

EFEITOS DA ESTRATÉGIA DE INDUÇÃO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENO 503 DE *Leishmania infatum chagasi* EM *E. coli* RECOMBINANTE

Francisco Canindé de Sousa Júnior^{1*}; Valéria Nogueira da Silva²; Michelle Rossana Ferreira Vaz³; Abimaelle Silva Chibério⁴; Vitor Troccoli Ribeiro⁵; Emanuele Cardoso Dias⁶; Everaldo Silvino dos Santos⁷; Gorete Ribeiro de Macedo⁸.

1. Doutorando em Biotecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

*Correspondência: Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Av. Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, Natal, RN, 59078-970. E-mail: fcfarma@yahoo.com.br

2. Doutora em Biotecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

3. Professora Adjunta, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento, Luiz Grande, s/n, Bairro Frei Damião, Sumé, PB, 58.540-000.

4,5. Graduandos em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

6. Graduada em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Sumé, PB.

7. Professor Adjunto, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

8. Professora Doutora, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito de duas estratégias de indução (pulso e adição gradual) com IPTG na expressão do antígeno 503 de *Leishmania infatum chagasi* em *E. coli*. No ensaio em batelada, o IPTG foi adicionado ao cultivo na concentração final de 1 mM. Na batelada alimentada, 0,2 mM do indutor foi adicionado a cada hora, totalizando uma concentração final de 0,8 mM. O procedimento de indução por pulsos de IPTG indicou um incremento de aproximadamente 49% na produção de biomassa quando comparado em batelada. Pode-se concluir que a estratégia de indução empregando pulsos de IPTG (batelada alimentada) foi mais eficaz na expressão do antígeno 503 quando comparado à estratégia de batelada simples. A eficácia da estratégia de indução foi confirmada por eletroforese.

Descritores: Indução, IPTG, Leishmaniose

EFFECTS OF STRATEGY OF INDUCTION IN THE PRODUCTION OF ANTIGEN 503 *Leishmaniachagasiinfatum* IN RECOMBINANT *E. coli*

ABSTRACT

The aim this study was evaluated the effect of two induction strategies (pulse and gradual addition) with IPTG in the expression of 503 antigen of *Leishmaniainfatumchagasi* in *E. coli*. In the test batch, IPTG was added to the culture at a final concentration of 1 mM. In fed-batch, 0.2 mM of the inducer was added every hour, reaching a final concentration of 0.8 mM. The procedure of induction by pulses of IPTG indicated an increase of approximately 49% in biomass production compared to batch. The results showed that the strategy of induction using pulses of IPTG (fed-batch) was more effective for 503 antigen expression when compared to the simple batch strategy. Efficacy of the induction strategy was confirmed by electrophoresis.

Keywords: Induction, IPTG, Leishmaniose

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral Americana (LVA) constitui um problema de saúde pública, assim como em parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano. A importância da Leishmaniose levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (3). É uma antroponose em expansão no Brasil, as espécies podem produzir manifestações cutâneas, cutâneas difusas, mucocutâneas e viscerais (6).

Nos últimos dez anos, a média anual de casos de LVA foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes. Os dados epidemiológicos revelam a periurbanização e a urbanização da LVA em diversas cidades brasileiras, dentre elas Natal, no Rio Grande do Norte, Maranhão e Piauí (14). Em 2010, a região Nordeste representou a maioria dos casos (47,1%), seguida pelas regiões Norte (18%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). Este aumento foi registrado em 21 Unidades Federativas, atingindo as cinco regiões do país (14).

A LVA é causada pela espécie *Leishmania chagasi*, parasita intracelular obrigatório (13). No Brasil a LVA apresenta perfil epidemiológico variado devido a fatores fisiogeográficos, climáticos, biológicos e características sociais que podem variar de acordo com a região do país (12).

