, o meio de cultivo e a proteína recombinante. Porém o principal fator limitante é creditado ao acúmulo de produtos metabólicos da fermentação que produzem efeitos inibitórios, especialmente, o acetato. Durante a fase de alimentação, um ou mais nutrientes são continuamente adicionados ao fermentador em quantidades limitantes para controlar as condições de cultivo, tais como acúmulo de componentes tóxicos, metabolismo celular e disponibilidade de oxigênio (Yamané e Shimizu, 1984). Como as taxas específicas de crescimento de culturas em batelada-alimentada são geralmente menores que a taxa específica de crescimento máxima do microrganismo em questão, a célula cultivada sob essas condições para alcançar altas densidades celulares tem um comportamento metabólico e fisiológico diferente daquele observado em culturas a baixas densidades celulares crescidas em frascos Erlenmeyer. Essa diferença certamente influencia na estabilidade do plasmídeo, na síntese da proteína recombinante, na estabilidade da proteína recombinante e, além disso, esse comportamento sugere que o processo pode ter uma maior influência na recuperação do produto.

Este estudo visa o desenvolvimento de um processo robusto que propicie maior produtividade para os processos fermentativos com *E. coli* recombinante, especificamente, para produção em escala de um modelo de proteína, a pró-insulina humana recombinante. Em bioprocessos utilizando microrganismos recombinantes, os objetivos, em geral, são: elevada estabilidade do plasmídeo, produtividade volumétrica aliada a baixos custos das matérias-primas utilizadas e eficientes processos de purificação. Para alcançar esses objetivos, diferentes métodos de cultivos foram realizados e serão apresentados nesta tese.

Os diferentes métodos de cultivo estudados para obtenção de elevadas densidades celulares e produção de pró-insulina humana foram:

- a) fermentação em batelada-alimentada,
- b) batelada-alimentada repetida com cortes ou cíclica em um estágio,

- c) fermentação batelada-alimentada cíclica em dois estágios e,
- d) fermentação com reciclo de células e microfiltração do meio de cultura.

Assim, concentrou-se o estudo em parâmetros específicos tais como crescimento celular, viabilidade, estabilidade do plasmídeo, formação do produto. No intuito de utilizar os processos estudados para a produção em escala, focou-se na questão do aumento de produtividade volumétrica para os diferentes métodos de cultivo.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVO

O advento da tecnologia recombinante confere a diversos microrganismos, inclusive a bactéria *Escherichia coli* a capacidade de produzir produtos de alto valor agregado, entre eles a insulina humana recombinante. Este alto potencial reside na capacidade de produzir proteínas recombinantes a partir de células reengenheiradas.

Produções em larga escala de produtos terapêuticos recombinantes necessitam de cultivo em altas densidades celulares para incrementar a biomassa microbiana obtida e a formação do produto em cultivos nos quais a proteína recombinante é formada em corpos de inclusão. O principal objetivo de fermentações seja industrial ou em fase de pesquisa e desenvolvimento é maximizar a produtividade volumétrica ( $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) para obter a maior quantidade possível de produto em um dado volume tendo um período de tempo pré-estabelecido. Sendo assim, altas densidades celulares tornam-se um pré-requisito para elevadas produtividades. Os objetivos do presente estudo visam o desenvolvimento de uma tecnologia de fermentação robusta que permita:

- a) Elevados níveis de biomassa em peso seco de células por litro;
- b) Determinar as condições nutricionais que permitem expressão da proteína de fusão da ordem de 20% ou mais em fermentações com alta concentração de biomassa;
- c) Redução do tempo de fermentação, mantendo níveis elevados de biomassa e expressão de modo tal a aumentar a produtividade do fermentador.
- d) Determinar a melhor estratégia de fermentação para atingir elevadas concentrações celulares, entre elas: fermentação batelada-alimentada,

fermentação batelada-alimentada com cortes, fermentações batelada-alimentada cíclicas e fermentações com reciclo e microfiltração.

Para alcançar estes objetivos uma série de problemas que podem ocorrer precisam ser estudados e solucionados:

- 1) Suprimento de quantitativos adequados de nutrientes a suspensões concentradas de biomassa;
- 2) Dificuldade em suprir oxigênio em quantidades adequadas a concentrações elevadas de biomassa;
- 3) Estudo da estabilidade do plasmídeo sob as condições de fermentação, antes e durante a indução;
- 4) Adesão das células à superfície das membranas, com conseqüente redução do fluxo de filtração e aumento da pressão;
- 5) Efeito do bombeamento sobre a integridade celular e o cisalhamento das células;
- 6) Limitações na concentração de oxigênio e manutenção da temperatura durante a fase de bombeamento;
- 7) Estudo da influência do fator de diluição sobre o crescimento celular;
- 8) Estudo sobre a composição da solução de alimentação antes e durante a indução com a finalidade de obter maior expressão da proteína recombinante;
- 9) Minimizar as perdas de nutrientes pela microfiltração;

## CAPÍTULO III

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### III.1 – Escherichia coli

Até meados dos anos setenta, a Escherichia coli não tinha grande importância industrial. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, essa perspectiva mudou, principalmente, porque grande parte desta tecnologia foi desenvolvida com estudos utilizando este microrganismo, seus fagos e plasmídeos.

A E. coli é o microrganismo mais bem estudado e explorado na atualidade. O profundo conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética. Genes estranhos ao seu genoma podem lhe ser introduzidos em plasmídeos e fagos ou até no seu próprio genoma com relativa facilidade e previsibilidade.

##### III.1.1 - Estabilidade do plasmídeo

A produtividade de um bioreator contendo cepas recombinantes é afetada pela taxa em que as células sem plasmídeo são geradas e propagadas. Este fenômeno foi observado por muitos pesquisadores e é responsável por dificuldades no escalonamento requerido para a comercialização de produtos recombinantes (Kumar et al, 1991).

A perda de plasmídeos por distribuição defeituosa dos mesmos entre células filhas durante a divisão celular é chamada de instabilidade segregativa.

Outra fonte de instabilidade é originada de mudanças estruturais como mutação pontual, deleção, inserção e arranjo do DNA do plasmídeo. Este tipo de instabilidade recebe o nome de instabilidade estrutural. As células resultantes, sem plasmídeo ou alteradas estruturalmente, são improdutivas (Summers, 1991) e contribuem para uma menor produtividade do processo.

No intuito de aumentar a estabilidade do plasmídeo, algumas estratégias são adotadas e podem ser chamadas de métodos seletivos. Estes métodos incluem a manutenção da pressão seletiva por incorporação de antibióticos no meio de cultura, complementação de auxotrofia no microorganismo hospedeiro, por incorporação de vetores plasmidiais de marcadores auxotróficos, repressão de fagos lisogênicos e incorporação de proteínas ou RNA suicidas.

Neste estudo a cepa utilizada é resistente a tetraciclina e auxotrófica para três aminoácidos, sendo eles, a histidina (His), a valina (Val) e a Isoleucina (Iso).

### III.1.2 – Principais aspectos para expressão de genes recombinantes em *E. coli*

A expressão de genes heterólogos é influenciada por diversos fatores dentre os quais destacam-se a estabilidade do plasmídeo, o número de cópias do plasmídeo, a força do promotor, a estabilidade do mRNA, a eficiência de transcrição e tradução, as modificações pós-traducionais, a estabilidade e a solubilidade da proteína recombinante, bem como a célula hospedeira e as condições de cultivo. (Sawers e Jarsch, 1996).

Processos recombinantes objetivando elevadas quantidades de proteína recombinante são baseados em sistemas de expressão fortes, os quais são regulados ao nível da transcrição e utilizam promotores de indução tais como  $P_{lac}$ ,  $\lambda P_L$  e  $\lambda P_R$  ou o promotor da T7 RNA polimerase (Swartz, 1996; Vicent et al., 1999). Alguns sistemas de produção de proteínas recombinantes utilizam a indução da proteína recombinante após uma fase de crescimento celular durante a qual a formação do produto é nula ou muito baixa (Lin, 2000). Depois de acionado o sinal

de indução, a taxa específica de produção alcança o seu valor máximo por um período curto de tempo e a síntese do produto continua por algumas horas. Isto é suficiente para que a proteína recombinante seja parte significativa da proteína celular. Essa elevada síntese da proteína heteróloga também afeta o metabolismo central, o que eventualmente pode resultar em um acúmulo de acetato (Shimizu et al., 1988; Seeger et al., 1995).

As condições ambientais para a cultura de microrganismos são um ponto importante para o sucesso de bioprocessos. A limitação de nutrientes gera stress nas bactérias, levando ao aumento de células desprovidas de plasmídeos. Vários relatos indicam que a limitação de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos podem ser prejudiciais à estabilidade do plasmídeo (Lima, 1993). A instabilidade em condições nutricionais limitantes pode ocasionar uma redução do número de cópias do plasmídeo, pois este é particularmente afetado pela limitação de fósforo e magnésio no meio de fermentação, enquanto que a limitação de glicose e amônia leva a um aumento no número de cópias do plasmídeo (Lima, 1993). Em geral, observa-se que a utilização de meio de cultura complexo, por exemplo, meio Jung, favorece a estabilização do número de cópias do plasmídeo.

O efeito da temperatura na produção de proteínas recombinantes necessita de maiores investigações, pois afeta a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo. O nível de oxigênio no meio tem igualmente grande efeito no metabolismo dos microrganismos. De um modo geral, a perda do plasmídeo aumenta com a diminuição da taxa de oxigenação. Um aumento na taxa de perda do plasmídeo pode ser a principal causa para a instabilidade (Kumar et al, 1991)

### III.1.3 - Formação de ácido acético em *E. coli*

A formação de ácido acético em fermentações de *Escherichia coli* tem sido estudada por diversos pesquisadores. Este ácido é produzido em culturas de células com altas densidades, inibe o crescimento celular e a síntese da proteína recombinante (Seeger et al., 1995; Shimizu et al., 1988). O acetato é produzido

quando a *E. coli* é crescida sob condições anaeróbicas ou em condições limitantes de oxigênio, porém cultivos de *E. coli* em presença de excesso de glicose, mesmo que em condições de aerobiose podem produzir acetato. (Luli e Strohl, 1990; Holms e el-Mansi, 1988; Klemann e Strohl, 1994).

O acetato é produzido quando o fluxo de carbono pelo caminho metabólico principal excede a demanda biosintética e a capacidade de geração de energia da célula (Holms, 1986; Holms e el-Mansi, 1988; Lee, 1996; Nakano et al., 1997). Concentrações de acetato acima de 5,0 g/L reduzem a taxa de crescimento, o rendimento em biomassa e a máxima concentração atingível em cultivos em altas densidades celulares (Luli e Strohl, 1990; Holms e el-Mansi, 1988). Além disso, o acetato tem efeito deletério maior em culturas recombinantes que em culturas não recombinantes (Koh et al., 1992) e a produção de proteínas recombinantes é significativamente reduzida pelo seu acúmulo (Shimizu et al., 1992; MacDonald e Neway, 1990)

A formação de acetato, bem como, sua atividade inibidora tem sido evitada com sucesso pelo controle da concentração da fonte de carbono no caldo fermentativo a níveis limitantes utilizando estratégias, tais como: a) alimentação exponencial de nutrientes (Yoon et al., 1994), b) controle da concentração de oxigênio dissolvido (Konstantinov et al., 1990), c) pelo monitoramento da concentração da fonte de carbono (Luli e Strohl, 1990; Shimizu et al., 1992; Turner et al., 1994) e do acetato (Shimizu et al., 1988). Sob limitação da fonte de carbono, não apenas a formação de acetato é suprimida como as células também assimilam o ácido acético e o convertem em massa celular, resultando em baixas concentrações (Shimizu et al., 1992, 1988; Turner et al., 1994).

### III.2 – Insulina Humana

A insulina humana é produzida nas células  $\beta$ -pancreáticas localizadas dentro do conjunto de células de 100 a 200  $\mu\text{m}$  conhecidos como Ilhotas de Langerhans. Estes conjuntos de células estão dispersos no interior do pâncreas de diversos vertebrados superiores, chegando à cerca de 15% da massa do órgão (Steiner et al., 1985). A insulina tem sido isolada de diferentes espécies de vertebrados, sendo que em todos eles, a molécula é formada de duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por pontes dissulfídricas.

Como muitos hormônios protéicos, a insulina humana, é sintetizada como uma proteína precursora maior que a proteoliticamente clivada para gerar o hormônio ativo. Deste modo, a insulina é produzida sob a forma de um único polipeptídeo, a pré-pró-insulina, com cadeia de 100 aminoácidos. Os vinte primeiros aminoácidos formam o peptídeo sinal ou seqüência pré da proteína e tem a função de facilitar a entrada da mesma no retículo endoplasmático rugoso. Durante este processo, o peptídeo sinal é separado da proteína, resultando na formação da pró-insulina (Figura III.1). A molécula resultante é a precursora da insulina, na qual as cadeias A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) estão ligada pelo peptídeo conectante C (35 aminoácidos). Esta adquire sua conformação com a formação de duas pontes dissulfídricas e é transportada para o aparelho de Golgi, onde vai ser empacotada em grânulos de estoque. Durante a formação e a maturação dos grânulos secretórios, a pró-insulina é clivada por enzimas proteolíticas do tipo da tripsina e da carboxipeptidase B, resultando na liberação do peptídeo C. As cadeias A e B, a partir deste momento, estão ligada entre si por pontes dissulfídricas, possuindo também uma outra ponte interna na cadeia A, formando a molécula de insulina.

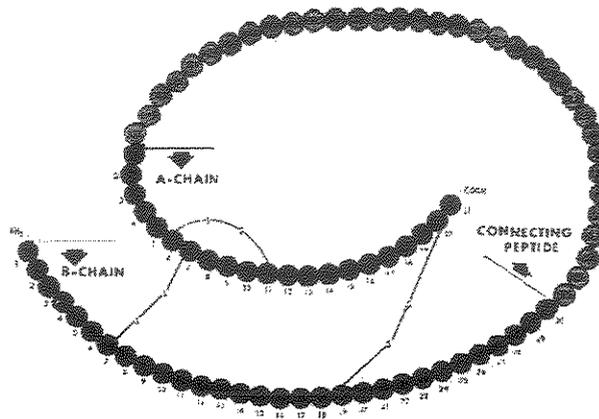


Figura III.1 – Molécula de pró-insulina Humana

### III.3 – Cultivo microbiano em altas densidades celulares

Cultivos microbianos em altas densidades são requeridos para incrementar as produções de biomassa e de formação do produto, ou seja, são alguns dos pré-requisitos para alta produtividade. Normalmente, altas concentrações celulares são obtidas em culturas submersas e as estratégias utilizadas incluem a utilização de cepas melhoradas, uso de diferentes configurações de bioreatores e a utilização de diferentes estratégias de cultivo. (Riesenberg e Guthke, 1999).

As primeiras culturas com elevada densidade foram estudadas para leveduras, cujo interesse variou entre produção de biomassa, produção de etanol e ou de proteínas de interesse. Com a descoberta e desenvolvimento da tecnologia para produção de antibióticos, diversas culturas de mesófilos foram desenvolvidas, como por exemplo, o desenvolvimento do cultivo de streptomycetes garantindo alta produtividade (Suzuki et al., 1987).

Os processos de cultivo em larga escala e o advento da tecnologia do DNA recombinante tomaram possível a produção de proteínas de alto valor agregado em diversos tipos de hospedeiros, destacando-se dentre eles a

Escherichia coli. Devido ao fato de sua fisiologia e sua genética molecular serem bem determinadas, a E coli tornou-se a pioneira em cultivos a elevadas concentrações celulares. Diversas revisões, tais como Riesenbergl et al. (1991), Klemann e Stroh (1994) e Lee (1996) são encontradas na literatura que sintetizam os recentes avanços em áreas que englobam desde estratégias moleculares em conjunto com tecnologia de fermentação para obtenção de altas concentrações de biomassa.

Krahe et al. (1996) e Holst et al. (1997) demonstraram que é possível trabalhar com microorganismos extremófilos em altas concentrações celulares, aumentando as possibilidades de pesquisas e produção de novos fármacos. A utilização destes microorganismos extremófilos com elevado potencial biotecnológico requer bastante pesquisa básica para isolamento e cultivo no intuito de obter altas concentrações de biomassa ou novos produtos.

Em termos de configuração, os tipos de bioreatores usualmente empregados neste tipo de cultivo incluem os tradicionais reatores de tanque agitados (STR) com instrumentação e sistema de alimentação de nutrientes usuais, reatores STR com retenção de células interna ou externamente, reatores de membrana de diálise, reatores gas-lift, entre outros.

Os reatores de tanque agitados são os mais amplamente utilizados, além de serem mecanicamente conhecidos e bem definidos. Por esses motivos são utilizados para fermentações robustas em larga-escala, nas quais os subprodutos normalmente se acumulam em níveis inibitórios.

O cultivo de Escherichia coli é o sistema procariótico largamente utilizado para síntese de proteínas heterólogas. Uma vez que o sistema de expressão esteja construído, a produção de proteínas recombinantes pode ser melhorada pelo aumento da quantidade de proteína por célula por unidade de tempo (produtividade específica) ou pelo aumento da concentração celular por unidade de tempo (produtividade celular), sendo que a primeira é muito difícil de variar, pois depende das características genéticas da cepa hospedeira e dos plasmídeos nela inseridos. As proteínas recombinantes têm sido importantes na produção de

compostos farmacêuticos, além disso, esse mercado tem crescido entre 5 e 15 % ao ano (Lee, 1996).

Fermentações contínuas, batelada e batelada-alimentada são os principais modos para o cultivo de células microbianas com altas densidades. A produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico nas quais as regras de boas práticas de fabricação requerem alta qualidade de produto final e reprodutibilidade de processamento, tem utilizado largamente fermentações em batelada alimentada no intuito de atingir alta densidade celular (HCDC – High Cell Density Culture) aumentando a produtividade do sistema levando a baixos investimentos e custos de produção. Geralmente, fermentações em batelada alimentada alcançam concentrações superiores a 50,0 g/L de peso seco de células (Yee e Blanch (1992) e Riesenberg et al. (1991)).

#### III.4 – Fermentação Batelada-alimentada

Técnicas para o cultivo de *Escherichia coli* a altas densidades celulares tem sido desenvolvidas para aumentar a produtividade e, também, para promover vantagens no processo tais como:

- reduzir o volume da cultura,
- melhorar o processo de recuperação das proteínas,
- reduzir o consumo de água,
- reduzir o consumo de matéria-prima,
- reduzir os custos de produção e
- reduzir os investimentos em equipamentos.

O processo fermentativo em batelada alimentada é definido como uma técnica na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação.

Os processos em batelada alimentada são os mais utilizados para

obtenção de altas densidades celulares. Essas culturas utilizam inóculos obtidos com elevadas taxas específicas de crescimento que são sustentadas por nutrientes que podem estar presentes no fermentador. Vários regimes de alimentação de nutrientes podem ser utilizados até que a fermentação se complete. Concentrações celulares entre 45,0 e 55,0 g/L (peso seco) podem ser rotineiramente obtidas em fermentações batelada alimentada tanto para *E. coli* recombinantes quanto não recombinantes, Yee e Blanch (1992) e Riesenberg et al. (1991).

O desenvolvimento de processos fermentativos em batelada alimentada tem liderado o aumento da produtividade de várias proteínas e produtos não protéicos tais como aminoácidos e poli(3-hidroxi-butirato), Lee e Chang (1995). Contudo, esta técnica apresenta diversas limitações incluindo:

- a) limitação pela capacidade de transferência de oxigênio,
- b) formação de produtos metabólicos secundários inibitórios e
- c) dissipação limitada do calor gerado.

A inibição do crescimento celular pode ocorrer quando algumas substâncias, incluindo fontes de carbono e nitrogênio, encontram-se acima de certos valores, explicando porque o simples aumento da concentração dos nutrientes nos meios de cultura em batelada não significa aumento no rendimento para altas concentrações celulares. Riesenberg (1991) apresentou concentrações inibitórias para o crescimento celular de *Escherichia coli* de diferentes nutrientes, entre eles, glicose (50,0 g/L), amônia (3,0 g/L), ferro (1,15 g/L), magnésio (8,7 g/L), fósforo (10,0 g/L) e zinco (0,04 g/L). No intuito de evitar a ação inibitória do excesso de nutrientes, as culturas em batelada alimentada iniciam com concentrações bem abaixo dos valores inibitórios e a adição de nutrientes é realizada na medida que for necessária para a manutenção ou aumento das taxas de crescimento.

### III.4.1 – Desenvolvimento de meios de cultura para fermentação em batelada alimentada

Existem três tipos de meio de cultura: definidos, complexos e semi-definidos. Os meios de culturas definidos geralmente são os mais utilizados em fermentação batelada-alimentada, pois os nutrientes são conhecidos e podem ser controlados durante o cultivo, além disso, facilitam o processo de recuperação de proteínas recombinantes (downstream). Contudo este tipo de meio só pode ser utilizado em culturas de células prototróficas. Para o crescimento celular alcançar altas densidades, é necessário desenvolver um meio de cultura balanceado que contenha todos nutrientes necessários para suportar a concentração celular desejada, evitando inibições por altas concentrações de algum nutriente, ou o inverso, a falta de crescimento devido à ausência de algum elemento essencial ao metabolismo celular. Também é desejável que a solução de alimentação que será adicionada ao meio de cultura inicial seja a mais simples possível. Hidróxido de amônio é freqüentemente utilizado como fonte de nitrogênio em fermentações batelada alimentada porque pode ser utilizado também para o controle de pH do cultivo. Para desenvolver este tipo de meio a abordagem geralmente utilizada é a consideração da composição mássica das células e dos coeficientes de rendimento de cada componente do meio. Riesenberg et al (1991) desenvolveu um meio de cultura definido, no qual a glicose, a amônia e o magnésio são meio inicial em separado, e o utilizou para cultivos em batelada alimentada que alcançaram 110 g/L células de *E. coli* TG1.

Em meios de cultura semi-definidos e complexos, nos quais encontram-se nutrientes como extrato de levedura e peptonas, a composição pode variar em quantidade e qualidade dificultando a reprodutibilidade das fermentações. Porém, em algumas culturas é necessário à utilização de meios complexos para estimular a formação do produto e/ou o crescimento celular, principalmente se as cepas utilizadas forem auxotróficas. O desenvolvimento de meios complexos ou semi-definidos são realizados de maneira empírica e/ou com planejamento experimental entre algumas substâncias contidas no meio de fermentação. A otimização de

qualquer meio de fermentação é um trabalho intensivo, demandando uma série de combinações de nutrientes que devem ser testadas.

#### III.4.2 – Concentração celular máxima para cultivo de *Escherichia coli*

Diversos cálculos foram realizados para estimar a concentração celular máxima obtida em fermentador para culturas de *Escherichia coli*. Märkl et al (1993) calculou que em cultura bem compactadas com células de 3,0 µm de comprimento e 1,0 µm de diâmetro, apenas 25 % da cultura poderia ser meio de cultura. Considerando que o peso seco de células está entre 20 e 25 % do peso úmido e que a densidade do caldo fermentativo é próxima a da água, segundo ele, a máxima concentração de células para culturas de *E. coli* está entre 160,0 e 200,0 g/L de peso seco de células.

A concentração máxima de células parece razoável quando os maiores valores encontrados para cultura de *E. coli* encontram-se em 180,0 g/L de peso seco para cultura cepa *E. coli* K12 em reator com diálise utilizando como glicose como fonte de carbono e 190,0 g/L utilizando glicerol como fonte de carbono (Nakano et al., 1997), 174,0 g/L para cultivo de *E. coli* W3110 em reator com diálise (Märkl, 1993) e 175,4 g/L de peso seco de células para *E. coli* recombinante produzindo poli(3-hidroxi-butirato) ( Lee et al., 1994). A viscosidade do meio aumenta rapidamente quando a concentração celular excede 200,0 g/L e o caldo celular diminui bastante sua fluidez em valores acima de 220,0 g/L (Mori et al, 1979), corroborando a teoria que o concentração celular máxima atinge valores de 200,0 g/L.

### III.4.3 – Principais problemas para o cultivo em batelada alimentada de Escherichia coli

Alguns parâmetros são importantes para o bom andamento de um cultivo a altas densidades celulares, entre eles temperatura de cultivo, taxa específica de crescimento celular e demanda de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. A seguir, os principais parâmetros serão abordados, e os problemas e soluções relacionados a eles serão comentados.

Diversos produtos metabólicos secundários são formados durante um cultivo de Escherichia coli, alguns deles tem efeitos tóxicos expressivos quando atingem determinadas concentrações no meio de cultura. O acetato é o metabólito que apresenta um dos maiores efeitos tóxicos e é produzido quando a E. coli é crescida em condições anaeróbicas ou em condições limitantes de oxigênio, e em condições aeróbicas desde que na presença de excesso de glicose. O acetato é produzido quando o fluxo de carbono para o caminho metabólico central excede a demanda biossintética e a capacidade de geração de energia da célula, saturando o ciclo tricarboxílico e/ou a cadeia de transporte de elétrons (Lee, 1996).

Diversos autores, entre eles Luli e Strohl (1990), Holms et al. (1988), Klemann e Strohl (1994), Carlsen et al (1990), Han et al. (1991), reportaram que altas concentrações de acetato, isto é, valores acima de 5,0 g/L reduzem o crescimento celular, o rendimento em biomassa e a máxima concentração celular atingível em culturas com altas densidades celulares. Além disso, foi demonstrado que o acetato tem efeito deletério maior em culturas de E. coli recombinantes que em culturas não-recombinantes e que a produção de produtos recombinantes é significativamente afetada pelo acúmulo de acetato. Mesmo assim, o mecanismo exato deste efeito prejudicial não foi elucidado, é possível que o acetato reprima a síntese do DNA, do RNA, de proteínas ou lipídeos (Lee, 1996).

O efeito prejudicial do acetato é exacerbado pelo acúmulo de sais resultantes da adição de ácido e bases utilizados para o controle do pH. Em geral, a formação de acetato depende do meio de cultura utilizado e da taxa específica

de crescimento. Exemplificando, em meios complexos e semi-definidos, o acetato é formado quando a taxa específica de crescimento excede  $0,20 \text{ h}^{-1}$ . (Paalme et al., 1990; Klemann e Strohl, 1994; Meyer e Fieschter, 1985). Já em meio definido, o acetato é formado quando a taxa específica de crescimento excede  $0,14 \text{ h}^{-1}$  (Fieschko e Ritsch, 1986). Porém, a taxa específica de crescimento crítica para a formação de acetato varia com o tipo de meio de cultura utilizado e com as diferentes cepas e plasmídeos para um sistema de produção heterólogo.

Em culturas para obtenção de altas densidades celular, tais como a batelada-alimentada, a produção de acetato é maior que em processos em batelada devido ao maior tempo de cultivo (Lee, 1996). Diversas estratégias para minimizar a formação de acetato em culturas em batelada-alimentada pelo controle da taxa específica de crescimento da cultura foram desenvolvidas. A maneira mais eficiente de controlar a taxa específica de crescimento é limitar os nutrientes necessários ao crescimento celular, seja a fonte de carbono ou nitrogênio (Riesenberg et al., 1991; Paalme et al., 1990; Yoon et al., 1994; Klemann e Strohl, 1994)

Em uma abordagem diferente, a concentração de acetato pode ser reduzida pela remoção do meio de cultura "in situ" utilizando diálise, microfiltração (Landwall e Holme, 1977) e/ou reciclo de células para o fermentador (Lee e Chang, 1989). Essa abordagem que tem processos mais difíceis de operar e escalonar, será melhor detalhada nos próximos capítulos desta tese.

Alterações na composição do meio de cultura, principalmente na fonte de carbono utilizada para o cultivo celular podem influenciar na minimização da formação de acetato. Holms (1986) e Korz et al (1995) substituíram a glicose por glicerol, como fonte de carbono, e obtiveram como resultado concentrações celulares finais elevadas e redução na taxa de formação de acetato. Este comportamento pode ser explicado pela menor taxa de transporte do glicerol para o interior da célula, se comparada à glicose, reduzindo o fluxo de carbono para a glicólise, o que resulta em menor taxa de formação deste metabólito (Holms, 1986; Korz et al., 1995)). Contudo esta fonte de carbono não é largamente utilizada para o cultivo de *E. coli* devido ao seu custo.

Alguns autores, entre eles, Han et al (1993), descreveram que a adição de determinados aminoácidos, como glicina e metionina, pode aliviar os efeitos prejudiciais do acetato e melhorar a expressão de proteínas recombinantes.

Outra importante variável que pode ser utilizada para o controle do metabolismo celular é a temperatura de cultivo. A temperatura ideal para o cultivo da *Escherichia coli* é 37 °C, com a diminuição deste valor para 30 °C, reduz-se a capacidade de consumo de nutrientes, bem como a taxa específica de crescimento, minimizando os efeitos tóxicos dos produtos metabólicos secundários, a geração de calor pelo metabolismo e a demanda de oxigênio. Este último aspecto pode permitir a obtenção de elevadas densidades celulares reduzindo a necessidade de enriquecer o ar com oxigênio puro.

Além disso, diversos processos de obtenção de proteínas recombinantes utilizam promotores ativados pela temperatura, ao operar-se o cultivo a baixas temperaturas evita-se a formação de corpos de inclusão antes de obter-se a concentração celular desejada. Frente a essas vantagens muitos autores foram persuadidos a realizar suas fermentações com batelada-alimentada a temperaturas mais baixas que a temperatura ótima de crescimento *E. coli* (MacDonald e Neway, 1990; Riesenber et al., 1991; Lee e Chang, 1989; Korz et al., 1995)

A oxigenação no meio de cultura torna-se limitante em culturas com altas densidades celulares devido, principalmente, a baixa solubilidade do oxigênio em água e a elevada concentração celular que exige alta demanda de oxigênio. A solubilidade do oxigênio em água a 25 °C e 1 atm é aproximadamente 8,0 mg/L, mas o suprimento de oxigênio pode ser incrementado com o aumento do fluxo de ar ou com o aumento da velocidade de agitação. Em cultivos com alta densidade celular é comum a utilização do enriquecimento do ar com oxigênio puro para prevenir limitações pelo oxigênio dissolvido no meio. Porém, essa estratégia traz algumas desvantagens, entre elas, o aumento significativo no custo de produção, pois exige-se um sofisticado sistema de segurança. Alguns pesquisadores realizaram cultivos sob condições pressurizadas no intuito de aumentar a solubilidade do oxigênio no meio de cultura (Matsui et al, 1989 e Strandberg e

Enfors, 1991), porém à pressões parciais acima de 0,4 atm, o gás carbônico expelido pela fermentação pode ser solubilizado e aumentar a concentração de ácido acético no meio causando efeitos deletérios à cultura.

Como a demanda de oxigênio, o consumo de nutrientes, a capacidade de produção da proteína recombinante pelo microrganismo depende da taxa de crescimento, as estratégias apresentadas acima devem ser combinadas para a obtenção de altas concentrações celulares em diferentes processos, principalmente, em cultivos realizados com batelada-alimentada. Deve-se salientar que o desenvolvimento do processo batelada-alimentada é normalmente realizado de forma empírica e é resultado da combinação de diferentes estratégias de controle das variáveis operacionais da fermentação. Em escala industrial, essas informações quase sempre são determinantes da viabilidade da produção e constituem segredo industrial e dificilmente são divulgadas.

A geração de calor metabólico em fermentações em batelada-alimentada ou cultivos com elevadas concentrações celulares pode ser um problema, especialmente para cultivos em larga escala, nos quais ocorre uma redução da relação entre a superfície da jaqueta de resfriamento e o volume do fermentador. As maiores fontes de calor são a agitação mecânica e o calor metabólico das células e esses problemas podem ser parcialmente resolvidos reduzindo a taxa de crescimento específica.

#### III.4.4 – Estratégias para cultivo de *Escherichia coli* em fermentações batelada-alimentada

O método para adição de nutrientes é um fator crítico para o sucesso de fermentações batelada-alimentada para cultivo de altas densidades celulares, pois afeta a concentração máxima de células atingível, a produtividade celular e a formação do produto (Jung et al., 1988). Normalmente as fermentações batelada-alimentada são conduzidas limitando-se uma das fontes de nutrientes, principalmente a de carbono.

Diversas estratégias de alimentação para fermentações batelada-alimentada podem ser utilizadas para alcançar elevadas concentrações celulares, entre elas:

- i) taxa de alimentação constante de nutrientes (Märkl et al., 1993; Jung et al., 1988);
- ii) taxa de alimentação de nutrientes incrementada gradualmente (Konstantinov et al, 1991; Paalme et al, 1990;
- iii) taxa de alimentação de nutrientes exponencial (Yoon et al., 1994; Jung et al., 1988; Yee e Blanch, 1993).

Na alimentação de nutrientes com taxa constante, a solução de nutrientes concentrada é adicionada ao fermentador a uma taxa pré-determinada. Neste tipo de estratégia, a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) decresce continuamente devido tanto ao aumento de volume da cultura e da concentração celular no fermentador. Observa-se também que o incremento da concentração celular diminui com o decorrer do tempo (Lee, 1996).

Estratégias que utilizam o incremento gradual da taxa de alimentação de nutrientes podem atingir maiores concentrações celulares que aquelas obtidas com taxas constantes, devido ao suprimento de maiores quantidades de nutrientes para concentrações celulares maiores. A cultura pode crescer exponencialmente durante todo o período de cultivo se a taxa de alimentação do substrato limitante é

adicionada em proporção ao crescimento celular (Lee, 1996).

O aumento da taxa de alimentação de nutrientes de forma exponencial foi desenvolvido de forma a manter a taxa específica de crescimento constante. Este tipo de estratégia também tem a vantagem de minimizar a formação de acetato controlando a taxa de crescimento específica abaixo de valores que propiciem a formação do acetato.

A taxa de alimentação que permite o crescimento celular com taxa específica de crescimento constante pode ser calculada usando as equações apresentadas abaixo, que são derivadas de um simples balanço de massa assumindo um rendimento constante de células com base no substrato (Lee, 1996).

$$M_s(t) = F S_F - \rho V(t) \quad (III.1)$$

$$= \left( \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) x(t) V(t) \quad (III.2)$$

$$= \left( \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) x(t_0) V(t_0) \exp[\mu(t - t_0)] \quad (III.3)$$

- Sendo:
- $M_s$  - taxa mássica de alimentação da fonte de carbono ( $gh^{-1}$ ),
  - $F$  - taxa de alimentação ( $Lh^{-1}$ ),
  - $S_F$  - concentração da solução de alimentação ( $gL^{-1}$ ),
  - $Y_{x/s}$  - rendimento celular com base na fonte de carbono ( $g_{célula}/g_{subst}$ ),
  - $\mu$  - taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ ),
  - $m$  - coeficiente de manutenção ( $g_{subst}/g_{célula}h^{-1}$ )
  - $x$  - concentração celular ( $g_{célula}L^{-1}$ )
  - $V$  - volume da cultura (L),

t – tempo de cultura (h)

Alimentação exponencial de nutrientes é um método simples, mas bastante eficaz para o alcance de elevadas densidades celulares em cultura de cepas de *E. coli* recombinantes ou não-recombinantes, pois a taxa específica de crescimento é mantida em valores entre 0,10 e 0,30 h<sup>-1</sup>, suficiente para evitar a formação de acetato. Korz et al (1995) atingiu concentrações celulares de 128,0 g/L e 148,0 g/L de peso seco, utilizando alimentação exponencial de glicose e glicerol como substratos respectivamente.

Estratégias mais sofisticadas para alimentação de nutrientes foram desenvolvidas utilizando esquemas de controle indiretos acoplados a monitoramento de vários parâmetros físicos das fermentações, tais como pH (Lee e Chang, 1993; Lee et al., 1994; Mizutani et al., 1986), oxigênio dissolvido (Mori et al., 1979) e evolução da taxa de emissão de CO<sub>2</sub> (Paalme et al, 1990).

O método DO-stat é baseado na medida do oxigênio dissolvido no meio de fermentação. É sabido que, na ausência de substrato no meio de cultura há um rápido aumento no valor na concentração do oxigênio dissolvido, essa medida acionará automaticamente a adição de nutrientes, mantendo a concentração do substrato limitante, ou seja, quando o DO aumenta acima de um valor pré-determinado. Esse método DO-stat balanceado garante que o suprimento de oxigênio e substrato, prevenindo excesso de nutriente no meio de cultura, controle a taxa específica de crescimento e, por consequência, evite a formação de produtos metabólicos. Porém, este é um método utilizado principalmente em fermentações cujo meio de cultura seja definido. A mudança na concentração de oxigênio dissolvido (DO) é menor em fermentações utilizando meios de cultura complexo ou semi-definido. Os meios de cultura complexos e semi-definidos contêm substratos complexos de carbono e nitrogênio que serão metabolizados conjuntamente com o substrato limitante. Isto é, as células metabolizarão os substratos complexos na ausência do carboidrato limitante, reduzindo o efeito na concentração de oxigênio dissolvido.

A segunda alternativa utilizando esquema de controle indireto, o pH-stat, é

baseada na observação de que o pH da cultura sofre mudanças no momento em que a principal fonte de carbono esgota-se. Quando a fonte de carbono é exaurida, o pH tende a aumentar devido, principalmente, a liberação de íons amônia pelas células, como resultado do metabolismo dos compostos complexos no meio. Sendo assim, este tipo de controle deve ser utilizado em fermentações em que o meio de cultura utilizado seja semi-definido ou complexo.

Os cultivos de *E. coli* produzem CO<sub>2</sub> durante o crescimento e a taxa de evolução de CO<sub>2</sub> é proporcional à taxa de consumo do substrato. Analogamente ao DO-stat e ao pH-stat, a taxa de evolução de CO<sub>2</sub> pode ser calculado pela concentração de CO<sub>2</sub> no gás de saída do fermentador e utilizado para o controle da adição de nutrientes.

Mais recentemente, alguns pesquisadores têm utilizado métodos diretos para o controle da adição de nutrientes que consistem em sensores on-line para medidas de concentração do substrato limitante que é ajustado a um valor pré-determinado. Essa estratégia tem permitido o controle mais apurado da taxa específica de crescimento.

A seguir, na Tabela III.1, encontra-se os principais sistemas de alimentação de nutrientes utilizados para fermentações batelada-alimentada para o cultivo de *E. coli*.

Tabela III.1 – Métodos de adição de nutrientes para culturas em fermentações batelada-alimentada.

