

**Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química**

**Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na
expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**

Carolina Bellão
Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

São Carlos – SP
2006

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Carolina Bellão

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.

São Carlos – SP
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

B433af

Bellão, Carolina.

Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3) / Carolina Bellão. -- São Carlos : UFSCar, 2006.
76 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Biotecnologia. 2. Canacistatina. 3. *Escherichia coli*. 4. Expressão heteróloga. 5. Fontes de carbono. 6. Engenharia genética. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

À minha mãe Angélica

Ao meu namorado Júlio

E aos meus irmãos Marta e Bruno

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Alberto Colli Badino Junior e Dr. Flávio Henrique da Silva pela orientação neste trabalho.

À minha mãe e ao meu namorado pela paciência nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar: Luciana, Sheila, Marcel, Célia, Juliana, Daniela e Álvaro pelo companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do DGE/UFSCar: Cássia, Rosseli, Viviane, Andréia, Mylene e Carol pela ajuda e pela companhia.

Ao técnico Amadeus que esteve sempre disposto a ajudar.

Às amigas Erida, Mônica, Karina e Rafa pela amizade e convivência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iv
Nomenclatura.....	v
Resumo	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Fungicidas e biofungicidas	3
2.2. Inibidores de proteases	4
2.3. Tecnologia do DNA recombinante.....	9
2.4. Expressão de proteínas heterólogas	14
2.5. Condições de cultivo	19
2.5.1. Ácido acético	21
2.5.2. Obtenção de alta concentração celular	23
2.5.3. Síntese de proteína heteróloga.....	25
3. Materiais e Métodos	29
3.1. Microrganismo	29
3.2. Meios de Cultura	29
3.2.1. Meio de cultura de reativação	29
3.2.2. Meios de cultura de inóculo	29
3.2.3. Meios de cultura de produção.....	30
3.3. Indutores	30
3.4. Métodos Analíticos.....	30
3.4.1. Determinação da concentração celular	30
3.4.2. Determinação das concentrações de substratos	31
3.4.3. Determinação da concentração de carboidratos totais.....	31
3.4.4. Determinação da concentração de nitrogênio.....	31
3.4.5. Avaliação da expressão de canacistatina	32
3.4.6. Purificação da canacistatina	32
3.4.7. Determinação da concentração de canacistatina	33
3.5. Metodologia Experimental	33

3.5.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa	34
3.5.1.1. Etapa 1: Avaliação de diferentes fontes de carbono no crescimento de <i>E.coli</i> BL21(DE3)	35
3.5.1.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina em caldos de fermentação com diferentes substratos – Avaliações do momento e tempo de indução	36
3.5.1.3. Etapa 3: Avaliação da indução por lactose	37
3.5.1.4. Etapa 4: Avaliação quantitativa da expressão de canacistatina	38
3.5.2. Cultivos em biorreator airlift de bancada	39
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa	42
4.1.1. Etapa 1: Avaliação de diferentes fontes de carbono no crescimento de <i>E.coli</i> BL21(DE3)	42
4.1.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina em caldos de fermentação com diferentes substratos – Avaliações do momento e tempo de indução	45
4.1.3. Etapa 3: Avaliação da indução por lactose	49
4.1.4. Etapa 4: Avaliação quantitativa da expressão de canacistatina	53
4.2. Cultivos em biorreator airlift	55
4.2.1. Etapa 1: Avaliação do crescimento celular	55
4.2.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina	56
5. Conclusões	59
6. Sugestões	61
Referências Bibliográficas	62
Apêndice A	69
Apêndice B	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Tecnologia do DNA recombinante: o DNA recombinante é formado e inserido na célula hospedeira	11
Figura 2.2.	Mecanismo proposto para a transformação de <i>E. coli</i> com uma molécula de DNA exógeno	14
Figura 2.3.	Esquema de funcionamento do <i>operon lac</i> .	18
Figura 3.1.	Procedimento experimental utilizado nos cultivos em mesa incubadora rotativa	34
Figura 3.2.	Procedimento experimental utilizado nos cultivos em biorreator airlift	40
Figura 4.1.	Curva de crescimento celular do cultivo padrão (C0_1)	42
Figura 4.2.	Curva de crescimento celular	43
Figura 4.3.	Curva de consumo de substrato	43
Figura 4.4.	Análise da expressão da canacistatina com 0,4 mM de IPTG sob várias condições de cultivo. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.	48
Figura 4.5.	Gel comparativo da expressão da canacistatina com 0,4 mM de IPTG para as diferentes fontes de carbono utilizadas. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.	49

Figura 4.6.	Análise da expressão da canacistatina com 0,4 mM de lactose sob várias condições de cultivo. SDS-PAGE mostrando em M _r marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.	50
Figura 4.7.	Atividades da galactosideo permease e β-galactosidase no metabolismo da lactose em <i>E. coli</i> .	51
Figura 4.8.	Análise da expressão da canacistatina, induzido com 4 mM e 40 mM de lactose. SDS-PAGE mostrando em M _r marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.	52
Figura 4.9.	Curva de crescimento celular para o cultivo realizado no biorreator airlift	55
Figura 4.10.	Curva de consumo de substrato e de oxigênio dissolvido no cultivo A1 realizado no biorreator airlift	56
Figura A.1.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo padrão (C0_1)	69
Figura A.2.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando glicerol (C1_1)	69
Figura A.3.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando glicose (C1_2)	70
Figura A.4.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando frutose (C1_3)	70
Figura A.5.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando frutose + glicose (C1_4)	70
Figura A.6.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando galactose (C1_5)	71
Figura A.7.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando lactose (C1_6)	71
Figura A.8.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando sacarose (C1_7)	71