Com o alto custo e toxicidade das drogas utilizadas no diagnóstico e na cura da leishmaniose, torna-se imprescindível buscar alternativas eficazes e menos invasivas ao organismo humano (18). Há um empenho particular na produção de antígenos por meio de microrganismos recombinantes tendo em vista o aproveitamento em soros e vacinas (4), e o uso da bactéria *Escherichia coli* como sistema de expressão apresenta-se como uma alternativa viável. Uma vez que a *E. coli* é um microrganismo bastante estudado e explorado, principalmente na produção de proteínas recombinantes. Isso se deve ao fato de a *E. coli* ser bem caracterizada em termos de genética molecular, fisiologia e sistemas de expressão (5).

A expressão de genes implantados em linhagens de *E. coli*, muitas vezes, necessita de indução, podendo ser realizada por compostos como o Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG), um indutor equivalente, a lactose sendo à fonte de carbono e um forte indutor químico utilizado largamente nos processos em que estão envolvidos a indução de promotores (15), representando uma das moléculas indutoras mais utilizadas nos mais variados sistemas de expressão heteróloga (28).

Pesquisas relatam que formas de indução tornam-se um parâmetro importante na otimização da expressão da proteína recombinante. A maioria dos pesquisadores aperfeiçoou a estratégia de indução variando a dose de indução (1-25), tempo de indução (8), além de temperatura, condições de aeração, composição do meio de cultivo e o indutor empregado. Existem poucos relatos na melhora do rendimento do produto, alterando o modo de adição de indutor, por exemplo, de modo descontínuo alimentado, ou descontínuo (16-20).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar o efeito de duas estratégias de indução com IPTG (batelada e batelada-alimentada) nas mesmas condições de temperatura, pH e velocidade de agitação, com a finalidade de otimizar o crescimento celular e a expressão da proteína 503 de interesse da *Leishmania infatum chagasi* expresso em *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo utilizado nos ensaios

Utilizou-se uma cepa de *E. coli* geneticamente modificada para expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* apresentando uma cauda ("tag") de seis resíduos de histidina em sua terminação e o peso molecular do antígeno 503 é de 56 kDa (13). Esta construção foi gentilmente cedida por Mary Wilson (University of Iowa, USA) e Daniella A. Martins (Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN).

Antibióticos utilizados

Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultivo com a finalidade de selecionar somente as bactérias que continham o antígeno. As soluções de antibióticos foram preparadas com água deionizada e esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm em condições assépticas, e após esterilização foram armazenadas a -20°C. A concentração de trabalho do antibiótico ampicilina foi de 0.1 g/L e Kanamicina de 0.025 g/L (23).

Meio de cultivo e preparo do Inóculo

O meio utilizado foi o 2xTY (16 g/L triptona, 10 g/L extrato de levedura, 5 g/L NaCl, pH 7.0), esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos (7). Esse meio foi suplementado com antibióticos ampicilina (0.1 g/L) e kanamicina (0.025 g/L), (23).

O estoque das cepas de *Escherichia coli* contendo o antígeno 503 foi armazenado a -80°C em microtubos com glicerol a 50%. Para ativação do microrganismo, 200 µL do

microtubo foi transferido assepticamente para Erlenmeyer contendo 50 mL do meio 2xTY, previamente esterilizado e suplementado com os antibióticos. Esse cultivo inicial foi realizado em incubador rotativo (37°C e 200 rpm), por 12 horas, sendo este o inóculo dos bioensaios conduzidos em biorreator (23).

Cultivo em biorreator de bancada com ensaios induzidos por IPTG realizados em batelada e batelada-alimentada

O trabalho foi realizado em um biorreator com capacidade para 2L (Biostat B, B. Braun Biotech, Alemanha) providos de sistemas de controle de temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de aeração. Em biorreator, 1350 mL do meio de cultivo (2xTY) foi inoculado com 150 mL de inóculo na fase exponencial de crescimento. No cultivo, o pH do meio foi mantido em $7,0 \pm 0,1$ através da adição automática de uma solução de NH_4OH 25% ou HCl 1N, e com vazão de aeração mantida constante na faixa de 1,0 – 1,5 vvm, a 400 rpm e 37°C.