Principais métodos de alimentação de nutrientes para cultivos em batelada alimentada
<p>Sem “Feed back control”</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Alimentação constante</b> – alimentação de nutrientes a uma taxa constante pré-determinada. A taxa específica de crescimento diminui continuamente.</li><li>• <b>Alimentação incrementada</b> – a taxa de alimentação de nutrientes sofre um incremento (gradual, linear ou em pulsos). A diminuição da taxa específica de crescimento pode ser compensada.</li><li>• <b>Alimentação exponencial</b> – a alimentação de nutrientes sofre um aumento exponencial. Pode-se alcançar taxas específicas de crescimento constantes.</li></ul>
<p>Com “Feed back control”</p> <p><b>Controle indireto</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>D<sub>O</sub> Stat</b> – a adição de nutrientes ocorre quando a concentração de oxigênio dissolvido no meio da fermentação aumenta, resultado do esgotamento do substrato.</li><li>• <b>pH Stat</b> – a adição de nutrientes ocorre quando o pH aumenta como resultado do esgotamento do substrato.</li><li>• <b>Evolução da taxa de dióxido de carbono (CER)</b> – é estimada com o uso de analisadores infravermelhos ou espectrômetro de massa on-line, e é utilizado para o controle da adição de nutrientes. O CER é proporcional a taxa de consumo da fonte de carbono. Este método é freqüentemente utilizado para controlar a taxa específica de crescimento.</li><li>• <b>Concentração de células</b> – a taxa de alimentação de nutrientes é determinada pela concentração celular, a qual é medida usando um turbidímetro laser on-line.</li></ul> <p><b>Controle direto</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Controle da concentração de substrato</b> – a alimentação de nutrientes é controlada pela concentração da principal fonte de carbono (p.ex. analisador de glicose on-line para controlar a concentração de glicose no fermentador).</li></ul>

### III.5 – Fermentação batelada-alimentada repetida

Diversas técnicas para o cultivo de microorganismos a altas densidades celulares têm sido desenvolvidas para aumentar a produtividade volumétrica, dentre elas destaca-se o cultivo em batelada-alimentada. No intuito de melhorar este desempenho, principalmente otimizando o tempo gasto no preparo e esterilização do fermentador, propõe-se a utilização de fermentações batelada-alimentada repetida, também conhecida como batelada-alimentada cíclica em 1 estágio. A produtividade pode ser aumentada em relação ao tempo efetivo de funcionamento do equipamento, reduzindo os custos de operação, o consumo de água, vapor e outras utilidades.

As fermentações em batelada-alimentada repetida ou, como também são conhecidas, as fermentações batelada-alimentada com cortes ou batelada-alimentada cíclica com um estágio, foram propostas pela primeira vez por Pirt (1975) como um sistema de cultura intermediário entre as culturas contínuas e as culturas em batelada alimentada.

Neste estudo, fermentações batelada-alimentada repetida são assumidas com tendo características similares às fermentações batelada-alimentada apresentadas no capítulo V desta tese. Porém, nas fermentações batelada-alimentada repetida uma parte do conteúdo do reator é retirada periodicamente e o restante da cultura é utilizado como ponto de partida para um próximo cultivo em batelada-alimentada. Essa metodologia garante uma série de benefícios para o início de cada fermentação, entre os quais, o aumento na razão volume do inóculo por volume de cultura, ou seja, a concentração celular do inóculo será maior que aquelas obtidas em inóculos crescidos em agitadores orbitais. Outra vantagem é a garantia de que as células estejam em condições ótimas de cultivo, pois parâmetros como pH, temperatura de cultivo, concentrações de substrato e de oxigênio dissolvido no meio são controladas.

Tipicamente um processo em batelada-alimentada repetida consiste em três estágios:

- i) preenchimento do fermentador com meio de cultura,
- ii) cultivo em batelada-alimentada e
- iii) coleta do meio de cultura.

Esses ciclos descritos acima são repetidos periodicamente. Idealmente, depois que uma operação constante é alcançada, as concentrações celulares e de substrato serão iguais no início de cada ciclo (Estado estacionário).

No final da primeira fase da fermentação em batelada alimentada parte do caldo de cultura é retirado assepticamente do fermentador ( $V_{out}$ ). Então, o meio de cultura esterilizado contendo concentração de nutrientes iguais a utilizada no primeiro ciclo da fermentação é adicionada assepticamente ( $V_{in}$ ). O segundo ciclo da fermentação em batelada alimentada repetida é iniciado com o resíduo celular do fermentador funcionando como inóculo, que pode ser determinado por  $X_f$  ( $V_f - V_{out}$ ).

Na segunda cultura, assume-se que o volume da cultura ( $V$ ) e a concentração celular ( $X$ ) aumentarão até o valor  $V_f$  e  $X_f$ , respectivamente, durante o tempo de fermentação  $t_f$ . Depois deste período, nova retirada do caldo de cultura e adição de novo meio de fermentação estéreis serão feitas. Esta mesma operação pode ser repetida  $n$  vezes, dependendo apenas da estabilidade do clone. Os valores de  $X$  e  $V$  para cada cultivo em batelada alimentada devem ser similares ao da primeira cultura.

Para começar a fermentação subsequente em batelada alimentada, os valores de  $V_f$ ,  $X_f$ ,  $V_{out}$  e  $V_{in}$  devem ser estimados e podem ser obtidos do balanços de massa e de volume, como indicado a seguir:

Balanço de volume:

$$V_f = V_f - V_{OUT} + V_{IN} \quad (III.4)$$

Balço de massa:

$$X_r V_r = X_f V_f - X_f V_{OUT} \quad (III.5)$$

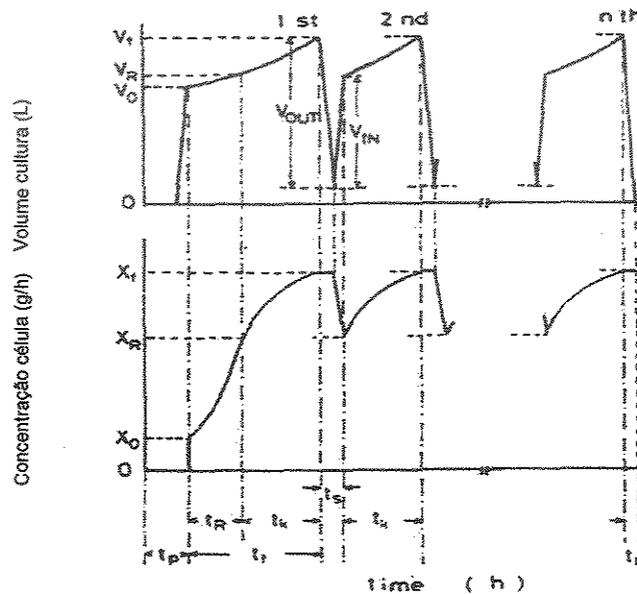


Figura III.2 – Gráfico de concentração celular e volume de cultura versus tempo para uma fermentação em batelada alimentada com cortes.

A produtividade volumétrica da fermentação será calculada pela equação abaixo:

$$P_{VOLCORTES} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{fi} \times V_{OUTi}) + x_{fn} \times V_{fn}}{t_f + t_r + \sum_{i=1}^n (t_{ki} + t_{ni})} \quad (III.6)$$

Para avaliar a possibilidade, vantagens e economicidade de utilizar a

técnica da fermentação com cortes no processo fermentativo de produção da pró-insulina humana recombinante, uma série de ensaios foram realizados e serão apresentados no capítulo VI.

### III.6 - Fermentação batelada-alimentada cíclica

Os processos fermentativos batelada-alimentada repetida, ou batelada-alimentada cíclica de um estágio, ou ainda batelada-alimentada com cortes, apresentam um pequeno incremento na produtividade volumétrica do processo quando comparada as fermentações batelada-alimentada. A queda na estabilidade do plasmídeo após a indução térmica reduz a eficiência do processo, pois apresenta instabilidade na recuperação da capacidade fisiológica da célula hospedeira dificultando a reprodutibilidade dos ciclos. Diversos autores, entre eles Jung et al (2000), Bentley et al (1990), Kim e Shuler (1990) e Weber e San (1990) reportaram queda na estabilidade do plasmídeo após a fase de indução.

A instabilidade genética de microorganismos recombinantes é um dos principais problemas para o aumento de escala dos processos fermentativos, já que usualmente as cepas recombinantes são mais instáveis quando em condições de expressão que em condições de repressão. Quando os genes clonados são expressos e altas quantidades são acumuladas no interior das células, a taxa de crescimento das células portadoras de plasmídeo decresce e facilmente as células não produtivas tornam-se predominantes.

Um expressivo número de pesquisadores têm demonstrado que a separação entre as fases de crescimento celular da célula hospedeira e a expressão gênica da proteína recombinante é essencial para aumentar a estabilidade e a produtividade do processo.

Sistemas de cultivo contínuo com dois estágios combinando configurações nas quais ocorre a separação de condições de crescimento e expressão termo-sensitiva é um exemplo do uso desta idéia (Ryu et al, 1985, 1988, 1990).

Sendo assim, o cultivo de *Escherichia coli* utilizando a técnica de batelada-alimentada cíclica com dois estágios será estudado para a síntese de proteínas

heterólogas. Essa técnica é similar a um processo batelada-alimentada repetida, diferenciando deste na medida em que a fase de indução não será conduzida no mesmo vaso em que será utilizado na fase de crescimento. Parte do volume retirado do fermentador deve ser transferida para outro fermentador no qual se conduzirá a fase de indução térmica.

A produtividade do processo fermentativo pode ser incrementada pela separação das fases de crescimento celular e expressão gênica e, conseqüentemente, pela otimização de cada fase. A separação dessas diferentes fases usualmente é realizada por promotores reguladores através da manipulação das condições de cultivo. Dois tipos de regulação podem ser encontrados em processos de produção de proteínas recombinantes, um controlado metabolicamente e outro controlado pela temperatura, sendo que este último, tem sido escolhido por diversos pesquisadores e instituições comerciais.

Em uma série de trabalhos, Ryu et al (1985, 1988, 1990) utilizaram o sistema de cultivo contínuo em dois estágios para estudar a performance da fermentação de *E. coli* recombinante. Existem dois processos de fermentação batelada-alimentada cíclicos ou repetidos, o primeiro utiliza apenas um estágio, no qual todos os processos cíclicos, tais como, o crescimento celular e a indução ocorrem em um único bioreator. O segundo tipo utiliza dois estágios, ou seja, o cultivo é realizado utilizando dois bioreatores, um para o crescimento celular e outro para a produção da proteína recombinante.

O processo em um único estágio apresenta algumas desvantagens devido à ocorrência de instabilidade do plasmídeo após a indução, interferindo negativamente na produtividade das fermentações batelada-alimentada cíclicas com único estágio. Este fato coincide com o relato de outros pesquisadores que reportaram processos produtivos para proteínas recombinantes utilizando *E. coli* como cepa hospedeira (Bentley et al., 1990).

Já o processo fermentativo em batelada-alimentada com dois estágios permite elevadas taxas de acúmulo de biomassa, devido à separação das fases de crescimento e indução. O inóculo inicial para cada novo ciclo será realizado

com células em condições ideais de cultivo, em concentrações elevadas o que na prática extingue a “fase-lag” da fermentação do segundo ciclo em diante.

A análise matemática para uma fermentação batelada-alimentada cíclica em dois estágios foi apresentada previamente por Curless et al (1991). Neste modelo dois fermentadores são utilizados, um para o crescimento das células e outro a para produção da proteína recombinante. Adições de nutrientes, exponencialmente e a taxas constantes, foram adotadas durante as fases de crescimento e indução térmica. Os volumes de cultura dos dois estágios para determinados tempos de indução ( $t_{ind}$ ) são:

no processo, quando

$$V_{01} = V_{01} \exp(\mu t) \quad (III.7)$$

$$V_{02} = V_{02} \exp(\mu t) \quad (III.8)$$

A taxa de alimentação exponencial (F) é:

$$F_1 = \mu V_{02} \exp(\mu t) \quad (III.9)$$

$$F_2 = \mu V_{02} \exp(\mu t) \quad (III.10)$$

Cálculo da produtividade volumétrica:

Em uma cultura batelada-alimentada convencional, a produtividade volumétrica ( $P_{vol}$ ) é calculada da seguinte maneira:

$$P_{vol} = \frac{P}{(t_{cresc} + t_{ind})} \quad (III.11)$$

Em uma cultura batelada-alimentada repetida, a produtividade volumétrica no ciclo n ( $P_{vol}(n)$ ) é determinada conforme a equação abaixo.

$$P_{voln} = \frac{\sum_i^n P_i}{(t_{cresc} + \sum_i^n t_{indi})} \quad (III.12)$$

A produtividade volumétrica de um processo batelada-alimentada cíclica de dois estágios com n ciclos ( $P_{vol}(n)$ ) pode ser calculado conforme a equação abaixo:

$$P_{voln} = \frac{\sum_i^n (P_{1i} V_{1i} + P_{2i} V_{2i})}{(t_{cresc} + \sum_i^n t_{indi}) \left( \sum_i^n (V_{1i} + V_{2i}) \right)} \quad (III.13)$$

No caso ideal, no qual o processo é infinitamente repetido e  $t_{ind}$ ,  $P_{mas2}$ ,  $V_{max1}$  e  $V_{max2}$  permanecem constantes durante todos os ciclos, a equação acima pode ser rearranjada da seguinte forma:

$$P_{vol\infty} = \frac{P_1 V_1 + P_2 V_2}{t_{ind} (V_1 + V_2)} \quad (III.14)$$

### III.7 - Fermentação com reciclo de células e microfiltração tangencial

As fermentações conduzidas pela técnica de batelada alimentada apresentaram um baixo crescimento celular comparando-se com o crescimento máximo para culturas de *E. coli*, que se situa entre 160-200 g/l registrado na literatura, Märkl (1993). Os rendimentos em biomassa obtidos, em média, se situam entre 40-50 g/l devido, principalmente, ao acúmulo de produtos metabólicos da fermentação ou concentração limitante de nutrientes essenciais.

A eficiência de diversas culturas microbianas e, até mesmo cultura de células, podem ser aumentadas significativamente com a remoção de metabólitos inibidores do crescimento celular (Märkl e Pörther, 1998). Alguns exemplos desses processos são a produção de etanol e acetato/butanol (Dürre et al, 1992), fermentação de *Lactobacilli* para produção de ácido láctico ou fermento (Gätje e

Gottschalk, 1991 e Hayakawa et al, 1990). Em culturas de células, os principais produtos metabólicos inibitórios são amônia e lactato (Lüdemann et al, 1994 e Omase et al., 1994). Outros exemplos são os cultivos em altas densidades celulares de microrganismos extremamente termofílicos, tais como, *Pyrococcus furious* (Kengen e Stams, 1994 e Rüdiger, 1992). Também, são exemplos os processos para cultivo em altas densidades celulares de *Escherichia coli*, as quais são largamente utilizadas para produção de proteínas recombinantes.

Para as culturas de *Escherichia coli* em altas densidades, usualmente, são utilizados reatores de tanques agitados (STR) com a tradicional instrumentação para alimentação de substratos e controle dos parâmetros operacionais (Riesenberg e Guntke, 1999). Contudo, alguns outros tipos de bioreatores agitados podem ser utilizados para a obtenção de altas densidades celulares, entre eles: Tanques agitados com diferentes tipos de retenção internas ou externas de células, reatores com diálises por membrana, entre outros (Riesenberg e Guntke, 1999).

Para culturas em reatores STR, o problema do acúmulo de produtos metabólicos a níveis inibitórios pode ser resolvido com a troca do meio de cultura, por meio de, por exemplo, bateladas repetidas. Enquanto meio novo é adicionado ao reator, o caldo fermentativo é retirado do fermentador.

O cultivo contínuo com reciclo de células permite operar em vazões específicas de alimentação acima da velocidade específica de crescimento máxima do microrganismo ultrapassando o limite imposto em sistemas contínuos comuns em que a vazão máxima de saída de meio do bioreator é determinada pela velocidade máxima específica de crescimento. Portanto, nos sistemas em reciclo é possível obter maiores produtividades (Grón et al, 1995).

O processo contínuo caracteriza-se principalmente por ser um sistema que pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário. A recirculação de células tem como objetivo a obtenção de altas densidades celulares no fermentador, no intuito de aumentar-se a produtividade do processo. O reciclo de células é particularmente vantajoso quando a concentração do

substrato tem de ser limitante devido à formação de produtos inibitórios e quando o produto formado não está associado ao crescimento (Zeng, 1999). O reciclo também pode proteger as células contra choques de concentrações iniciais de substrato inibidor uma vez que a vazão específica de diluição é elevada.

O reciclo de células pode ser interno ou externo ao bioreator. Quando a recirculação é interna, uma fração do meio é retirada através de uma membrana permeável localizada no interior do fermentador. No caso do reciclo externo, o caldo fermentativo flui através de um separador de células, de maneira que uma corrente de células concentrada retorna ao fermentador, enquanto uma outra corrente é retirada isenta de células, normalmente chamada de filtrado ou permeado. Vários sistemas podem ser utilizados para a retenção de biomassa, tais como centrifugação, sedimentação, imobilização ou um sistema de filtração por membranas. Segundo Pirt (1975), dependendo da disposição do sistema de separação dentro ou fora do bioreator, os métodos podem ser divididos em sistemas internos ou externos.

Técnicas de microfiltração e ultrafiltração são aplicadas para separar componentes inibitórios, os quais são majoritariamente de baixo peso molecular, enquanto retêm os microrganismos. Contudo, o fluxo hidráulico através dessas membranas porosas pode levar ao entupimento ou impregnação das membranas (Belfort, 1989), especialmente no caso de culturas com altas densidades celulares. Além disso, o bombeamento de cultura através de unidades externas causa estresse às células. Portanto, reatores STR com sistemas de filtração internos parecem ser melhores comparados àqueles de reciclo externo, segundo Riesenber e Gutke, 1999.

Alguns pesquisadores utilizaram o sistema contínuo com reciclo externo para obtenção de altas densidades celulares. Lee e Chang (1989) produziu plasmídeos a partir de *E. coli* recombinante. Um sistema de produção de interleucina humana a partir da *E. coli* foi empregado por MacDonald e Neway (1990). Grón et al (1996) demonstraram que um sistema com reciclo de células resultou em maiores produtividades na obtenção de proteinase A por *Saccharomyces cerevisiae* quando comparado ao cultivo contínuo.

Em contraste a micro e ultrafiltrações, as membranas de diálises utilizam o princípio da difusão, ou seja, a remoção efetiva dos componentes de baixo peso molecular é realizada pela difusão através de membrana semipermeável baseada em um gradiente de concentração. A grande vantagem para a utilização de membranas de diálise é que a permeabilidade da membrana não sofre mudanças mesmo em processos com longo período de tempo. Os princípios básicos das culturas em diálises, bem como, a teoria básica foi discutida por Shultz e Gerhardt (1969) e Moser (1985).

Märkl et al (1990) propuseram uma nova configuração para o cultivo em alta densidade celular, chamado reator de membrana de diálise, o qual opera com retenção celular total. O sistema consiste em duas câmaras cilíndricas abertas alocadas em um único vaso. A câmara interna, formada por uma membrana de diálise, é ajustada internamente à câmara externa, Figura III.3. Cada câmara tem seus próprios acessórios de agitação e adição de nutrientes. As vantagens do reator de membrana de diálise são a remoção contínua dos compostos inibitórios, evitando o estresse celular pelo bombeamento das células através de um sistema externo de filtração. Esse tipo de estratégia tem sido utilizado com eficácia para o cultivo de diferentes microorganismos, prolongando a fase exponencial de crescimento e produção, por intermédio da remoção do meio metabolizado e adição de meio novo, retendo as células no interior do bioreator.

A aplicação do cultivo em diálise em processos industriais biotecnológicos requer a utilização de filtros tangenciais externos, pois estes sistemas necessitam de alta capacidade de transferência de massa para a remoção eficiente dos metabólitos.

Cultivos em diálise de bactérias aeróbicas com módulos externos podem ser utilizados para além de remover os inibidores, também fornecer oxigênio e outros substratos, Fucks et al (2002).

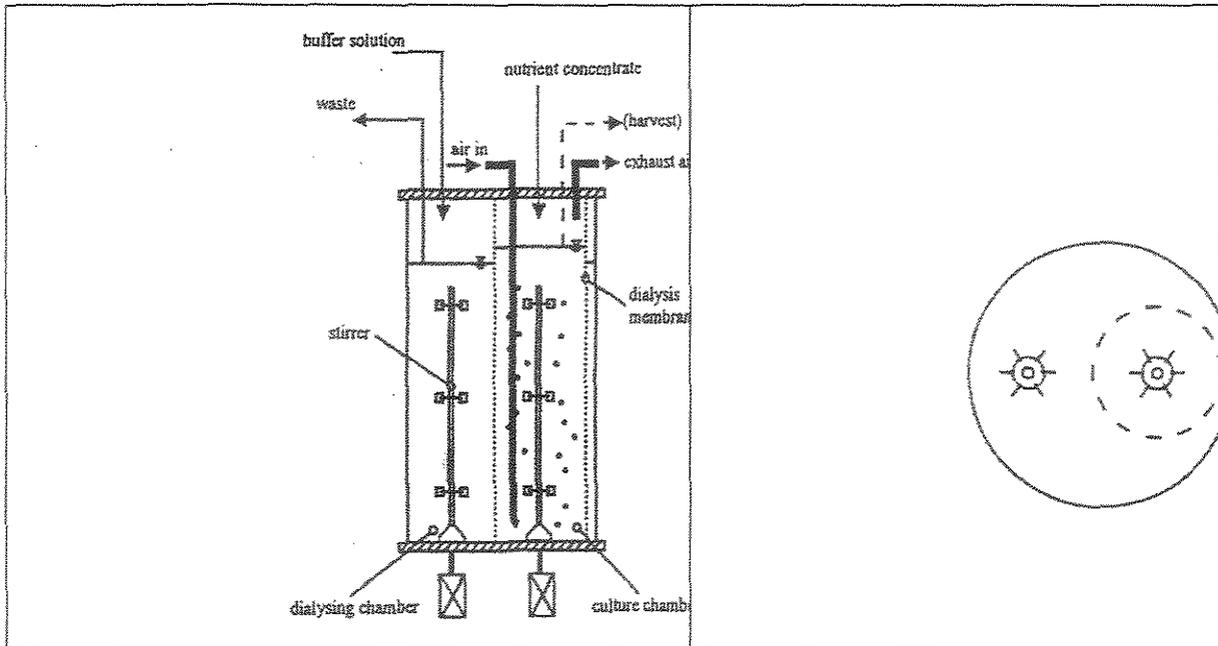


Figura III.3 – Bioreator de membrana de diálise, proposto por Márkl et al (1990) para cultivo de células suspensas com agitadores..

### III.7.1 – Representação matemática de um sistema de reciclo células de filtração tangencial

A Figura III.4 mostra um diagrama esquemático para um sistema de reciclo com microfiltração. As cinéticas para fermentações com reciclo podem ser escritas por intermédio de um balanço de massa para o crescimento celular ( $X$ ), o substrato ( $S$ ) e o produto ( $P$ ). As equações das taxas são:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - BD)X \quad (III.15)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu}{Y_{X/S}} X \quad (III.16)$$

$$\frac{dP}{dt} = -DP + Q_p X \quad (III.17)$$

Onde,  $B$  e  $D$  são a taxa de sangria e a taxa de diluição respectivamente.

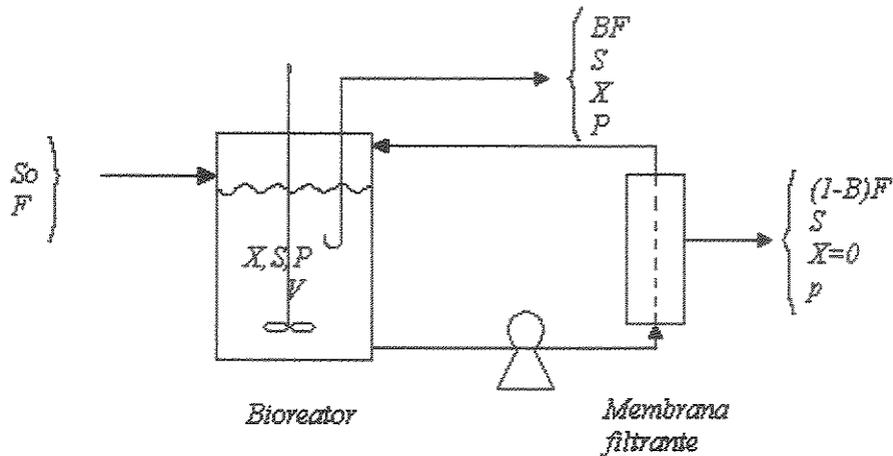


Figura III.4 – Diagrama esquemático de sistema de reciclo com microfiltração

A terceira equação mostra que em altas concentrações celulares e/ou com baixa taxa de diluição tende-se a aumentar a concentração de produtos metabólicos (Acetato, principalmente) no interior do fermentador. Caso o reator esteja operando no modo ( $B=0$ ) de total reciclo, não haverá estado estacionário e a biomassa ( $X$ ) tenderá a aumentar com o tempo, de acordo com a velocidade do crescimento celular.

### III.7.2 – Sistemas de filtração tangencial

As filtrações tangenciais são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos para separação de pequenas partículas em suspensão, além da concentração e separação das moléculas solúveis. Esses processos são operados de maneira que a solução de alimentação é bombeada paralelamente à membrana e apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas de filtração tradicionais, pois conseguem maior quantidade de filtrado devido à redução na formação de depósitos sobre a superfície da membrana. Essa característica possibilita o trabalho em sistema fechado (Bowen, 1993).

Os dois principais tipos de filtração tangencial com membranas utilizadas para purificação de produtos biotecnológicos são a microfiltração e a ultrafiltração. A escolha de um desses dois tipos de filtração depende principalmente do tamanho das partículas a serem removidas. A microfiltração é, em geral, empregada para remover partículas com tamanho entre 0,05  $\mu\text{m}$  e 2,0  $\mu\text{m}$ , enquanto a ultrafiltração remove partículas cujo tamanho variam entre 2,0 nm e 0,1  $\mu\text{m}$ .

Os sistemas de filtração podem ser realizados por diferentes tipos de filtros, entre os quais estão os filtros do tipo cassete, tipo tubular e tipo rotativo.

Os filtros do tipo cassete são constituídos de múltiplas camadas, compostas de folhas de membrana alocadas entre separadores de filtrado e retentados.

Os sistemas de filtros tubulares são utilizados quando são necessárias condições de escoamento turbulento do fluido em processo. Esses filtros podem ser feitos de diversos materiais, tais como, cerâmica, polipropileno ou polietileno. A grande maioria dos processos biotecnológicos que utilizaram esse sistema demonstraram que é possível obter fluxos maiores, bem como maiores períodos de tempo de uso entre os ciclos de limpeza.

A grande desvantagem para a utilização dos sistemas de filtração em processos biotecnológicos é o fenômeno de gel de polarização, o qual consiste no

aumento da concentração entre a solução filtrante e a superfície da membrana (Wheelwright, 1996). Camadas densas de partículas formadas sobre as membranas e as condições de processo limitam drasticamente a separação de suspensões celulares e até enzimas (Kroner et al., 1984). Segundo Kroner et al (1984), o tamanho e a concentração das partículas, a massa das moléculas de proteína, o pH, a concentração de sais e a compressibilidade das camadas formadas sob as condições fluidodinâmicas do processo influenciam de maneira decisiva no transporte de macro moléculas através da membrana.

A retenção das partículas resulta na formação da torta sobre a superfície da membrana, mesmo quando o fluxo de alimentação é mantido a altas velocidades. Esses depósitos aumentam a resistência ao fluxo do filtrado. Na filtração, também ocorre a penetração de partículas nos poros da membrana filtrante levando ao bloqueio parcial, com conseqüente perda do fluxo de filtrado. O tipo de bloqueio mais prejudicial ocorre quando as partículas têm diâmetro próximo ao diâmetro dos poros da membrana, neste caso o bloqueio pode ser completo. Os parâmetros que influenciam no gel de polimerização são a velocidade de alimentação, a pressão, a temperatura, a concentração de sólidos no meio de alimentação, a geometria do filtro e o diâmetro do poro. Uma das estratégias para redução da formação do gel de polarização é utilizar membrana com diâmetro de poros maiores, pois há uma significativa redução na espessura da camada de gel sobre a membrana. Segundo Riesmeier et al. (1989), essa espessura diminui com aumento da velocidade do fluxo de alimentação tangencial e eleva-se com o aumento da pressão transmembranar e com a concentração celular.

O fluxo do permeado irá sempre decrescer ao longo do processo de filtração, mesmo quando todas as outras variáveis de processo forem mantidas constantes. Esse fenômeno é chamado de "fouling" e é normalmente causado devido à ação de espécies específicas contidas no fluido filtrante e torna-se irreversível durante o processo. Esse comportamento claramente prejudicial ao processo de filtração pode ser resultado isolado ou combinado dos seguintes fatores: a) depósito ou acúmulo de partículas sólidas na superfície ou no interior

dos poros ou da membrana, b) precipitação de pequenos solutos na superfície ou no interior dos poros ou da membrana e c) adsorção de solutos macromoleculares na superfície ou no interior dos poros da membrana (Datar e Rosén, 1993).

O aumento da concentração celular no fluido de alimentação provoca queda no fluxo de filtrado através da membrana, conforme observou Riesmeier (1987), ao trabalhar com módulos tubulares em concentrações celulares de 0,7; 1,1 e 5,0% (v/v). Esse comportamento também foi observado por Kroner et al (1984). Segundo estes autores, em filtrações que objetivem altas densidades celulares o fluxo do filtrado decresce à medida que se aumenta a concentração de células durante o processo. Esta queda no fluxo é nitidamente observada na etapa final do processo, quando a concentração celular é bastante elevada. De acordo com Kroner et al (1984), este fato ocorre devido ao aumento da viscosidade do meio, resultado do aumento da concentração de células, o que reduz o número de Reynolds ( $Re$ ) e aumenta a resistência ao transporte de massa. Aliando-se a esses fatores, a compactação da camada de gel de polimerização que adere fortemente a membrana.

Segundo Glabizewski (1991), a ampliação da escala de um sistema de filtração é convenientemente obtida pela simples utilização do fluxo e da pressão transmembranar previamente otimizados em pequena escala. É fundamental que algumas condições sejam mantidas constantes tais como, material da membrana e a geometria do sistema.

As condições de trabalho dos processos de separação por membranas devem ser otimizadas, e os seguintes aspectos devem ser considerados fluxo do filtrado, recuperação do produto desejado e regeneração da membrana.

## CAPÍTULO IV

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### IV.1 – Cepas e plasmídeos

##### IV.1.1 – Cepas

A cepa utilizada neste trabalho foi a *Escherichia coli* K-12 N-4830-1, fornecida pela Pharmacia (Suécia). A cepa hospedeira é auxotrófica para os aminoácidos isoleucina, valina e histidina e contém o gene termo-indutor *ci*<sup>857</sup>.

Tabela IV.1 – Características da cepa N-4830-1

Cepa	Características	Fonte
N-4830-1	F <sup>+</sup> Su <sup>+</sup> his <sup>+</sup> ilu <sup>+</sup> gal <sup>+</sup> k8(chid pgL)N <sup>+</sup> ci <sup>857</sup> Bam H1	Pharmacia

A cepa foi estocada em glicerol 16% a -70°C.

##### IV.1.2 – Plasmídeo

O plasmídeo pHIS é derivativo do plasmídeo pLMT8.5 contendo: (i) uma origem de replicação do pUC8, (ii) o gene de resistência a tetraciclina do pRP4, (iii) o promotor pL do fago Lambda, (iv) a região SD do gene 10 do fago T7, (v) finalizador de transcrição independente Rho e (vi) o gene da pró-insulina humana com inserção (HIS)<sub>6</sub> (MetAlaHisHisHisHisHisHisMetGlyArgPro-Ins).

O gene sintético da pró-insulina foi construído e clonado entre os sítios NcoI e BamHI do vetor pLMT8.5 para fazer o vetor de expressão da pró-insulina humana pHIS. O vetor PHIS foi então inserido na cepa hospedeira N-4830-1, conforme a patente US 6509452 B1. O plasmídeo pHIS utilizado nesta tese está listado na Tabela IV.2 e sua construção é apresentada na figura IV.1.

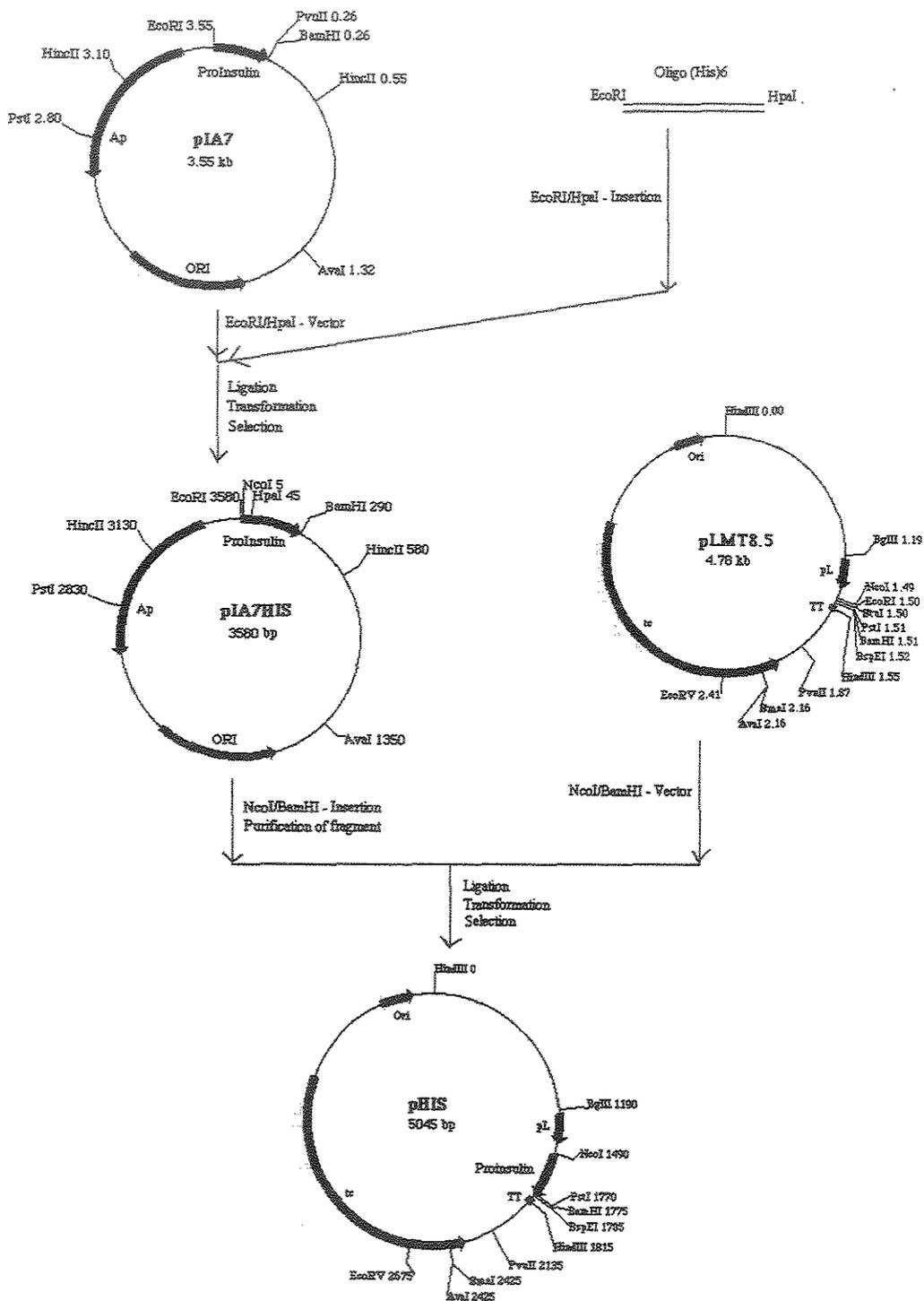


Figura IV.1 – Mapa da construção do Plasmídeo pHIS

**Tabela IV.2 – Características do plasmídeo pHIS**

Plasmídeo	Características	Fonte e referência
pHIS	Tet <sup>r</sup> , P <sub>T7</sub> , Rho, PI, Met-Ala-His-His-His-His-His-His-Met-Gly-Arg-Pro-Ins.	Biommm S/A US6509452B1 patent

## IV.2 – Meios de Cultivo

Os diferentes meios de cultura utilizados neste trabalho para crescimento da cepa N-4830 pHIS estão apresentados à abaixo. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave por 20 minutos a 121 °C. As soluções estéreis como solução oligodinâmica, soluções de aminoácidos, solução de tetraciclina, soluções de glicose e magnésio foram adicionadas depois da esterilização dos meios de cultura, de maneira asséptica em fluxo laminar.

As composições dessas soluções são descritas no item apresentado a seguir.

### IV.2.1 – Meio ágar - LBA

A composição do meio ágar - LBA é descrita na tabela 2.3. Esse meio é utilizado em placas de Petri para os testes de estabilidade do plasmídeo e contagem de unidades formadoras de colônias.

**Tabela IV.3 – Composição do meio LBA.**

Componentes	g/L
Extrato de levedura	5,0
Peptona de caseína	10,0
Cloreto de sódio	10,0
Ágar bacteriológico	15,0

### IV.2.2 – Meio “Feed1” – Extrato de Levedura 20%

O meio denominado “Feed 1” consiste de uma solução de extrato de levedura 20% (m/v) cuja composição é apresentada na Tabela IV

Esta solução foi utilizada para adição programada de extrato de levedura em fermentações do tipo batelada alimentada, batelada alimentada repetida e batelada alimentada cíclica com dois estágios.

**Tabela IV.4 – Composição do meio Feed1.**

<b>Componente</b>	<b>(g/L)</b>
Extrato de Levedura	200,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,8
Tetraciclina	0,004

#### **IV.2.3 – Meio “Feed2” – Glicose 70%**

A solução de glicose 70%, (m/v), aqui chamada de Feed2, teve a composição apresentada na Tabela IV.5 e foi adicionada em pequenas quantidades quando evidenciada a ausência de carboidratos no meio de cultura.

**Tabela IV.5 – Composição do meio Feed2.**

<b>Componentes</b>	<b>(g/L)</b>
Glicose	700
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,8
Tetraciclina	0,004

#### **IV.2.4 – Meio de cultura inicial para fermentadores (Meio Jung modificado).**

A composição do meio de cultura inicial utilizado nas fermentações foi descrita por Jung et al (1988), contendo extrato de levedura, sais de fosfato, sulfato de magnésio, ácido cítrico, solução oligodinâmica e adicionando-se 0,96 mL/L de solução aminoácido e 0,32 mL/L de solução tetraciclina.

#### **IV.2.5 – Meio Jung modificado com 40 g/L de peptona de caseína**

O meio utilizado para o crescimento vegetativo e fermentações em frascos tem a mesma composição de meio Jung apresentado no item IV.2.4, acrescido de 40 g/L de peptona de caseína.

#### IV.2.6 – Solução anti-espuma 40 %

Solução utilizada para evitar a formação de espuma no interior do fermentador e frascos Erlenmeyers. A concentração da solução anti-espuma foi 400ml da emulsão de Simeticone C (Dow Corning) por litro de água deionizada.

#### IV.2.7 – Solução NH<sub>4</sub>OH (5N)

Solução de hidróxido de sódio (5N) utilizada para manutenção do pH nos fermentadores.

#### IV.2.8 – Solução oligodinâmica

Composição de solução utilizada para adição de micro-elementos essenciais para o crescimento celular.

**Tabela IV.6 – Composição da solução oligodinâmica**

Componentes	g/L
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15,58
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	15,58
MnSO <sub>4</sub> nH <sub>2</sub> O	0,39
AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,39
CoCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,56
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,78
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,78
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,39

#### IV.2.9 – Solução Aminoácidos

Solução de aminoácidos adicionada ao meio de cultura, em virtude da cepa N-4830-1 ser auxotrófica para os aminoácidos valina, histidina e isoleucina. A composição da solução de aminoácidos é apresentada na Tabela IV.7.