Figura A.9.	Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo no Airlift	72
Figura B.1.	Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo padrão (C0_1)	73
Figura B.2.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando glicerol (C1_1)	73
Figura B.3.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando glicose (C1_2)	74
Figura B.4.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando frutose (C1_3)	74
Figura B.5.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando frutose + glicose (C1_4)	74
Figura B.6.	Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo utilizando galactose (C1_5)	75
Figura B.7.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando lactose (C1_6)	75
Figura B.8.	Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo utilizando sacarose (C1_7)	75
Figura B.9.	Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo no Airlift	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Cultivos realizados para obtenção de parâmetros relacionados com o crescimento celular	35
Tabela 3.2	Condições experimentais empregadas nos cultivos realizados para avaliação qualitativa da expressão de canacistatina com 0,4 mM de IPTG	37
Tabela 3.3.	Condições experimentais empregadas nos cultivos induzidos com lactose	38
Tabela 3.4.	Condições experimentais empregadas nos cultivos realizados no biorreator	41
Tabela 4.1.	Equações de Cx em função de DO obtidas nos cultivos	44
Tabela 4.2.	Parâmetros de crescimento celular de <i>E. coli</i> em diferentes fontes de carbono	45
Tabela 4.3.	Concentração de canacistatina obtida para diferentes fontes de carbono	53
Tabela 4.4.	Massa de canacistatina produzida por custo de matéria prima (meio de cultura)	54
Tabela 4.5.	Concentração de canacistatina obtida no cultivo realizado em biorreator airlift	57
Tabela 4.6.	Produção específica de canacistatina obtida nos cultivos realizados em biorreator airlift	57

NOMENCLATURA

CC = canacistatina

IPTG = isopropiltio- β -d-galactosídeo, análogo de lactose sintético

CAP = proteína ativadora de genes por catabólitos

LB = meio de cultura Luria Bertani

Cs = concentração de substrato

Cx = concentração celular

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade específica máxima de crescimento celular

$Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato a células

Cs₀ = concentração de substrato inicial

Cx₀ = concentração celular inicial

DO = densidade ótica

C_N = concentração de nitrogênio

V_{HCL} = volume de ácido clorídrico

C_{HCL} = concentração de ácido clorídrico

C_C = concentração de canacistatina

OD = oxigênio dissolvido

P_{Cc/x} = produção específica de canacistatina

RESUMO

A canacistatina (CC) é um inibidor competitivo e reversível de proteases, que bloqueia a atividade proteolítica de enzimas de insetos, fungos e nematóides, prejudicando assim o crescimento, desenvolvimento e reprodução destes organismos patogênicos. É produzida em quantidades limitadas pela cana-de-açúcar, inviabilizando sua extração e purificação para produção de produtos comerciais, sendo a tecnologia de DNA recombinante uma alternativa para o aumento da sua produção. Atualmente, a CC é produzida no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar (LBM-DGE/UFSCar) por *E. coli* BL21(DE3) em mesa incubadora rotativa utilizando o meio de cultura comercial (Circlegrow[®]) de alto custo. Com a finalidade de se produzir CC em maior escala, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da expressão de CC em *E. coli* BL21(DE3), avaliando-se diferentes fontes de carbono, tipo de indutor e momento de indução, em mesa incubadora rotativa no sentido de se avaliar a expressão, bem como comprovar as novas condições de expressão em biorreator airlift de 6 L de capacidade útil. Nos ensaios em mesa incubadora rotativa foram obtidos crescimentos celulares semelhantes quando se utilizou glicerol, glicose, frutose e frutose + glicose, e baixo crescimento celular quando se utilizou galactose. Foi observada uma alta expressão quando se utilizou galactose como fonte de carbono e IPTG 0,4 mM como indutor. Quando foi utilizada lactose como indutor em concentrações de 4 e 40 mM, observou-se expressão de CC apenas nos cultivos com galactose como fonte de carbono. Foram obtidas produções volumétricas (mg/L) no máximo de 61% da concentração de CC obtida no cultivo padrão, com exceção dos cultivos com galactose induzidos com 0,4 mM de IPTG e 4 mM de lactose, e produção específica (mg_{CC}/g_{célula}) com valores superiores a 75% do obtido no cultivo padrão. Quanto aos cultivos em biorreator airlift, expressão de CC foi superior à do cultivo realizado em mesa incubadora rotativa utilizando glicose como fonte de carbono, em torno de 80% da produção obtida no cultivo padrão após 1 hora de indução, alcançando 90% na segunda hora. Em termos de produção específica, nesse cultivo obteve-se 79,9 mg_{CC}/g_{célula} após 2 horas de indução, cerca de 25% superior ao cultivo padrão.