A indução foi realizada no início da fase exponencial de crescimento, quando a densidade óptica inicial (OD 600nm) atingiu 0,5 (fase log). Duas estratégias de indução com IPTG (batelada e batelada alimentada) foram avaliadas. No ensaio em batelada, o IPTG(22) foi adicionado ao cultivo na concentração final de 1mM. Na batelada alimentada, 0,2 mM do indutor foi adicionado ao meio de cultivo, a cada hora durante o período de 4 horas, totalizando uma concentração final de 0,8mM de IPTG (19-26). Alíquotas foram coletadas a cada hora durante um período de até 7 horas, para análises da biomassa, proteína intracelular e expressão do antígeno 503. As células foram submetidas à centrifugação (centrífuga Eppendorf 5415D) a 13.000 rpm por 30 minutos, e no precipitado foi determinado a biomassa por peso seco a 80°C, obtendo peso constante, e em seguida as células foram rompidas para análise da proteína intracelular. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína extracelular, sendo as proteínas intracelular e extracelular quantificadas pelo método de Lowry (10).

Concentração celular (X) e Lise da parede celular

O crescimento celular foi mensurado de acordo com a absorbância do meio de cultura no comprimento de onda de 600 nm e por massa seca (g/L)(17).

Em relação à lise da parede celular foi utilizado um tampão de *lise* a base de uréia (NaH_2PO_4 100 mM, uréia 8 M, Tris-Cl 10 mM a pH 8.0), onde as células foram armazenadas em banho de gelo por 15 minutos, e posteriormente ressuspensa em tampão de *lise* a base de uréia homogeneizando por 60 minutos em vórtex. Os resíduos

foram removidos por centrifugação (Eppendorfcentrifuge 5415 D) a 16100x g por 30 minutos, e as proteínas intracelulares analisadas.

Purificação do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*

Após centrifugação do fermentado, o sobrenadante foi submetido ao processo de purificação onde a expressão das proteínas fusionadas em cauda de histidina possibilitou a purificação do antígeno 503 em cromatografia de afinidade. Na purificação, as amostras foram submetidas à cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) (Qiagen, Valencia, CA) utilizando coluna de Níquel-Sepharose ("NiSepharose High performance" GE Healthcare), a quantificação da proteína de interesse (10), e qualitativamente por eletroforese (9). A expressão da proteína de interesse foi analisada por SDS-PAGE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da estratégia de indução por IPTG em cultivo em batelada

A Figura 1A apresenta o crescimento celular do clone 503 de *E. coli* cultivado em meio 2xTY (37°C e 400 rpm) induzido por IPTG em biorreator. Pode-se observar ausência da fase lag, indicando uma rápida adaptação da bactéria ao meio 2xTY. Para essas condições, a máxima concentração celular obtida foi de 5,63 g/L, no instante de 5 horas de cultivo, resultados similares aos obtidos por outros autores (23).

A Figura 1B mostra o perfil da proteína intracelular para o clone 503 induzido por pulso único de IPTG em biorreator. O procedimento de indução com IPTG foi realizado no início da fase exponencial de crescimento, após 1 hora de cultivo, em que a concentração celular era de 4,19 g/L.

Quanto à expressão, observa-se que a máxima concentração (0,049 g/L) da proteína ocorre no instante em a indução foi realizada. A literatura relata (11-24) que as condições fisiológicas do microrganismo no instante da indução é fator importante para viabilizar a síntese de proteínas recombinantes.

O IPTG é um indutor que atua somente bloqueando o repressor produzindo gene *lac I*, e apresenta livre penetração na célula mesmo na presença de fontes de carbono como a glicose, tendo seu uso muito difundido na literatura, ainda que seja um indutor oneroso (21).