Tabela IV.7 – Composição da solução de aminoácidos

Componentes	g/L
Valina	0,5
Isoleucina	0,15
Histidina	0,5

#### IV.2.10 – Solução Tetraciclina

Solução de antibiótico utilizada como pressão seletiva para os experimentos em frascos e em fermentadores. Essa solução é esterilizada por filtração

Tabela IV.8 – Composição da solução de tetraciclina

Componentes	g/L
tetraciclina	12,5
Álcool 95%	500 mL/L

#### IV.2.11 – Meio de alimentação por gradiente diluído

Nos experimentos com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por gradiente linear, as concentrações utilizadas no meio de alimentação por gradiente diluído para os sais, ácido cítrico, solução aminoácido e solução oligodinâmica foram as mesmas usadas na composição do meio de fermentação inicial.

As concentrações de glicose e extrato de levedura serão demonstradas na Tabela VIII.1.

#### IV.2.12 – Meio de alimentação por gradiente concentrado

Nos experimentos com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por gradiente linear, as concentrações utilizadas para os sais, ácido cítrico, solução aminoácido e solução oligodinâmica foram aumentadas por três vezes em relação àquelas usadas na composição do meio de fermentação inicial.

As concentrações de glicose e extrato de levedura serão demonstradas na Tabela VIII.1.

#### **IV.2.13 – Meio alimentação do reciclo por pH-stat**

Nos experimentos com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por gradiente linear, as concentrações utilizadas para os sais, ácido cítrico, solução aminoácido e solução oligodinâmica foram aumentadas por três vezes em relação àquelas usadas na composição do meio de fermentação inicial.

As concentrações de glicose e extrato de levedura serão demonstradas na Tabela VIII.4 e VIII.5.

### IV.3 – Equipamentos

#### IV.3.1 – Fermentadores

Os experimentos foram realizados em fermentadores Inceltech com capacidade útil de 4,0 L e 12,0 L e fermentadores BioFlo3000 e BioFlo IV com capacidade útil de 4,0 L e 12,0 L, respectivamente.

#### IV.13.2 – Sistemas de microfiltração tangencial

Foram utilizados nestes experimentos dois sistemas de filtração:

A) Sistema de filtração Filtron.

Esse sistema de filtração modelo mini-cassete de 0,30  $\mu\text{m}$  e com área específica de 65,0  $\text{cm}^2$ .

B) Sistema de filtração Frings-Mycrodin

Esse sistema de filtração modelo tubular ou “hollow-fiber” de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade e com área específica de 0,2  $\text{m}^2$ . Autoclavável a 121  $^{\circ}\text{C}$ .

A limpeza deste tipo de membrana é realizada com NaOH 0,5 N a 40  $^{\circ}\text{C}$  logo após o término da operação.

## **IV.4 - Métodos**

### **IV.4.1 – Concentração celular**

#### **Densidade ótica (O.D.):**

O crescimento celular foi acompanhado pela medida da densidade ótica a 540 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia, Sweden). Utilizou-se como referência solução salina 0.9% (NaCl). As amostras foram diluídas em solução salina no caso da absorbância exceder o valor de 0,600.

#### **Peso seco de células:**

O peso seco foi determinado gravimetricamente em amostras de 1,5 mL de suspensão de células. As amostras de suspensão de células foram centrifugadas em tubos Eppendorf pré-pesados de 2 mL e lavadas uma vez em solução salina 0,9 %. Depois de retirar o sobrenadante, as amostras foram secadas a 60 °C por no mínimo 24 horas. 1,0 OD (540nm) equivale a 0,35 g/L de peso seco de células.

#### **Unidade formadora de colônias (CFU):**

As unidades formadoras de colônias foram analisadas pelo plaqueamento de no mínimo três diluições e cada uma delas em triplicata em placas de LBA, as quais foram incubadas de um a três dias a 30 °C.

### **IV.4.2 – Estabilidade do plasmídeo**

Para determinação da estabilidade do plasmídeo foi utilizada a técnica da pressão seletiva. Amostras estéreis foram retiradas no tempo desejado e plaqueadas por esgotamento em placas de LBA e incubadas a 30 °C durante 24 a 48 horas. Depois de crescidas, 100 colônias foram isoladas e repicadas em placas de LBA com e sem antibiótico. As placas inoculadas foram novamente incubadas a 30 °C durante 24 a 48 horas e, então se determina a percentagem de colônias resistentes à tetraciclina.

#### **IV.4.3 – Análise de componentes no meio de cultura**

##### **IV.4.3.1 – Concentração de glicose**

A concentração de glicose foi mensurada pelo analisador de glicose YSI2000 (Yellow Spring Incorporation, USA). As amostras do meio de fermentação foram retiradas e 1,0 mL foi centrifugado em tubo eppendorf por 3 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi aplicado no analisador e a concentração de glicose determinada. No caso da concentração de glicose exceder 10,0 g/L, diluiu-se a amostra em solução salina 0,9%.

##### **IV.4.3.2 – Concentração de acetato**

A concentração de acetato foi determinada enzimaticamente com o kit nº. 148261 da Boehringer Mannheim (Alemanha) em microtitulação com quatro paralelas para cada amostra.

As amostras do meio de fermentação foram retiradas e 1,0 mL foi centrifugado em tubo eppendorf por 3 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi diluído 10 vezes e analisado pelo kit nº. 148261 da Boehringer Mannheim (Alemanha) e a concentração de acetato determinada. No caso do valor obtido exceder 1,5 g/L, diluiu-se a amostra 50 vezes em solução salina 0,9%.

#### **IV.4.4 – Medidas em linha**

##### **IV.4.4.1 - Análise de pH**

As medidas de pH foram realizadas com eletrodo DPAS da Mettler-Toledo (USA).

##### **IV.4.4.2 – Análise de oxigênio dissolvido**

A concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura foi determinada por eletrodo polarográficos da Ingold (USA), acompanhada durante toda a fermentação e registrada pelos programas aplicados a cada fermentação.

#### IV.4.5 – Quantificação da proteína de fusão em géis de SDS-PAGE

Para determinação da concentração da proteína recombinante como fração da proteína celular foram coletadas amostras em tempos pré-determinados. As amostras de 1,0 mL foram centrifugadas em tubo Eppendorf por 3 minutos a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 1,0 mL de tampão Tris-base 0,1M e, novamente, centrifugado por 5 minutos a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em volume determinado de tampão Tris-Base 0,1M correspondente ao volume 100 µL usado para ressuspender uma amostra com O.D. de 6,25. Transfere-se 50 µL da amostra ressuspendida e 50 µL de tampão de lise 2X para outro tubo Eppendorf. Então as amostras foram aquecidas em banho-maria por 3 minutos e então aplicadas no gel SDS-PAGE. Os géis correram a 60 V em temperatura ambiente, entre 10 e 14 horas. Depois da eletroforese, os géis foram colados na solução fixadora durante 1 hora, corados em solução corante por 8 horas e descorados em solução descorante durante 1 hora, sempre em agitação suave. Os géis foram secados em folha de celofane a 80 °C por 3 horas.

As análises densitométricas das intensidades das bandas nos géis foram quantitativamente realizadas utilizando Image Master VDS da Pharmacia (Suécia) pela comparação com curvas padrões de proteínas com densitometrias conhecidas adicionadas em cada gel.

#### IV.4.6 – Quantificação da proteína total

A quantificação da proteína total foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

As amostras de 100µl foram misturadas a 900µl da solução reagente (contendo 100mg/L Comassie-Brilliant Blue G-250, 50mL/L ácido fosfórico 85% (M/v)) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. A absorbância a 595nm foi imediata e comparada à curva padrão com soro de albumina bovina como padrão.

#### IV.4.7 - Determinação da concentração de proteína de fusão

Para o cálculo da concentração de Proteína de fusão obtida numa fermentação após a indução, foram utilizadas as seguintes equações:

$$PT = x_t \times 0,55 \text{ (g/L)} \quad (\text{IV.1})$$

$$PF = PT \cdot \frac{D}{100} \quad (\text{IV.2})$$

Cálculo da Proteína de fusão (g/L), sendo:

$x_t$  = Concentração de Biomassa celular (Peso Seco) num determinado instante t (g/L)

D = percentagem da área relativa determinada por Densitometria no instante t.

PT = proteína total (g/L)

PF = proteína de fusão (g/L)

#### IV.4.8 – Parâmetros cinéticos

##### IV.4.8.1 - Velocidade específica de crescimento $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ ) e da velocidade de crescimento $dx/dt$ (g/L.h).

Para determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) - ( $\text{h}^{-1}$ ) e a velocidade de crescimento ( $dx/dt$ ) - (g/L.h) em um intervalo de tempo pré-determinado utilizou-se o seguinte procedimento:

Calcular  $dx/dt$  (g/L.h) com a seguinte expressão:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x_t \quad (\text{IV.3})$$

Cálculo de  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ), utilizou-se a seguinte expressão:

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0} \quad (\text{IV.4})$$

Nos quais,

$x_0$  e  $x_t$  = concentração de Biomassa celular (Peso seco) nos instantes  $t_0$  e  $t$  respectivamente (g/L)

$t_0$  e  $t$  = tempo inicial e final do intervalo considerado (h)

$\mu$  = velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$dx/dt$  = velocidade de crescimento (g/L.h)

#### IV.4.8.2 - Produtividade celular

Para determinar a produtividade em concentração celular ( $P_x$ ) em um intervalo de tempo pré-determinado, utilizou-se a equação abaixo:

$$P_V = \frac{X_f}{(t_p + t_f) V_f} \quad (IV.5)$$

No qual,

$P_V$  é a produtividade volumétrica (aumento de concentração de Biomassa) (g/L.h)

$V_f$  é o volume final no fermentador (L),

$t_p$  é o tempo de preparo e esterilização do fermentador (h),

$t_f$  é o tempo de fermentação (h)

$X_f$  = Biomassa formada (g)

#### IV.4.8.3 - Fator de conversão

Para calcular o fator de conversão substrato a células ( $Y_x/s$ ) em um intervalo de tempo pré-determinado, calcula-se os valores de Biomassa seca (g) no fermentador em cada instante pela equação:

$$X = V \times x \quad (IV.6)$$

Sendo,  $X$  = Biomassa (g) no instante considerado

$V$  = Volume no fermentador no instante considerado

$x$  = Peso seco (g/L) no instante considerado

E depois, calculam-se os valores de  $Y_x/s$  (g/g) nos intervalos pré-determinados, usando a expressão:

$$Y_{x/s} = \frac{dX/dt}{dS/dt} \quad (IV.7)$$

Integrando-se temos:

$$Y_{x/s} = \frac{X_t - X_0}{S_t - S_0} \quad (IV.8)$$

Sendo que,

$t_0$  = tempo inicial do intervalo considerado (h)

$t$  = tempo final do intervalo considerado (h)

$x_0$  e  $x_t$  = concentrações de Biomassa celular (Peso seco) nos instantes  $t_0$  e  $t$  respectivamente (g/L)

$V_0$  e  $V_t$  = volumes no fermentador nos instantes  $t_0$  e  $t$  respectivamente (g)

$X_0$  e  $X_t$  = biomassa celular Total (seca) nos instantes  $t_0$  e  $t$  respectivamente (g)

$Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato a células, também conhecido como "Conversion Yield Factor" (g de células produzidas /g de substrato consumido)

$S_0$  e  $S_t$  = consumos acumulados ( $\Sigma S$ ) de substrato (glicose) nos instantes  $t_0$  e  $t$  respectivamente (g)

#### IV.4.8.4 - Balanço de volume na fermentação

Para o cálculo dos volumes no fermentador num intervalo de tempo pré-determinado, usando a seguinte fórmula:

$$V_t = V_0 + (v_a + v_b + v_c + v_d + v_e - v_z) \quad (IV.9)$$

Sendo que,

$t_0$  = tempo inicial de intervalo considerado (h)

$t$  = tempo final do intervalo considerado (h)

$V_0$  e  $V_t$  = volumes no fermentador nos tempos  $t_0$  e  $t$  de um intervalo considerado (L)

$v_a$  = volume de "feeds" adicionado no intervalo de tempo considerado (L)

$v_b$  = volume de "base" adicionado no intervalo de tempo considerado (L)

$v_c$  = volume de “ácido” adicionado no intervalo de tempo considerado (L)

$v_z$  = volume de retiradas do fermentador no intervalo de tempo considerado (L)

$v_d$  = volume de “antiespuma” (AF) adicionado no intervalo de tempo considerado (L)

$v_e$  = volume de outras adições feitas no intervalo de tempo considerado (L).

#### IV.4.8.5 - Taxa específica de consumo de glicose.

A taxa específica de consumo de glicose foi calculada de acordo com a seguinte equação.

$$q_s = \left( \frac{dS}{dt} \right) x = \left( \frac{S_f - S_0}{t_f - t_0} \right) x \quad (\text{IV.10})$$

Sendo,

$S$  = concentração de substrato (g/L)

$x$  = concentração de biomassa celular (Peso seco) (g/L)

$q_s$  = taxa específica de consumo de substrato.

## **IV.5 – Metodologia da condução das fermentações**

A metodologia utilizada para a condução das diferentes estratégias de fermentações será apresentada nos itens abaixo. Metodologias específicas para determinadas estratégias serão tratadas no respectivo capítulo deste trabalho.

### **IV.5.1 - Preparo do inóculo**

Frascos Erlenmeyer 500 ml, contendo 100 mL de meio Jung modificado foram inoculados com 100  $\mu$ l de células e colocados em agitadores rotativos com temperatura a 30 °C e velocidade de 250 rpm, onde permaneceram para crescimento por aproximadamente 14 horas.

### **IV.5.2 –Condições de cultivo da fermentação**

A metodologia utilizada para o preparo e condução das fermentações é descrita nos itens abaixo.

#### **IV.5.2.1 - Limpeza do fermentador**

Antes do início da preparação do fermentador, foi efetuada a lavagem com água deionizada, por cinco vezes.

#### **IV.5.2.2 - Preparo do Eletrodo de medição de oxigênio dissolvido.**

Desconectou-se o eletrodo do fermentador, o qual foi desmontado e as condições do mesmo verificadas (guarnições, membrana e ponta de vidro). Após isso o eletrodo foi lavado e secado cuidadosamente, a seguir foi colocada nova solução eletrolítica, e realizou-se a montagem e conexão junto ao corpo do fermentador.

#### **IV.5.2.3 - Calibração do eletrodo de pH**

O Eletrodo de pH foi calibrado em dois valores de referência, e posteriormente conectado ao fermentador, para logo em seguida adicionar-se o meio de cultura.

#### **IV.5.2.4 - Esterilização do fermentador e meio de fermentação.**

Após o meio de cultura ser adicionado ao fermentador foi realizada a esterilização do fermentador e do meio de cultura por 25 minutos, com os parâmetros ajustados nos seguintes valores: a) 200 RPM, b) vazão de ar em 2,0 L/L/min, temperatura em 121 °C e pressão em 1,2 Kg/cm<sup>2</sup>.

#### **IV.5.2.5 - Preparo para o início da fermentação.**

Os parâmetros RPM, temperatura, aeração, pH, pressão foram ajustados para as condições desejadas. O eletrodo de oxigênio foi calibrado antes do início da fermentação. O eletrodo foi calibrado na ausência de oxigênio (Zero) e no máximo da solvência do oxigênio no meio de cultura (100%).

#### **IV.5.2.6 – Inoculação do fermentador.**

A inoculação do fermentador foi realizada após a transferência sob fluxo laminar para frasco Kitasato previamente montado e esterilizado. O inóculo germinado foi então, transferido em condições assépticas para o fermentador.

#### **IV.5.2.7 - Acompanhamento da fermentação**

Durante o andamento da fermentação foram retiradas amostras a cada hora, para as análises necessárias. Foram realizadas as adições de nutrientes em tempo e quantidades programadas de acordo com o experimento. Todas as

anotações referentes às mudanças acontecidas período de fermentação foram anotadas em formulário de acompanhamento de fermentação.

A taxa de Oxigênio dissolvido foi mantida acima do valor especificado para o experimento (30%), seja pelo aumento na agitação, ou pelo aumento na proporção de oxigênio puro na mistura ar/oxigênio. Tomando-se o cuidado de adicionar o oxigênio puro somente quando a agitação e aeração não fossem suficientes para manter a taxa de oxigênio dissolvido no valor especificado.

#### **IV.5.2.8 - Finalização da fermentação.**

Após o término da fermentação, as células foram coletadas, centrifugadas e lavadas. Depois de descarregado, o fermentador foi lavado imediatamente com água deionizada, e aquecido a 80 °C por 15 minutos. Após lavagem com água, encheu-se o fermentador com solução de NaOH 0.5N e o mesmo foi aquecido por 15 minutos a uma temperatura de 105°C. Depois do resfriamento da soda, descarregou-se o fermentador e lavou-se com água deionizada por, no mínimo, 3 vezes. Caso houvesse incrustações, a tampa era retirada e lavada manualmente com bucha e detergente.

## CAPÍTULO V

### FERMENTAÇÃO BATELADA-ALIMENTADA

#### V.1 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada

Os procedimentos para preparação e condução das fermentações, bem como os métodos de análise foram apresentados no capítulo IV, item IV.4.

A estratégia de alimentação de nutrientes utilizada nos processos fermentativos batelada-alimentada consistiam na adição de três diferentes tipos de nutrientes, sendo eles Feed1, Feed2 e solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (5N).

O primeiro tipo de alimentação denominada de Feed1 consiste na adição programada de uma solução de extrato de levedura a 20% e  $\text{MgSO}_4$  0,28 %. As vazões de adição da solução de extrato de levedura 20% foram determinadas de maneira empírica e incrementadas na medida que a concentração celular aumenta (dados não mostrados). A composição do Feed 1 foi apresentada no capítulo IV, item IV.2.2.

O segundo tipo de adição de nutrientes é uma solução de glicose 70%, chamada neste trabalho de Feed2. A adição é feita em glucose-loop (pH-stat), ou seja, este nutriente é considerado o substrato limitante da fermentação e é adicionado para o acerto do pH sempre que esta variável tende a um valor maior que 6,80. A adição de Feed2 ao meio para a manutenção do pH inicia-se quando a glicose inicial do meio de cultura for totalmente exaurida. Na ausência de glicose, o pH do meio de fermentação tende a aumentar devido ao metabolismo dos aminoácidos presentes no extrato de levedura resultando na liberação de íons amônio. Outra evidência da ausência de glicose disponível no meio é o aumento do oxigênio dissolvido.

O terceiro tipo de alimentação foi feito pela adição de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (5N) utilizado, principalmente no começo do cultivo, antes do término da glicose inicial do meio de fermentação e no caso do pH atingir valores menores que 6,75 durante a fase batelada-alimentada.

O pH do meio de fermentação foi mantido em 6,80 pela adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (5N) ou solução de glicose 70% ("Feed2"), por intermédio de bombas peristálticas. Outros valores de pH foram testados e os melhores resultados obtidos neste valor (dados não mostrados).

A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima de 20% aumentando-se a velocidade de agitação ou incrementando o ar com oxigênio puro por intermédio de um misturador automático de gases para os fermentadores NBS e, por intermédio de manômetros para os fermentadores Inceltech, nos quais a mistura de gases foi realizada manualmente. A vazão de entrada de ar foi medida e mantida em 1,0 L/L/min.

O volume inicial do fermentador Inceltech LH 210 (4,0 Litros) foi de 2,0 litros, sendo que o volume final obtido permaneceu por volta de 3,0 l. O volume inicial do fermentador BioFlo3000 foi 3,0 litros e seu volume final era aproximadamente 4,0 L. Nos fermentadores Bioflo IV e LH210 (12,0 Litros), o volume inicial foi de 8,0 litros e o volume final obtido era aproximadamente 12,0 litros. O incremento de volume foi de aproximadamente 50% em relação ao volume inicial das fermentações. A vazão de entrada de ar foi medida por meio de um rotâmetro e mantida em 1,0 L/L/min. A Figura V.1 apresenta o esquema de montagem experimental dos fermentadores e dos recipientes para adição dos nutrientes.

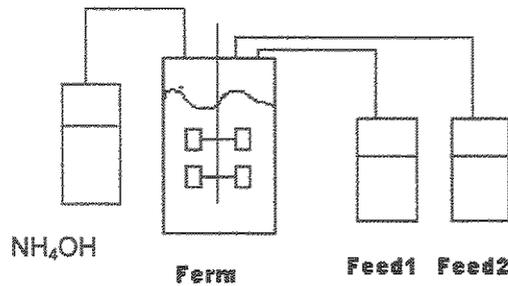


Figura V.1 - Esquema de montagem dos experimentos em batelada alimentada (Fermentação tradicional)

As fermentações em batelada alimentada apresentam gráficos de volume de cultura e concentração celular versus tempo de cultivo, conforme demonstrado na Figura V.2. Com a adição de nutrientes ao fermentador durante o cultivo, o volume de cultura e a concentração celular aumentam para  $V_f$  e  $X_f$ , nos quais  $t_p$ ,  $t_f$  e  $t_h$  são respectivamente tempo de preparo do fermentador, tempo de fermentação e tempo de coleta.

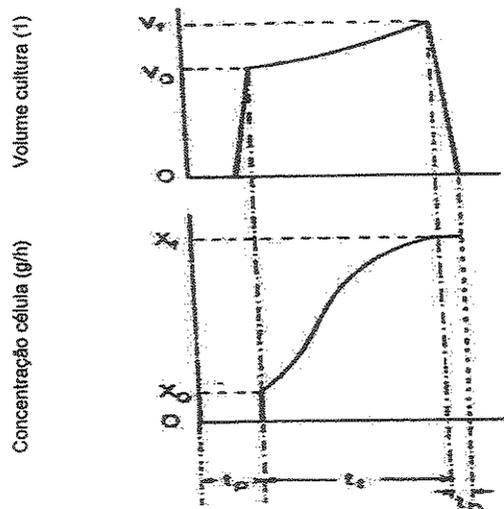


Figura V.2 - Curvas características de fermentações batelada-alimentada.  
A – Concentração celular versus tempo. B – Volume da cultura versus tempo.

## V.2 – Resultados

Os resultados obtidos no processo fermentativo industrial desenvolvido pela BIOMM S/A para produção de proteínas recombinantes serão apresentados neste capítulo. Os dados resultantes do processo fermentativo foram exaustivamente testados em fermentadores de bancada de capacidade de 4 e 12 litros e em escala piloto, ou seja, fermentadores de 1500 litros de capacidade.

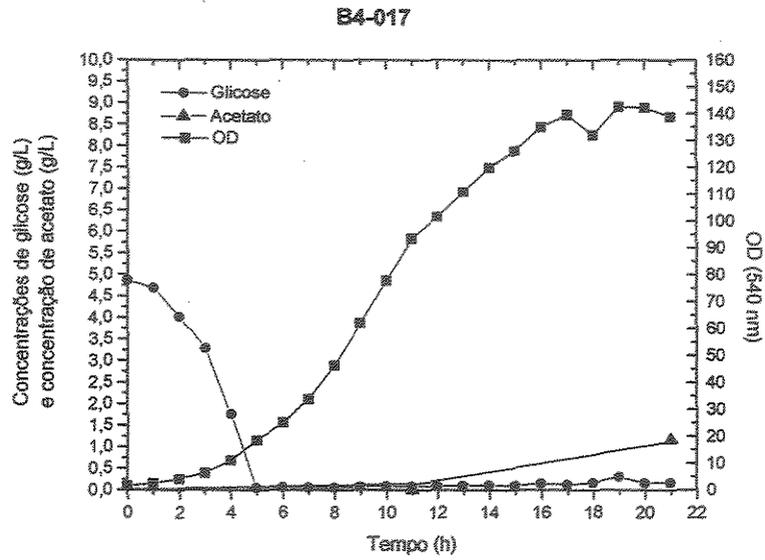
Esse modo operacional será chamado de fermentação batelada-alimentada tradicional para efeito de comparação com os resultados obtidos nas diferentes condições de cultivos e com as diferentes estratégias de fermentação que serão apresentadas nos capítulos seguintes desta tese.

Para as fermentações batelada-alimentada tradicional, o período de crescimento celular foi conduzido a uma temperatura de 30,0 °C, seguida da fase de indução da proteína de fusão à temperatura de 40,0 °C. O pH do meio de fermentação foi mantido em 6,80 pela adição de NH<sub>4</sub>OH (5N) ou solução de glicose 70% ("Feed2"), por intermédio de bombas peristálticas. A adição da solução de extrato de levedura 20% (Feed1) foi, por intermédio de bombas peristálticas, de maneira semi-contínua e com incrementos da vazão por pulsos em tempos pré-determinados.

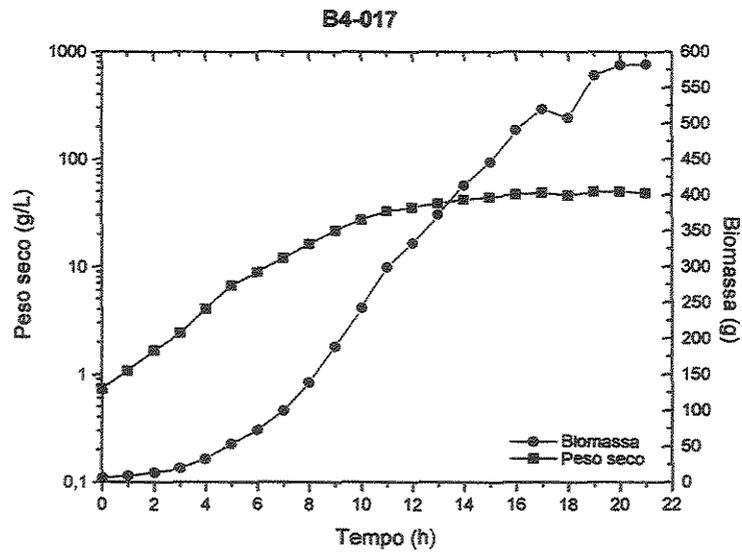
A Figura V.3 apresenta os resultados obtidos de uma fermentação tradicional típica em batelada alimentada. Observa-se que a concentração de peso seco de células tende a estabilizar-se no patamar de 50,0 g/L e que durante o período de indução não há aumento significativo da concentração celular, apesar de haver um aumento de volume do fermentado. Esse comportamento pode ser explicado pelo comprometimento do crescimento microbiano devido ao acúmulo de produtos metabólicos no fermentador e, também porque, em função da mudança genética feita na cepa, a produção da proteína recombinante requer a utilização dos nutrientes disponíveis no meio de fermentação. Esses fatores reduzem a taxa de crescimento específica na fase de indução, e com aumento de volume do fermentador a concentração celular permanece praticamente constante devido a diluição.

A fermentação B4-017, apresentada na Figura V.3, demonstra curvas de cinéticas de crescimento, de consumo de glicose, de formação de acetato e de formação da pró-insulina humana características para uma fermentação com fase de crescimento a 30 °C e fase de indução a 40 °C. A concentração de glicose é mantida em níveis próximos a zero por consequência da metodologia adotada para adição do "Feed2", na qual a bomba peristáltica só é acionada quando não há glicose presente no meio e desativada quando o pH do meio retorna ao valor inicial estabelecido em 6,80. A concentração de acetato tende a aumentar no final da fermentação, principalmente durante a indução a 40 °C. Este acréscimo na concentração de acetato pode ser atribuído a necessidade de maior energia para a formação da proteína recombinante e para a manutenção do crescimento celular. Essa demanda provavelmente excede a capacidade do metabolismo oxidativo da *E. coli*, forçando o microrganismo a suprir a energia pela síntese do ácido acético, pois essa via é a segunda maior fonte de ATP e NADH<sub>2</sub>.

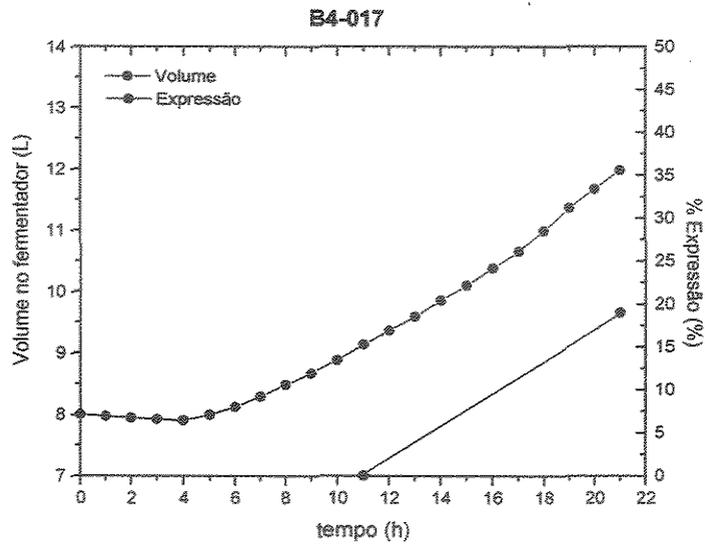
Além das cinéticas de crescimento e de consumo de glicose, são apresentadas na Figura V.3 as curvas de peso seco (g/L), aumento do volume no fermentador, biomassa total formada e estabilidade do plasmídeo. A fermentação B4-017 apresentou concentração final de células em peso seco de 48,6 g/L, a concentração de glicose foi mantida limitante, entre 0,0 e 0,1 g/L. A concentração de acetato permaneceu próxima a zero enquanto a temperatura foi mantida a 30,0 °C, elevando-se a temperatura a 40 °C a sua concentração atingiu o valor de 1,17 g/L. A estabilidade do plasmídeo, até o início da indução, manteve-se constante em 100 %, decrescendo com a elevação da temperatura até o valor de 95 %. A taxa específica de crescimento desta fermentação foi 0,200 h<sup>-1</sup>, sendo que no período de crescimento a taxa específica de crescimento foi 0,346 h<sup>-1</sup> e no período de indução 0,039 h<sup>-1</sup>. O fator de conversão de gramas de células por gramas de substrato ( $Y_{X/S}$ ) durante a fermentação foi 0,659 g<sub>células</sub> /g<sub>glicose</sub>, sendo que na fase de crescimento e na fase de indução, os valores obtidos foram, respectivamente, 1,252 e 0,419 g<sub>células</sub> /g<sub>glicose</sub>. Os elevados valores do fator de conversão  $Y_{X/S}$  são devido ao metabolismo protéico das fontes de carbono existentes no extrato de levedura, além da glicose consumida. A produtividade em biomassa da fermentação observada foi 2,316 g/L/h.



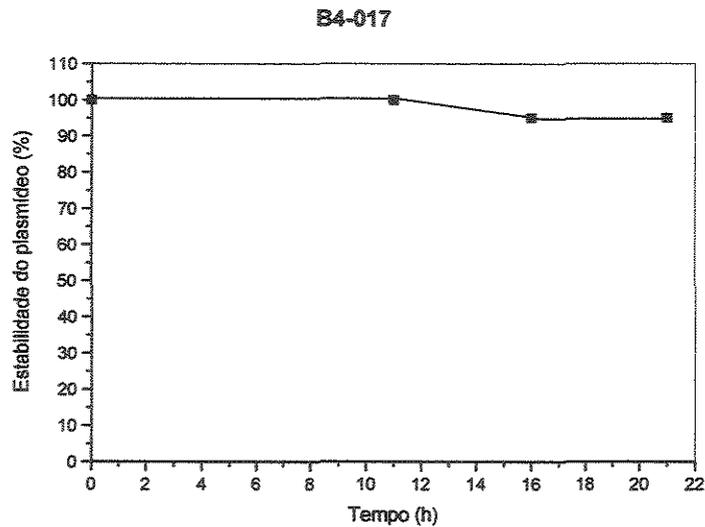
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura V.3 – (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e OD (540 nm) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se *E. coli*. (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).

A Tabela V.1 apresenta a média dos resultados apresentados em experimentos realizados com temperatura de crescimento a 30 °C e temperatura de indução a 40 °C por 10 horas. A fase de indução foi iniciada quando a

densidade ótica atingiu valores maiores que 100. Observou-se nestes experimentos que a estabilidade do plasmídeo permanece elevada e que a concentração celular aumenta durante a fase de indução por algumas horas.

Tabela V.1 – Média dos dados finais obtidos em fermentações batelada-alimentada tradicional.

Ferm	O.D. (540nm)	P.S. (g/L)	$Y_{X/S}$ cres (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{X/S}$ ind (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{X/S}$ total (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$\mu_{cresc}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{ind}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{total}$ (h <sup>-1</sup> )	Exp. (%)	Prod. (g/L/h)
Média	141,8	49,64	1,155	0,376	0,586	0,308	0,036	0,186	18,6	2,201
	Estabilidade(%)		Acetato (g/L)							
Média	97,0		0,863							

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos em experimentos para avaliação dos efeitos de parâmetros importantes em processos fermentativos realizados em batelada-alimentada. Tais parâmetros são temperatura de cultivo, oscilações na concentração de glicose, oscilações na concentração de oxigênio dissolvido, efeito de diferentes impellers, efeitos da pressão interna no fermentador.

### V.2.1 – Efeito da temperatura de crescimento

Nos próximos itens serão apresentados resultados experimentais obtidos para avaliação da influência da temperatura de crescimento nos processos fermentativos em batelada-alimentada para produção de insulina humana recombinante.

As fermentações em batelada alimentada foram feitas em fermentadores Inceltech LH210, com capacidade máxima de 4,0 ou 20,0 litros, em fermentadores BioFlo3000 com capacidade máxima de 5,0 litros ou ainda em fermentadores Bioflo IV da NBS com capacidade máxima de 20,0 litros. Todos os reatores estavam equipados com controladores de temperatura, de velocidade de agitação, de pH e medidores da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

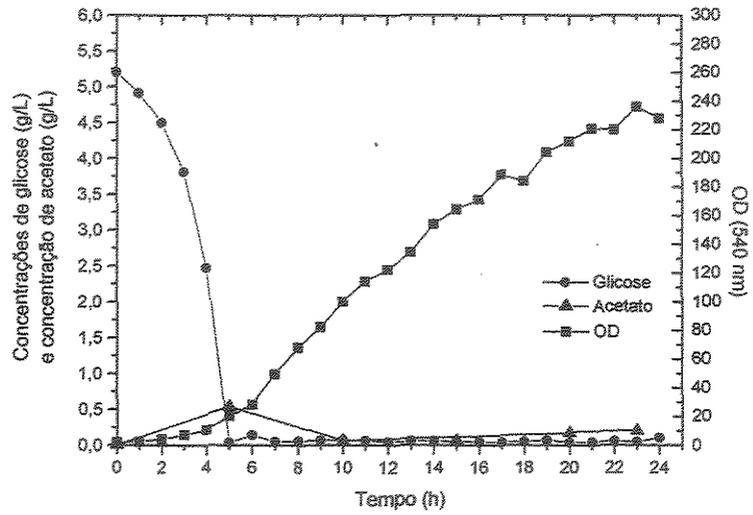
Os experimentos foram realizados variando-se a temperatura de crescimento em 30,0 °C, 36,0 °C e 38,0 °C. Como é sabido, a temperatura ótima de crescimento da *E. coli* é 37 °C. O principal objetivo dessa etapa é avaliar o efeito da temperatura no crescimento celular, na obtenção de biomassa, na produção de produtos metabólicos e na expressão da proteína de fusão.

Todos os experimentos foram realizados mantendo-se a concentração de glicose limitante, entre 0,0 e 0,1 g/L, mantendo-se o pH em 6,80 e a concentração de oxigênio dissolvido acima de 20 % para evitar a formação de acetato em função de alguma variação nestes patamares.

A Figura V.4 apresenta as cinéticas de crescimento celular, de consumo de glicose e formação de acetato para a fermentação F697 realizada a 30 °C durante 24 horas. Os resultados obtidos foram 79,7 g/L de peso seco de células. A concentração de glicose foi mantida limitante, entre 0,0 e 0,1 g/L, a concentração de acetato permaneceu próxima a zero e a estabilidade do plasmídeo ficou em 100 % durante toda a fermentação. Na temperatura de 30 °C não há indução da proteína de fusão.

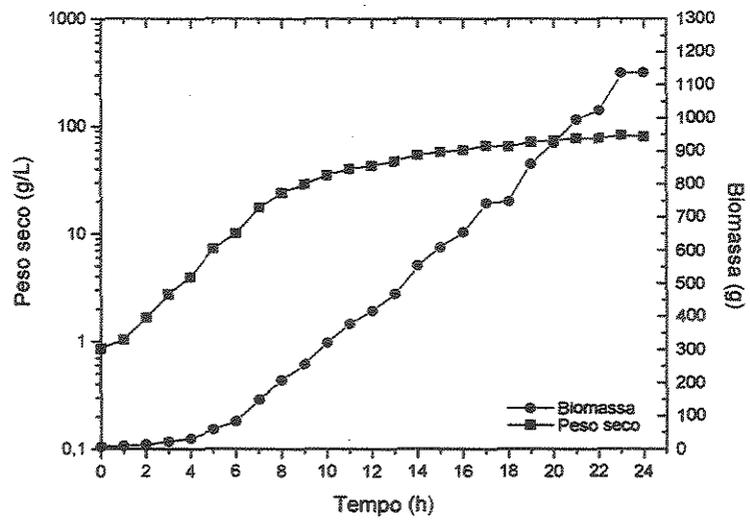
A maioria dos processos fermentativos para obtenção de proteínas heterólogas utilizando cepas *E. coli* recombinantes são realizados atingindo elevadas concentrações celulares, para só assim iniciar-se a indução dos corpos de inclusão. A Figura V.4 demonstrou claramente que é possível atingir concentrações celulares maiores que 50,0 g/L a 30,0 °C em fermentações batelada-alimentada com adição de substrato via pH-Stat. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), o rendimento de células por substrato ( $Y_{X/S}$ ) e a produtividade em biomassa (P) foram, respectivamente, 0,188 h<sup>-1</sup>, 0,792 g<sub>células</sub>/g<sub>glicose</sub> e 2,490 g/L/h.