ABSTRACT

Canecystatin (CC) is a competitive and reversible protease inhibitor which blocks the proteolytic enzymes activities of insects, fungus e nematodes, prejudicing thus the growth, development and reproduction from these pathogenic organisms. CC is produced by sugarcane, but with limited production, difficulting extraction and purification for production of commercial products, so recombinant DNA technology is one alternative for increase of CC production. Nowadays, CC is produced in the Molecular Biology Laboratory of the Department of Genetic and Evolution of UFSCar (LBM-DGE/UFSCar) from *E. coli* BL21(DE3) in shaker, utilizing a high cost commercial culture medium (CircleGrow®). With the purpose of produce CC in higher scale, the aim of present work was the study the CC expression in *E. coli* BL21(DE3), evaluating different carbon source, kind of inductor and induction moment in shaker, as well as confirming the expression conditions in airlift bioreactor of 6 L working volume. In the experiments carried out in shaker were obtained similar cellular growth when utilized glycerol, glucose, fructose e fructose + glucose, and low cellular growth when utilized galactose. It was observed high expression when galactose was utilized as carbon source and IPTG 0,4 mM as inductor. When lactose at 4 e 40 mM was utilized as inductor, CC expression occurred only in the culture containing galactose as carbon source. Volumetric production (in mg/L) of CC up to 61% those from standard culture was obtained, with exception the culture that utilized galactose induced with 0,4 mM of IPTG and 4 mM of lactose, and specific production ($\text{mg}_{\text{CC}}/\text{g}_{\text{cells}}$) greater 75% from standard culture. With respect of cultures in airlift bioreactor, CC expression was superior to expression culture carried out in shaker utilizing glucose with carbon source, approximately 80% of CC concentration obtained in the standard culture after 1 hour of induction and achieving more than 90% in the second hour of induction. In terms of specific production, in this culture was obtained 79,9 $\text{mg}_{\text{CC}}/\text{g}_{\text{cell}}$, value approximately 25% superior to the standard culture.

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem vários mecanismos de defesa contra o ataque de agentes biológicos e de estresses do ambiente, tais como liberação de produtos químicos voláteis que atraem predadores e parasitas eliminando os insetos herbívoros, chamada de defesa indireta; e a defesa direta, que é a liberação de produtos que atuam como veneno expulsando o inimigo ou freando seu crescimento (Keller e Baldwin, 2001).

Os mecanismos de defesa das plantas incluem dois principais eventos: respostas localizadas e sistêmicas. As respostas localizadas ocorrem dentro dos tecidos que estão próximos aos organismos invasores, e ocorre uma oxidação rápida com troca iônica entre H^+ e K^+ , fortalecendo a parede celular. As respostas sistêmicas são desencadeadas em resposta a estímulos (Joshi *et al.*, 1998), que envolve reações da planta ligadas à ativação de genes de defesa para reação de hipersensibilidade (causa rápida morte das células no local de infecção, o que impede a expansão do patógeno), resistência sistêmica adquirida e produção de lignina, enzimas hidrolíticas e fitoalexinas (componentes antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados quando as plantas são expostas a microrganismos, que atacam a parede celular do patógeno) (Rizzardi *et al.*, 2003).

Plantas superiores possuem lipoxigenases, enzimas que produzem hidroperóxidos de ácidos graxos, precursores da síntese do ácido jasmônico. O ácido jasmônico possui atividade de fitorregulação e está envolvido em processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a insetos e patógenos, induzindo a síntese de genes que expressam inibidores de proteases (Silva *et al.*, 2004). Os inibidores de proteases também participam no mecanismo de defesa contra muitos insetos herbívoros, que regulam as atividades proteolíticas endógenas em órgãos e inibem atividades catalíticas ou enzimas proteolíticas em nematóides, insetos e fungos (Soares-Costa *et al.*, 2002).

Muitas doenças que ocorrem em plantas são causadas por fungos patogênicos, resultando em perdas de produção e qualidade. A cana de açúcar que tem um papel importante na economia brasileira muitas vezes tem a sua produtividade limitada por estas doenças. Atualmente, o combate ao ataque patogênico mais aplicado é o uso de fungicidas e pesticidas que aumentam os custos e os problemas ambientais (Soares-Costa *et al.*, 2002). Uma estratégia para combater o ataque patogênico sem prejudicar o meio ambiente é o uso de proteínas inibidoras de proteases, que bloqueiam a atividade proteolítica em insetos, fungos e nematóides, prejudicando assim o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução. A cana de açúcar possui proteínas inibidoras de proteases, chamadas de canacistatinas, em seus tecidos,

mas a sua produção é limitada, inviabilizando a extração e purificação para produção de produtos comerciais, e uma alternativa para o aumento da produção é através da tecnologia de DNA recombinante.

Microrganismos geneticamente modificados são utilizados industrialmente para a produção de hormônios, antibióticos, enzimas e proteínas em geral. Na produção de moléculas heterólogas, tanto a etapa de desenvolvimento da cepa que carrega o gene de interesse como a etapa de desenvolvimento de processo de produção são importantes, e neste sentido o estudo das condições de cultivo em reator é importante para a viabilidade do processo (Rossi, 2001).