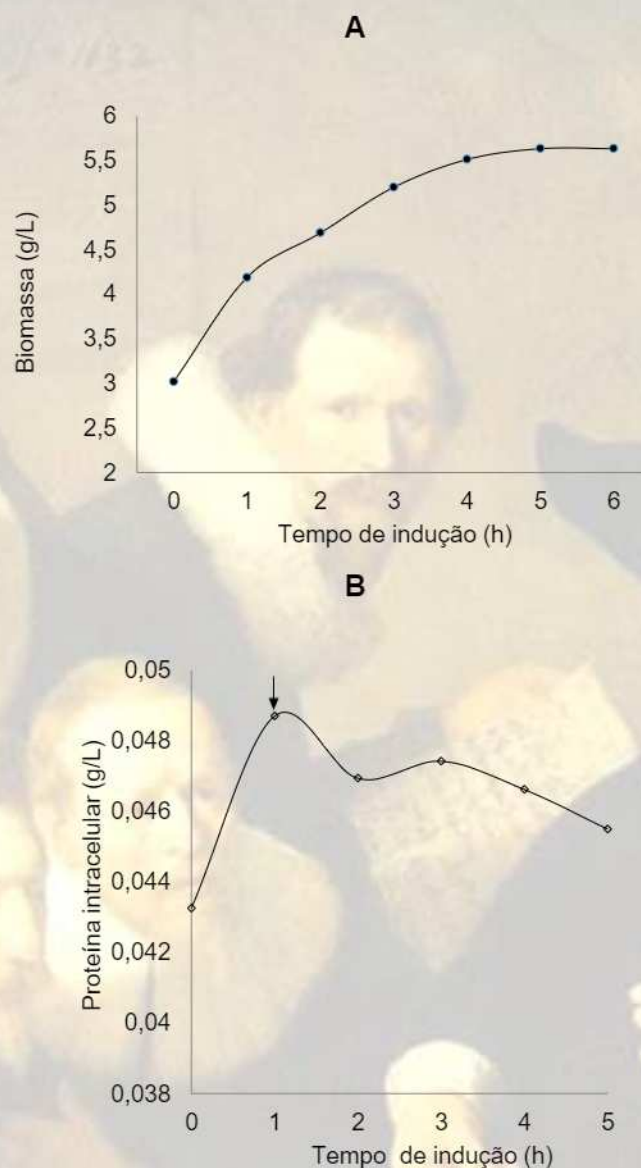


Figura 1.A: Perfil do crescimento celular (•) para o clone 503 cultivado em meio 2xTY em biorreator a 37°C e 400 rpm, induzido por IPTG. **B:** Perfil da proteína intracelular (◊) para o clone 503 cultivado em meio 2xTY em biorreator a 37°C e 400 rpm, induzido por IPTG.

A Figura 2 apresenta o SDS-PAGE com a análise da expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* durante o cultivo *E. coli* recombinante em meio 2xTY induzido por pulso único de IPTG onde pode-se observar a expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi*. Nota-se que a proteína eluída apresentou bandas com baixa nitidez indicando o baixo nível de expressão da proteína.

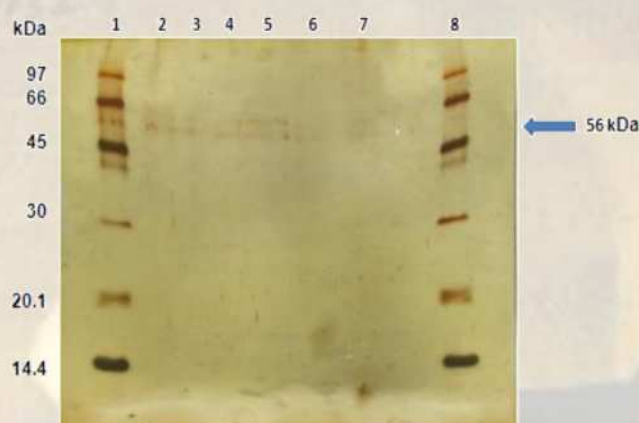


Figura2: SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de *Leishmania i.chagasi* durante o cultivo de *E.coli* recombinante em meio 2xTY induzido por 1 mM de IPTG. Linha (1): Marcador; Linha (2): Proteína Eluída no instante da inoculação (0h); Linha (3): Proteína Eluída 1h; Linha (4): Proteína Eluída 2h; Linha (5): Proteína Eluída 3h; Linha (6): Proteína Eluída 4h; Linha (7): Proteína Eluída 5h; Linha (8): Marcador.