F697

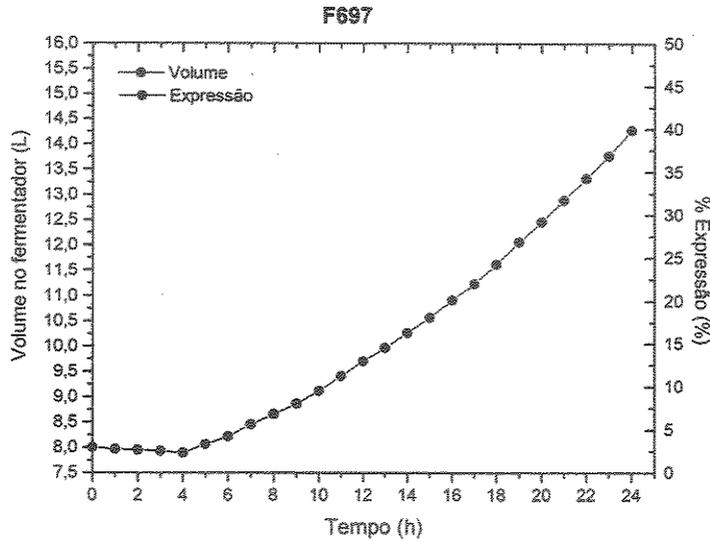


(A)

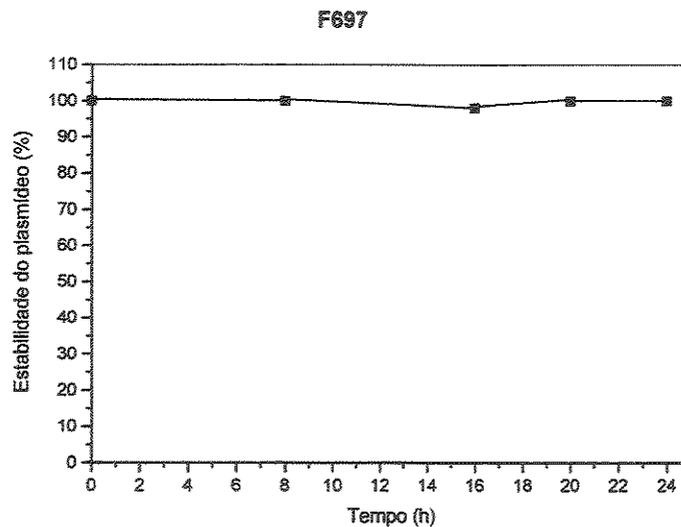
F697



(B)



(C)

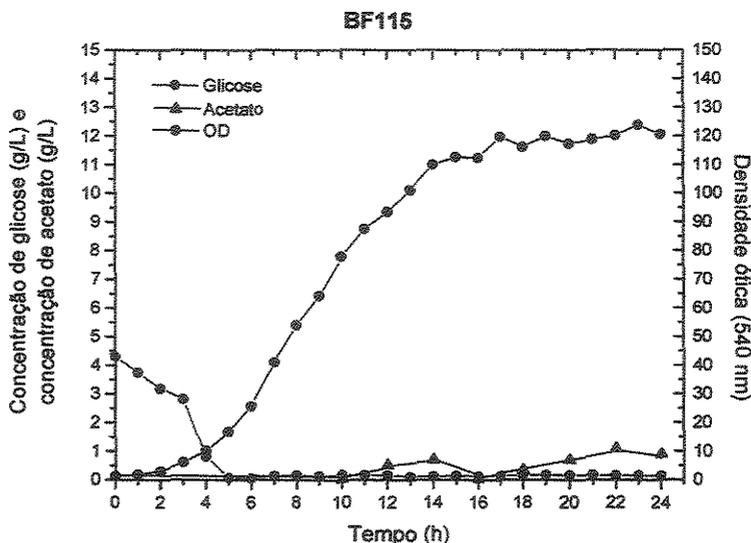


(D)

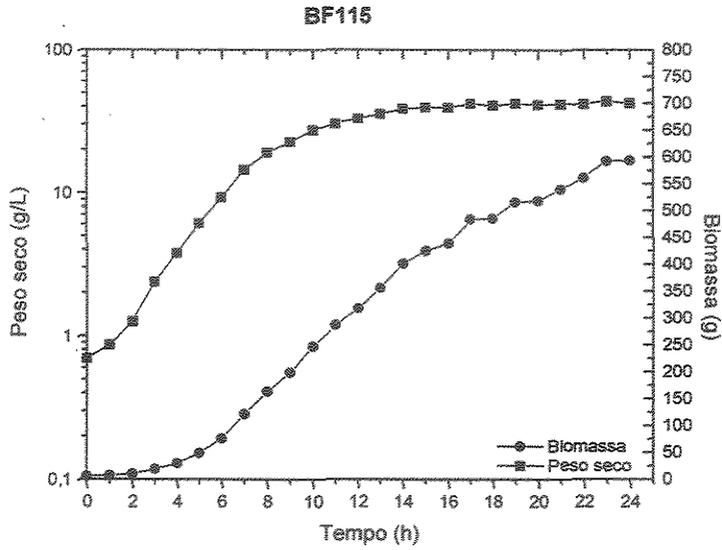
**Figura V.4** – Crescimento de *E. coli* K-12 N-4830-1 em fermentação batelada alimentada a 30 °C por 24 horas. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h). (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).

A Figura V.5 apresenta a cinética de crescimento para fermentação BF115 conduzida a 30 °C por 10 horas e a temperatura de 36 °C por 14 horas. Os

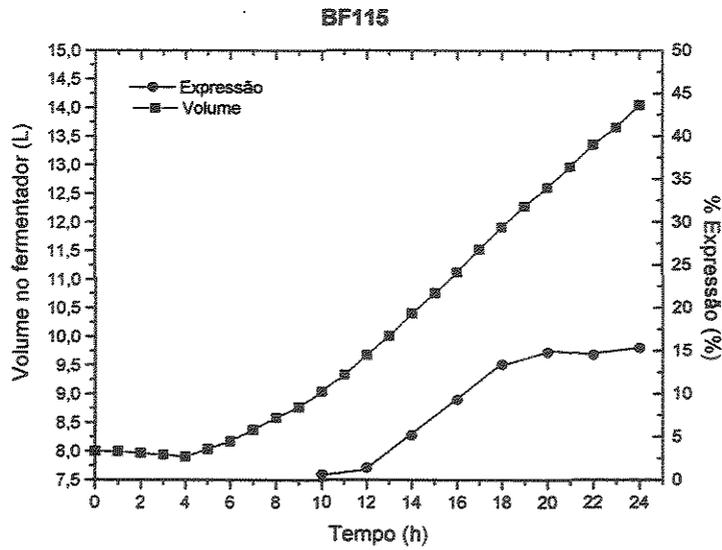
resultados obtidos para concentração final de peso seco de células foi 42,25 g/L. A glicose foi mantida limitante, entre 0,0 e 0,1 g/L e a concentração de acetato permaneceu próxima a zero durante o crescimento a 30,0 °C e atingiu 0,94 g/L no final da fermentação, indicando que a esta temperatura praticamente não há formação de acetato. Além disso, a fermentação a 36 °C demonstra que a estabilidade do plasmídeo permanece elevada, por volta de 100 %. Porém, a formação de proteína recombinante foi menor que a observada nas fermentações padrão, esse comportamento deve-se ao fato de que a 36 °C a proteína repressora termo-sensível continua parcialmente ativa, pois se encontra em uma faixa intermediária de inativação do gene repressor da indução. Sendo que, em análise microscópica, observou-se que nem todas as células apresentam corpos de inclusão [resultado não apresentado]. A percentagem de expressão da proteína de fusão foi de aproximadamente 15,0 %. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), o rendimento de células por substrato ( $Y_{X/S}$ ) e a produtividade em biomassa (P) foram, respectivamente,  $0,171h^{-1}$ ,  $0,344 g_{células}/g_{glicose}$  e  $1,308 g/L/h$ .



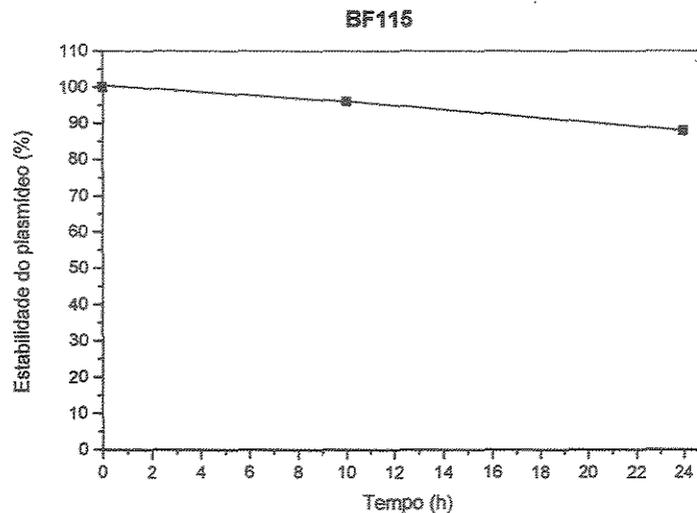
(A)



(B)



(C)



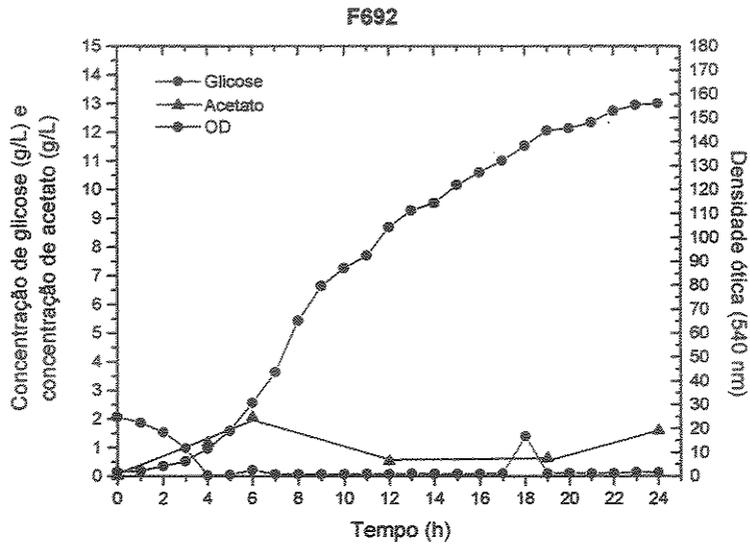
(D)

**Figura V.5** – Fermentação com crescimento a 30 °C por 10 horas e indução a 36 °C por 14 horas.

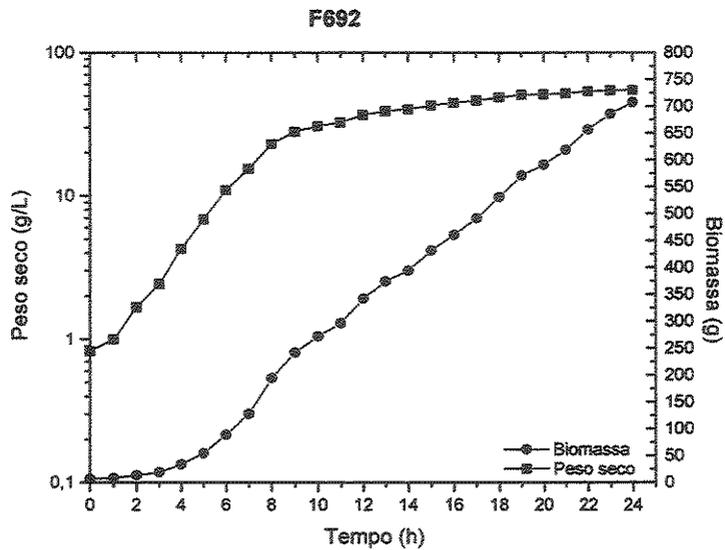
(A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se *E. coli*. (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).

A fermentação F692 foi conduzida a 30 °C por 2 horas e após esse tempo a temperatura foi elevada a 38 °C por 22 horas. A Figura V.6 apresenta as cinéticas de crescimento celular, consumo de glicose, formação de acetato, formação do produto e volume no fermentador. O resultado observado para concentração final de peso seco de células foi 54,6 g/L. A concentração de glicose foi mantida limitante, entre 0,0 e 0,1 g/L, a concentração de acetato atingiu 2,02 g/L no início da fermentação, provavelmente devido ao acúmulo de substrato em conjunto com a elevação da temperatura, alcançando 1,59 g/l de concentração final de acetato. A alta concentração final de biomassa mostra que a temperatura de 38 °C não afeta o crescimento celular. A expressão de proteína de fusão obtida nestas condições foi 17,0 % sugerindo que a expressão da proteína de fusão pode ser realizada a temperaturas entre 38 °C e 40 °C, com a vantagem de garantir valores mais elevados para a estabilidade do plasmídeo. A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ), o rendimento de células por substrato ( $Y_{X/S}$ ) e a produtividade

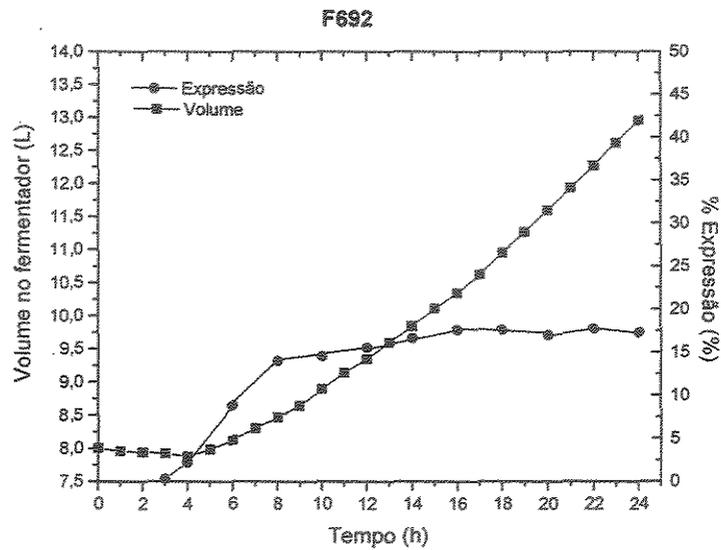
volumétrica em biomassa (P) foram, respectivamente,  $0,174 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,565 \text{ g células/g glicose}$  e  $1,690 \text{ g/L/h}$ .



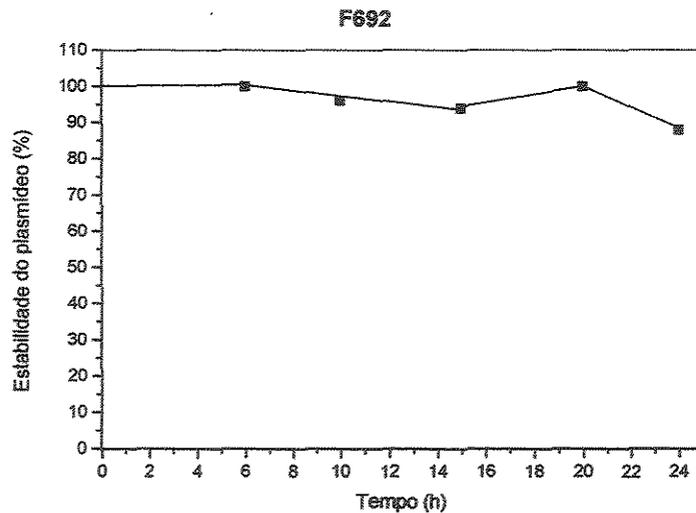
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figura V.6** – Fermentação com crescimento a 30 °C por 2 horas e indução a 38 °C por 22 horas. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h) em uma típica fermentação em batelada alimentada para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se *E. coli*. (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador e expressão da proteína recombinante versus tempo (h). (D) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).

Os experimentos permitem concluir que a estabilidade do plasmídeo pHis é mantida em valores da ordem de 100% em temperaturas de indução mais

baixas na ordem de 38 °C. Ao realizar-se a indução da proteína de fusão a 42,0 °C geralmente ocorrem perdas do plasmídeo pHis, o que pode acarretar em menor produtividade, devido ao menor número de células viáveis aptas a produção da proteína de interesse.

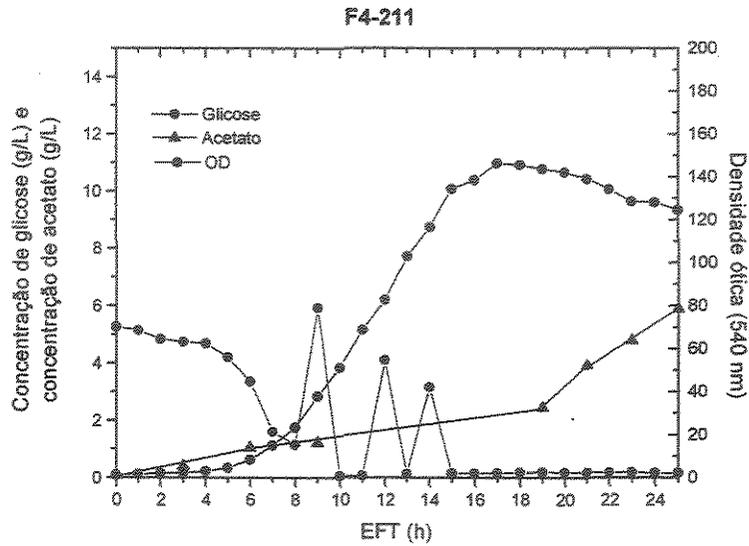
A formação de acetato é fortemente influenciada pelo aumento da temperatura de fermentação, corroborando o trabalho de Klemann e Strohl (1994). Contudo observando-se os resultados obtidos na fermentação a temperaturas de 38 °C, portanto próximas da temperatura ótima de crescimento da *Escherichia coli*, concluiu-se que é possível haver crescimento celular e boa expressão da proteína recombinante sem a perda de plasmídeos, desde que sejam observadas as seguintes condições: pH mantido em 6,80, concentração de oxigênio dissolvido acima de 20 % de saturação e concentração de glicose abaixo de 0,1 g/L.

Contudo, observando os resultados obtidos para a expressão de proteína de fusão obtidos na fermentação a 36 °C, pode-se concluir que a esta temperatura não apresentou resultados satisfatórios para expressão da proteína de fusão, pois se encontra em uma faixa intermediária de desativação do gene repressor da indução, sendo que, em análise microscópica, observa-se que nem todas as células apresentam corpos de inclusão (dados não mostrados). A 38 °C, todas as células apresentam corpos de inclusão bem definidos, os valores obtidos para expressão foram sugestivos, provavelmente devido à estabilidade do clone ser próxima a 100%. As concentrações finais de biomassa, em fermentações induzidas a temperaturas mais baixas que 40 °C, foram maiores que a apresentada na fermentação controle. Este comportamento pode ser atribuído a temperatura ótima de crescimento da *E. coli* ser 37 °C, favorecendo a formação de biomassa.

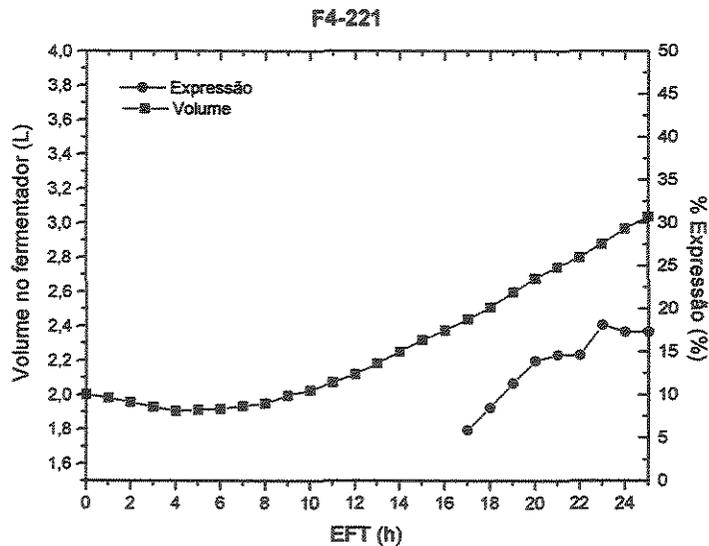
### V.2.2– Efeito das oscilações na concentração de glicose no meio de fermentação

Todos os experimentos foram realizados em fermentador BioFlo IV (NBS) com capacidade máxima de 20,0 L. O experimento foi realizado a 30 °C e, depois, a termo-indução foi realizada elevando-se a temperatura de cultivo para 42 °C durante 8 horas, mantendo a concentração de glicose limitante na fase batelada-alimentada entre 0,0 e 0,1 g/L. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em níveis acima 20% e o pH foi mantido a 6,80.

A Figura V.7 mostra o resultado de cultivo de *E.coli* recombinante em altas densidades celulares em um processo batelada-alimentada. Neste experimento, a adição de glicose foi realizada por pulsos na fase de crescimento, causando oscilações na concentração de glicose na cultura. Na fase de indução térmica a adição de glicose foi realizada de maneira que a concentração do substrato manteve-se limitante. As concentrações de acetato observadas foram 1,22 g/L, na fase de crescimento, e 5,89 g/L na fase de termo-indução. A concentração celular alcançou 51,2 g/L no término da fase de crescimento e recuou a 43,6 g/L no final da fase de indução. A estabilidade do plasmídeo permaneceu em 100% durante toda a fase de crescimento e apresentou uma ligeira queda no final da fase de indução, chegando a 64%. A quantidade de proteína de fusão encontrada neste experimento foi 17,3 % da proteína total.



(A)



(B)

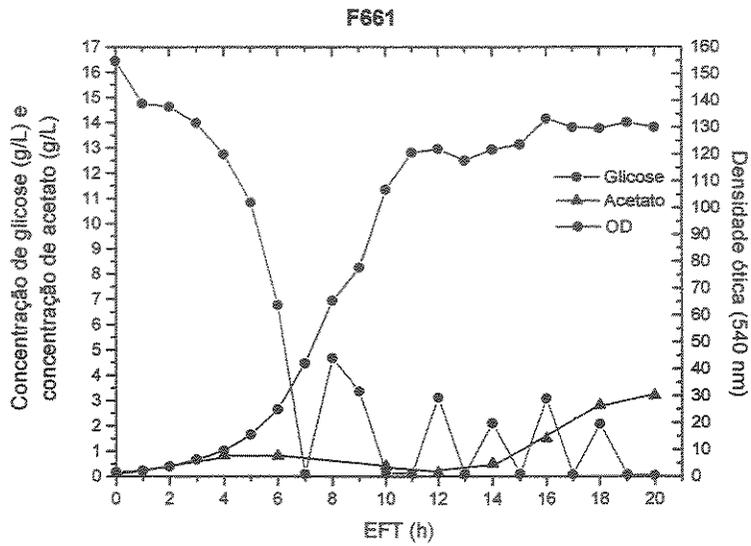
**Figura V.7** – Perfil de cultivo em batelada-alimentada para altas densidades celulares de *E coli* recombinante. Crescimento a 30 °C por 17 horas adicionando glicose por pulsos e indução térmica a 40 °C por 8 horas com adição de glicose limitante. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h).

Observou-se que o excesso de glicose propicia o crescimento celular, aumentando a taxa específica de crescimento, contudo acarretou também a formação de acetato. Ao que tudo indica, com a limitação do substrato na fase de

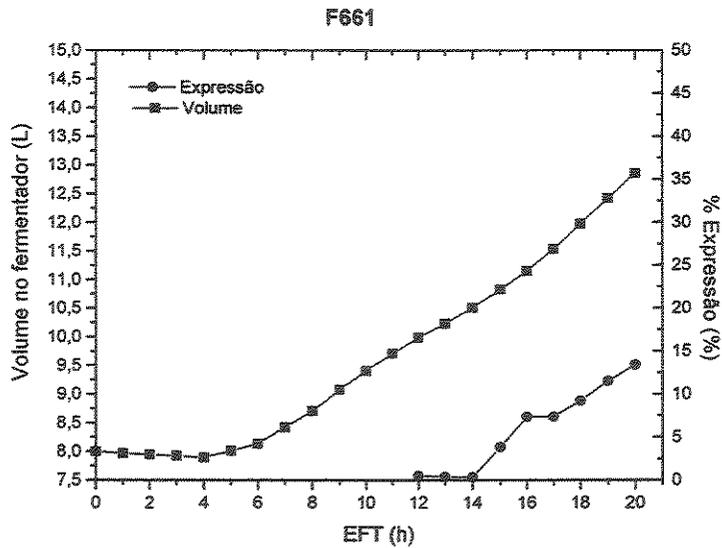
indução diminuiu-se a velocidade de formação do acetato. Por esse fato, pôde-se observar que a formação da proteína quase não foi prejudicada.

O experimento apresentado na Figura V.8 demonstra o resultado do cultivo em batelada-alimentada, no qual a adição de glicose inicia-se ao término da glicose inicial presente no meio de cultura e foi realizada em pulsos durante toda a fermentação, inclusive durante a fase de indução térmica, proporcionando oscilações na concentração de glicose no meio fermentativo durante todo o processo. A concentração de acetato foi 0,645 g/L na fase de crescimento, enquanto que no final da fase de indução térmica alcançou 5,45 g/L. A concentração celular final obtida foi 45,52 g/L. A estabilidade do plasmídeo permaneceu 100 % enquanto o cultivo foi mantido a 30 °C e sofreu uma queda no final da fase de indução térmica para 80 %. A porcentagem de expressão da proteína de fusão foi 13,4% da proteína total obtida.

A baixa expressão da proteína de fusão pode ser creditada a inibição exercida pelo acetato produzido durante a fermentação em conjunto com o excesso de glicose na fase indutiva. A alta concentração de acetato, segundo a bibliografia, é resultado do excesso de substrato no meio de fermentação. Também, nessas fermentações realizadas com excesso de glicose observou-se um aumento na taxa específica de crescimento, devido à não limitação pelo substrato na fase de crescimento. Já na fase de indução, a taxa específica de crescimento diminuiu drasticamente, como resultado do aumento da temperatura de cultivo para 42 °C.



(A)



(B)

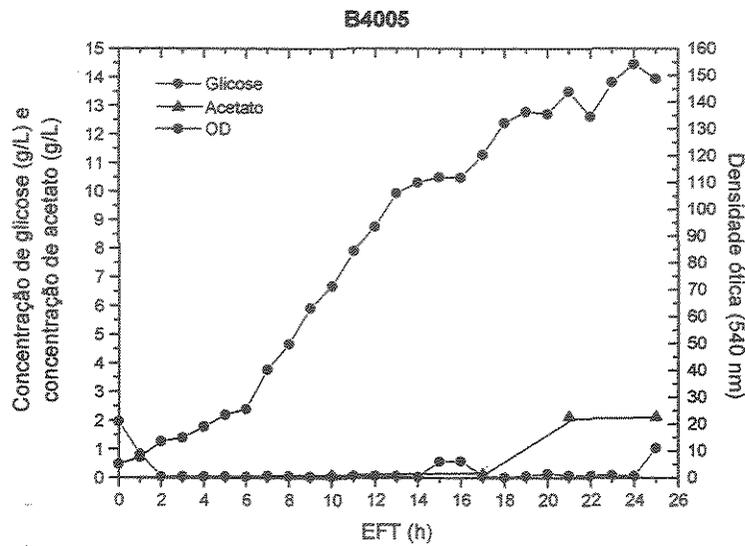
**Figura V.8** – Perfil de cultivo em batelada-alimentada de *E. coli* recombinante. Crescimento a 30 °C por 12 horas e termo-indução a 42 °C por 8 horas adicionando glicose por pulsos. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h).

### V.2.3– Efeito das oscilações na concentração de oxigênio dissolvido.

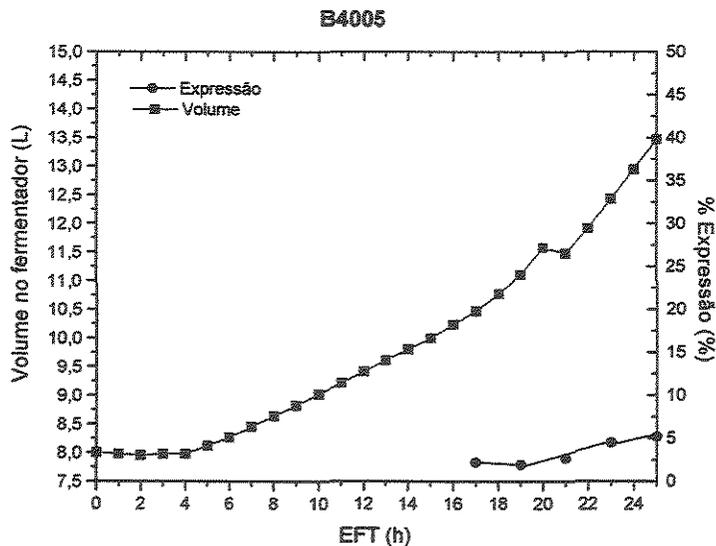
Os experimentos foram realizados em fermentador BioFlo IV (NBS) com capacidade máxima de 20,0 L. O experimento foi realizado a 30 °C durante 17 horas e, depois, a termo-indução foi realizada elevando-se a temperatura de cultivo para 42 °C durante 8 horas, mantendo a concentração de glicose limitante na fase batelada-alimentada entre 0,0 e 0,1 g/L. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em níveis acima de 20% e o pH foi mantido a 6,80.

A Figura V.9 mostra o resultado de cultivo de *E.coli* recombinante em altas densidades celulares em um processo batelada-alimentada. Neste experimento, a batelada-alimentada inicia-se ao término da glicose inicial do meio de cultivo. A adição de glicose foi realizada pelo método pH-Stat, no intuito de manter a fonte de carbono limitante no meio de cultura.

A concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação sofreu variações pela manipulação dos fluxos volumétricos de ar e oxigênio puro em um misturador de gases. Sob essas condições, a concentração de acetato alcançou 0,63 g/L em 17 horas na fase de crescimento. Enquanto que, na fase de indução térmica, a concentração de acetato observada foi 2,12 g/L após 8 horas. A concentração celular aumentou exponencialmente alcançando 45,0 g/L. A estabilidade do plasmídeo permaneceu em 100% durante toda a fase de crescimento e apresentou um ligeira queda no final da fase de indução, chegando a 70%. A quantidade de proteína de fusão encontrada neste experimento foi 5,2 % da proteína total.



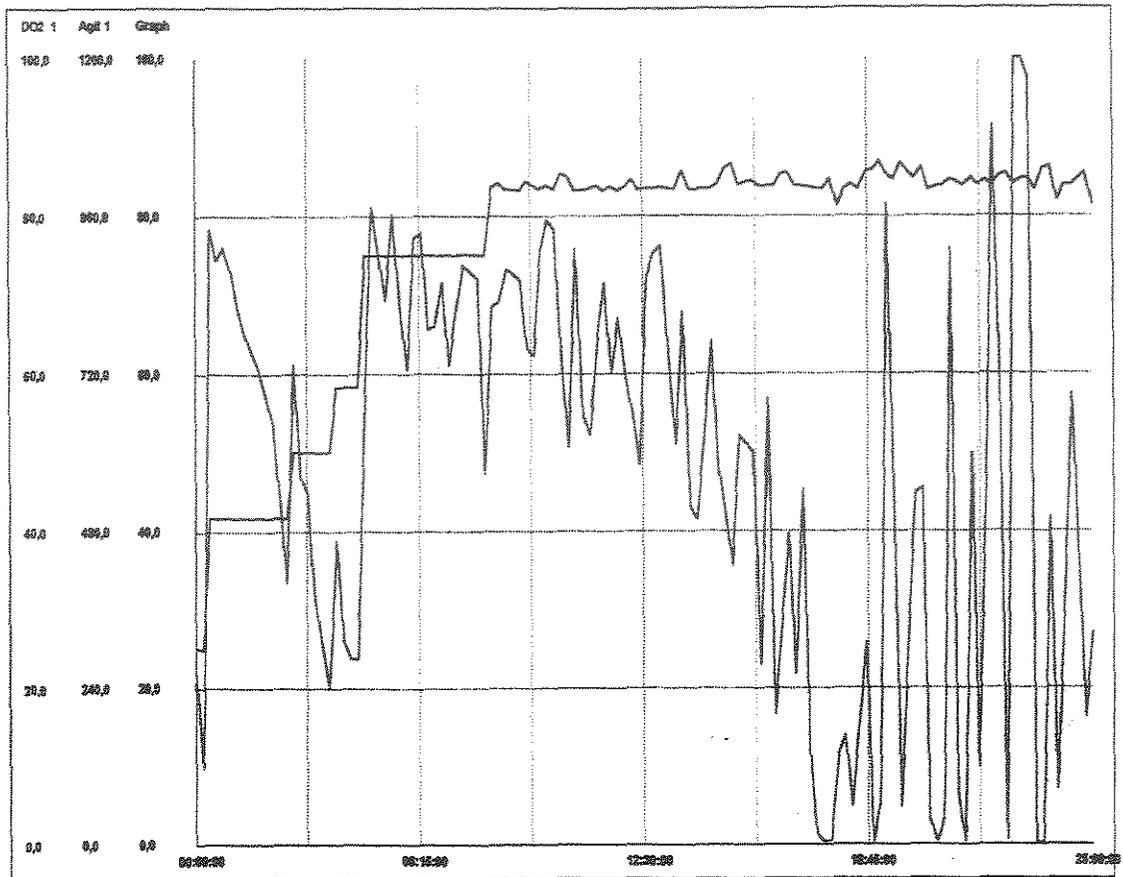
(A)



(B)

**Figura V.9** – Cultivo batelada-alimentada em alta densidade celular de *E coli* recombinante com adição limitante de glicose e oscilações na concentração de oxigênio dissolvido no meio de fermentação. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h). (B) Volume no fermentador e expressão da proteína de fusão versus tempo (h).

Figura V.10 mostra o perfil da concentração de oxigênio dissolvido no experimento relatado.



**Figura V.10** – Perfil de concentração de oxigênio dissolvido em cultivo batelada-alimentada de *E coli* recombinante, adição limitante de glicose. Fermentação B4005

Este experimento demonstrou que oscilações na concentração do oxigênio dissolvido no meio de fermentação influenciam negativamente tanto o crescimento celular quanto na formação da proteína de fusão, deixando evidente que o controle acurado do oxigênio dissolvido é primordial para o bom andamento do processo fermentativo industrial. Esse tipo de controle deve ser exercido pela observação da agitação, da aeração, de enriquecimento do ar com oxigênio puro e até pela técnica utilizada para suprimento dos nutrientes.

### V.2.4– Efeito do tipo de Turbina

As fermentações com alta densidade são freqüentemente processos realizados em sistemas de duas fases gás-líquido com viscosidade crescente devido ao crescimento celular. Esses processos necessitam de boa mistura para homogeneização do meio de fermentação e para aumentar a capacidade de transferência de massa durante o processo. A turbina modelo Rushton é universalmente utilizada em fermentações industriais, devido a elevada turbulência que provoca, facilitando com isso a transferência de oxigênio. Contudo a turbina Rushton apresenta alguns inconvenientes, tais como:

- a) Movimento radial do fluido induzindo a formação de zonas de estagnação.
- b) Elevada demanda de potência, exigindo instalação de motores de elevada potência.

Ao longo da última década, novos tipos de turbina foram desenvolvidos, exercendo elevada movimentação axial do fluido no interior do reator, isto é, aumenta-se o efeito de bombeamento reduzindo a formação de zonas de estagnação ou de baixa concentração de oxigênio dissolvido. Alguns exemplos destes tipos de turbina são as turbinas Scaba, Prochen e Lightnin. A potência absorvida por essas turbinas é sensivelmente menor quando comparadas à turbina Rushton exigindo, portanto, uma menor potência instalada.

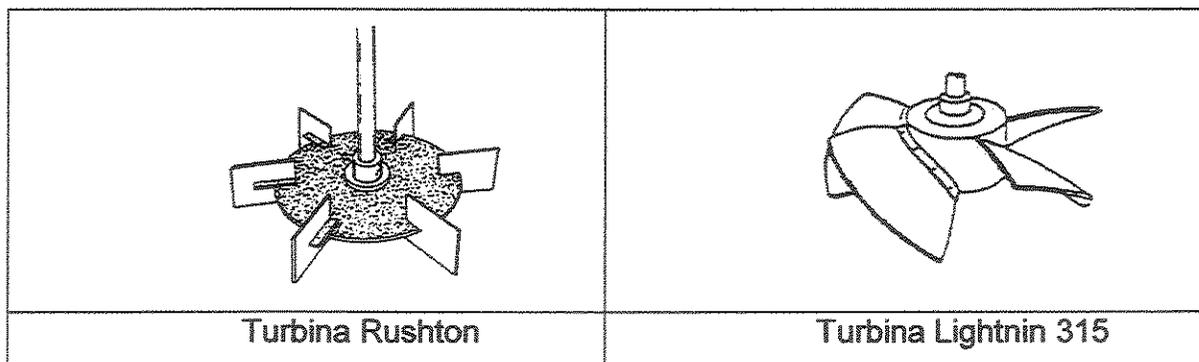


Figura V.11 – Tipos de turbinas

Para avaliar o efeito da utilização de turbinas Rushton e/ou Lightnin 315 isoladamente ou em combinação sobre o desenvolvimento do processo fermentativo foram propostos alguns experimentos cujos resultados são apresentados na Tabela V.2.

As fermentações foram conduzidas em igualdade de condições, mantendo-se as características e condições de operação apresentadas para a fermentação padrão. As disposições das turbinas são apresentadas de maneira que a turbina alocada na parte superior do eixo encontra-se do lado esquerdo da sigla. Por exemplo, LLR, significa duas turbinas Lightnin 315 na parte superior e uma turbina Rushton na parte inferior.

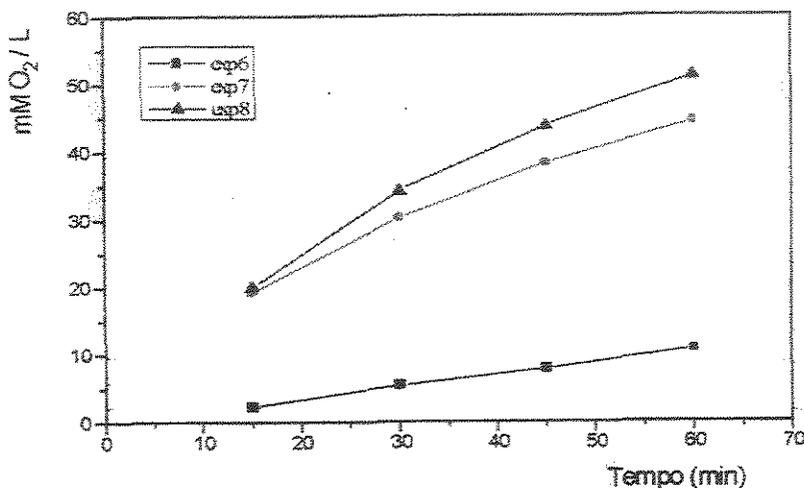
**Tabela V.2** – Resultado médio do efeito da disposição das turbinas sobre o crescimento celular e a expressão da proteína de fusão.

Disposição das turbinas	Biomassa (g células)	$Y_{x/S}$ (g células / g glicose)	Expressão (%)
RRR	565,1	0,354	7,5
LRR	574,4	0,341	11,9
LRL	367,4	0,922	12,0
LLR	480,7	0,619	13,7

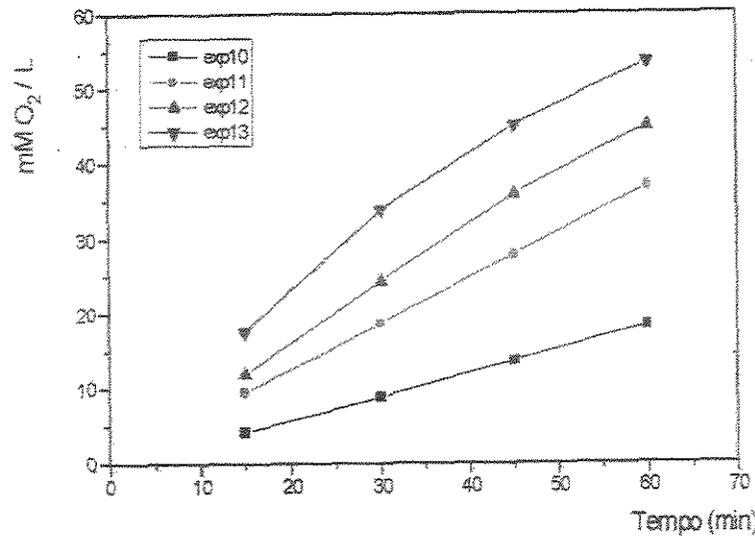
Esses resultados demonstraram que apesar das turbinas Rushton apresentarem melhor transferência de oxigênio devido a elevada turbulência, as turbinas Lightnin 315 apresentam resultados melhores sob condições de fermentação, principalmente quando instaladas na parte superior, pois apresenta efeitos de menor formação de espuma e de zonas de estagnação no interior.