Muitas proteínas heterólogas são produzidas por microrganismos recombinantes, sendo a *Escherichia coli* o mais utilizado nestes processos, devido ao vasto conhecimento acumulado sobre o mesmo.

Atualmente, a canacistatina é produzida no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar (LBM-DGE/UFSCar) a partir de *E. coli* BL21(DE3), sendo sua potente atividade antifúngica comprovada contra o fungo *Trichoderma reesei* (Soares-Costa *et al.*, 2002). A produção vem sendo realizada mesa incubadora rotativa utilizando o meio de cultura comercial Circlegrow[®], à concentração de 40 g/L e indução com IPTG (isopropiltio- β -d-galactosídeo). Tal meio de cultura apresenta alto custo e é conhecido por aumentar a replicação de plasmídeos em culturas de *E. coli* utilizando duas fontes de carbono.

No entanto, para testes subseqüentes de aplicação da canacistatina como biofungicida em maior escala, há a necessidade do aumento da produção, o que significa o emprego de biorreatores, a utilização de meios de cultura eficientes e de baixo custo, e a definição das melhores condições de indução, avaliando-se o tipo de indutor, e os melhores momento e período de indução.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da expressão de canacistatina em *E. coli* BL21(DE3), avaliando-se diferentes fontes de carbono no crescimento celular e na expressão de canacistatina, estudando o tipo de indutor (IPTG ou lactose) e o estudo do momento e tempo de indução, em mesa incubadora rotativa no sentido de se melhorar a expressão, bem como validar as novas condições de expressão em biorreator airlift de bancada de 6 L de capacidade útil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungicidas e Biofungicidas

Atualmente, o combate aos ataques patogênicos em plantas é realizado através do uso de fungicidas, pesticidas e herbicidas que fazem parte de um grupo de substâncias químicas muito resistentes à degradação por processos bioquímicos, por isso são muito estáveis e de longa vida, além de serem tóxicos e bioacumulativos nos tecidos de animais e humanos, causando prejuízos ambientais, doenças graves e perdas da biodiversidade (www.jornalcana.com.br, 23/08/2004).

Alguns herbicidas influenciam a severidade de doenças, induzindo ou inibindo a síntese de fitoalexinas. Herbicidas do grupo químico difeniléteres geram espécies reativas de oxigênio, as quais mediam a ativação de genes de defesa responsáveis pela síntese de fitoalexinas. O uso de subdoses de glifosfato ocasiona efeito contrário, diminuindo a produção de fitoalexinas. Os impactos negativos com o uso de herbicidas podem ser minimizados com o uso de bioherbicidas (Rizzardi *et al.*, 2003).

Os agrotóxicos que merecem mais atenção são os organoclorados que contaminam a água subterrânea trazendo enormes problemas ambientais (www.jornalcana.com.br, 23/08/2004).

Além da poluição ambiental e dos alimentos, os agrotóxicos têm um elevado custo. Por estes motivos, cientistas estão desenvolvendo produtos biológicos de baixo custo e que diminuem a contaminação do ambiente e dos alimentos e a intoxicação dos produtores rurais (www.jornalcana.com.br, 27/11/2003).

No Brasil, o controle biológico de pragas já é utilizado desde da década de 20, quando o Instituto Biológico combateu a broca do café com a utilização da vespinha de Uganda. Hoje o Brasil tem importantes programas de controle biológico, em destaque está o controle microbiano que utiliza bactérias, fungos, vírus e nematóides no combate a pragas e doenças que atacam culturas de importância econômica, como a cana de açúcar. A cigarrinha é a principal praga da cana de açúcar, pois causa redução de até 60 % de peso da cana e principalmente de teor de sacarose, provocando perdas na produção de açúcar e de álcool. Bons resultados têm sido obtidos no combate à cigarrinha da cana de açúcar com o fungo *Metharizium anisopliae*. Em pelo menos 160 hectares de cana de açúcar do estado de São Paulo já está sendo realizado o controle biológico da cigarrinha, obtendo uma redução significativa na aplicação de produtos químicos. No período de 2002/2003, o custo médio de

tratamento utilizando produtos químicos foi de R\$ 160,00/ha, enquanto que utilizando controle biológico, o custo caiu para R\$ 40,00/ha, que foi uma redução bastante significativa (www.biologico.sp.gov.br, mar/abr-2004).

Cientistas paranaenses estão estudando o genoma de uma bactéria que é capaz de produzir amônia a partir do nitrogênio, substituindo os fertilizantes nitrogenados, permitindo uma enorme economia para os agricultores, além de não contaminar a atmosfera e o lençol freático (www.jornalcana.com.br, 23/08/2004).

Pesquisadores do Laboratório de Controle Microbiano do Setor de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz desenvolveram três bioinseticidas para o combate das pragas (Metarril, Boveril e Trichodermil). O Metarril e o Boveril são formulados com isolados de fungos que ocorrem na natureza, atuam por contato, infectando insetos e ácaros. Agem nas culturas de morangos, citros, cana de açúcar, hortaliças, seringueiras e floricultura. O Trichodermil é um fungo eficaz contra outros fungos específicos que causam doenças na agricultura, ele atua como antagonista, evitando a ocorrência de outros fungos em determinada região, age contra doenças do solo, principalmente no tratamento de grãos e sementes (www.jornalcana.com.br, 27/11/2003).

O ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar) desenvolveu um produto biológico, o Glutucid, produzido a partir de cepas de *Pseudomonas sp.*, constituídos por metabólitos ativos suportados em sulfato de amônio, que se mostra efetivo no controle fitossanitário.

Estão sendo realizados estudos no combate ao gorgulho aquático (*Oryzophagus oryzae*), inseto que ataca culturas de arroz, através da engenharia genética. Com a introdução, no genoma do arroz, de um gene que codifica uma proteína que destrói o trato digestivo do inseto, serão obtidas plantas mais resistentes (www.cib.gov.br, 11/03/2004).

Estudos realizados com proteína inibidora da protease cisteínica da cana de açúcar chamada de canacistatina comprovaram que esta é capaz de desenvolver safras de cana de açúcar mais resistentes ao ataque patogênico, o que pode reduzir o uso de produtos químicos na agricultura, diminuindo o custo e os problemas com o ambiente, além de fornecer alimentos mais saudáveis (Soares-Costa *et al.*, 2002).

2.2. Inibidores de Proteases

As proteases, enzimas proteolíticas, são agrupadas em 4 grupos de acordo com os resíduos de aminoácidos nos sítios ativos, o pH ótimo de atividade, similaridades na

seqüência de aminoácidos, similaridade para inibidores. São classificadas em proteases serínica, cisteínica, aspártica e metalo (Oliveira *et al.*, 2003).

Proteases cisteínicas são enzimas encontradas em todos os organismos, incluindo vírus, bactérias, animais e plantas. Elas são sintetizadas como pré-pro-enzimas e são caracterizadas por compreender os resíduos de cisteína, histidina e asparagina. A estrutura é caracterizada por pelo menos três pontes de dissulfeto (Hellberg *et al.*, 2002).

Hellberg *et al.* (2002) expressaram uma protease cisteínica da *Entamoeba histolytica*, que causa a patogenicidade da ameba, em *E. coli* BL21 e testaram vários inibidores. Os reagentes que inibem proteases serínica, aspártica e metalo não influenciaram a atividade da protease cisteínica da *Entamoeba histolytica* recombinante. No entanto, todos os inibidores de proteases cisteínicas testados reduziram ou bloquearam completamente a atividade enzimática da protease.

Em mamíferos, há um grupo de proteases cisteínicas conhecidas como catepsinas que são importantes em muitos processos fisiológicos e para regular estes processos há um grande número de inibidores endógenos destas proteases (Oliva *et al.*, 2004).

Os inibidores são responsáveis por vários processos regulatórios, tais como, respostas imunológicas, regulação de câncer e contra invasão de parasitas (Oliva *et al.*, 2004).

Os inibidores de proteases cisteínica e serínica estão distribuídos nos tecidos das plantas, protegendo-as contra o ataque patogênico e servindo como proteína de reserva em algumas sementes. São inibidores competitivos e reversíveis que bloqueiam a atividade proteolítica em insetos, fungos e nematóides, prejudicando assim o crescimento, desenvolvimento e reprodução destes patogênicos (Soares-Costa *et al.*, 2002). Os inibidores de proteases cisteínicas, conhecidos como cistatinas, foram primeiramente identificadas em animais (Peng *et al.*, 2004) e podem proteger as células de proteólises endógenas e exógenas inapropriadas e/ou estar envolvido no mecanismo de controle responsável pela inativação protéica intra e extracelular. As cistatinas possuem, também, utilidade em aplicações medicinais como no tratamento de inflamações, distrofia muscular, doenças hereditárias, tumores malignos, entre outros (Turk e Bode, 1991).

A cistatina é composta por uma superfamília apresentando similaridades na seqüência de aminoácidos e funções, sua atividade é explicada pela presença de três pontos de contato com a protease alvo: dois pontos de contato correspondem ao “loop hairpin” formado entre as conformações β antiparalelas, o primeiro “loop” contém o motivo conservado QXVXG encontrado em todos os membros da superfamília, enquanto que o segundo “loop”, menos conservado, pode apresentar um triptofano próximo à região C-terminal; o terceiro ponto de

contato é um resíduo conservado de glicina, localizado na extremidade N-terminal, é um ponto de contato fechado com o resíduo catalítico da enzima, mas em uma conformação que tem uma ponte peptídica invulnerável ao ataque proteolítico (Margis *et al.*, 1998).

Os inibidores de proteases cisteínicas são ricos em serina e glicina, pobre em histidina, cisteína e metionina, e não possuem triptofano (Joshi *et al.*, 1998).

Quase todas as cistatinas conhecidas inibem a atividade da papaína e outras proteases cisteínicas e podem ser intra e extracelulares (Ojima *et al.*, 1997). Ojima *et al.* (1997) encontraram cistatina extracelular em cenouras e até o momento desta publicação não havia relatos de cistatina extracelular em plantas.

Os inibidores de proteases cisteínicas e serínicas possuem várias características de inibição competitiva e reversível similares, mas acredita-se que os mecanismos de interação sejam diferentes (Abrahamson *et al.*, 1987).