Avaliação da estratégia de indução por IPTG utilizando pulsos (batelada alimentada)

Para avaliar a estratégia de indução empregando IPTG em batelada alimentada, adicionou-se 0,2 mM do indutor a cada hora de cultivo durante 4 horas. O procedimento de indução por pulsos de IPTG foi iniciado na fase exponencial de crescimento, no instante correspondente a 1 hora de cultivo, em que a concentração celular era de 3,16 g/L.

Nesta estratégia obteve-se a máxima concentração celular de 8,40 g/L às 5 horas do cultivo (Figura 3A). Este resultado indica um incremento de aproximadamente 49% na produção de biomassa quando comparado com o procedimento em cultivo em batelada que atingiu a concentração máxima de 5,63 g/L, como relatado anteriormente na Figura 1A. Tal fato evidencia que a estratégia em batelada alimentada com pulsos de IPTG parece ser mais eficiente no que se refere ao crescimento celular. O que indica o potencial da estratégia, tendo em vista a importância de altas densidades celulares em processos que envolvem a síntese de proteína recombinante.

Quanto à expressão da proteína (Figura 3B), obteve-se uma concentração máxima de 0,168 g/L às 6 horas de cultivo. Pode-se observar um incremento de 3 vezes na expressão da proteína intracelular quando comparado com a estratégia em batelada (Figura 1B), reforçando o indicativo do potencial da estratégia de batelada alimentada com pulsos de IPTG para o processo, quando comparado com os ensaios em batelada. A indução também é dependente da quantidade do indutor disponível para a célula,

sabendo-se que com o aumento da quantidade do indutor, mais rápida é a resposta da célula na produção de proteína (27). É interessante notar que ao adotar-se a estratégia de batelada simples adicionou-se 1,0mM de IPTG em um único pulso, enquanto que na estratégia de batelada alimentada adicionou-se apenas 0,8 mM fracionados em 04 pulsos de 0,2 mM. Entretanto a batelada alimentada proporcionou um incremento de 3 vezes na quantidade de proteína obtida, sugerindo que a forma de adição do indutor pode ser também relevante para o processo de síntese da proteína pelas células.