### V.2.5– Efeito da pressão interna do fermentador.

Para avaliar o efeito da pressão em cúpula sobre a fermentação foram realizados experimentos de transferência de oxigênio empregando a técnica da oxidação do bissulfito de sódio de Fernstrom e Cooper (1944). Esses experimentos indicativos foram realizados no fermentador LH210 (12 Litros) da Inceltech com três turbinas Rushton. Os resultados obtidos foram apresentados nas Figuras V.12 e V.13. Pôde-se observar que com o aumento da pressão em cúpula para 0,2; 0,4 e 0,8 bar a transferência de oxigênio foi incrementada em até 3 vezes, superando os 50 mM O<sub>2</sub>/L/min.



**Figura V.12** – Efeito do enriquecimento do ar com oxigênio puro e P = 0,0 bar. Exp6 – V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 7 e 8 – V<sub>AR</sub> = 0,25 L/L/min e V<sub>O<sub>2</sub></sub> = 0,25 L/L/min.



**Figura V.13** - Efeito do aumento da pressão em cúpula sobre a transferência de oxigênio. Exp10 - P = 0,0 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 11 - P = 0,2 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min. Exp 12 - P = 0,4 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min e Exp 13 – P = 0,8 bar e V<sub>AR</sub> = 0,5 L/L/min.

Diversas fermentações foram conduzidas em diferentes condições de pressão, com e sem enriquecimento do ar com oxigênio e mantendo-se os parâmetros seguidos para condução da fermentação padrão, demonstrou que, sob certas condições de pressão e concomitante enriquecimento do ar com oxigênio, resultou em significativos aumentos da expressão da proteína de fusão.

A Tabela V.3 apresenta os resultados obtidos nos experimentos de aumento da pressão em cúpula.

**Tabela V.3** - Efeito da pressão em cúpula e aeração com e sem adição de oxigênio puro sobre o crescimento celular e a expressão da proteína de fusão

Pressão (Bar)	Aeração		Biomassa obtida (g células)	Y <sub>x/s</sub> (g células / g glicose)	Expressão (%)
	Oxigênio (L/min)	Ar (L/min)			
0,0	0	10	371,5	0,842	9,7
0,4	0	10	416,1	0,529	10,0
0,8	0	10	367,4	0,922	7,7
0,0	5	5	480,7	0,619	19,3
0,4	5	5	539,4	0,563	22,7

Observando os resultados apresentados na Tabela V.3, conclui-se que o enriquecimento do ar com oxigênio puro é fundamental para a expressão da proteína de fusão. Nos experimentos com o aumento da pressão em cúpula observa-se que a pressão 0,8 bar foi bastante prejudicial a fermentação tanto no crescimento celular quanto na expressão da proteína de fusão, devido ao desequilíbrio no controle do pH. Nestas condições ocorre a solubilização do gás carbônico no meio de fermentação formando ácido carbônico, o que resultou no abaixamento do pH, reduzindo o consumo de substrato via pH-Stat e a expressão da proteína de fusão. A pressão interna do fermentador pode ser elevada até o limite de 0,4 bar sem efeito prejudicial ao processo fermentativo.

## CAPÍTULO VI

## FERMENTAÇÃO BATELADA-ALIMENTADA REPETIDA

## VI.1 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada repetida

De maneira análoga aos processos batelada-alimentada, as fermentações com cortes foram realizadas com três tipos de adição de nutrientes, sendo eles: Feed1 que consiste na adição programada de uma solução de extrato de levedura a 20% e  $MgSO_4$ ; Feed2 que consiste na adição de uma solução de glicose a 70% e o terceiro tipo é a adição de solução de  $NH_4OH$  (5N) para acerto do pH.

A adição de glicose 70% (Feed2) foi realizada por glucose-loop (pH-stat), ou seja, este nutriente foi considerado o substrato limitante da fermentação e foi adicionado para o acerto do pH após o esgotamento da glicose inicial do meio de fermentação, sempre que esta variável tendesse a um valor maior que 6,80. As adições de extrato de levedura (Feed 1) obedeceram a Tabela VI.1

**Tabela VI.1** – Vazões do meio de alimentação designado como “feed1” para os diferentes fermentadores.

EFT(h)	LH210 – 12 Litros	Bioflo IV
4	120 mL/h	120 mL/h
6	150 mL/h	150 mL/h
9	210 mL/h	210 mL/h

As fermentações com cortes foram iniciadas como uma fermentação batelada-alimentada. Após 12 horas de cultivo parte do meio fermentativo foi coletada, de maneira que um litro do meio de cultivo foi deixado no vaso como inóculo para a nova etapa do cultivo. Imediatamente após a retirada do meio, uma nova quantidade de meio de fermentação estéril é adicionada ao fermentador assepticamente, de modo que o volume inicial do primeiro ciclo da fermentação

seja atingido, bem como as concentrações iniciais do meio de cultura. Esse processo é repetido indefinidamente.

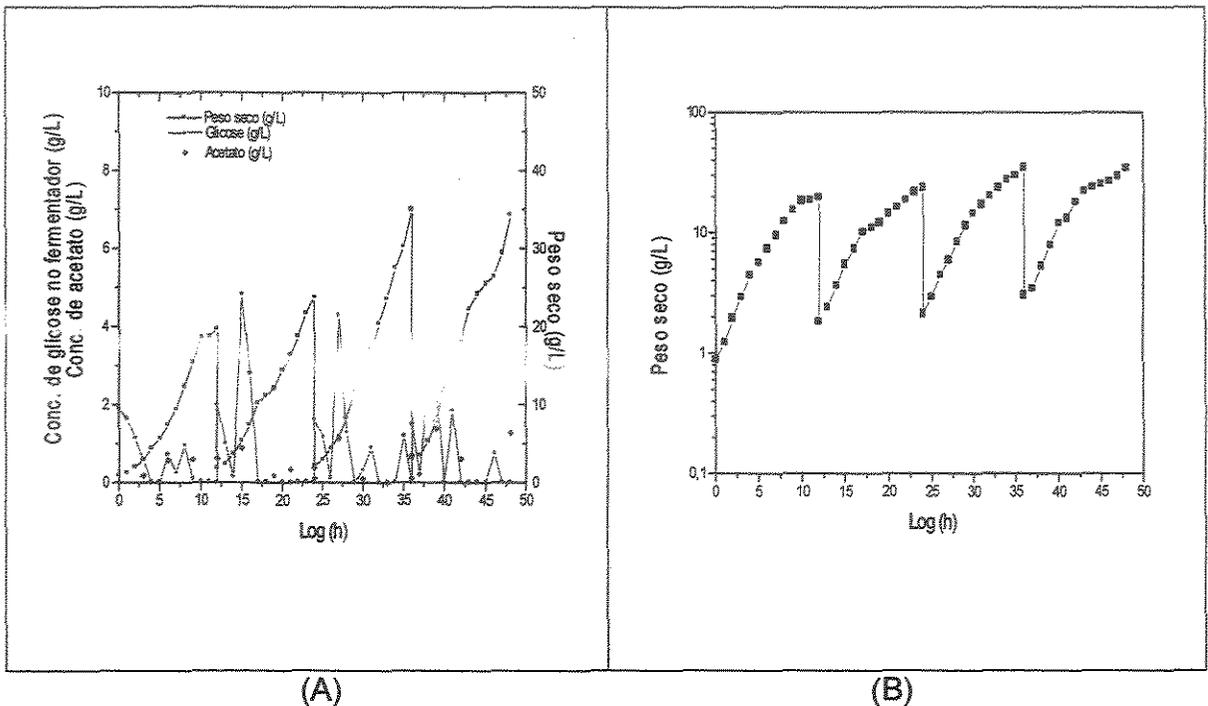
## VI.2 – Resultados

As fermentações com cortes foram preparadas de modo análogo às fermentações batelada alimentada com retomada do processo a cada 12 horas de fermentação. A fermentação apresentada na Figura VI.1 foi conduzida a 30 °C, ou seja, somente na fase de crescimento celular, sem promover a indução da proteína de fusão. Ao final de cada ciclo da fermentação procedeu-se uma retirada do caldo de fermentado (corte) e adição do meio novo de fermentação e estéril até atingir-se o volume do ciclo inicial da fermentação, iniciando-se assim outra fase fermentativa.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura VI.1. Pode-se observar que existe uma pequena formação de acetato e que logo após o corte a concentração de acetato diminui drasticamente devido a sua diluição no novo meio de fermentação. Em consequência desta diluição, da adição de novos nutrientes, da diminuição da concentração celular e da diluição de outros produtos metabólicos resultantes do ciclo anterior da fermentação, o crescimento celular foi retomado sem inibição aparente, resultando em uma curta fase lag. Observa-se que o novo ciclo fermentativo foi pouco influenciado pelas condições do ciclo anterior. Sugerindo que novas fermentações podem ser feitas com retiradas de fermentado e adição de meio novo, tornando o processo pseudocontínuo.

Os testes de estabilidade não apresentaram variação significativa para as amostras retiradas antes e logo após o corte reforçando a tese de que sucessivos cortes não prejudicam a fisiologia da bactéria. Para corroborar esta tese, foram realizados testes em frascos Erlenmeyers com sucessivas passagens. Os frascos eram inoculados e cresciam durante aproximadamente 14 horas e depois parte de fermentado era retirada assepticamente do frasco e adicionada a outro frasco com meio novo, de maneira a reproduzir a fermentação com cortes. O resultado foi que

em 8 passagens, sempre a 30 °C, não foi observada queda na estabilidade dos plasmídeos (resultados não apresentados).



**Figura VI.1–** (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo (h) em fermentação com cortes, apenas com adição de glicose 70% e 10,0 g/l de YE inicial. (sem indução). (B) Peso seco (g/l) versus tempo (h).

Os resultados experimentais apresentados na Figura VI.2 demonstraram claramente que, ao retirar após 12 horas de fermentação aproximadamente 8,0 L de fermentado (aproximadamente 90% do volume do final do fermentador) e adicionando 7,0 L de meio Jung novo (90% do volume inicial do novo ciclo fermentativo), as células encontravam-se metabolicamente ativas e capazes de continuar a fase de crescimento. Ou seja, não há variação significativa na taxa específica de crescimento em cada ciclo fermentativo e, portanto, a velocidade de formação horária da biomassa tende a manter-se constante nos diferentes ciclos fermentativos.

Tabela VI.2 - Dados experimentais da fermentação com cortes a 30°C.

	Peso Seco (g/L)	Volume Coletado (L)	Biomassa Coletada (g)	Estabilidade do plasmídeo (%)	Tempo de fermentação (h)
1º corte	19,63	7,9	155,1	100	12
2º corte	23,76	7,1	168,7	100	12
3º corte	25,51	8,5	216,8	98	12
4º corte	34,35	9,4	322,9	100	12
Total		32,9	863,9		48

A partir dos dados experimentais apresentados, na Tabela VI.2, a conclusão mais importante foi à demonstração da viabilidade da fermentação de insulina recombinante com a *E.coli* utilizando a técnica de cortes parciais.

### VI.2.1 – Efeito da fase de indução

Os experimentos preliminares das fermentações batelada-alimentada com cortes parciais sem indução mostraram a possibilidade de obtenção de um significativo aumento na biomassa obtida. O rendimento de processos fermentativos com microorganismos recombinantes expressando proteína quimérica sob a forma de corpos de inclusão é estritamente ligado à quantidade de biomassa celular obtida, desde que a expressão da proteína de fusão acompanhe também a formação de biomassa.

O principal ponto a ser estudado foi o tempo de crescimento ótimo a 30 °C e o período de indução a 42 °C, de tal modo a que o processo fermentativo seja o mais produtivo possível tanto para obtenção de biomassa quanto para expressão de proteína de fusão. No desenvolvimento do processo com cortes, fixamos o tempo de fermentação em 24 horas para facilitar tanto a comparação com o processo batelada-alimentada tradicional, quanto à implementação em processos industriais.

Várias combinações de tempos de crescimento a 30 °C e indução a 42 °C foram estudadas, sendo que a mais promissora foi à combinação com 7 horas

para a fase de crescimento, seguida de 5 horas da fase de indução e retirada de 80% do volume acumulado, conforme resultados apresentados nas Tabelas VI.3, VI.4 e VI.5.

A Tabela VI.3 apresenta os resultados experimentais finais obtidos no primeiro ciclo da fermentação batelada-alimentada repetida, enquanto que a Tabela VI. 4 refere-se aos dados obtidos ao final do segundo corte.

A Tabela VI.5 demonstra o resumo dos resultados experimentais das fermentações com cortes parciais comparando-as com as fermentações padrão apresentada na Tabela V.2.

**Tabela VI.3 - Resultados experimentais das fermentações com cortes parciais: 1º Corte**

1º Corte								
	Horas de cultivo (h)		Volume Retirado (L)	Peso Seco (g/L)	Biomassa Formada (g)	Expressão (%)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	μ (h <sup>-1</sup> )
	30 °C	42 °C						
F464	7	5	8,3	46,2	383,4	21,9	0,673	0,345
F465	7	5	8,3	36,4	302,1	13,8	0,766	0,330
F565	7	5	7,9	33,5	264,6	13,7	0,503	0,329
F596	7	5	7,4	30,0	222,5	14,1	0,451	0,316
F568	7	7	10,5	41,7	438,0	9,9	0,430	0,301
F566	5	7	8,3	22,7	189	6,2	0,479	0,285
F567	5	8	9,1	30,9	281	7,6	0,366	0,300
F597	9	5	8,6	40,9	352,2	7,2	0,480	0,287
F564	10	7	11,5	42,5	488,6	14,9	0,392	0,243
Média			8,9	36,1	324,6	12,1		

Fermentação batelada-alimentada repetida

Tabela VI.4 - Resultados experimentais das fermentações com cortes parciais: 2º Corte

2º Corte								
	Horas de cultivo (h)		Volume Retirado (L)	Peso Seco (g/L)	Biomassa Formada (g)	Expressão (%)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	μ (h <sup>-1</sup> )
	30 °C	42 °C						
F464	7	5	10,26	46,3	474,4	22,3	0,467	0,089
F465	7	5	10,87	55,7	605,6	20,4	0,687	0,125
F565	7	5	13,58	44,6	606,0	14,3	0,549	0,107
F596	7	5	13,82	57,2	794,3	21,2	0,567	0,119
F568	7	7	15,36	45,9	705,3	15,8	0,449	0,088
F566	5	7	13,51	38,1	514,6	11,9	0,386	0,183
F567	5	8	13,65	35,6	485,4	19,2	0,352	0,094
F597	9	5	11,85	36,5	433,0	19,2	0,723	0,106
F564	10	7	15,22	37,5	570,0	7,5	0,491	0,057
Média			13,12	44,15	576,0	16,2		

Tabela VI.5 - Resumo dos resultados experimentais das fermentações com cortes parciais

	Horas de cultivo (h)		Volume Retirado (L)	Biomassa Formada (g)	Incremento em biomassa (%)	Produtividade Volumétrica (g/L/h)	Incremento Produtividade (%)
	30 °C	42 °C					
Controle	17	8	12	614,1	100	2,047	100
F464	7	5	18,56	858,1	140	1,926	101
F465	7	5	19,17	907,7	148	1,973	103
F565	7	5	21,48	870,1	142	1,688	94
F596	7	5	21,23	1016,8	166	1,995	104
F568	7	7	25,86	1143,3	186	1,579	92
F566	5	7	21,81	703,4	114	1,344	70
F567	5	8	22,75	766,4	125	1,296	69
F597	9	5	20,45	785,2	128	1,371	75
F564	10	7	26,72	1058,6	172	1,165	63
Média			22,00	901,1	147	1,593	86

O rendimento médio em biomassa formada nas fermentações com cortes parciais foi 47,0 % maior que o apresentado na fermentação controle, quando não são considerados os tempos de preparo do fermentador e de fermentação, o que corrobora os resultados observados na Figura VI.1. Porém, quando se compara a produtividade volumétrica obtida nestas fermentações, observa-se que há uma diminuição de 14 %. A produção de biomassa foi maior devido exclusivamente ao maior volume de fermentado no mesmo período de tempo e não devido ao aumento da taxa de formação de biomassa que, ao contrário, sofreu leve diminuição. A exceção à queda da produtividade foi observada nas fermentações realizadas com 7 horas de crescimento e 5 horas de indução. A média de aumento de biomassa formada em 24 horas foi aumentada em 49% e a produtividade volumétrica manteve-se estável. Em outras palavras, manteve-se a taxa de formação de biomassa e aumentou-se o volume trabalhado no mesmo período de tempo.

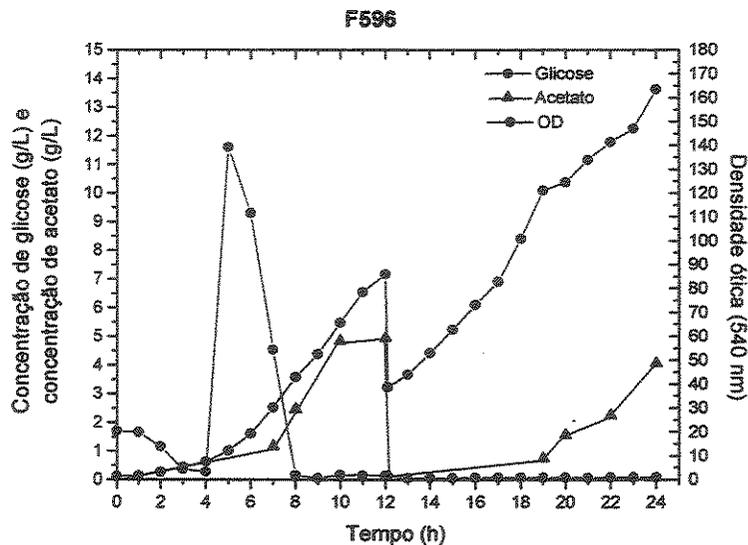
A diminuição da produtividade volumétrica em fermentações batelada-alimentada em um único estágio foi influenciada pela diminuição do valor da taxa específica de crescimento observada no segundo ciclo. Essa diminuição pode ser resultado das variações bruscas da temperatura de cultivo realizadas para proceder à indução no primeiro ciclo e conseqüente redução da temperatura para 30 °C no início do segundo ciclo da fermentação. Acarretando, inclusive, variações na estabilidade do plasmídeo, conforme será enfatizado mais adiante.

Pode-se observar também que os níveis de expressão da proteína de fusão são mais baixos que os obtidos em fermentações batelada alimentada tradicional, nas quais a fase de indução foi realizada por 8 horas e em concentrações mais elevadas. Contudo o rendimento em proteína de fusão é aumentado devido ao aumento da biomassa.

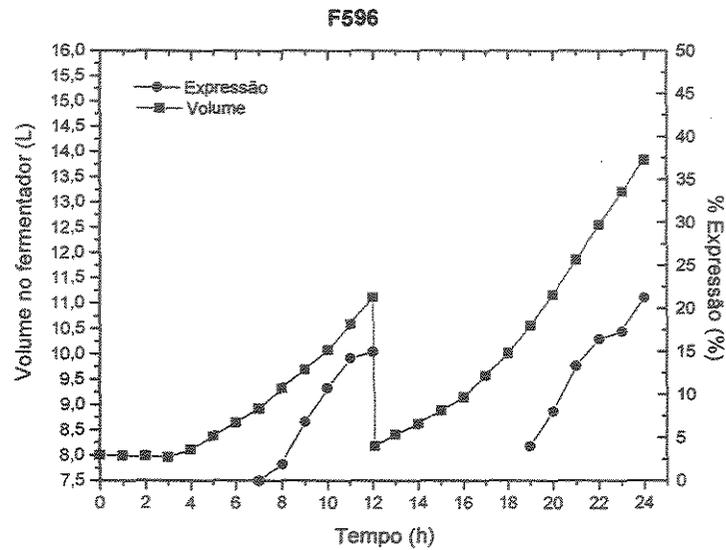
A Figura VI.2 mostra o comportamento típico de fermentações com cortes, e com indução a 42 °C. A fase de crescimento foi realizada por 7 horas e a fase de indução por 5 horas, nas mesmas temperaturas utilizadas para as fermentações padrão. Ao final da primeira indução foi realizada a retirada de 7,9L, deixando-se 1,0 L do caldo fermentativo no bioreator para inoculo e, imediatamente após a

retirada adicionou-se 7,0 L de meio novo e a fermentação foi novamente retomada com temperatura de crescimento a 30 °C por 7 horas e temperatura de indução a 42 °C por 5 horas. Neste gráfico pode-se observar o significativo aumento na concentração de acetato durante a indução. A justificativa para a maior formação de acetato é a mesma para as fermentações batelada alimentada tradicional, ou seja, o aumento da temperatura propiciou a formação de acetato, pois os outros parâmetros da fermentação pH e concentração de oxigênio dissolvido foram mantidos constantes.

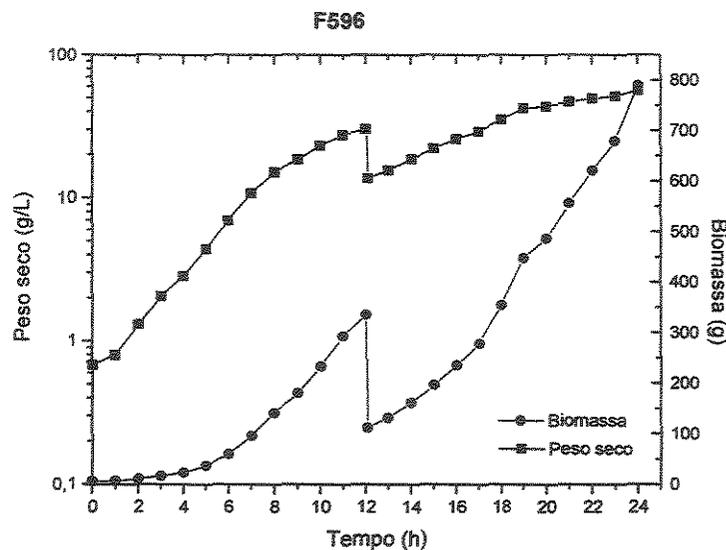
Nesta configuração de tempo de crescimento e indução, respectivamente, 7 e 5 horas, observou-se que o rendimento em biomassa e o rendimento em proteína de fusão foram incrementados em 49%. Sendo que no primeiro corte tanto a concentração celular quanto a expressão da proteína de fusão são menores que aquelas obtidas durante o segundo ciclo.



(A)



(B)



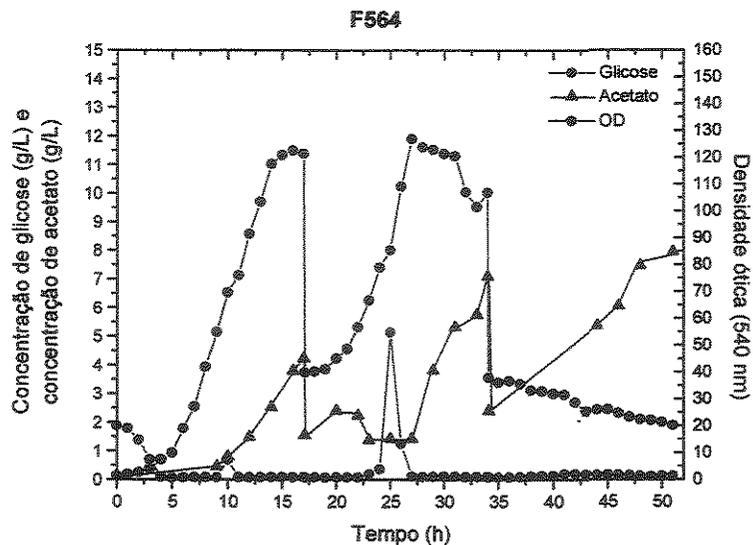
(C)

**Figura VI.2-** Ferm. com cortes com 7 horas de crescimento e 5 horas de indução. (A) Concentração de glicose (g/l), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo de fermentação (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Volume no fermentador (L) e expressão da proteína de fusão (%) versus tempo (h) e (C) Peso seco (g/l) e biomassa formada (g) versus tempo (h).

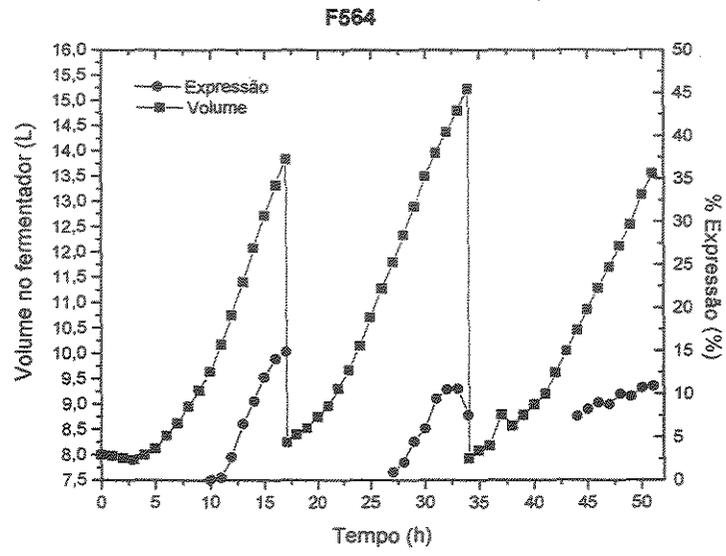
A decisão de fazer um único corte e do tempo de fermentação ficar limitado a 24 horas deixou pouca margem de manobra, mas diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que os tempos de cultivo apresentados na Figura VI.3 foram os que apresentaram os melhores resultados. Porém, as fermentações

feitas com indução apresentaram uma fase-lag mais prolongada, devido provavelmente a queda da estabilidade do plasmídeo no final de cada etapa de indução. Isto se deve ao fato de que as células que inocularam o segundo ciclo da fermentação com cortes sofreram indução, afetando a retomada do crescimento celular devido à necessidade das células se readaptarem as novas condições de cultivo. No caso da fermentação a 30 °C este comportamento não foi observado, ver Figura VI.1.

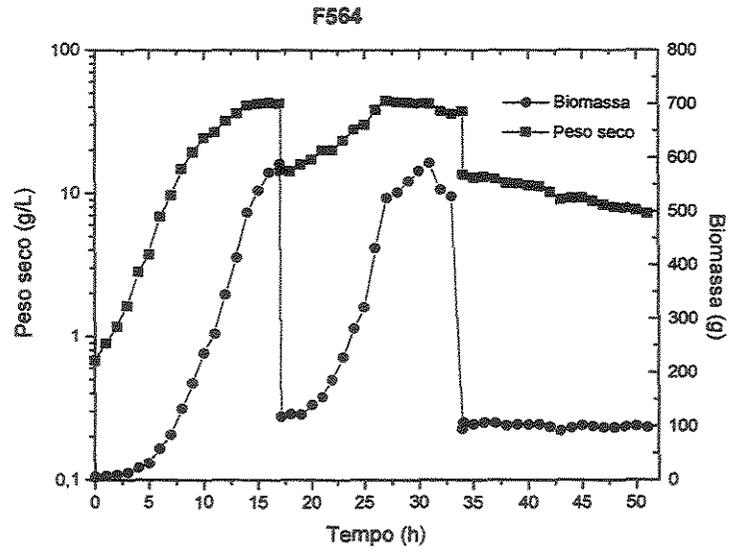
Apesar das vantagens apresentadas na fermentação com cortes tendo fase de crescimento com 7 horas e indução com 5 horas, a Figura VI.3 demonstra que essa estratégia não é viável para mais de 2 ciclos, pois a estabilidade do clone é seriamente comprometida, provavelmente pelas bruscas variações da temperatura de cultivo (fases de crescimento e indução), conforme fia evidenciado na Figura VI.3.D.



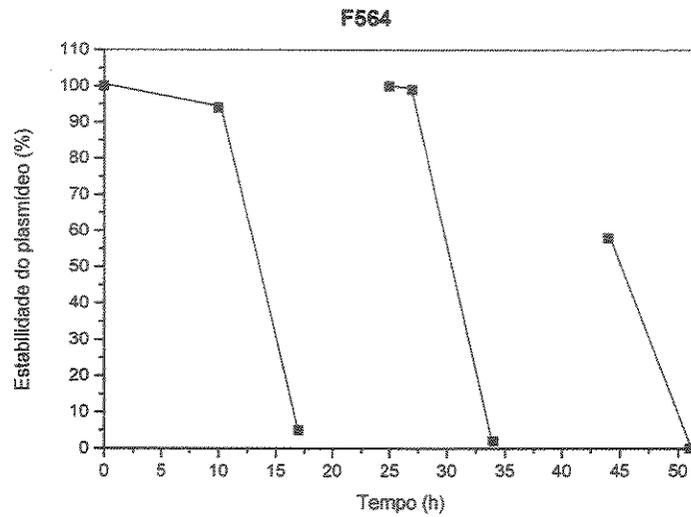
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figura VI.3–** Fermentação batelada alimentada repetida cortes com 10 horas de crescimento e 7 horas de indução. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Volume no fermentador (L) e expressão da proteína de fusão (%) versus tempo (h), (C) Peso seco (g/l) e biomassa formada (g) versus tempo (h) e (D) Estabilidade do plasmídeo (%) versus tempo (h).

No intuito de contornar este problema e, por conseqüência, aumentar a produtividade em biomassa e em proteína de fusão propõe-se o estudo das fermentações em batelada cíclica, nas quais se utilizam dois sistemas de fermentação em paralelo, conforme será demonstrado no capítulo VII desta tese.

## CAPÍTULO VII

## FERMENTAÇÃO BATELADA-ALIMENTADA CÍCLICA

## VII.1 – Fermentação batelada-alimentada cíclica em dois estágios

Diante dos resultados apresentados no capítulo anterior ficou evidenciado que os processos realizados em batelada-alimentada repetida, ou batelada-alimentada cíclica de um estágio, ou ainda batelada-alimentada com cortes, apresentaram um pequeno incremento na produtividade volumétrica do processo quando comparada as fermentações batelada-alimentada. Contudo, a queda na estabilidade do plasmídeo após a indução térmica reduziu a viabilidade do processo já que apresenta uma instabilidade na recuperação da capacidade fisiológica da célula hospedeira dificultando a reprodutibilidade dos ciclos. Diversos autores, entre eles Jung et al (2000), Bentley et al (1990), Kim e Shuler (1990) e Weber et al (1990) reportaram queda na estabilidade do plasmídeo após a fase de indução.

Um expressivo número de pesquisadores têm demonstrado que a separação entre o crescimento celular da célula hospedeira e a expressão gênica da proteína recombinante é essencial para aumentar a estabilidade e produtividade do processo.

Sendo assim, o cultivo de *Escherichia coli* utilizando a técnica de batelada-alimentada cíclica com dois estágios foi estudado para a síntese de proteínas heterólogas. Essa técnica é similar a um processo batelada-alimentada repetida, diferenciando deste na medida em que a fase de indução não será conduzida no mesmo vaso em que será utilizado na fase de crescimento. Parte do volume retirado do fermentador deve ser transferida para outro fermentador no qual se conduzirá a fase de indução térmica.

## VII.2 – Estratégia de cultivo das fermentações batelada-alimentada cíclica com dois estágios

O processo fermentativo em batelada-alimentada cíclica em dois estágios é um processo batelada-alimentada modificado. De maneira a separar as fases de crescimento e de produção da proteína quimérica, devido às condições ótimas de crescimento e indução serem usualmente diferentes.

De maneira análoga aos processos batelada-alimentada, as fermentações cíclicas com dois estágios foram realizadas com três tipos de adição de nutrientes, sendo eles: Feed1 que consiste na adição programada de uma solução de extrato de levedura a 20% e  $MgSO_4$  0,28 %, Feed2 que consiste na adição de uma solução de glicose a 70% e o terceiro tipo é a adição de solução de  $NH_4OH$  (5N) para acerto do pH.

A adição de glicose 70% (Feed2) foi realizada por glucose-loop (pH-stat), ou seja, este nutriente foi considerado o substrato limitante da fermentação e foi adicionado para o acerto do pH após o esgotamento da glicose inicial do meio de fermentação, sempre que esta variável tendesse a um valor maior que 6,80. As adições de extrato de levedura 20% (Feed 1) obedeceram a Tabela VII.1.

**Tabela VII.1 – Vazões do meio de alimentação designado como “Feed1” para os diferentes fermentadores.**

EFT(h)	LH210 – 12 Litros	Bioflo IV
4	120 mL/h	120 mL/h
6	150 mL/h	150 mL/h
9	210 mL/h	210 mL/h

As fermentações batelada-alimentada cíclicas em dois estágios foram iniciadas no Fermentador 1, como uma fermentação batelada-alimentada tradicional. Após um certo período de crescimento aproximadamente 1,0 L do caldo fermentativo foi transferido para o Fermentador 2 previamente preparado e contendo meio de cultura estéril no qual seria iniciada nova fase de crescimento. O Fermentador 1 foi, então, induzido e o volume do fermentador foi coletado após

o término da fase de indução. Imediatamente após a coleta, 7,0 litros de meio de cultura estéril foram adicionados ao Fermentador 1 que, neste momento, estaria pronto para receber 1,0 litro do caldo fermentativo cultivado, na fase de crescimento, no Fermentador 2.

Aproximadamente 1,0 L do caldo fermentativo da cultura crescida no Fermentador 2 foi transferida para o Fermentador 1, no qual seria iniciada nova fase de crescimento. O Fermentador 2 foi induzido e o volume do fermentador foi coletado após o término da fase de indução. Imediatamente após a coleta, 7,0 litros de meio de cultura estéril foram adicionados ao Fermentador 2 que, neste momento, estaria pronto para receber 1,0 litro do caldo fermentativo cultivado na fase de crescimento no Fermentador 1. Esse processo foi repetido indefinidamente, conforme apresentado na Figura VII.1.

Os fermentadores utilizados para este tipo de estratégias foram o BioFloIV (NBS) e o LH210-12 L (Inceltech) ambos com volume útil máximo de 14 litros.

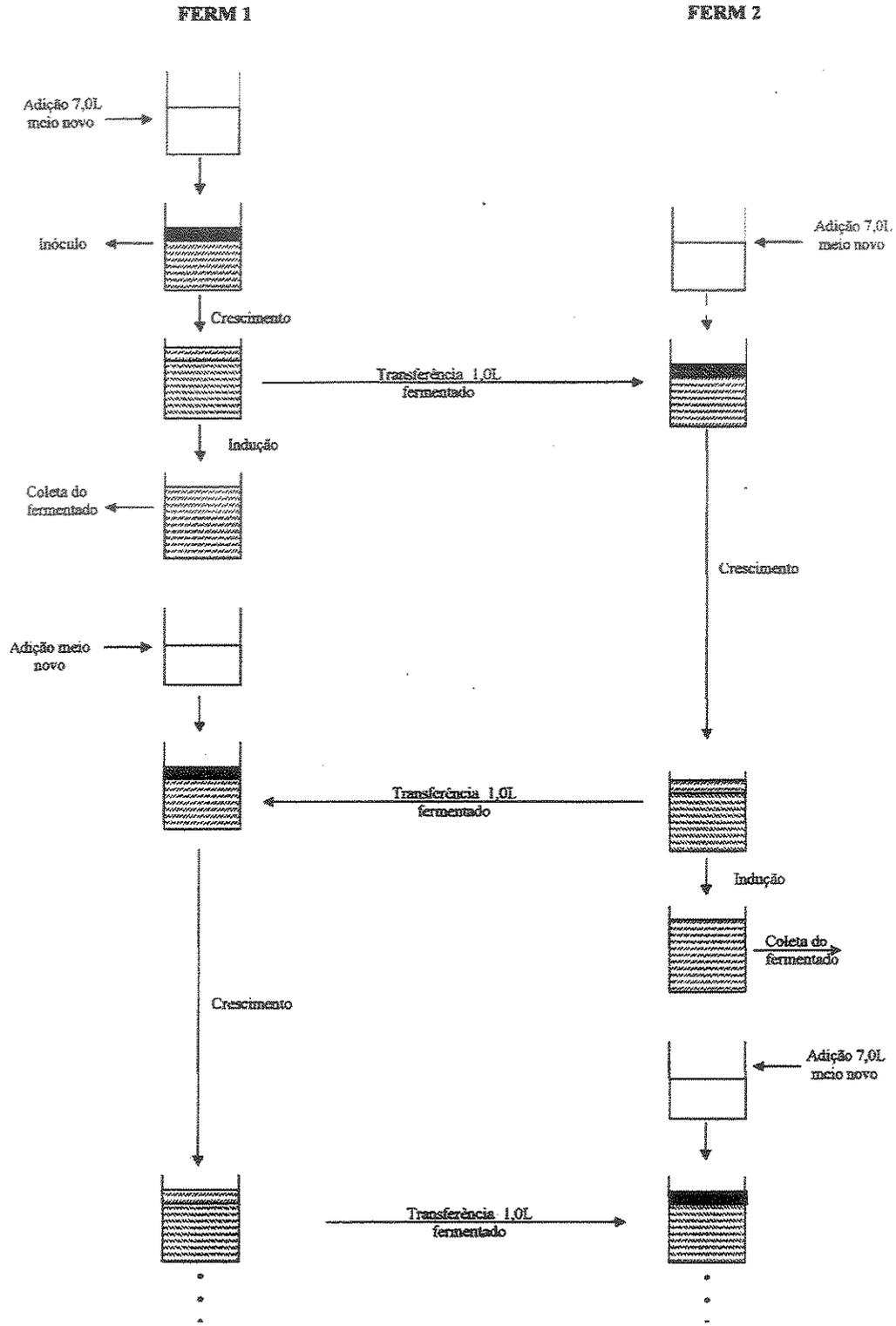


Figura VII.1 – Estratégia utilizada para cultivo em fermentações batelada-alimentada cíclicas com dois estágios

### VII.3 – Resultados

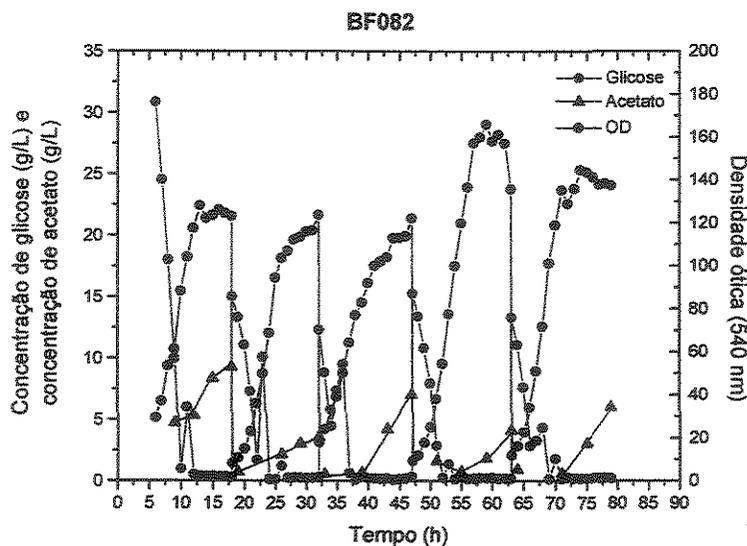
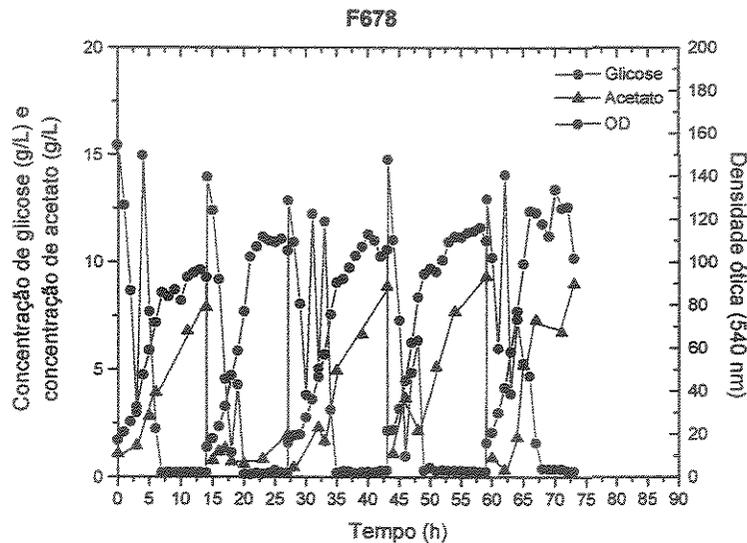
As fermentações cíclicas com dois estágios foram preparadas de maneira análogas às fermentações padrão com retomada do processo fermentativo ao final da fase de crescimento em cada um dos fermentadores, por intermédio da transferência de 1,0 litro do fermentado de um fermentador para o outro que atuaria como inóculo concentrado do ciclo posterior. O esquema utilizado para a condução desse tipo de estratégia de fermentação foi apresentado na Figura VII.1.