A superfamília da cistatina está dividida em três famílias, baseado em suas seqüências homólogas, na presença e posição de pontes de dissulfetos e massa molar da proteína. A primeira família é das estefinas, que é composta de proteínas de baixo peso molecular (aproximadamente 11 kDa) e que não contém pontes de dissulfeto e carboidratos; a segunda, das cistatinas, agrupa proteínas com 120-122 aminoácidos, contém resíduos cisteínicos conservados formando duas pontes de dissulfeto próximo à região C-terminal (ligações covalentes de proteínas e grupos dissulfeto de resíduos de cisteína ajudam a proteger a proteína de uma desnaturação) e podem ser glicosiladas e/ou fosforiladas; a terceira família, dos kininogênios, se caracteriza por ser formada por glicoproteínas de alto peso molecular (60-120 kDa) e com três domínios repetidos similares aos da família da cistatina (Margis *et al.*, 1998).

As cistatinas de plantas apresentam diferenças estruturais em relação a cistatina animal, o que justifica uma nova família, a fitocistatina, que foi originalmente encontrada em sementes de arroz e milho. A classificação das cistatinas de plantas como uma família independente é suportada por alguns pontos principais: a existência de uma seqüência consenso típica; o agrupamento em uma classe estatisticamente distinta das cistatinas e estefinas e a diversidade genômica entre diferentes membros de cistatinas de plantas, caracterizado não só pelo tamanho e posição dos introns, mas também pela multiplicação de exons e fusão com exons distintos não relatado funcionalmente (Margis *et al.*, 1998). As fitocistatinas possuem uma seqüência conservada na região N-terminal da α -hélice, que também as diferenciam da cistatina animal (Shyu *et al.*, 2004). As fitocistatinas são proteínas termo-estáveis (Peng *et al.*, 2004) que não possui pontes de dissulfeto, igualmente ao grupo

das estefinas, e contém uma seqüência conservada L-A-R-[FY]-A-[VI]-X3-N na região N-terminal (primeiro resíduo de aminoácido), são também semelhantes as cistatinas por incluírem o motivo QXVXG. As fitocistatinas não possuem resíduos cisteínicos com exceção da cistatina de papaia. As fitocistatinas possuem várias funções biológicas: funções fisiológicas de regulação das atividades de proteases endógenas em sementes durante a maturação, participação na inibição como elemento importante na defesa contra ataque por insetos e nematóides, utilizadas em processos alimentícios para inibição de autólises e amaciamento de carnes (Peng *et al.*, 2004) e várias aplicações biotecnológicas (Oliveira *et al.*, 2003) e também como modulador de morte celular programada (Reis e Margis, 2001). A atividade inibitória das fitocistatinas é devido ao fato de estas possuírem resíduos de glicina na região N-terminal.

Abrahamson *et al.* (1987) observaram que o resíduo de glicina é conservado em todas as cistatinas, indicando que a ponte de glicil pode ser um sítio reativo inibitório das cistatinas.

Ritonja *et al.* (1989) caracterizaram a cathelina, um inibidor de catepsina L de leucócito de porco e não foi encontrado o resíduo de glicina 9 encontrado em todas as cistatinas como importante na atividade inibitória, também não foi encontrado a seqüência conservada QXVXG. Estas regiões conservadas são importantes para a interação da cistatina com as proteases cisteínas da família da papaína, como não estão presentes na cathelina esta interação deve ser diferente. Por estas razões, sugerem que as cistatinas sejam divididas em 4 famílias.

Abe *et al.* (1988) estudaram a orizacistatina (cistatina do arroz) e observaram que a orizacistatina sem a região N-terminal incluindo o resíduo de glicina e com 231 aminoácidos inibiu a atividade de protease em papaia tão bem quanto a orizacistatina nativa, indicando que em orizacistatina, a glicina não é necessária para atividade inibitória.

Margis *et al.* (1998) observaram que a cistatina da cenoura diverge de outras fitocistatinas pela presença de um segmento adicional que pode corresponder ao segundo domínio hélice encontrado na cistatina do ovo e em todos os membros da família da cistatina animal.

Reis *et al.* (2001) identificaram 25 possíveis fitocistatinas da cana-de-açúcar e através de uma análise filogenética agruparam as fitocistatinas em 4 grupos: i) contendo o consenso N-terminal, ii) contendo o consenso N-terminal e mais uma extensão C-terminal (último resíduo de aminoácido), iii) destituído do consenso N-terminal e iv) destituído do consenso N-terminal e do motivo conservado QXVXG encontrado em todos os membros da superfamília e indispensável para a atividade inibidora das cistatinas. Observaram que a cana de açúcar

possui fitocistatinas com características novas e com expressão diferencial não só encontradas em sementes, mas também em outros órgãos e tecidos (Reis e Margis, 2001).

Soares-Costa *et al.* (2002) observaram que a canacistatina, nome dado para a cistatina da cana de açúcar tem uma estrutura secundária similar à da orizacistatina I do arroz.