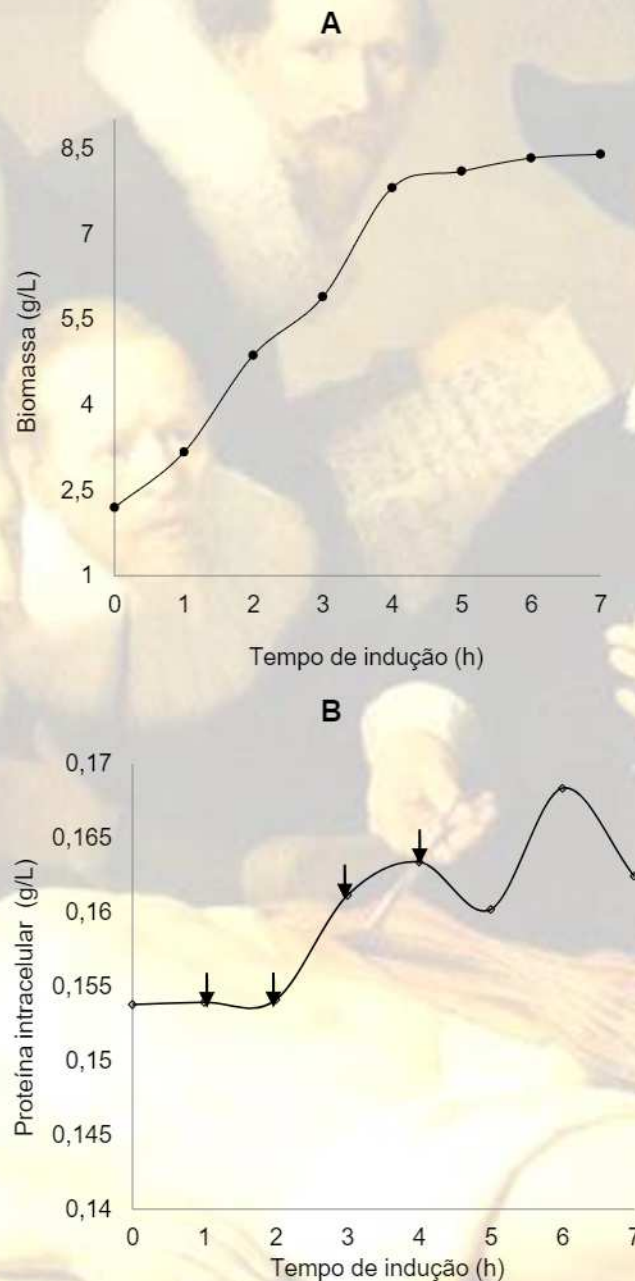


Figura 3. A: Perfil do crescimento celular (·) para o clone 503 cultivado em meio 2xTY em biorreator a 37°C e 400 rpm, induzido por pulsos de IPTG. **B:** Perfil da proteína intracelular (◊) para o clone 503 cultivado em meio 2xTY em biorreator a 37°C e 400 rpm, induzido por pulsos de IPTG.

A Figura 4 apresenta a expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* por SDS-PAGE durante o cultivo em batelada alimentada. Observou-se bandas mais nítidas (Linhas 3,4,5,6) em relação a proteína eluída quando comparada com a estratégia em batelada (Figura 2), mais um indicativo de que tal estratégia foi mais eficaz na indução da proteína 503. A expressão da proteína de interesse foi confirmada por eletroforese, pela visualização de bandas proteicas com massa molecular de aproximadamente 56 kDa.

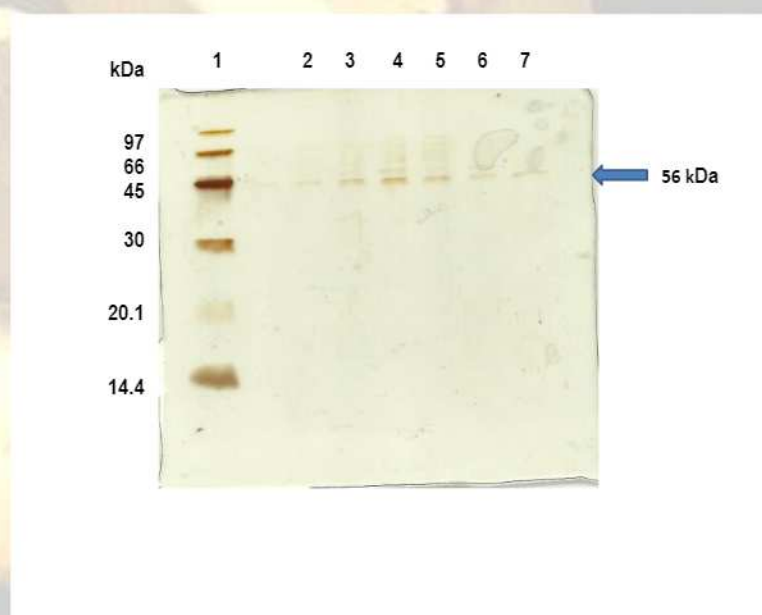


Figura4: SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* durante o cultivo *E. coli* recombinante em meio 2xTY induzido por pulsos de IPTG totalizando 0,8 mM. Linha (1): Marcador; Linha (2): Proteína Eluída 1h; Linha (3): Proteína Eluída 2h; Linha (4): Proteína Eluída 3h; Linha (5): Proteína Eluída 4h; Linha (6): Proteína Eluída 5h; Linha (7): Proteína Eluída 6h; Linha (8): Proteína Eluída 7h.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a estratégia de indução empregando pulsos de IPTG (batelada alimentada) fracionando-se a quantidade total de indutor adicionado em diferentes instantes ao longo do cultivo, foi mais eficaz na expressão do antígeno 503 quando comparado à estratégia de batelada simples, onde todo o indutor é adicionado em um único instante, mesmo sendo a quantidade total de indutor adicionado em pulsos fracionados inferior à quantidade adicionada na estratégia de pulso único. A eficácia desta estratégia de indução é também confirmada pela visualização de bandas proteicas mais nítidas na eletroforese, com massa molecular de aproximadamente 56 kDa .