A fermentação apresentada na Figura VII.2 foi conduzida a 30 °C na fase de crescimento celular e a 42 °C durante a indução da proteína de fusão. Cada fase da fermentação durou em média 8 horas a 30 °C e 8 horas a 42 °C, ao final da qual procedeu-se a retirada do caldo de fermentado (corte) e adição do meio de fermentação novo e estéril até atingir-se o volume inicial da fermentação, iniciando-se assim outra fase fermentativa. Antes do início da fase indutiva, 1,0 litro de fermentado foi assepticamente transferido para inocular o segundo fermentador, que repetiu os procedimentos realizados para o primeiro fermentador.

As cinéticas de crescimento celular, formação de acetato, consumo de substrato são apresentados na Figura VII.2 e referem-se às fermentações F678 (A) e BF082 (B). Pode-se observar que a formação de acetato acontece principalmente na fase de indução, como logo após a coleta das células houve a adição de meio novo e posterior transferência do inóculo, a concentração de acetato diminui drasticamente devido a sua diluição no novo meio de fermentação. Em consequência do inóculo robusto feito ao início de cada ciclo, elevadas densidades celulares foram alcançadas em curto período de tempo, quando comparada às fermentações batelada-alimentada tradicionais, permitindo um alto consumo de glicose e, portanto, altas taxas de acúmulo de biomassa sejam atingidas. Em um cultivo típico em batelada-alimentada, grande parte do tempo de fermentação é gasto em concentrações relativamente baixas de células e com taxas pequenas de acúmulo de biomassa.

Observa-se que um novo ciclo fermentativo não é influenciado pelas condições do ciclo anterior. Isto sugere que novos ciclos fermentativos podem ser

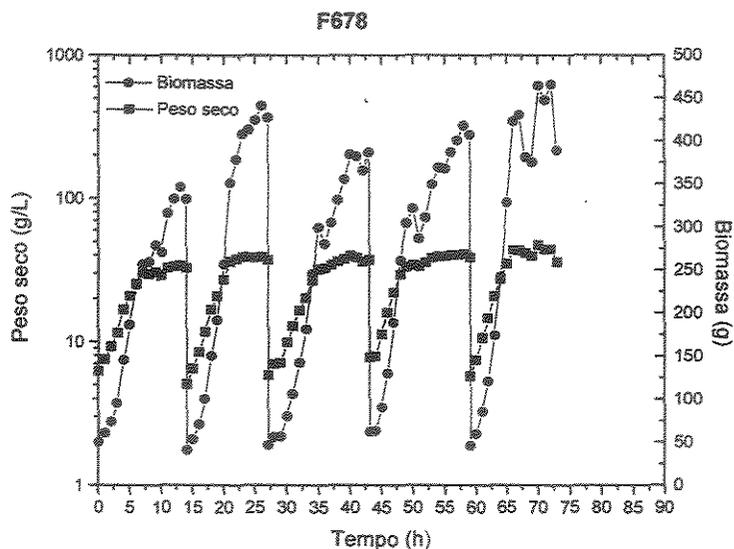
feitos com transferência, antes da indução, de parte do fermentado como inóculo para o próximo ciclo e a adição de meio novo torna o processo pseudocontínuo.



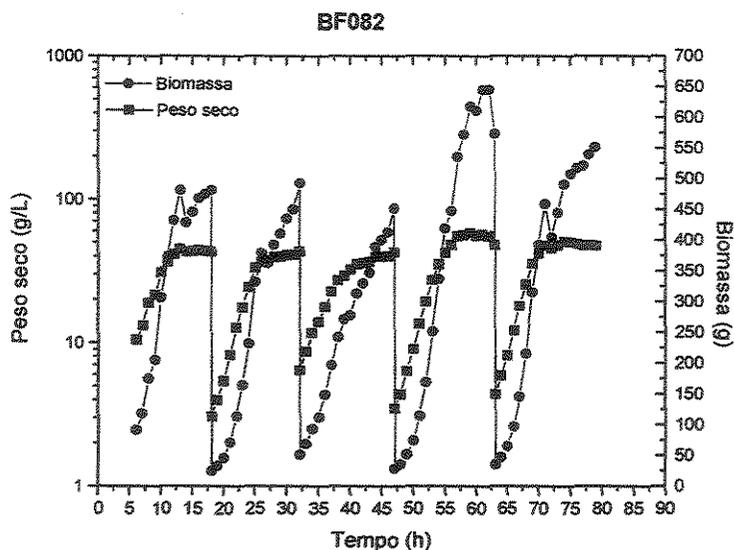
**Figura VII.2**– Cinéticas de crescimento celular (g/L), consumo de glicose (g/L) e formação de acetato (g/L) versus tempo (h) das fermentações batelada-alimentada cíclicas em dois estágios F678 (A) e B3-082 (B).

A Figura VII.3 apresenta as curvas de peso seco de células e biomassa obtidas nos experimentos F678 e BF082, conduzidos em batelada-alimentada

cíclica em dois estágios. O peso seco médio obtido neste experimento, ao final de cada ciclo, foi 40,6 g/L e a biomassa de células formadas 448,3 g.



(A)



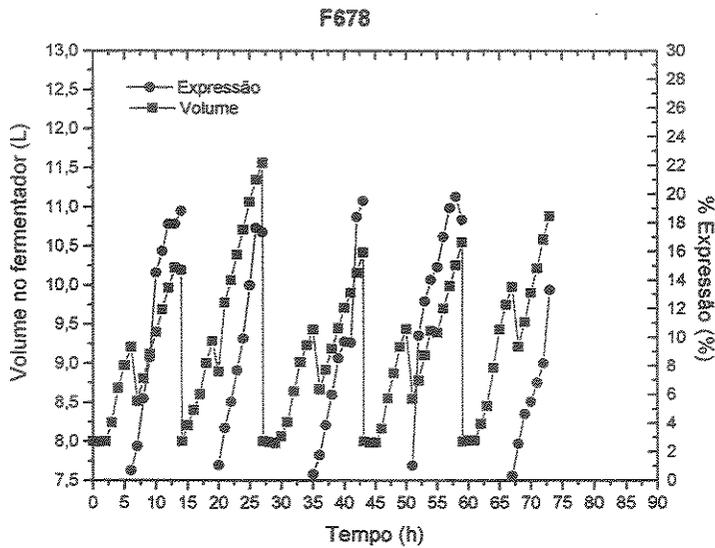
(B)

**Figura VII.3**– Curvas de peso seco de células (g/L) e biomassa formada (g) versus tempo (h) das fermentações batelada-alimentada cíclicas em dois estágios F678 (A) e B3-082(B).

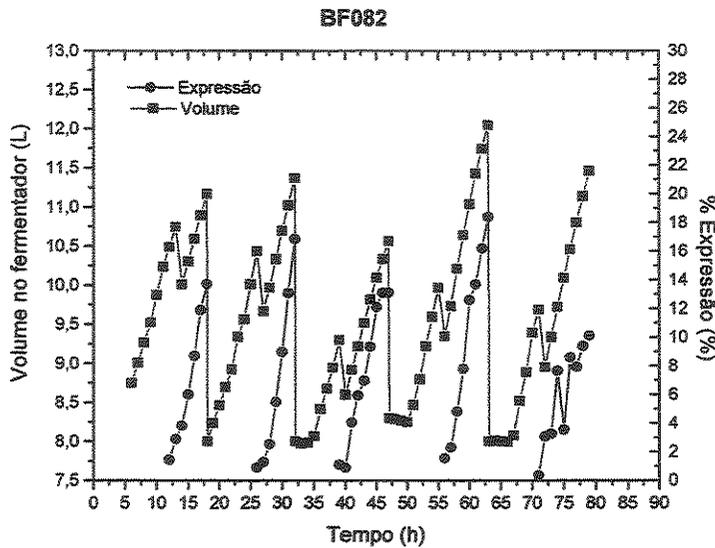
O volume de caldo de cultura no fermentador e a cinética de formação da pró-insulina é apresentada na Figura VII.4 (A) e (B). O volume médio coletado

Fermentação batelada-alimentada cíclica

para este experimento em cada ciclo foi 10,9 L, enquanto o volume total coletado foi 108,9 L. A expressão da proteína recombinante foi, em média, 15,9% para cada ciclo.



(A)



(B)

Figura VII.4– Cinéticas de produção da pró-insulina (g/L) e volume no fermentador (L) versus tempo (h) das fermentações batelada-alimentada cíclicas em dois estágios F678 e B3-082.

Os resultados experimentais para cada ciclo fermentativo referentes às Figuras VII.2, VII.3 e VII.4 estão apresentados na Tabela VII.2.

Os testes de estabilidade não apresentaram variação significativa para as amostras retiradas antes e logo após a transferência de 1,0 L de fermentado para inoculação do outro fermentador, ou seja, a transferência do inóculo não prejudica a fisiologia da bactéria. Esse resultado corroborou o resultado dos testes realizados em frascos Erlenmeyers com sucessivas passagens. Os frascos eram inoculados e cresciam durante aproximadamente 14 horas e depois parte de fermentado era retirada do frasco assepticamente e adicionada a outro frasco com meio novo, de maneira a reproduzir a fermentação com cortes. O resultado foi que em 8 passagens não foi observada queda na estabilidade dos plasmídeos (Resultados não apresentados).

Tabela VII.2 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios

F678 – BF082								
	Peso Seco (g/L)	Biomassa Formada (g)	Volume Retirado (L)	$Y_{XS}$ (g/g)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Expres-são (%)	Acetato (g/g)	Estabili-dade (%)
F-1C	32,56	331,95	10,2	0,455	0,118	18,8	7,876	nd
B-1C	43,13	481,66	10,2	0,538	0,118	13,7	9,258	6,0
F-2C	36,95	427,11	11,5	0,450	0,153	17,3	1,944	nd
B-2C	43,31	492,35	11,4	0,383	0,189	16,9	3,556	88,0
F-3C	37,10	379,20	10,2	0,380	0,116	19,5	8,870	nd
B-3C	42,77	451,86	10,5	0,466	0,126	13,1	7,023	98,0
F-4C	38,56	406,73	10,5	0,360	0,100	18,2	9,324	nd
B-4C	47,52	572,51	11,0	0,395	0,164	18,4	4,100	98,0
F-5C	35,72	388,74	10,8	0,265	0,131	13,3	8,951	nd
B-5C	48,10	551,23	11,4	0,402	0,150	10,1	5,971	nd
Média	40,57	448,33	10,8	0,409	0,136	15,9	6,690	

As tabelas VII.3 e VII.4 apresentam os resultados obtidos com outras duas fermentações cíclicas em dois estágios. Na fermentação BF101/F708 foram

## Fermentação batelada-alimentada cíclica

realizados quatro ciclos e na fermentação BF102/F709 nove ciclos, sendo crescidos por 8 horas a 30 °C e induzidos também por 8 horas a 42 °C.

Os valores de peso seco de células (g/L), biomassa formada (g), volume de fermentado retirado em cada ciclo (L), percentagem de proteína de fusão (%), concentração final de acetato em cada ciclo (g/L), taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ ), fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$  (g/g)) e estabilidade do plasmídeo ao final do ciclo(%) estão apresentados nas Tabelas abaixo.

Tabela VII.3 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios

BF102 – F709								
	Peso Seco (g/L)	Biomassa Formada (g)	Volume Retirado (L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Expressão (%)	Acetato (g/g)	Estabilidade (%)
B-1C	21,43	213,21	10,0	-	-	17,8	3,457	28,0
F-1C	41,55	420,54	10,1	0,599	0,187	23,5	3,719	4,0
B-2C	45,60	471,87	11,4	0,496	0,137	31,8	2,393	14,0
F-2C	26,86	267,00	9,9	0,423	0,106	21,8	5,582	96,0
B-3C	40,86	430,83	10,5	0,410	0,151	31,4	4,426	60,0
F-3C	36,47	378,52	10,4	0,383	0,125	25,9	6,095	88,0
B-4C	51,82	567,22	11,0	0,456	0,145	23,9	0,177	100,0
F-4C	48,72	586,32	11,0	0,530	0,138	22,7	1,073	100,0
B-5C	41,32	468,95	10,4	0,309	0,144	25,8	3,679	nd
Média	39,40	422,72	10,5	0,401	0,126	24,9	3,400	60

Tabela VII.4 - Resultados experimentais das fermentações cíclicas em dois estágios

BF101 – F708								
	Peso Seco (g/L)	Biomassa Formada (g)	Volume Retirado (L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Expressão (%)	Acetato (g/g)	Estabilidade (%)
B-1C	35,98	387,00	10,7	-	-	10,4	7,167	70,0
F-1C	39,95	403,86	10,0	0,453	0,123	18,7	2,918	10,0
B-2C	38,47	398,27	10,3	0,397	0,143	26,9	3,860	42,0
F-2C	37,79	445,29	11,7	0,491	0,131	21,6	nd	48,0
Média	38,05	408,60	10,7	0,447	0,132	19,4	4,906	42,0

As produtividades volumétricas para fermentações batelada-alimentada cíclica em dois estágios são apresentadas na Tabela VII.4. Pode-se observar que a produtividade volumétrica é aumentada em 37% em relação às fermentações em batelada alimentada tradicional.

Esse aumento na produtividade pode ser explicado como efeito do inóculo concentrado no início de cada ciclo, que varia entre 15 e 20 de O.D. (540 nm); pela condição fisiológica do inóculo, que se encontra em crescimento exponencial no momento da transferência em meio novo com presença dos nutrientes fundamentais ao crescimento celular e pela diluição dos produtos inibitórios. Altas concentrações celulares em fase de crescimento exponencial geram elevado consumo de substrato que, por consequência, propiciam elevada produção em biomassa.

Tabela VII.5 – Produtividade volumétrica das fermentações batelada-alimentada em dois estágios.

Fermentação	Produtividade volumétrica (g/L/h)
F678 – BF082	2,831
BF101 - F708	2,389
BF102 - F709	2,493
Média	2,571

## CAPÍTULO VIII

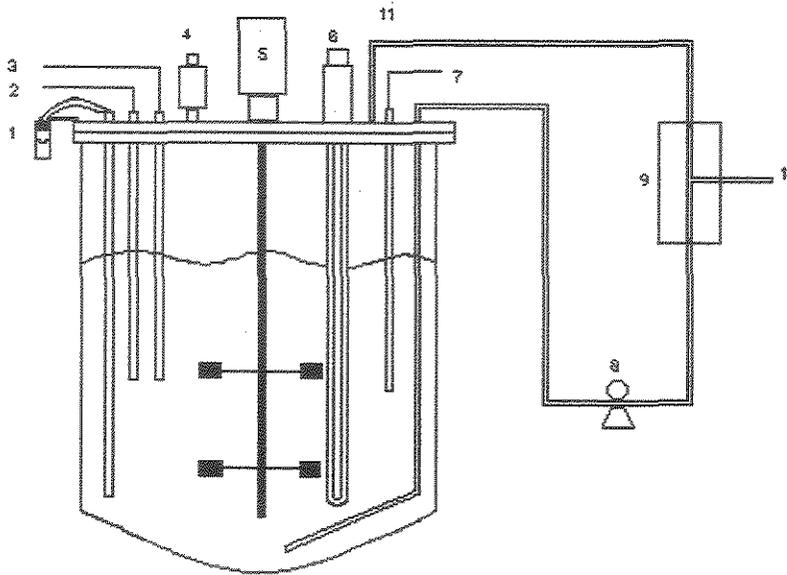
FERMENTAÇÃO COM RECICLO DE CÉLULAS E MICROFILTRAÇÃO  
TANGENCIAL

## VIII.1 – Resultados

## VIII.1.1 – Estratégia de cultivo das fermentações com reciclo total de células e microfiltração - Experimentos preliminares.

Visando a obtenção de maior crescimento celular, alguns experimentos preliminares foram realizados objetivando-se desenvolver a fermentação utilizando-se a técnica da microfiltração acoplada ao reciclo de células e compará-la com resultados obtidos em fermentações em batelada alimentada tradicional. Neste modo operacional, alguns estudos foram feitos com a utilização de módulos externos, nos quais são feitas as filtrações do meio de fermentação, no intuito de diminuir a concentração de produtos inibitórios e reciclar as células ao fermentador. A utilização deste método propiciou um incremento significativo da concentração celular. Neste sentido propôs-se a realização da microfiltração do meio de cultura durante toda a fermentação.

Todas as fermentações com microfiltração foram realizadas utilizando os fermentadores LH210 4,0 Litros (Inceltech) e BioFlo3000 (NBS) acoplados a unidades de filtração tangencial (marca Filtron, mini-kassette de 0,30  $\mu\text{m}$  e com área específica de 65,0  $\text{cm}^2$ ), com o qual foi realizada a filtração do meio de fermentação na vazão de 500 ml/h com o reciclo total das células, ou seja, sem a taxa de sangria. A Figura VIII.1 apresenta o esquema utilizado para realização desses experimentos.

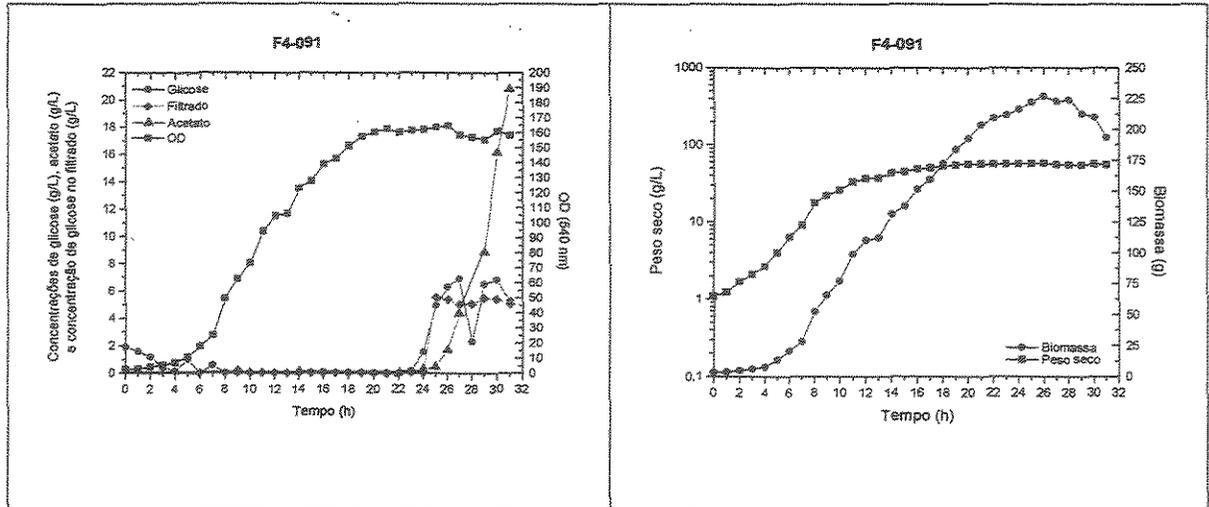


1- Amostrador	7- Termopar
2- Eletrodo de pH	8- Bomba peristáltica
3- Eletrodo de Oxigênio Dissolvido	9- Membrana filtrante
4- Saída de ar	10-Saída do filtrado
5- Motor	11-Reciclo das células
6- Controlador de Temperatura	

Figura VIII.1 – Fermentador com filtração tangencial e reciclo total de células

Em um primeiro momento, definiu-se uma taxa de diluição de 0,2 e fez-se uma adaptação das condições utilizadas em fermentações em batelada alimentada. Para o sistema de alimentação, utilizou-se uma solução de alimentação única composta de extrato de levedura (3,0 g/L), peptona de caseína (4,8 g/L), sais de fosfato, solução oligodinâmica, solução de aminoácidos,  $MgSO_4$  2,8 g/L e glicose 35,0 g/L. As concentrações dos sais de fosfato e das soluções oligodinâmicas e de aminoácidos são as mesmas do meio de fermentação inicial.

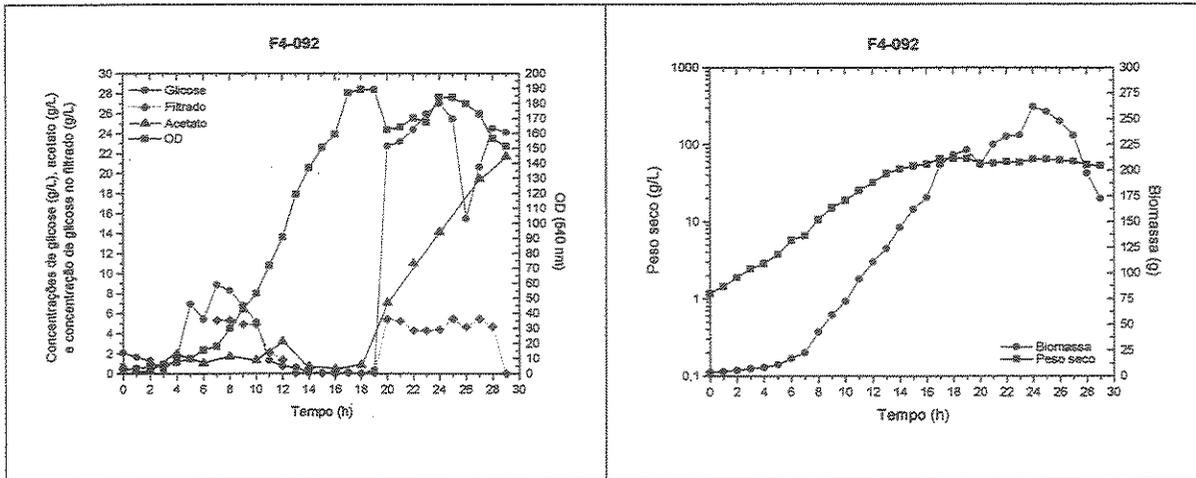
A Figura VIII.2 apresenta os resultados desse experimento. Observou-se que a concentração celular não ultrapassou os 60,0 g/L, sendo que a partir da 22 horas de cultivo houve acúmulo de glicose e formação de acetato, que podem ter sido os responsáveis pela inibição do crescimento celular.



**Figura VIII.2** – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração. Alimentação única com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 3,0 g/L, peptona de caseína 4,8 g/L, sais de fosfato,  $MgSO_4$  2,8 g/l e glicose 35,0 g/L. (A) Concentração de glicose (g/L), concentração de acetato (g/L) e concentração de glicose no filtrado (g/L) e Densidade ótica (540 nm versus Tempo (h)), (B) Peso seco (g/L) e Biomassa (g) versus tempo (h).

Os experimentos seguintes foram desenvolvidos com a utilização de uma solução concentrada de glicose “Feed2” (solução de glicose 70%) adicionada através de um “loop” de glicose (pH-stat) e com a adição de solução de alimentação composta de extrato de levedura 12,0 g/L, peptona de caseína 12,0 g/L, sais de fosfato, solução oligodinâmica e  $MgSO_4$  2,8 g/L).

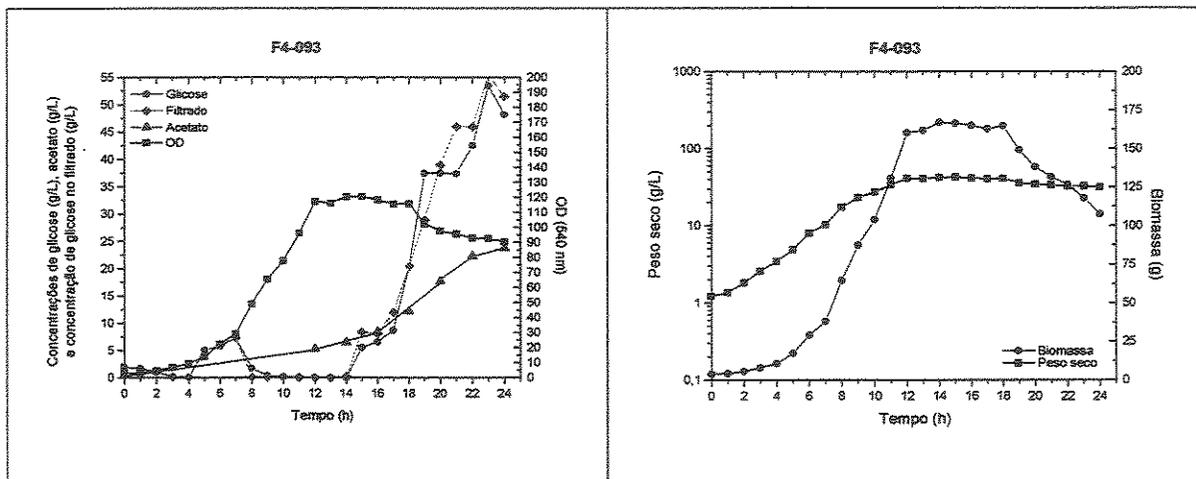
As Figuras VIII.3 e VIII.4 apresentam os resultados destes experimentos, nos quais variaram apenas a concentração dos componentes da solução de alimentação. Em ambos os experimentos a concentração celular não ultrapassou valores acima de 65,0 g/L, sendo que as concentrações de glicose e acetato foram bastante elevadas quando se efetuou a expressão da proteína de fusão.



(A)

(B)

Figura VIII.3 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração. Alimentação com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 12,0 g/L, peptona de caseína 12,0 g/L, sais de fosfato e magnésio e glicose 35,0 g/L. Feed2 – glicose 70% (glucose-loop) (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L), glicose no filtrado (g/L) e densidade ótica (540 nm) versus tempo (h) (com indução), (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h).



(A)

(B)

Figura VIII.4 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração. Alimentação com vazão de 500 mL/h, composto por extrato de levedura 12,0 g/L, peptona de caseína 12,0 g/L, ác. cítrico, sais de fosfato e magnésio e glicose 35,0 g/L. Feed2 – glicose 70% (glucose-loop) (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L), glicose no filtrado (g/L) e densidade ótica (540 nm) versus tempo (h) (com indução), (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h).

Como o crescimento celular não alcançou os patamares esperados nestas fermentações, as quais foram adaptadas à estratégia de alimentação similar a batelada-alimentada tradicional, optou-se nos experimentos subsequentes por fazer uma adaptação na metodologia de alimentação dos substratos, glicose e extrato de levedura (fontes de C e N). Realizou-se a alimentação dos nutrientes por gradiente devido à necessidade de aumentar-se a concentração de substrato durante a fermentação em função das altas concentrações celulares.

### VIII.1.2 – Estratégia de cultivo das fermentações com microfiltração tangencial, reciclo total de células e alimentação por gradiente linear.

Em virtude dos experimentos preliminares não terem obtido concentrações celulares maiores que 100,0 g/L de peso seco de células, concluiu-se que a principal causa foi a falta de micronutrientes em altas concentrações, já que a hospedeira utilizada é prototrófica.

Mignone e Rossa (1993) desenvolveram um modelo matemático de alimentação de nutrientes por gradiente linear para fermentações batelada-alimentada. Essa técnica permite calcular valores operacionais de vazão de alimentação e a concentração do gradiente necessária para obter um desejado rendimento em biomassa, requerendo a taxa de crescimento específica desejada para a fermentação ( $\mu$ ) e o rendimento celular em função do nutriente limitante ( $Y_{x/s}$ ).

O modelo experimental utilizado por Mignone e Rossa (1993) é o apresentado na figura VIII.5: Os vasos C e D são geometricamente idênticos e contêm volumes iguais de soluções concentradas (C) e diluídas (D) de nutrientes. Ambos os reservatórios são interligados e a solução do frasco D é continuamente homogeneizada por agitação mecânica. A bomba P retira nutrientes do reservatório D a uma taxa de escoamento constante F. O nutriente do reservatório D é repostado pelo nutriente contido no reservatório C, portanto o nível em ambos os recipientes é o mesmo a qualquer tempo, e a concentração do meio na saída do reservatório D aumenta com o tempo, gerando o gradiente de alimentação.

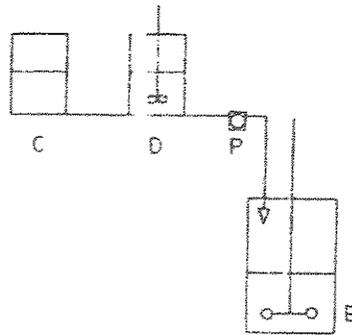


Figura VIII.5 – Representação esquemática do sistema de alimentação por gradiente linear.

Na derivação do modelo matemático consideram-se verdadeiras as seguintes premissas:

i) a difusão dos nutrientes nos tubos de conexão em ambos os reservatórios é desprezível se comparada à taxa de escoamento.

ii) a densidade das soluções concentrada e diluída é a mesma.

iii) no reservatório D ocorre mistura perfeita instantaneamente.

Faz-se então o seguinte balanço de massa:

Reservatório de nutrientes concentrado (C).

$$\frac{dV_c}{dt} = -F_c$$

Reservatório de nutrientes diluído (D)

$$\frac{dV_d}{dt} = -F + F_c$$

(VIII.1)

(VIII.2)

Como os reservatórios têm volumes constantes:

$$\frac{dV_c}{dt} = \frac{dV_d}{dt}$$

(VIII.3)

Combinando as equações, temos:

$$F_c = \frac{F}{2} \quad (\text{VIII.4})$$

Chegamos a variação de  $V_d$  com o tempo, que é dada por:

$$V_d = V_{do} - \frac{F}{2}t \quad (\text{VIII.5})$$

Um balanço de massa do substrato no reservatório D é dado por:

$$\frac{d(S_r(t)V_d)}{dt} = -FS_r(t) + F_c S_c \quad (\text{VIII.6})$$

Integrando-se, temos:

$$S_r(t) = S_{do} + \frac{F}{2V_{do}}(S_c - S_{do})t \quad (\text{VIII.7})$$

Para fermentações em batelada alimentada (Fed-batch fermentation - FBF), temos o seguinte balanço de massa:

Biomassa:

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV \quad (\text{VIII.8})$$

Substrato:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_r(t) - \frac{\mu XV}{Y_{X/S}} \quad (\text{VIII.9})$$

Para estabelecer uma fermentação batelada alimentada com gradiente linear de substrato é necessário estabelecer valores para  $F$ ,  $S_{do}$  e  $S_c$ .

Supondo que no início da adição de nutrientes, a concentração do substrato é igual a zero.

$$FS_{do} = \frac{\mu_o X_o V_o}{Y_{X/S}} \quad (\text{VIII.10})$$

Para assegurar que não haverá acúmulo de substrato no reator para tempo maior que zero, o gradiente deverá ser, em  $t=0$ , igual ou maior à máxima variação na taxa de consumo do substrato.

$$\frac{d(FS_r(t))}{dt} = \frac{d}{dt} \left[ \frac{\mu_o X_o V_o \exp(\mu_o t)}{Y_{X/S}} \right] \quad (\text{VIII.11})$$

A limitação para as duas equações anteriores é  $\mu_o \leq \mu_{max}$ .

Combinando-as equações, temos

$$\frac{F^2}{2V_{do}} (S_c - S_{do}) = \frac{\mu_o^2 X_o V_o}{Y_{X/S}} \quad (\text{VIII.12})$$

Da definição de rendimento de crescimento

$$S_c + S_{do} = \frac{X_f V_f - X_o V_o}{Y_{X/S} V_{do}} \quad (\text{VIII.13})$$

E da combinação das equações acima, chegamos ao valor do fluxo do gradiente:

$$F = \frac{b + \sqrt{b^2 + 4\mu_o V_o}}{2} \quad (\text{VIII.14})$$

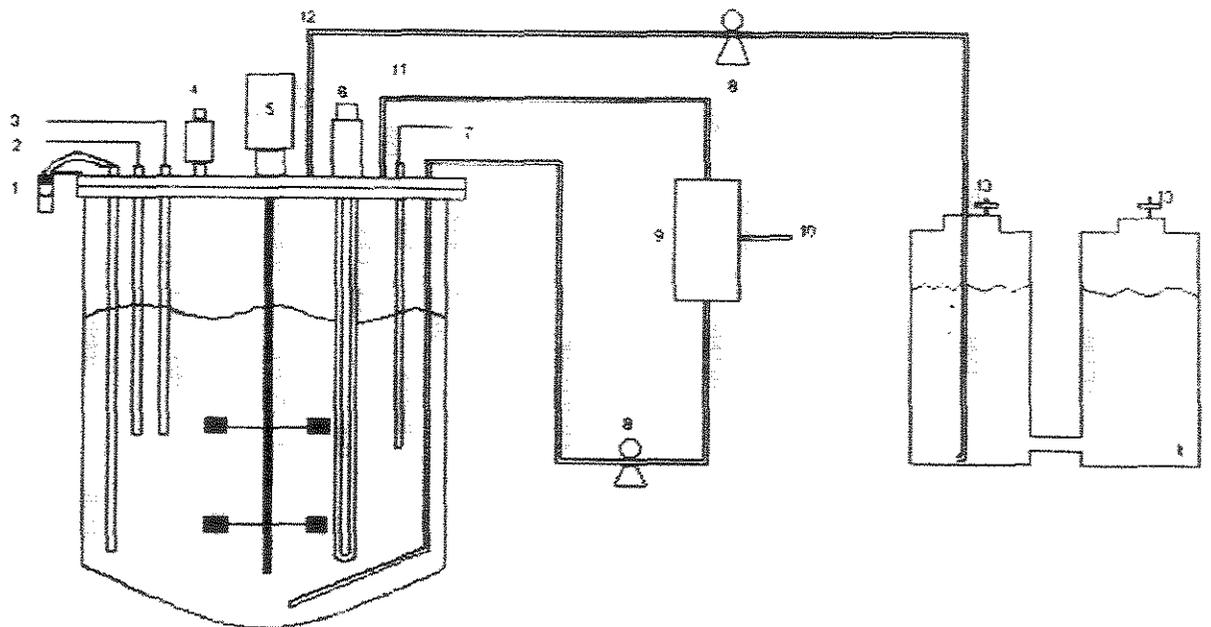
$$b = \frac{2\mu_o V_o X_o V_{do}}{X_f V_f - X_o V_o} \quad (\text{VIII.15})$$

Adaptando o modelo matemático de Mignore fixando a vazão de alimentação e igualando-a vazão do filtrado, podem-se determinar os valores de  $S_{do}$  e  $S_c$ . Além disso, calculou-se um gradiente para extrato de levedura, utilizando

como parâmetro a concentração consumida em fermentações batelada alimentada tradicional.

Foi estabelecida arbitrariamente a vazão de alimentação de 500 mL/h com igual retirada, significando taxas de diluições elevadas de  $D = 0,20$  L/h. Pois os experimentos com reciclo de células foram realizados em fermentador Inceltech/LH 210 modelo de 4 litros volume total, contendo 2 litros de meio Jung modificado inicial e 0,5 litros de inóculo crescido overnight.

As fermentações foram conduzidas durante as primeiras 3 a 4 horas em batelada apenas com acerto do pH. Após o consumo da glicose inicial do meio, iniciava a adição da solução de alimentação e o reciclo das células, com uma vazão de 500mL/h. A figura VIII.6 representa o esquema do sistema de fermentação utilizado com microfiltração, reciclo total de células e alimentação de nutrientes por gradiente linear.



1- Amostrador	8- Bomba peristáltica
2- Eletrodo de pH	9- Membrana filtrante
3- Eletrodo de Oxigênio Dissolvido	10- Saída do filtrado
4- Saída de ar	11- Reciclo das células
5- Motor	12- Entrada da solução alimentação
6- Controlador de Temperatura	13- Frascos para as soluções de alimentação. (Diluído e Concentrado)
7- Termopar	

Figura VIII.6 – Esquema do sistema de fermentação utilizado com microfiltração, reciclo total de células e alimentação de nutrientes por gradientes linear.

A tabela VIII.1 mostra a composição da solução de alimentação única utilizada em fermentações com reciclo.

**Tabela VIII.1** – Condições para as fermentações com reciclo total de células por filtração tangencial e alimentação por gradiente linear.

Ferm N°	Composição da solução alimentação g/L			Vazão (ml/h)	Vol. No ferment. (L)	Início do reciclo (h)
	Frasco de Aliment.	YE	Glic.			
04-98	1	15,4	3,15	500	2,5	4
	2	39,51	117,90			
04-99	1	15,4	3,15	500	2,5	3
	2	118,5	117,9			
04-100	1	154	3,15	500	2,5	3
	2	118,5	117,9			
04-101	1	15,4	2,6	500	2,5	3
	2	120,0	166,4			

As Figuras VIII.7, VIII.8, VIII.9 e VIII.10 apresentam o comportamento das fermentações com microfiltração, gradiente linear de alimentação e reciclo total de células nas condições expressas na Tabela VIII.1. A microfiltração foi iniciada em conjunto com a adição da alimentação em gradiente no momento em que se esgotou a glicose presente no reator, aproximadamente com 3 horas de fermentação. As vazões de alimentação do feed e de saída do filtrado foram mantidas constantes em 500 ml/h, permanecendo o volume do fermentador constante em 2,5L. A taxa de diluição utilizada foi de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ .

Dos resultados experimentais observa-se que o crescimento celular situou-se próximo a 120 g/l durante o período de crescimento, de acordo com o esperado para as concentrações de glicose utilizadas pelo método do gradiente. No entanto, com a indução a concentração celular apresentou queda na ordem de aproximadamente 30,0%. Presume-se que este fato seja creditado a ausência de nutrientes essenciais para a produção da proteína recombinante e crescimento celular.

Experimentos em frascos foram feitos com amostras retiradas na fase de indução e demonstraram que as células continuaram viáveis e produtoras de pró-insulina.

A concentração de glicose manteve-se baixa mesmo quando a concentração de entrada foi muito elevada, aumentando gradativamente no final da fermentação. A concentração de acetato manteve-se em um patamar aceitável mesmo para concentrações celulares elevadas.

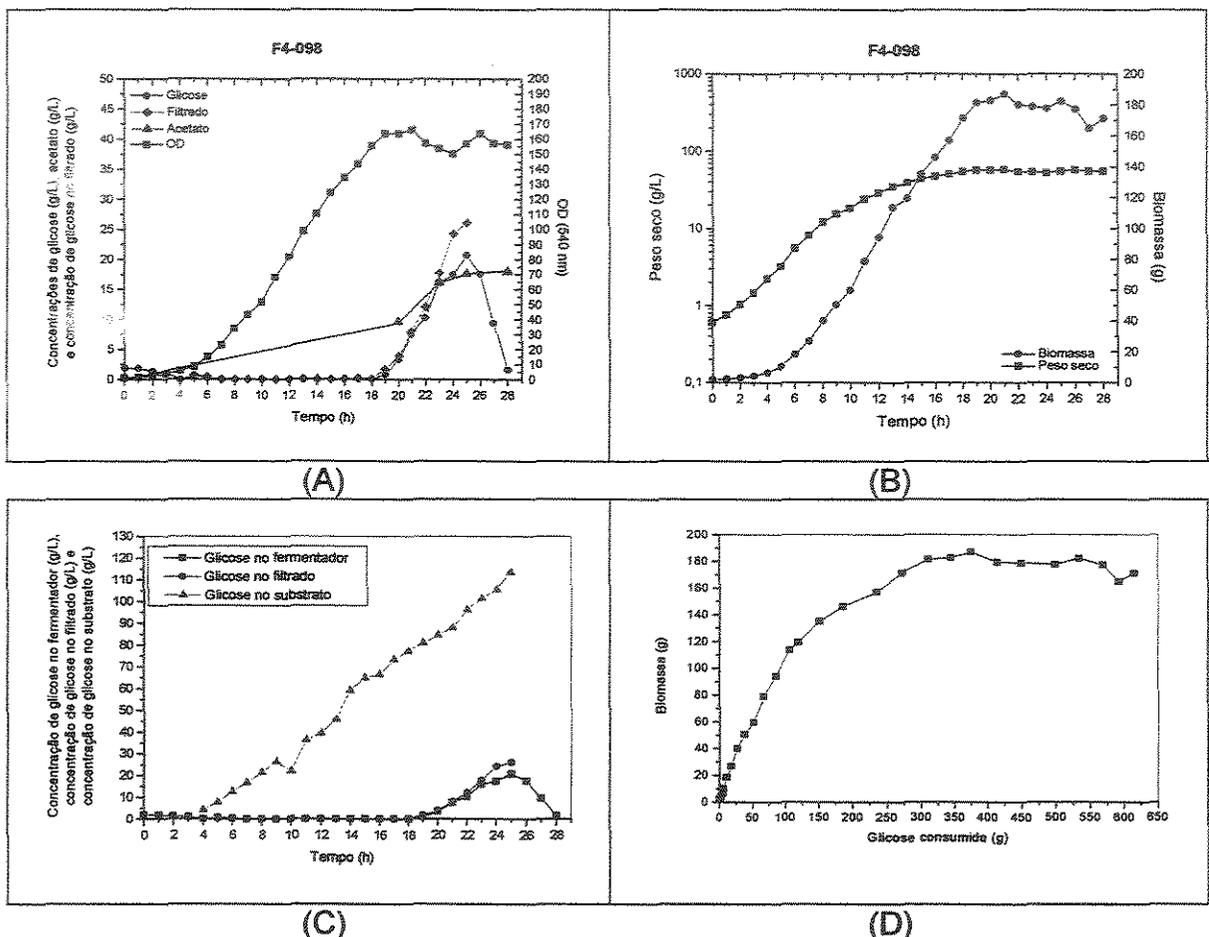


Figura VIII.7 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de Leveduras = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de Leveduras = 39,5 g/L e glicose = 117,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h) e (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g).

No experimento 04-098 a concentração celular obtida foi aproximadamente 60,0 g/L, sem apresentar acúmulo de glicose ou elevada

formação de acetato. Suspeitou-se da limitação do crescimento celular por ausência de microelementos importantes para o metabolismo celular.

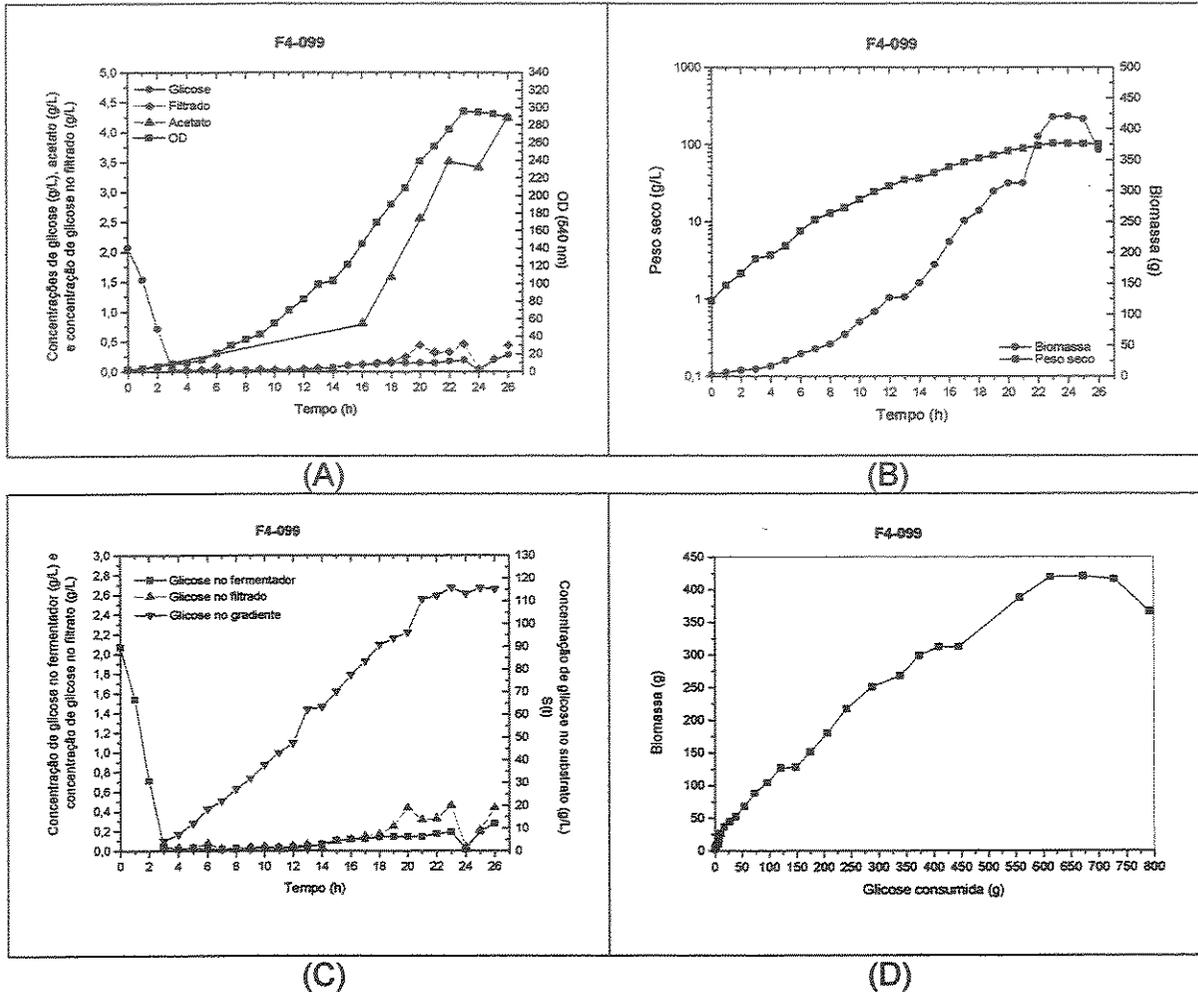


Figura VIII.8 — Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de Leveduras = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de Leveduras = 118,5 g/L e glicose = 117,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h) e (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g).

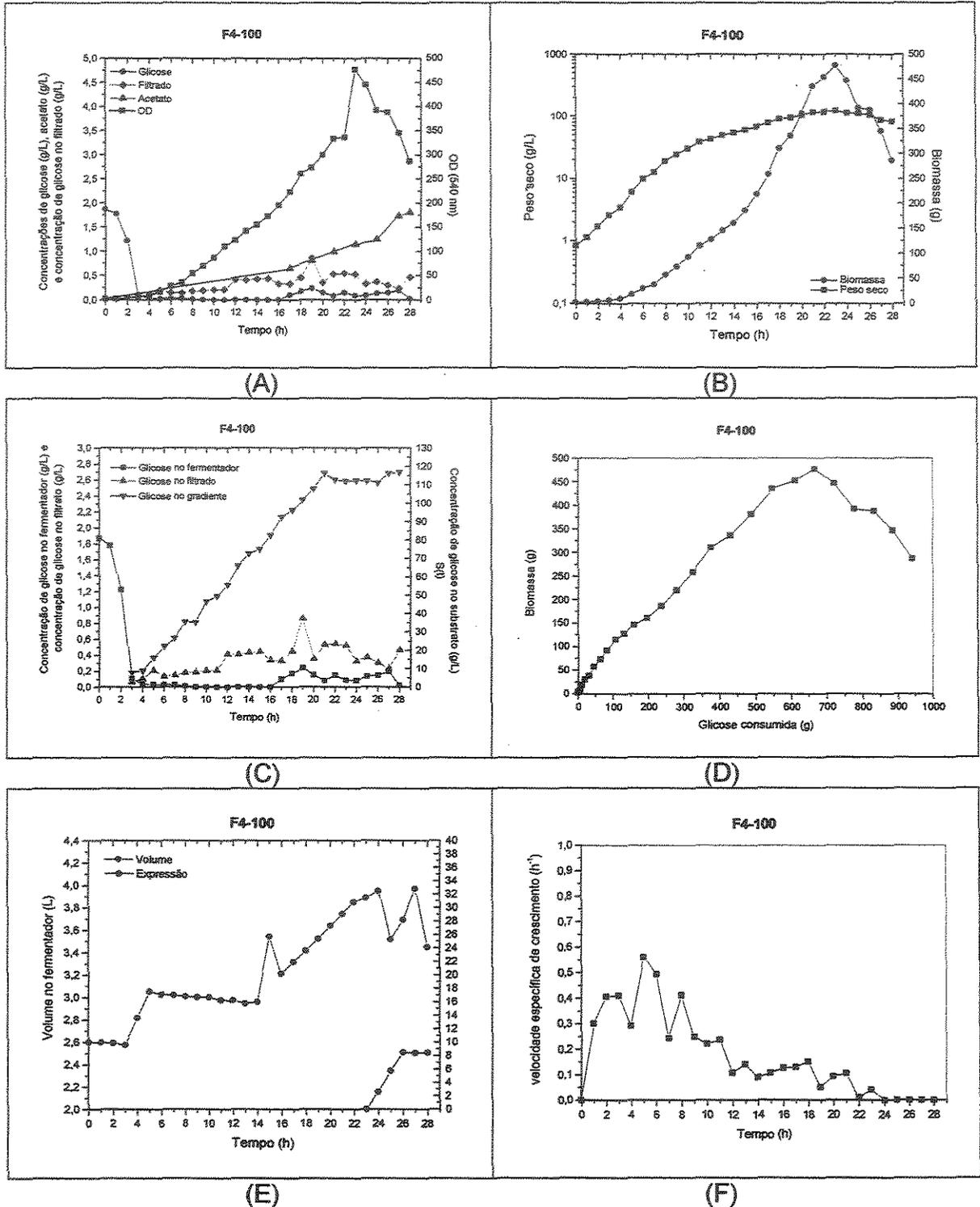


Figura VIII.9 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de levedura = 15,4 g/L e glicose = 3,15 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de levedura = 118,53 g/L e glicose = 118,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/l) e peso seco (g/l) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/l) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose (g/L) no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus tempo (h), (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g), (E) Peso seco (g/L) e expressão (%) versus tempo (h) e (F) Velocidade específica de crescimento (h<sup>-1</sup>) versus tempo (h).

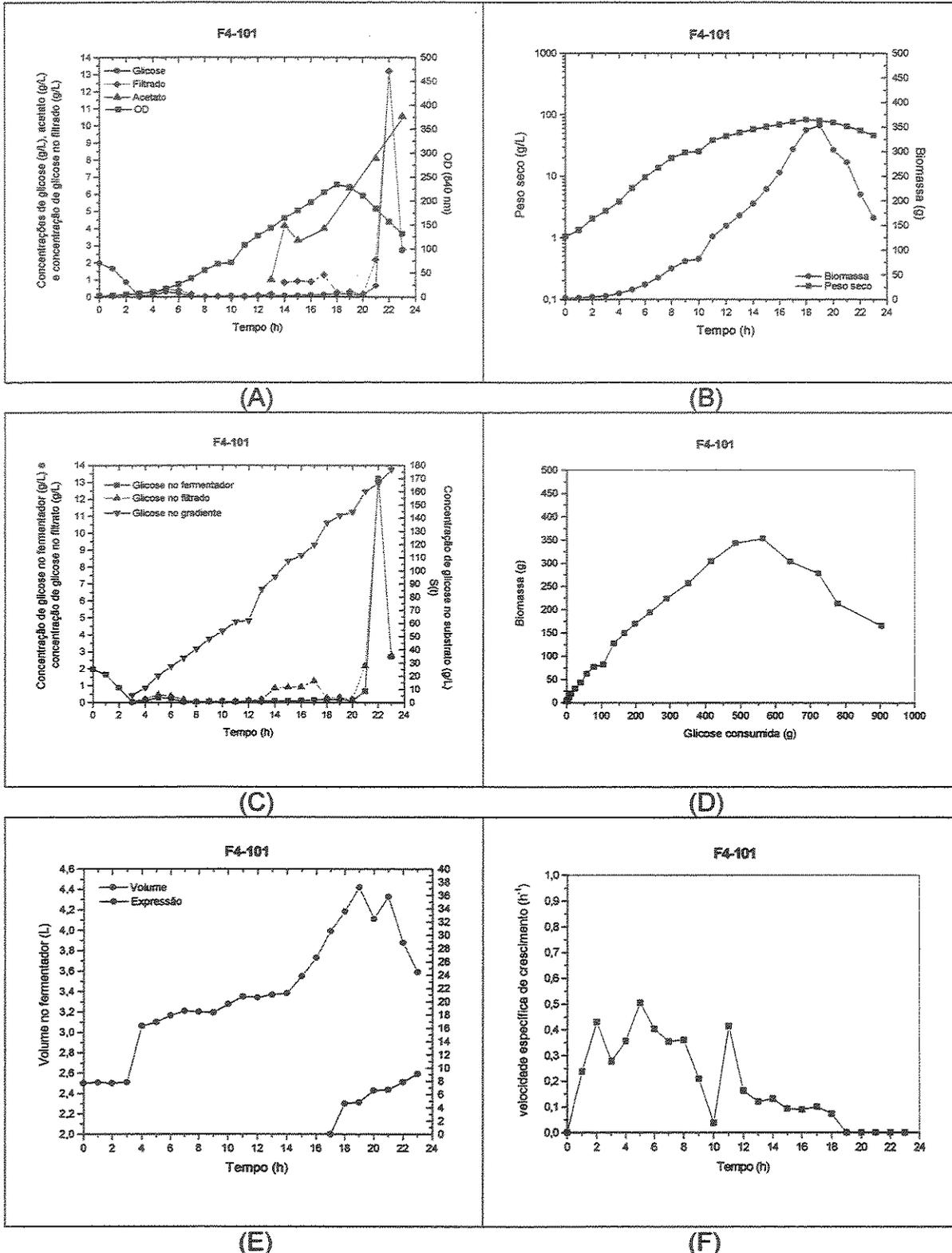


Figura VIII.10 – Fermentação com reciclo total de células acoplada a sistema de microfiltração com alimentação de nutrientes com gradiente linear. Vazão de alimentação 500 mL/h. Alimentação diluída: Extrato de levedura = 15,4 g/L e glicose = 2,63 g/L. Alimentação concentrada: Extrato de levedura = 120,0 g/L e glicose = 166,0 g/L. (A) Concentração de glicose no fermentador(g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo (h) em fermentação com cortes (com indução), (B) Peso seco (g/L) e expressão do corpo de inclusão (%) versus tempo (h), (C) Concentração da glicose no fermentador, na saída do filtro e no gradiente versus

tempo (h), (D) Biomassa formada (g) versus glicose consumida (g), (E) Peso seco (g/L) e expressão (%) versus tempo (h) e (F) Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ ) versus tempo (h).

Esses resultados com reciclo total de células, microfiltração e gradiente linear de alimentação demonstram que foi possível alcançar uma biomassa de aproximadamente 120,0 g/L significativamente maior de que as alcançadas em fermentações em batelada alimentada ou mesmo nos estudos preliminares com micro filtração e reciclo total de células.

O gráfico da Figura VIII.9 mostra claramente que apesar de operar com reciclo total de células e microfiltração, com unidade de diluição igual a  $0,20 h^{-1}$ , existem duas condições distintas de crescimento celular: uma com  $\mu = 0,138 h^{-1}$  e outra com  $\mu = 0,041 h^{-1}$  significativamente menor. Esta diferença na velocidade específica de crescimento pode ser resultante dos seguintes fatores:

- a) Deficiência nutricional demonstrada pela diminuição da velocidade específica de crescimento na fase de crescimento ou, quando no período indutivo pela queda na concentração celular.
- b) Acúmulo gradativo de substâncias inibidoras, principalmente no período indutivo.

Alguns experimentos realizados com taxas de diluição iguais a  $0,100 h^{-1}$  demonstraram a viabilidade da utilização do reciclo de células acoplados a microfiltração tangencial com alimentação por gradiente linear para obtenção de concentrações celulares próximas a 70,0 g/L com 22 horas de fermentação, conforme dados demonstrados na Tabela VIII.2. Estes experimentos, no entanto, apresentaram incremento no volume do fermentador devido à baixa vazão de filtrado, que pode ter sido causada por entupimento da membrana filtrante.

Tabela VIII.2 – Dados finais para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por gradiente linear com taxas de diluição  $D = 0,100 \text{ h}^{-1}$ . Análise do crescimento celular em diferentes composições do meio de alimentação.

Ferm N°	Composição da solução alimentação g/L			Vazão (ml/h)	Vol. Final no ferment. (L)	Início do reciclo (h)	Peso Seco Final (g/L)
	Frasco de Aliment.	YE	Glic.				
B3-039	1	15,4	5,0	300	4,0	3,0	65,88
	2	100,0	190,0				
B3-040	1	15,4	5,0	300	4,0	3,0	70,62
	2	100,0	190,0				

Experimentos anteriores mostraram claramente que as células crescidas em alta densidade celular mantêm as suas características metabólicas inalteradas como a expressão da proteína de fusão. Assim, transferindo alíquotas de células crescidas em alta densidade celular para novo meio (O.D.=5,0) em frascos, elas não só cresceram normalmente como foram também capazes de expressar a proteína quimérica.

Estes resultados experimentais apresentados nas Figuras VIII.9 e VIII.10 mostraram baixa expressão da proteína quimérica quando a indução das células foi realizada em concentrações acima de 80,0 g/L. Este fato não foi creditado a alguma alteração fisiológica da cultura, mas sim, às condições nutricionais não otimizadas do meio para a fase indutiva em tais concentrações celulares. O problema a ser resolvido foi determinar condições nutricionais acopladas com estratégias de alimentação que permitissem a obtenção de elevada expressão da proteína recombinante em fermentação com elevada concentração de biomassa (~100,0 g/L).

### VIII.1.3 – Estratégia de cultivo das fermentações com microfiltração tangencial, reciclo total de células e alimentação por pH-Stat.

No intuito de melhorar a composição do meio único de alimentação propiciando condições favoráveis para o crescimento celular e para a indução da proteína quimérica em condições de alta densidade celular, foi proposta a adaptação da adição dos nutrientes, de forma a obedecer ao princípio utilizado para adição do substrato utilizando a técnica de controle indireto pH-stat, na qual a adição do substrato é consequência de variações do valor do pH da cultura.

Nas fermentações com reciclo com alimentação por gradiente linear, a quantidade de substrato foi calculada para alcançar concentrações celulares da ordem de 120,0 g/L. Porém, esse cálculo não considerou a quantidade de substrato necessária para a produção dos corpos de inclusão, desta maneira houve queda na concentração celular e baixa expressão da proteína de fusão ao término da fase indutiva. A quantidade de sais de fosfato, solução oligodinâmica, extrato de levedura e peptonas utilizadas nas alimentações com gradiente linear foram estimadas em três vezes as utilizadas em fermentações batelada-alimentada tradicional.

Para adaptação do método de controle indireto pH-stat, utilizou-se uma solução de nutrientes composta por glicose, extrato de levedura, sal de fosfato, solução oligodinâmica e outros sais que compõem o meio de cultura inicial.

A solução de nutrientes foi adicionada por bombas peristálticas acionadas pela variação de pH, de maneira análoga à adição de glicose 70% realizada em fermentações batelada-alimentada tradicional. A retirada do filtrado também foi realizada de maneira similar. Ou seja, as bombas peristálticas para retirada do filtrado e adições de nutrientes foram acionadas no mesmo momento, de modo que o volume de meio de cultura no fermentador permaneceu constante. A bomba de recirculação do meio de cultura no sistema de microfiltração foi mantida acionada em 30,0 L/min. O reciclo de células e microfiltração iniciaram logo após o término da glicose inicial do meio de cultura.

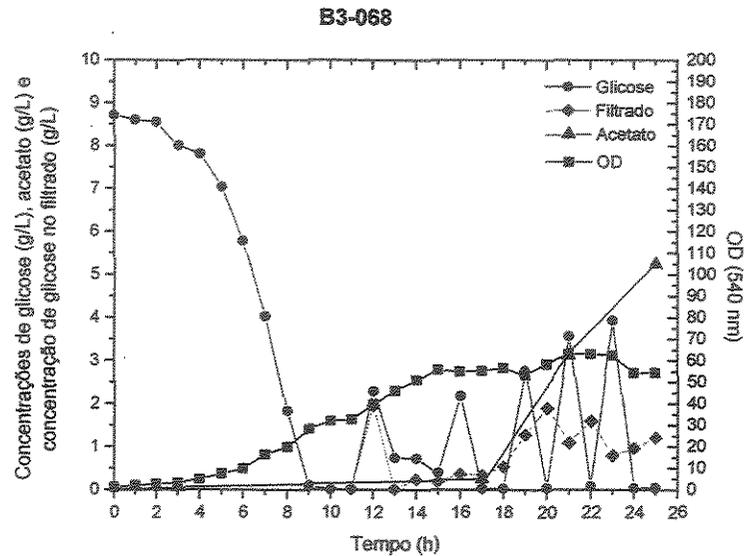
Experimentos foram realizados com a finalidade de estudar o crescimento celular em fermentações com reciclo, microfiltração e adição de nutrientes via pH-stat. Diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura no meio de alimentação foram estudadas e os resultados apresentados na Tabela VIII.3.

**Tabela VIII.3** – Dados finais em fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH-stat. Análise do crescimento celular em diferentes composições do meio de alimentação.

Ferm	Composição de alimentação única (g/L)		Peso Seco (g/L)	Tempo de cultivo (h)	Início do reciclo (h)	Produtividade (g/L/h)
	YE	Glic.				
B3-043	30	100	67,24	27	8	2,490
B3-046	30	100	58,88	22	4	2,676
B3-047	120	100	136,13	22	3	6,188
B3-048	120	100	124,50	22	4	5,659
B3-068	30	300	36,8	22	8	1,672
B3-069	30	300	8,59	24	8	0,390

Observando os dados da Tabela VIII.4, pode-se afirmar que a configuração do meio de nutrientes único composto por glicose 10% (m/v) e extrato de levedura 12% (m/v) apresentou melhor desempenho para o crescimento celular. O aumento na concentração de glicose proporcionou baixo crescimento celular. Observando-se a Figura VIII.11, vê-se que houve acúmulo de glicose durante toda a fermentação e, conseqüente formação de ácido acético. Além disso, a taxa de diluição foi extremamente baixa.

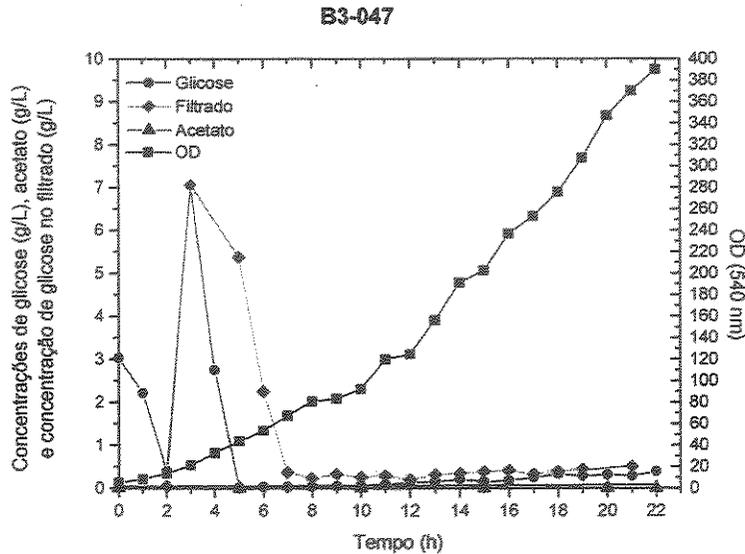
O efeito da concentração do extrato de levedura também pode ser observado na Tabela VIII.3. Os experimentos conduzidos com solução de alimentação única contendo 100,0 g/L de glicose apresentaram os resultados mais satisfatórios em peso seco de células. Ao utilizar 30 g/L de extrato de levedura, o resultado apresentado foi em média 63,0 g/L de peso seco, enquanto que ao utilizar 120,0 g/L de extrato de levedura, o resultado apresentado foi em média 130,0 g/L de peso seco de células. A produtividade celular considerando o tempo de fermentação foi próxima a 6,0 g/L/h, ou seja, aproximadamente três vezes maior que o resultado obtido em fermentações batelada-alimentada tradicional.



**Figura VIII.11** – Cinéticas de crescimento celular (g/L), de consumo de glicose (g/L), de formação de acetato (g/L) e concentração de glicose no filtrado versus tempo (h). Fermentação com solução de nutrientes composta por glicose 30% e extrato de levedura 3%.

A Figura VIII.12 mostra as cinéticas de crescimento, consumo de glicose e formação de acetato, bem como a concentração de glicose no filtrado para a fermentação B3-047. A concentração celular final obtida em 22 horas de fermentação foi de 136,0 g/L, a concentração de glicose permaneceu limitante durante quase toda a fermentação havendo uma elevação na sua concentração apenas no início do processo, mas não houve efeitos deletérios sobre as células. Não houve acúmulo de acetato durante o cultivo.

No entanto, nestes experimentos ainda não foi avaliado o acompanhamento da expressão da proteína de fusão nessas condições de fermentação. Para avaliar este parâmetro, preparou-se uma nova série de experimentos variando as concentrações de extrato de levedura na solução de alimentação de adição de nutrientes.



**Figura VIII.12** - Cinéticas de crescimento celular (g/L), de consumo de glicose (g/L), de formação de acetato (g/L) e concentração de glicose no filtrado versus tempo (h). Fermentação com solução de nutrientes composta por glicose 10% e extrato de levedura 12%.

#### VIII.1.4 – Estratégia de cultivo das fermentações com microfiltração tangencial, reciclo total de células e alimentação por pH-Stat. Avaliação da fase de indução da proteína de fusão.

Para avaliar a expressão da proteína de fusão, considerou-se a concentração de glicose com melhores desempenhos para obtenção de densidades celulares elevadas e variaram-se as concentrações de extrato de levedura. Alguns experimentos foram realizados adicionando peptona de caseína ao meio de cultivo. A fase de crescimento foi conduzida a 30 °C e a indução a 40 °C, sendo que esta foi iniciada quando a densidade ótica alcançou 200 OD (540 nm), ou seja, aproximadamente 70,0 g/L. O pH da cultura foi mantido em 6,80 pela adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  durante o período no qual a glicose inicial foi consumida e pela adição da solução de alimentação após este período. A concentração de oxigênio foi mantida acima de 20 % pelo incremento da agitação (RPM), pelo aumento da vazão de ar e pelo enriquecimento do ar com oxigênio dissolvido.

Para adaptação do método de controle indireto pH-stat, utilizou-se uma solução de nutrientes composta por glicose, extrato de levedura, sal de fosfato, solução oligodinâmica e outros sais que compõem o meio de cultura inicial. A solução de nutrientes única foi adicionada por bombas peristálticas acionadas pela variação de pH, de maneira similar à série de experimento para avaliação do crescimento celular.

Para manter o volume do fermentador constante, foram utilizadas duas bombas peristálticas. Sendo que a bomba para adição de nutrientes era acionada para o acerto do pH em 6,80, funcionando como adição de uma solução ácida. A bomba para retirada do filtrado era acionada no mesmo instante, de maneira a compensar o volume adicionado ao fermentador.

A bomba de recirculação do meio de cultura no sistema de microfiltração foi mantida acionada em 30,0 L/min. O reciclo de células e microfiltração iniciaram logo após o término da glicose inicial do meio de cultura.

Os resultados referentes à série de experimentos realizada para avaliar a porcentagem de expressão são apresentados na Tabela VIII.4. A concentração de células final, a porcentagem de expressão da proteína de interesse e a produtividade celular nos experimentos com reciclo, microfiltração e adição de nutrientes via pH-stat estão tabulados. As diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura no meio de alimentação único estudadas e os resultados são apresentados nas Tabela VIII.4 e VIII.5.

**Tabela VIII.4** – Dados finais para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH-stat. Análise do crescimento celular e expressão da proteína de fusão em diferentes composições do meio de alimentação.

Ferm	Composição da solução alimentação (g/L)			Peso Seco (g/L)	Expressão (%)	Tempo de cultivo (h)	Tempo de indução (h)	Produtividade (g/L/h)
	YE	Peptona	Glicose					
B3-064	100	0	100	98,22	10,9	25	8	3,929
B3-065	100	20	100	155,6	14,1	25	8	6,224
B3-066	150	0	100	173,8	17,8	27	10	6,437
B3-067	150	20	100	150,7	16,3	27	10	5,581

Segundo a Tabela acima, a fermentação B3-066 apresentou o melhor desempenho tanto para obtenção de células quanto para produção da proteína de fusão, sendo que este experimento foi realizado com extrato de levedura a 15% (m/v).

O efeito da peptona no meio de alimentação não foi tão significativo quanto o efeito da concentração do extrato de levedura, pois a concentração celular apresentou aumento da ordem de 70%.

**Tabela VIII.5** – Dados obtidos para fermentações com reciclo total de células, microfiltração e alimentação por método indireto pH-stat. Análise das fases de crescimento celular e de indução da proteína de fusão.

Ferm	O.D. (540nm)	P.S. (g/L)	$Y_{X/S}$ cres (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{X/S}$ ind (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$Y_{X/S}$ TOT (g <sub>cel</sub> /g <sub>glic</sub> )	$\mu_{cresc}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{ind}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{total}$ (h <sup>-1</sup> )	Estab. (%)	Acet. (g/L)
B3-064	281,2	98,22	0,821	0,462	0,612	0,246	0,077	0,192	99	3,982
B3-065	446,4	155,58	0,598	0,544	0,584	0,305	0,032	0,218	92	5,927
B3-066	498,0	173,76	1,062	0,237	0,610	0,309	0,032	0,207	98	7,151
B3-067	432,0	150,76	0,893	0,446	0,738	0,293	0,028	0,195	96	0,477

As fermentações com reciclo tiveram taxas específicas de crescimento significativamente maiores que as apresentadas nos outros modos de cultivo (batelada-alimentada tradicional e batelada-alimentada com um ou dois estágios) sem, no entanto, apresentar inibição pela formação de acetato ou acúmulo de nutrientes e/ou outras substâncias.

Outro aspecto importante a ser observado neste tipo de estratégia de cultivo em altas densidades celulares foi à manutenção da estabilidade do plasmídeo em níveis próximos a 100 %. Esse aspecto torna-se importante quando é lembrada a importância da viabilidade celular somado a transferência do plasmídeo das células mães para as células filhas.

Apesar destes resultados estimulantes, as fermentações com reciclo de células apresentam alguns problemas que devem ser comentados:

i) Os sistemas de filtração apresentam dificuldade de manter a vazão do filtrado devido principalmente ao fenômeno da “gel filtração” o qual consiste na

formação e compactação de uma torta entre a superfície da membrana filtrante e do meio de cultura a ser filtrado.

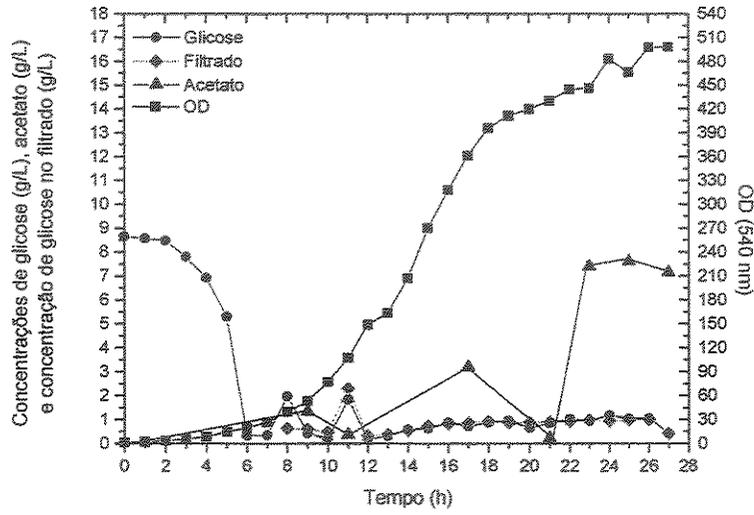
ii) Perdas de nutrientes devido a microfiltração. Com relação a esse aspecto, é necessário estudar a relação entre nutrientes consumidos no processo e a quantidade de peso seco de células e proteína de fusão obtidas.

iii) Devido ao aumento da viscosidade do meio de cultura, o reciclo de células torna-se mais difícil, exigindo maior potência da bomba de recirculação da solução a ser filtrada.

A Figura VIII.13 apresenta os resultados obtidos na fermentação B3-066, aquela que apresentou os resultados mais promissores nas diferentes configurações de composição da solução de alimentação única. Além das cinéticas de crescimento e de consumo de glicose, são apresentadas na Figura VIII.13 as curvas de peso seco (g/L), aumento do volume no fermentador, biomassa total formada e estabilidade do plasmídeo, bem como a cinética de formação da proteína de fusão.

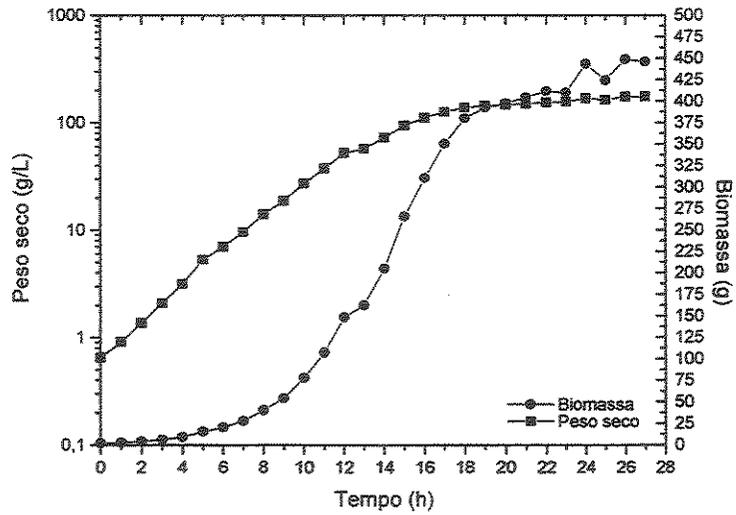
A fermentação apresentou concentração final de células em peso seco de 173,8 g/L, a concentração de glicose foi mantida limitante, entre 0,0 e 1,0 g/L durante toda a fase de alimentação de nutrientes. A concentração de acetato permaneceu próxima a zero enquanto a temperatura foi mantida a 30,0 °C, elevando-se a temperatura a 40 °C a sua concentração atingiu o valor de 7,15 g/L. A estabilidade do plasmídeo, durante toda a fermentação, não apresentou variação significativa e manteve-se próxima a 100 %, mesmo durante o período de indução. A taxa específica de crescimento desta fermentação foi 0,207 h<sup>-1</sup>, sendo que no período de crescimento a taxa específica de crescimento foi 0,309 h<sup>-1</sup> e no período de indução 0,032 h<sup>-1</sup>. O fator de conversão de células por substrato ( $Y_{X/S}$ ) durante a fermentação foi 0,610 g<sub>células</sub> /g<sub>glicose</sub>, durante a fase de crescimento e a fase de indução, os valores obtidos foram, respectivamente, 0,748 e 0,227 g<sub>células</sub> /g<sub>glicose</sub>. A produtividade em biomassa da fermentação observada foi 6,437 g/L/h.

B3-066

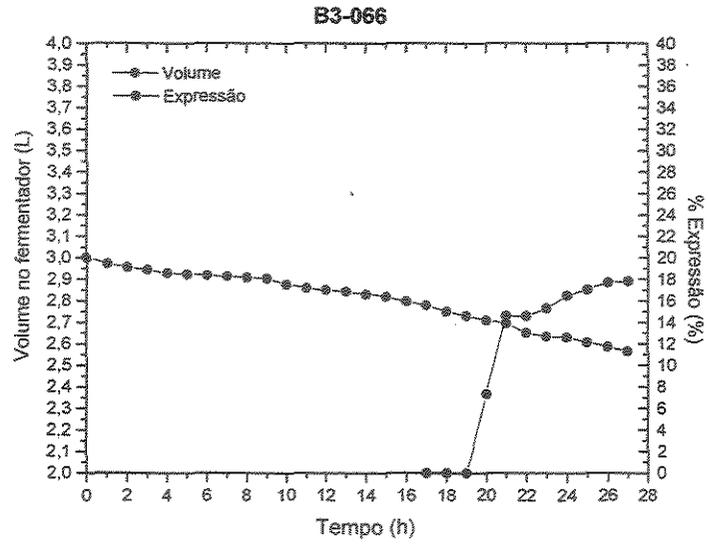


(A)

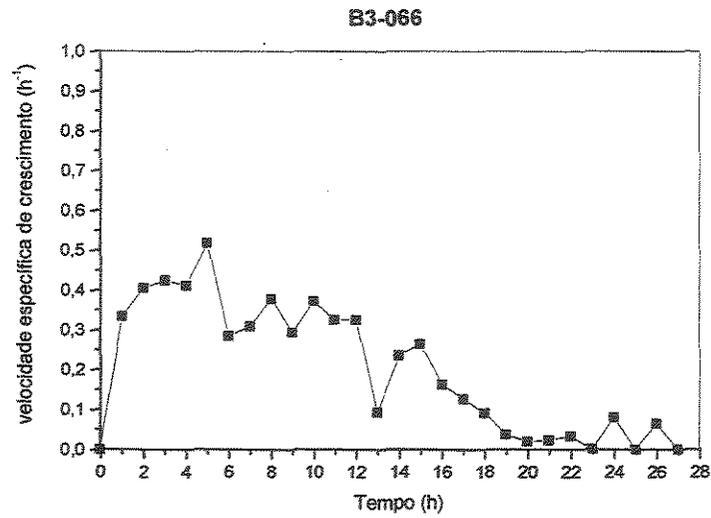
B3-066



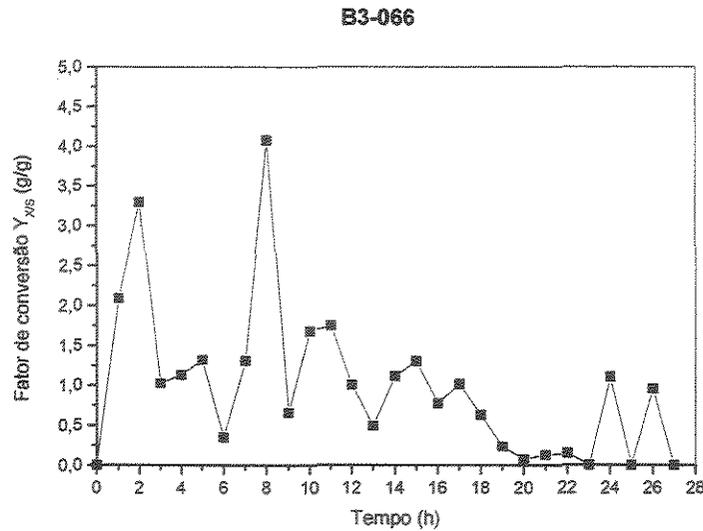
(B)



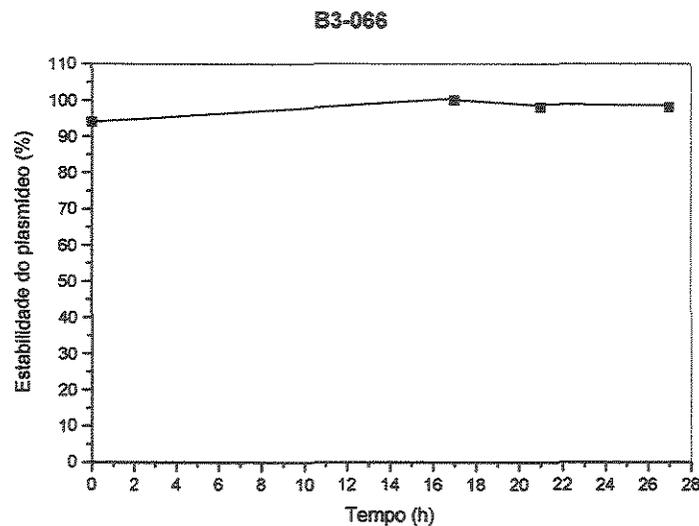
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura VIII.13 – Cinéticas para fermentação com reciclo total de células e microfiltração do meio de cultura utilizando alimentação de nutrientes por pH-Stat. (A) Concentração de glicose (g/L), acetato (g/L) e peso seco (g/L) versus tempo de fermentação (h) para obtenção de insulina recombinante, utilizando-se *E. coli*. (B) Peso seco (g/L) e biomassa (g) versus tempo (h). (C) Volume no fermentador versus tempo (h). (D) Velocidade específica de crescimento versus tempo (h). (E) Fator de conversão  $Y_{X/S}$  ( $g_{células}/g_{glicose}$ ) versus tempo (h). (F) Estabilidade do plasmídeo versus tempo (h).