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Austin CJD, Mizdrak J, Matin A, Sirijovski N, Kosim-Satyaputra P, Willows, RD, et al. Optimised expression and purification of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Protein Expr. Purif.* 2004;37:392–398.
2. Penna GO, Teixeira MG, Costa MCN, Pereira SM, Carmo EH, Nascimento EMR. Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
3. Casagrande B, Rezende K, Matsumoto PSS, Lemos JC, Guimarães RB. Leishmanioses tegumentar americana e visceral americana: Flebotomíneos capturados no entorno do Parque Estadual do Morro do Diabo, no município de Teodoro Sampaio, SP – Brasil. *Hygeia.* 2013;16:148-158.
4. Cha HJ, Shin HS, Lim HJ, Cho HS, Dalal NN, Pham MQ, et al. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. *Biochem Eng J.* 2005; 24:225-233.
5. Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins use in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004;24:625- 635.
6. Dossi ACS. Níveis de IgG antileishmania e perfil de citocinas em cães machos e fêmeas assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*. [Dissertação]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo; 2006.
7. Hortsch R, Botz W. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011; 90:69-76.
8. Hu SY, Wu JL, Huang JH. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 2004; 107:161-171.
9. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 27:680-685.
10. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
11. Liria CW. Processo descontínuo alimentado no cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS para produção de proteína recombinante troponina C. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1995.
12. Maia-Elkhoury A, Alves W, Sousa-Gomes MI, Sena A, Luna E. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública.* 2008; 24:2941-2947.
13. Martins, DRA, Jeronimo SMB, Donelson JEE, Wilson ME. *Leishmania chagasi* T cell antigens identified through a double library screen. *Infect Immun.* 2006; 74: 6940-6948.
14. Ministério da Saúde do Brasil (MSB). (2013), Portal da saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31937.
15. Panda AK, Khan RH, Rao KB, Toley SM. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. *J Biotechnol.* 1999; 75:161-172.
16. Ramírez DM, Bentley WE. Fed-batch feeding and induction policies that improve foreign protein synthesis and stability by avoiding stress responses. *Biotechnol. Bioeng.* 1995; 47: 596-608.
17. Rodrigues GS, Campanhola C, Valarini PJ, Queiroz J.F de, Frighetto RTS, Filho LOR, et al. Avaliação de impacto ambiental de atividades em estabelecimentos familiares do Novo Rural. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2003.
18. Selvapandiyam A, Dey R, Gannavaram S, Lakhal-Naouar I, Duncan R, Salotra P, et al. Immunity to Visceral leishmaniasis using genetically defined live-attenuated parasites. *J Trop Med Med.* 2012; 1:1-12.
19. Sereikate I, Statkute A, Morkunas M, Radzevicius K, Borromeo V, Secchi C, et al. Production of recombinant mink growth hormone in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 74:316-23.

20. Striedner G, Cserjan-Puschmann M, Potschacher F, Bayer K. Tuning the transcription rate of recombinant protein in strong *Escherichia coli* expression systems through repressor titration. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19:1427-1432.
21. Tian H, Tang L, Wang Y, Wang X, Guan L, Zhang J, et al. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther.* 2011; 17:123-129.
22. Tomazetto G, Mulinari F, Stanisçuaski, F, Settembrini B, Carlini CR, AyuMAZ. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme Microb. Technol.* 2007; 41:821-827.
23. Vaz MRF, Franca RLS, Andrade SSL, Sousa JFC, Santos ES, Martins DRA, Macedo GRM. Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmania chagasi* in recombinant *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol.* 2011; 42:1390-1396.
24. Vaz MRF. Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígeno da *Leishmania chagasi*. [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2008.
25. Vidal L, Álvaro G, Benaiges MD, Caminal G. Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose-phosphate aldolase production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *J. Biotechnol.* 2005; 118:75-87.
26. Xue W, Fan D, Shang L, Zhu C, Ma X, Zhu X, et al. Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *J. Biosci. Bioeng.* 2010; 109:257-261.
27. Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio. Technol.* 1992; 10:1550-1556.
28. Zanfonato K. Produção de poli (3-hidroxibutirato) por linhagens de *escherichia coli* dh5α e jm101 recombinantes. [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.