Do gráfico (D), pode-se distinguir claramente dois valores médios para velocidades específicas de crescimento referentes às fases de crescimento celular

e de indução da proteína de fusão. Essa diferença demonstra a inibição no crescimento celular como resposta a indução da proteína recombinante. Conforme Lin (2000), existe competição entre as funções de regulação e manutenção metabólicas das células e os níveis de transcrição e tradução, para as moléculas de RNA polimerase, bem como para os fatores de tradução que contribuem para a expressão do gene recombinante. Essa competição leva à inibição do crescimento celular na fase indutiva, o que pode ser observado nos diferentes modos de cultivo durante essa tese.

#### VIII.1.5 – Análise do processo de microfiltração tangencial.

Neste trabalho, optou-se pela utilização de reciclo externo de células através de filtros tangenciais devido à freqüente utilização destes equipamentos em processos biotecnológicos, principalmente aqueles de fibra oca e cassetes. Apesar de amplamente utilizados, sabe-se que estes processos apresentam várias características indesejáveis, entre eles o "fouling", a formação do gel de polarização e a formação de espuma (Lee e Chang, 1989; Lee, et al., 1994; Lee et al., 1991; MacDonald e Neway, 1990; Grón et al., 1995; Bowen et al., 1993).

Os sistemas de microfiltração tangencial utilizados foram os sistemas Filtron modelo mini-cassete de 0,30  $\mu\text{m}$  de porosidade e 65  $\text{cm}^2$  de área específica, para os experimentos preliminares e com gradiente de alimentação e o sistema Frings-Myroclin, modelo tubular, de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade e 0,2  $\text{m}^2$  de área específica para os demais experimentos.

O sistema Filtron apresentou problemas para manutenção da vazão de filtrado durante o final dos ensaios. Outro aspecto negativo deste sistema foi o fato desta membrana não ser esterilizável em autoclave, dificultando a operação de esterilização. Realizava-se a limpeza da membrana após o ensaio com NaOH 5N a 40 °C e uma sanitização química com solução formol 1% e posterior enxágüe com salina estéril. Neste tipo de sistema ficou evidenciado a formação do gel polimerização e, por conseqüência, a diminuição da vazão de filtrado no decorrer da fermentação, ou seja, com a elevação da concentração celular.

Para evitar o “fouling” propôs-se a utilização de um sistema de microfiltração com área de filtração maior. Com a utilização da membrana Frings-Microdyn e mantendo-se a vazão de recirculação em aproximadamente 10,0 L/min foi possível estabelecer uma boa relação entre a velocidade tangencial por área filtrante. Contudo, mesmo com este cuidado, as fermentações realizadas com reciclo total de células e microfiltração do meio de fermentação apresentaram relativa dificuldade para a manutenção da vazão de retirada do filtrado, devido ao aumento da viscosidade do meio. Este comportamento foi observado por Reismeier et al. (1987) e Kroner et al. (1987) que observaram em filtrações, cujo objetivo foi obter elevada concentração celular, a vazão do filtrado decresce durante o processo à medida que a concentração de células aumenta. A queda da vazão foi nitidamente observada na etapa final quando a concentração celular alcança valores acima de 120,0 g/L. De acordo com Kroner et al. (1987) este comportamento deve-se ao aumento da viscosidade do meio de fermentação devido à elevada concentração celular atingida, com conseqüente redução do número de Reynolds (Re) e aumento da resistência ao transporte de massa. Soma-se a esses fatores, a compactação da camada de gel polimerização que adere fortemente à superfície da membrana, reduzindo a sua permeabilidade.

Outro parâmetro importante para a manutenção da vazão de filtrado foi evitar a formação de espuma. Quando do surgimento de espuma no meio de fermentação fez-se a utilização de anti-espumante a base de simeticone, porém esta substância adere-se na membrana de filtração, potencializando o efeito de “fouling”. Sugere-se, então, a utilização de agentes anti-espumantes solúveis, tais como polipropilenoglicol P2000, apesar do seu alto custo. Para reduzir a formação de espuma o retorno do meio de fermentação ao bioreator foi feito por intermédio de um tubo de inox no interior do caldo de fermentação, evitando que o líquido fosse lançado do topo do fermentador sobre líquido interno causando menos turbulência e conseqüentemente menor formação de espuma.

## CAPÍTULO IX

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho foi possível estudar o cultivo de *Escherichia coli* recombinante em altas densidades celulares identificando importantes parâmetros cinéticos para as fases de crescimento e indução da proteína recombinante. Foram estudadas diversas estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares com objetivo de induzir a expressão da proteína de fusão, utilizando como modelo a pró-insulina humana. As estratégias de cultivo estudadas foram batelada-alimentada, batelada-alimentada repetida, batelada-alimentada cíclica em dois estágios e a fermentação batelada-alimentada com reciclo total de células e microfiltração.

A fermentação batelada-alimentada continua sendo a estratégia de cultivo mais utilizada para produção de proteínas recombinantes em cepas de *E. coli*. No decorrer deste trabalho, diversos aspectos sobre a condução da fermentação visando alta produtividade de biomassa e de proteína recombinante foram discutidos. Essa alta produtividade está diretamente ligada a alguns fatores, tais como: i) a manutenção da glicose em concentrações limitantes, principalmente durante o período da indução da proteína e ii) a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em níveis entre 20 e 30%. Esses fatores mantêm a taxa de crescimento específico entre os valores 0,100 a 0,200 h<sup>-1</sup>, reduzindo a formação de subprodutos metabólicos tóxicos, corroborando diversos pesquisadores, tais como Klemann e Strohl (1994), Paalme et al. (1990) e Lima e Thiemann (2003).

Os experimentos realizados com oscilações na concentração de glicose no meio de fermentação durante o cultivo por intermédio de pulsos demonstraram que altas concentrações de substrato na fase de crescimento foram favoráveis ao crescimento celular em cultivos a 30 °C, aumentando a taxa de crescimento específica da fermentação. Na fase de indução da proteína de fusão, observou-se que a combinação entre excesso de glicose e altas temperaturas de cultivo propiciam a formação de acetato, prejudicando a formação dos corpos de

inclusão. Diante destes resultados fica evidenciado que a manutenção da concentração de substrato em patamares limitantes é condição necessária para ocorrer expressão da proteína de fusão em níveis satisfatórios.

Dos experimentos com fermentações batelada-alimentada nos quais foram realizadas oscilações na concentração de oxigênio dissolvido com variações nos fluxos volumétricos de ar e oxigênio puro, bem como na composição da mistura de ambos por meio de um misturador de gases, pode-se concluir que a ausência ou excesso de oxigenação acarreta tanto a formação de acetato quanto afeta a produção da proteína de fusão. Evidencia-se a necessidade da manutenção da concentração do oxigênio dissolvido entre 20 e 30 % para o bom andamento da fermentação.

Para as fermentações batelada-alimentada definiu-se a melhor configuração para a disposição das turbinas em fermentadores de bancada com capacidade máxima de 20 litros. Sendo que o melhor resultado obtido utilizando três turbinas foi com a configuração a seguir, uma turbina Rushton e duas turbinas Lightin 315, do fundo para o topo do eixo do fermentador. Essa configuração é capaz de aumentar a eficiência de mistura do gás no meio de fermentação, resultando em maior aproveitamento do oxigênio dissolvido.

Com os dados de produtividade em biomassa e em proteína de fusão fornecidos pela BIOMM S/A e apresentados na Tabela V.2 para fermentações batelada-alimentada tradicional, será realizada a comparação com outras estratégias de cultivo, tais como: Batelada-alimentada repetida, batelada-alimentada cíclica em dois estágios e fermentação com microfiltração tangencial e reciclo total de células.

A produtividade celular obtida em fermentações batelada-alimentada tradicional foi, em média,  $P_{FB} = 2,201$  g/L/h, sendo que a concentração em peso seco de células obtida foi 49,6 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 18,6 %. Estes são valores comercialmente viáveis para projetos de produção industrial de proteínas recombinantes.

A segunda alternativa estudada para obtenção de altas densidades foi à fermentação batelada-alimentada repetida, ou como também é chamada,

batelada-alimentada cíclica com único estágio. Os experimentos utilizando esta estratégia consistiam em um início análogo as fermentações batelada-alimentada tradicional, sendo que após a fase de indução o meio fermentado foi coletado, de maneira que um litro do meio de cultivo foi deixado no fermentador para atuar como inóculo no ciclo seguinte. Imediatamente após a retirada do fermentado, uma quantidade de meio de fermentação estéril foi adicionada ao fermentador assepticamente, de modo que o volume inicial do primeiro ciclo fosse atingido, bem como as concentrações iniciais do meio de cultura.

As fermentações batelada-alimentada repetida realizadas sem indução apresentaram como resultados o aumento significativo da produtividade em biomassa. Pois o novo ciclo fermentativo, bem como a estabilidade do plasmídeo e a taxa específica de crescimento não são influenciadas pela retirada do fermentado e adição do meio de fermentação novo e estéril.

Os experimentos conduzidos seguindo esta estratégia que apresentaram os melhores resultados foram realizados com 5 horas de crescimento e 7 horas de indução para cada ciclo. Ao término do primeiro ciclo parte significativa do meio de fermentação foi retirada, de maneira que 1,0 L do fermentado permaneça no bioreator para inóculo do segundo ciclo. Imediatamente após a coleta do caldo fermentativo, 7,0 L de meio novo foi adicionado, reiniciando a fermentação nas mesmas condições do primeiro ciclo. Observou-se que a partir do segundo ciclo o crescimento celular foi afetado pelas mudanças de temperatura, pois a estabilidade do plasmídeo foi afetada pelas mudanças de temperatura ocorridas nas fases de crescimento e indução dos ciclos anteriores. Após a primeira indução, observou-se, em todos os experimentos, a ocorrência de uma fase lag prolongada, devido à ocorrência de baixa concentração de células produtivas no inoculo dos ciclos posteriores o que reduziu a produtividade volumétrica do cultivo no tempo estabelecido em cada ciclo. A instabilidade genética de microorganismos recombinantes é um dos principais problemas para o aumento de escala dos processos fermentativos, já que usualmente as cepas recombinantes são mais instáveis quando em condições de expressão que em condições de repressão. Os resultados da expressão da proteína de fusão foram menores que em fermentações batelada-alimentada tradicionais. A produtividade

celular obtida em fermentações batelada-alimentada repetida foi, em média,  $P_{RFB} = 1,895$  g/L/h, sendo que a média das concentrações finais em peso seco de células foi 46,7 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,0%.

O cultivo de *Escherichia coli* utilizando a técnica de batelada-alimentada cíclica com dois estágios também foi estudado para a síntese de proteínas heterólogas. Essa técnica é similar a um processo batelada-alimentada repetida, diferenciando deste na medida em que a fase de indução não será conduzida no mesmo vaso em que será utilizado na fase de crescimento. Parte do volume retirado do fermentador será transferida para outro fermentador no qual se conduzirá a fase de indução térmica, de acordo com a Figura VII.1. Essa metodologia apresentou resultados em produtividade expressivamente melhores que os obtidos anteriormente em fermentações batelada-alimentada repetida. Sendo que a produtividade celular obtida em fermentações batelada-alimentada cíclica em dois estágios foi, em média,  $P_{CFB} = 2,571$  g/L/h. A média obtida das concentrações finais em peso seco de células em cada ciclo foi 39,3 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 19,4%.

As fermentações conduzidas pela técnica de batelada alimentada tradicional apresentaram um baixo crescimento celular comparando-se com o crescimento máximo teórico para culturas de *E. coli*, que se situa entre 160-200 g/l registrado na literatura. Os rendimentos em biomassa obtidos, em média, se situam em 40-50 g/l devido, principalmente, ao acúmulo de produtos metabólicos da fermentação.

Ao compararmos com resultados obtidos em fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes concluímos que a eficiência pode ser aumentada com a remoção de subprodutos metabólicos inibidores do crescimento celular, conforme reportado por Märkl e Pörther (1998) e por Fucks et al (2002). Processos operados com reciclo total de células são vantajosos quando o produto formado não está associado ao crescimento, como neste caso de proteínas recombinantes intracelulares.

As fermentações realizadas com vazão de alimentação constante e gradiente linear de nutrientes apresentaram resultados experimentais próximos a 120,0 g/L durante o período de crescimento. Porém, quando as células foram induzidas ocorreu queda na concentração celular e o resultado em porcentagem de proteína de fusão foi pífio, conforme apresentado nas Figuras VIII.7, VIII.8, VIII.9 e VIII.10. Presume-se que este fato seja creditado à competição metabólica existente entre as funções de manutenção celular e de regulação gênica do gene recombinante e à ausência de nutrientes essenciais para a produção da proteína recombinante em conjunto ao crescimento celular.

A utilização de vazões exponenciais para fermentações com reciclo garantiu a obtenção de concentrações celulares acima de 160,0 g/L de células com 17,8 % proteína de fusão. No entanto, esta estratégia de cultivo apresenta dificuldades na sua condução, devido principalmente, a ocorrência do fenômeno de gel polimerização na membrana filtrante. Com o aumento da viscosidade do meio de fermentação a partir de densidade ótica de 300 OD (540nm) tornou-se mais difícil o bombeamento do meio de fermentação através da membrana filtrante, o que reduz a eficiência da microfiltração e diminui a vazão de filtrado, podendo até acarretar em acúmulo de volume no fermentador. A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido também é um fator crítico para o bom andamento do processo, exigindo que a vazão do ar seja elevada até 9,0 L/L/min em conjunto com enriquecimento do ar com oxigênio puro. Contudo, este processo pode ser explorado industrialmente, pois o incremento em produtividade em biomassa é 340% maior que a batelada-alimentada tradicional e 70% maior que a batelada-alimentada cíclica em dois estágios, conforme será demonstrado nas Tabelas IX.1 e IX.2.

A produtividade celular obtida em fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes foi  $P_R = 6,437$  g/L/h. A média obtida das concentrações finais em peso seco de células em cada ciclo foi 173,8 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,8%.

As Tabelas IX.1 e IX.2 fazem a comparação entre as diferentes estratégias de cultivo em altas densidades celulares. Para simular a utilização

destas diferentes estratégias em processos industriais é necessário fazer algumas considerações.

i) Considera-se que são utilizados dois fermentadores na batelada-alimentada cíclica em dois estágios, todas as outras estratégias de cultivo são calculadas considerando sistemas de produção utilizando duas linhas de fermentação.

ii) Considera-se que são mantidos os dados finais de peso seco de células (g/L) e de expressão da proteína de fusão para cada estratégia.

iii) Considera-se o tempo de preparo do fermentador e crescimento do inóculo igual a 20 horas para as diferentes estratégias de cultivo.

iv) Considera-se o tempo de fermentação para estratégia batelada-alimentada tradicional como sendo 24 horas.

iv) Considera-se o tempo de fermentação para estratégia batelada-alimentada repetida como sendo 24 horas para dois ciclos.

v) Considera-se o tempo de fermentação para estratégia batelada-alimentada cíclica em dois estágios como sendo 16 horas em cada ciclo e

vi) Considera-se o tempo de cultivo em fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes como sendo 27 horas.

Portanto, nas Tabelas IX.1 e IX.2, os resultados das estratégias batelada-alimentada tradicional (FB), batelada-alimentada repetida (RFB) e reciclo total de células com microfiltração e alimentação por pH-stat (Reciclo) foram calculados para 3 corridas em dois sistemas fermentativos. Enquanto, para a estratégia de fermentação batelada-alimentada cíclica com dois estágios (CFB) foram calculados para 17 ciclos fermentativos.

Tabela IX.1 – Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares.

	VOLUME (L)	Tempo de Ferm. e Prep. (h)
FB	78	132
RFB	121	132
CFB	182	136
Reciclo	72	141

Tabela IX.2 – Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares.

	Produtividade Biomassa (g/h)	Produtividade Prot. de Fusão (g/h)	Fator de Incremento Biomassa	Fator de Incremento Proteína de Fusão
FB	27,1	2,76	1,00	1,00
RFB	42,6	4,05	1,54	1,43
CFB	53,3	5,69	1,98	2,07
Reciclo	88,7	8,68	3,41	3,28

Com esses dados pode-se concluir que a utilização de um sistema de microfiltração, por reduzir a quantidade de produtos metabólicos no meio de fermentação e por reciclo total de células, pode ter aplicação industrial imediata devido ao grande aumento da produtividade obtido neste sistema.

Todas as estratégias de cultivo estudadas apresentam incremento em biomassa e em proteína de fusão quando comparadas à fermentação batelada alimentada tradicional. A estratégia do reciclo total de células acopladas a sistemas de microfiltração apresenta aumento da produtividade da ordem de 3,4 vezes e destaca-se como sendo a estratégia capaz de melhorar a produtividade de sistemas de produção de proteínas recombinantes através de cultivos de *E. coli* em altas densidades celulares.

## CAPÍTULO X

### CONCLUSÕES

1 - Neste trabalho estudou-se o cultivo de *Escherichia coli* recombinante em altas densidades celulares identificando importantes parâmetros cinéticos para as fases de crescimento e indução da proteína recombinante. Foram estudadas diversas estratégias de cultivo para obtenção de altas densidades celulares, dentre elas o cultivo com reciclo total de células, microfiltração tangencial do meio de fermentação e alimentação exponencial por pH-stat. A técnica foi utilizada com sucesso, mostrando a viabilidade deste processo para produção de proteínas recombinantes.

2 - Para as fermentações batelada-alimentada tradicional, repetida e cíclica em dois estágios, bem como para as fermentações com reciclo e microfiltração, é imprescindível que algumas variáveis de processo sejam bem controladas para evitar a formação de produtos metabólicos e manter a produtividade volumétrica. Os principais parâmetros a serem controlados são a temperatura de crescimento e indução, o pH de cultivo, a concentração do substrato limitante e a concentração de oxigênio dissolvido. Variações nestes parâmetros provocam redução na biomassa obtida e na formação de corpos de inclusão.

3 - A estabilidade do plasmídeo pHis é mantida elevada a temperaturas de indução entre 38 e 40 °C, mantendo-se os outros parâmetros da fermentação dentro dos patamares ótimos.

4 - O estudo cinético de fermentações batelada-alimentada repetida mostrou que a concentração final média em peso seco de células foi 46,7 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,0%. Sendo que a produtividade celular obtida foi, em média,  $P_{RFB} = 1,895$  g/L/h. Houve redução na produtividade volumétrica devido à ocorrência de fase lag prolongada no segundo ciclo da fermentação. A partir do segundo ciclo, a estabilidade do plasmídeo sofre queda e atinge até 20%. Os fatores de incremento em biomassa e em proteína de

fusão obtidos, em relação a batelada-alimentada tradicional, foram respectivamente 1,54 e 1,43.

5 - O cultivo de *Escherichia coli*, utilizando a técnica de batelada-alimentada cíclica em dois estágios, apresentou concentrações finais médias em peso seco de células em cada ciclo de 39,3 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 19,4%. Sendo que a produtividade celular obtida foi, em média,  $P_{CFB} = 2,571$  g/L/h. Os fatores de incremento em biomassa e em proteína de fusão obtidos, em relação à batelada-alimentada tradicional, foram respectivamente 1,98 e 2,07.

6 – Fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes obtiveram produtividade celular igual a  $P_R = 6,437$  g/L/h. A concentração final em peso seco de células foi 173,8 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,8%. Os fatores de incremento em biomassa e em proteína de fusão obtidos, em relação à batelada-alimentada tradicional, foram respectivamente 3,41 e 3,28.

7 – Fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes mostraram-se adequadas para remoção de inibidores no meio de cultura permitindo maior crescimento celular e conseqüentemente maior produtividade. Neste tipo de estratégia de cultivo foram obtidas concentrações celulares até 3,4 vezes superiores aos cultivos em batelada-alimentada tradicional.

## CAPÍTULO XI

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1 – Estudar o emprego da estratégia das fermentações batelada-alimentada cíclicas acopladas a sistemas de microfiltração com reciclo total de células para a fase de crescimento celular. A fase de indução da proteína de fusão deve ser realizada em um segundo bioreator, no qual as condições nutricionais devem ser otimizadas. Desta maneira, espera-se evitar os problemas com o bombeamento, formação de espuma ocorridos no sistema de microfiltração e reciclo de células. Espera-se, nesta configuração, diminuir o efeito da ausência de microelementos na fase de indução.

2 – Utilização de soluções anti-espumante solúveis em fermentações com microfiltração e reciclo total, tais como polipropilenoglicol P2000, minimizando o fenômeno de entupimento das membranas filtrantes.

## CAPÍTULO X

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELFORT, G.; Membrane and bioreactors: a technical challenge in biotechnology, *Biotechnol. Bioeng.*; v.33, nº. 8, 1047-1066, 1989.

BENTLEY W.E.; MIRJALILI, N.; ANDERSEN, D.C.; DAVIS, R.H.; KOMPOLA, D.S.; Plasmid encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*; v. 35, 668-681, 1990.

BIOMM S/A, Montes Claros, MG, Spartaco, A.F.; Lima, B.D.; Thiemann, J.E.; Sousa, H.R.T.; Vilela, L.; Vector for expression of heterologous protein and methods for extracting recombinant protein and for purifying isolated recombinant insulin. US 6509452 B1, Jan.21, 2003.

BOWEN, R. Understanding flux patterns in membrane processing of protein solutions and suspension. *Trends Biotechnol.*; v.11, nº. 11, 451-460, 1993.

BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method form the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; v. 72: 248-254;1976.

CARLSEN, S.; JENSEN, E. B.; Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression if different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnology and bioengineering*, v. 36: 1-11, 1990.

CURLESS, C.; FU, K.; SWANK, R.; MENJARES, A.; FIESCHKO, J.; TSAI, L. Design and evaluation of a two-stage cyclic, recombinant fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.*; v. 38: 1082-1090; 1991.

DATAR, R.V.; ROSÉN, C.G. Cell and cell debris removal: centrifugation and crossflow filtration. In: Stephanopoulos, G. (Ed.), biotechnology: a multi volume comprehensive treatise – Bioprocessing. 2 ed., Weinheim: VHC, v.3, p 816, 1993.

DURRE, P.; BALH, H.; GOTTSCHALK, G.; Die acetone-butanol-gärung: Grundlage für einen modernen biotechnologischen Prozeß; Chem. Ing. Technol.; v. 64: 491-498; 1992.

FERNSTROM, G.A.; COOPER, C.M.; Miller, S.A.; Performance of agitated gas-liquid contactors; Ind. Eng. Chem.; v. 36(6), 504-509, 1944.

FIESCHKO, J.; RITSCH, T.; Production of human alpha consensus interferon in recombinant *E. coli*; Chem. Eng. Commun; v. 45; 229-240, 1986.

FUCHS, C.; KOSTER, D.; WIEBUSCH, S.; MAHR, K.; EISBRENNER, G.; MARKL, H.; Scale up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. J. Biotechnol.; v. 93, nº 3, 243-251, 2002.

GÄTJE, G.; GOTTSCHALK, G; Limitation of growth and lactic acid production in batch and continous cultures of *Lactobacullus helveticus*.; Appl. Microbiol. Biotechnol.; 34: 446-449; 1991.

GEORGIU, G.; VALAX, P.; Expression of correctly folded proteins in *E. coli*; Curr. Opin. Biotechnol.; v.7; 190-197, 1996.

GLABIZEWSKI, F. Scale-Up von Tangentialflußsystemen in Kassetenbauweise.; bioEngenieering, v.3, p. 68-70, 1991.

GRÓN, S.; BIEDERMANN, K.; EMBORG, C. Production of proteinase A by *Sacharomyces cerevisiae* in a cell-recycling fermentation system experiments and computer simulation.; Appl. Microbiol. Biotechnol.; v. 44, nº.6, 724-730, 1996.

GRÓN, S.; BIEDERMANN, K.; EMBORG, C. Enzyme production in a cell recycle fermentation system evaluated by computer simulations. *Bioprocess Eng.*, v. 13, 59-68, 1995.

HAN, K.; LIN, H.C.; HONG, J.; Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *E. coli* fermentation.; *Biotechnol. Bioeng.* v.41, 316-324, 1993.

HAN, K.; LIN, H.C.; HONG, J.; Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation.; *Biotechnol. Bioeng.* v.39, 663-671, 1991.

HAYAKAWA, K; SANSAWA, H.; NAGUMENE, T.; ENDO, I.; High density culture of *Lactobacillus casei* by cross flow culture method based on kinetic properties of the microorganisms.; *J. Ferment. Bioeng.* 70: 404-408;1990.

HOLMS, W.H.; EL-MANSI, E.M.; Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures; *J. Gen. Microbiol.* 11:2875-2883, 1988.

HOLMS, W.H.; The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul.* v. 28, 69-115, 1986.

HOLST, O.; MANELIUS, A.; KRAHE, M.; MÄRKEL, H, SHARP, R; Thermophiles and fermentation technology.; *Comp. Biochem. Physiol. A*, v.118, 415-422, 1997.

JUNG, G.; DENÉFLE, P.; BEQUART, J.; AND MAYAUX, J.-F.; High Cell Density Fermentation Studies of Recombinant *Escherichia coli* Strains Expressions Human Interleukin-1 $\beta$ ; *Ann. Inst. Pauster/Microbiol*; 139:129-141;1988.

JUNG, K-H.; LIM H-K.; PARK, D-H.; CHUNG, S-I.; Production characteristics of interferon-a using an L-arabinose promoter system in a high-cell-density culture.; Appl. Microbiol. Biotechnol.; 53: 201-208, 2000.

KENGEN, S.W.M.; STAMS,A.J.M.; Growth and energy conservation in batch cultures of *Pyrococcus furiosus*. FEMS Microbiol. Lett. 117:305-310, 1994.

KIM, B.G.; SHULER M.L.; Analysis of pBR322 replication kinetics in Escherichia coli and its dependency on growth rate.; Biotechnol. Lett.; 36: 233-242, 1990.

KLEMANN, G.L.; STROHL, W.R.; Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation.; Cur. Opin. Biotechnol., v.5; 180-186, 1994.

KOH, B.T; NAKASHIMADA, U.; PFEIFFER, M.; YAP, M.G.S.; Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E.coli* K12 Strains ; Biotechnology Letters; v.14: 1115-1118; 1992.

KONSTANTINOV, K.B.; KISHIMOTO, M.; SEKI, T.; YOSHIDA, T; A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*; Biotechnol. Bioeng.; 36: 678-684;1990.

KONSTANTINOV, K.B.; NISHIO, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T; Physiologically motivated strategies for control of the fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for phenylalanine production; J. Ferment. Bioeng.; 71: 350-355;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*; J. Biotechnol.; 39, 59-65;1995.

KRAHE, M.; ANTRANIKIAN, G.; MARK. L. Fermentation of extremophilic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. v.18, nº 2-3, 271-285, 1996.

KRONER, K.H.; SCHÜTTE, H.; HUSTEDT, H. Cross-flow filtration in the downstream processing of enzymes.; Proc. Biochem. v.19, 1984.

KUMAR, P.K.P; MASCHKE, H.E.; FRIEHS, K.; SCHUGERL, K.; Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors; Tibtech, 1991; 9:279-284.

LANDWALL, P.; HOLME, T.; Influence of glucose and dissolved oxygen concentrations on yields of *Escherichia coli* B in dialysis culture; J. Gen. Microbiol.; 103: 345-352; 1977.

LEE, C.W.; CHANG, H.N.; Continuous Production of Penicillin Acylase from Recombinant *E. coli* in a Membrane Cell Recycle Fermentors; Annals New York Academy of Science; v.613, 839-845; 1989.

LEE, S.Y.; High cell-density culture of *Escherichia coli*, Trends Biotechnol., v.14, 98-105, 1996.

LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; Production of poly-hydroxyalkanoic acid). Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., v.52, 27-58, 1995.

LEE, S.Y.; CHANG, H.N.; High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source; Biotechnol. Lett., 15, 971-974, 1993.

LEE, Y.L.; CHANG, H. N.; High Cell Density Culture of a Recombinant *Escherichia coli* Producing Penicillin Acylase in a Membrane Cell Recycle Fermentor; Biotechnology and Bioengineering; 36:330-337; 1990.

LEE, W.G.; LEE, Y.S., CHANG, H.N., CHANG, Y.K.; A cell retention internal filter reactor for ethanol production using tapioca hydrolysates. Biotechnol. Tech. v.8, 817-820, 1994.

LIMA, B.D.; *Produção de insulina humana através de precursores recombinantes em Escherichia coli*; Tese de doutorado, Universidade de Brasília; 1993.

LIMA, W.J.N.; THIEMANN, J.F.; Influência da temperatura de indução no crescimento celular, na formação de acetato e na produção de pró-insulina humana recombinante utilizando clones E.coli n-4830-1. Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações – CD, 2003.

LIN, H.; Cellular responses to the induction of recombinant genes in Escherichia coli fed-batches cultures, Dissertation zur Erlangung des akademischen grades doctor rerum naturalium; Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät; Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberf; Deutschland, 2000.

LUDEMANN, L.; PÖRTNER, R.; MÄRKL, H.; Effect of NH<sub>3</sub> on the cell growth of a hybridoma cell line. Cytotechnology, v. 14: 11-20, 1994.

LULI, G.W.; STROHL, W.R.; Comparasion of growth, acetate production and acetate inhibition of Escherichia coli strains in batch and fed-batch fermentation; Appl. Environ. Microbiol.; v. 56: 1004-1011; 1990.

MACDONALD, H.L.; NEWAY, J.O. Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of Escherichia coli K-12.; Appl. Environ. Microbiol. v. 56, 640-650, 1990.

MÄRKL, H.; PÖRTHNER, R.; Dialysis culture; Appl. Microbiol. Biotechnol.; v. 50: 403-414, 1998.

MÄRKL, H.; ZENNECK, C.; DUBACH, A.C.; OGBONNA, J.C.; Cultivation of Escherichia coli to High Cell Densities in a Dialysis Reactor, Appl. Microbiol. Biotechnol.; v. 39:48-52; 1993.

MÄRKEL, H.; OGBONNA, J.C.; Nutrient-split Feeding Strategy for Dialysis of Cultivation of *Escherichia coli*; Appl. Microbiol. Biotechnol.; v.44:1092-1100; 1993.

MÄRKEL H.; LECHNER, M. GÖTZ, F. A new dialysis fermenter for the production of high concentration of extracellular enzymes.; J. Ferm. Bioeng., v.4, nº. 69, 244-249, 1990.

MATSUI, T.; YOKOTA, H.; SATO, S.; MUKATAKA, S.; TAKAHASHI, J.; Pressurized culture of *E. coli* for a high concentration. Agric. Biol. Chem., v.5, 2115-2120, 1989.

MEYER, H.P.; FIESCHTER, A.; Growth control in microbial cultures.; Annu Rev Microbiol; v. 39:299-319; 1985.

MIGNONE, C.F.; ROSSA, C.A.; A Simple Method of Designing Fed-batch Cultures with Linear Gradient Feed Nutrients; Proc. Biochem.; v. 28; 405-10; 1993.

MIZUTANI, S.; MORI, H.; SAKAGUCHI, K.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S.; Effect of amino acid supplement on cell yield and gene production in *Escherichia coli* harboring plasmid; Biotechnol. Bioeng.; 28, 204-209, 1986.

MORI, H.; YANO, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S.; High density cultivation of biomass in fed-batch system with DO-Stat, J. Chem. Eng. Japan, v.12, 313-319, 1979.

MORI, H.; YAMANÉ, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S.; Comparison of cell productivities among fed-batch, repeated fed-batch and continuous cultures at high cell concentration.; Fermentation technol.; v. 61:391-401; 1983.

MOSER, A.; Special cultivation techniques. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; (eds) Biotechnology, v. 2 VCH, Weinheim, 311-347; 1985.

NAKANO, K.; RISCHKE, M.; SATO, S.; MÄRKL, H.; Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; v.48:597-601; 1997.

OMASE, T.; HIGASHIYAMA, K.I.; SHIOYA, S.; SUGA, K.I.; Effects of lactate concentration on hybridoma culture in lactate-controlled fed-batch operation. *Biotechnol. Bioeng.*; v. 34: 259-268; 1994

PAALME, T.; TILSMA, K.; KAHRU, A.; VANATALU, K.; VILU, R.; *Biotechnol. Bioeng*; Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate, v. 35, 312-319, 1990.

PIRT, S. J., Principles of microbe and cell cultivation, Blackwell, Oxford, pp. 211-218, 1975.

RIESENBERG, D.; GUTTKE, R.; High-cell-density cultivation of microorganism.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; v. 51, 422-430; 1999.

RIESENBERG, D.; SCHULZ, V.; KNORRE, W.A.; POHL, H.D.; KORZ, D.; SANDERS, E.A.; ROSS, A.; DECKWER, W.-D.; High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J. Biotechnol.*; v. 20, 17-28; 1991.

RIESENBERG, D.; High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*; v. 2, 380-384; 1991.

REISMEIER, B.; KRONER, K.H.; KULA, M.-R. Tangential filtration of microbial suspensions: Filtration resistance and model development. *J. Biotechnol.*, v. 12, nº. 2, 153-172, 1989.

RUDIGER, A.; Effect of gassing, agitation, substrate supplementation and dialysis on the growth of an extremely thermophilic archaeon *Pyrococcus woesei*.; Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 37, 501-504, 1992.

RYU, D.D.Y.; LEE S.B.; PARK, S.H.; Performance of recombinant fermentation and evolution of gene expression efficiency for gene product in a two-stage continuous culture system.; Biotechnol. Bioeng.; v. 31: 805-820, 1988.

RYU, D.D.Y.; KIM J.Y.; PARK, S.H.; Effect of growth rate on the performance of a two-stage continuous culture system in a recombinant *Escherichia coli* fermentation. Biotechnol. Bioeng., v. 36: 493-505, 1990.

RYU, D.D.Y.; KIM J.Y.; PARK, S.H.; CHANG C.C.; Improvement of heterologous protein using recombinant *Yarrowia lipolytica* and cyclic fed-batch process strategy. Biotechnol. Bioeng., v. 59: 379-385, 1997.

SAWERS, G., JARSCH, M.; Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*; Ann. N.Y. Acad. Sci., v. 721: 257-267; 1996.

SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; McCARTHY, J.-E.-G.; DECKWER, W.-D.; RINAS, U.; Comparasion of temperature and isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-pyramidose-induced synthesis of fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*; Enzyme Microb. Technol.; v. 10: 947-953; 1995.

SHIMIZU, N.; FUKUZONO, S.; FUJIMORI, K.; NISHIMURA, N.; ODAWARA, Y.; Fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration monitoring. J. Ferm. Technol; v. 66: 187-191; 1988.

SHULTZ, J.S.; GERHARDT, P.; Dialysis culture of microorganisms: design, theory and results; Bacteriological Reviews; v. 1:1-47; 1969.

STEINER, D.F.; CHAN, S.J.; WELSH, J.M.; KWOK, S.C.M.; Structure and evolution of insulin gene; Ann. Rev. Genet.; v. 19:463-484; 1985.

STRANDBERG, L.; ENFORS, S.-O. Batch and Fed-batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *E. coli*. Biotechnol. Lett., v.13, 609-614, 1991.

SUMMERS, D.K.; Kinetics of plasmid loss, Tibtech, 9:273-278; 1991.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; Mass production of thiostrpton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-Stat modal feeding of multi-substrate.; Appl.Microbiol. Biotechnol.; v. 25, 526-531, 1987.

SWARTZ, J.R.; *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, USA; 1693-1711; 1996.

TURNER, C.; GREGORY, M.E.; THORNHILL, N.F.; Closed-loop control of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* using on-line HPLC. Biotechnol. Bioeng.; v. 44: 819-829; 1994.

VICENTE, M.; Chater, K.F.; de LORENZO, V.; Bacterial transcription factors involved in global regulation. Mol. Microbiol.; v. 33: 8-17; 1999.

WEBER, A.E.; SAN, K.-Y., Dynamics of plasmid maintenance in a CSTR upon square-wave perturbation in dilution rate.; Biotechnol. Bioeng.; v.34, 1104-1113, 1990.

WHEELWRIGHT, S. M.; Protein purification: design and scale up of downstream processing. 2 ed. Munich, Hanser Publishers, 1996.

YAMANÉ, T.; SHIMIZU, S.; Fed-batch technique in microbial process. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.; 30, 147-194; 1984.

YEE, L.; BLANCH, H.W.; Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*; Bio/Technology; 10, 1550-1556; 1992.

YOON, S. K.; KANG, W.K; PARK, T.H.; Fed-batch operation of recombinant E. coli containing trp promoter with controlled specific growth Rate Biotechnol. Bioeng., 43: 995-999, 1994

ZENG, A.; Continuous culture, In: Demain, A. L.; Davies, J.E. (Eds.). Manual of industrial microbiology and biotechnology, Washington, ASM, p. 830, 1999.