Shyu *et al.* (2004) expressaram a cistatina de gergelim em *E. coli* BL21 e testaram a sua atividade de inibição em proteases de papaia e obtiveram um coeficiente de inibição (Ki) de $7,89.10^{-8}$ M para a cistatina na forma nativa e $2,77.10^{-8}$ M para a cistatina recombinante, mostrando que esta possui uma atividade de inibição efetiva.

Gruden *et al.* (1998) verificaram que quando o besouro *Leptinotarsa decemlineata*, principal praga das culturas de batata, ingere inibidores de proteases tem o seu crescimento alterado, isto ocorre porque o inibidor induz a expressão de uma atividade proteolítica específica no intestino do inseto, mas inibidores de proteases extraídos da batata não inibiram a atividade da protease cisteínica no besouro. Quando o inseto é alimentado com trans-epoxi succinil-L-leucilamido-(4-guanidino)-butano, um inibidor de baixo peso molecular de proteases cisteínicas, tem mostrado retardo no crescimento e aumento na mortalidade da larva do besouro e baixa fecundidade nas espécies adultas. Construção de plantas transgênicas produzindo inibidores de proteases suscetíveis pode ser uma alternativa de proteção das lavouras contra o besouro *Leptinotarsa decemlineata*.

O tabaco *Nicotiana glauca* produz vários inibidores de proteases serínicas, um inibidor de chimotripsina e quatro inibidores de tripsina. Heath *et al.* (1997) testaram estes inibidores no intestino da lagarta *Helicoverpa punctigera* e do grilo *Teleogryllus commodus*, pestes que causam perdas em lavouras na Austrália, e observaram substancial inibição das proteases destes insetos. *Teleogryllus commodus* quando alimentado com uma dieta artificial contendo 0,33% m/v de inibidor de protease de *Nicotiana glauca* e 3% m/v de caseína teve um peso médio reduzido de 67%. *Helicoverpa punctigera* também teve seu crescimento reduzido em 54% quando alimentados com uma dieta contendo 0,26% m/v de inibidor. Foi observado que utilizando dietas artificiais houve retardo no crescimento, causado pela diminuição da atividade proteolítica nos intestinos dos insetos, mas não teve diferenças significativas em relação à mortalidade, já quando utiliza tabacos transgênicos contendo inibidores da *Nicotiana glauca* houve aumento na mortalidade. Inibidores de proteases serínicas de outras plantas contêm 1 ou 2 domínios de inibição, enquanto que a *Nicotiana glauca* contem 5 ou 6. Isto fornece atividade inibitória contra muitas proteases em intestino de pestes específicas, podendo aumentar a resistência a insetos em plantas de *Nicotiana glauca* transgênica.

Joshi *et al.* (1998) extraíram proteína inibidora de protease da semente de milho e testaram a atividade antifúngica em quatro cepas de *Trichoderma reesei*, quatro de *Aspergillus flavus* e duas de *Fusarium moniliforme*. Observaram que uma das cepas de *Trichoderma reesei* foi inibida com 2 µg/mL de proteína, as outras cepas de *Trichoderma reesei* e todas de *Fusarium moniliforme* foram inibidas com 10-20 µg/mL de proteína, já o fungo *Aspergillus flavus* não foi inibido com menos de 40 µg/mL. A atividade antifúngica pode ser devido a hidrolases, como chitinases e glucanases que são responsáveis pela degradação da parede celular dos fungos.

Soares-Costa *et al.* (2002) testaram a atividade inibitória da canacistatina no fungo *Trichoderma reesei* e observaram que uma concentração de 50 µg/mL de canacistatina foi capaz de inibir o crescimento do fungo e com concentrações entre 100 e 200 µg/mL o crescimento foi totalmente inibido.

2.3. Tecnologia do DNA recombinante

A tecnologia do DNA recombinante começou a ser desenvolvida no final dos anos 70 e foi um grande progresso para o entendimento e combate de doenças. A oportunidade de introduzir um novo DNA em células hospedeiras criou um microrganismo industrial capaz de produzir proteínas de alto valor (Bailey e Ollis, 1986). Através desta técnica pode-se realizar diagnóstico pré-natal de doenças genéticas, a produção de larga escala de potentes agentes farmacêuticos, o sequenciamento do genoma humano, a introdução de novos traços em bactérias, plantas e animais para indústria e agricultura, terapia gênica (Lehninger *et al.*, 1993).

Em 1975 o primeiro anticorpo monoclonal foi produzido. No ano de 1977 um gene humano foi expresso em bactéria e um gene da insulina de rato foi clonado, no ano seguinte, insulina humana e hormônio de crescimento foram produzidos e DNA bacteriano foi inserido em cromossomo de levedura. A insulina humana recombinante foi aprovada pelo FDA em 1982 e o hormônio de crescimento recombinante foi aprovado em 1985. Em 1986 α -interferon e a primeira vacina recombinante para hepatite B foram aprovadas. O fator VIII foi aprovado em 1992 e β -interferon um ano mais tarde. Com estas descobertas, a tecnologia do DNA recombinante foi ganhando espaço e grande importância (Demain, 2001). O instituto Butantan é capaz de produzir 50 milhões de doses por ano de vacina recombinante contra hepatite B.

Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia é atualmente possível realizar investigação de paternidade e o diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas através da análise de DNA (Lehninger *et al.*, 1993). Uma outra consequência da utilização desta técnica é a possibilidade de utilizar plantas para a produção de substâncias farmacêuticas. Estão sendo obtidos resultados positivos por meio de modificações genéticas de plantas para a produção de compostos de interesse medicinal, tais como: a hirudina, um poderoso anticoagulante e a vitamina C (www.cib.org.br, 11/08/2003).

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes. Primeiro, o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado a uma outra molécula de DNA chamada de vetor de clonagem para formar o que se chama de DNA recombinante. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado de transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada (Bailey e Ollis, 1986).

No entanto, a transformação não acontece em todas as células, só certas linhagens são transformáveis, chamadas de células competentes. As células competentes possuem alta capacidade de inserir o DNA na célula do que as células não competentes. A competência pode depender do estado fisiológico da célula. *E. coli* normalmente não são competentes, mas sua importância para a genética microbiana tem levado ao desenvolvimento de procedimentos empíricos para induzir sua competência. Este procedimento envolve tratamento da *E. coli* com altas concentrações de íons cálcio com manipulação da temperatura, que alteram a permeabilidade da parede celular permitindo a entrada do DNA exógeno através da membrana celular (Shuler e Kargi, 1992). A permeabilidade da membrana celular também é alterada com a adição de manganês no meio (Bailey e Ollis, 1986).

Somente algumas células terão o plasmídeo com o gene de interesse, por isso é necessária a realização de um método para selecionar estas células. O gene de interesse freqüentemente confere resistência a antibióticos. Portanto, antibióticos são acrescentados ao meio de cultura para selecionar somente as linhagens que portam os plasmídeos recombinantes. (Lehninger *et al.*, 1993).

O inserto é obtido através do uso de endonucleases de restrição, que reconhece e corta seqüências de nucleotídeos específicos dentro do DNA deixando extremidades de fitas simples de DNA permitindo a ligação do inserto no vetor. As enzimas de restrição mais largamente utilizada na tecnologia do DNA recombinante são as do tipo II que são proteínas

simples, não requer ATP e clivam o DNA dentro do seu sítio de reconhecimento (Lehninger *et al.*, 1993). A utilidade das enzimas de restrição na tecnologia do DNA recombinante vem de sua especificidade em clivar DNA em sítios particulares. Estas enzimas reconhecem sítios de 6 ou 4 nucleotídeos, e estes fragmentos são suficientemente longos para conter informação genética e suficientemente pequenos para permitir uma manipulação física e bioquímica conveniente *in vitro* (Bailey e Ollis, 1986).

Após a clivagem do DNA os fragmentos se ligam ao vetor através da enzima DNA ligase, esta enzima catalisa a ligação fosfodiéster entre o grupo OH livre na extremidade 3' de uma das cadeias de DNA e um grupo fosfato na extremidade 5' da outra cadeia. Em *E. coli* o fosfato deve ser ativado utilizando NAD⁺ como cofator (alguns organismos utilizam ATP), para fornecer a energia química requerida. (Lehninger *et al.*, 1993). A Figura 2.1 esquematiza a tecnologia do DNA recombinante.

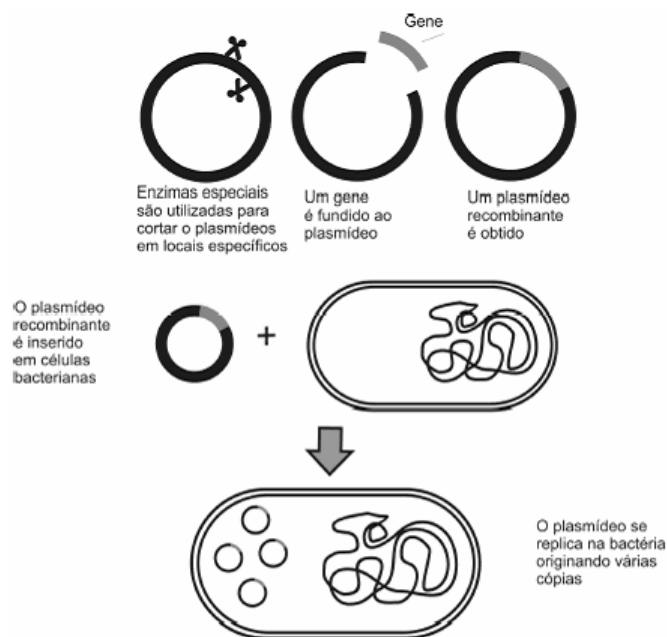


Figura 2.1: Tecnologia do DNA recombinante: o DNA recombinante é formado e inserido na célula hospedeira

Há três tipos de vetores de clonagem utilizados na metodologia do DNA recombinante, que são comumente utilizados em *E. coli*, plasmídeos, bacteriófagos e cosmídeos. Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA circular que replica separadamente do cromossomo do hospedeiro, têm a vantagem de ter pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico, permitindo que em um meio contendo antibiótico, só as células transformadas cresçam. Quando o segmento de DNA é maior, pode ser clonado utilizando bacteriófago λ como vetor, permite a clonagem de DNA acima de 23 kb e seu

“design” assegura que todas as partículas viáveis do fago irão conter o fragmento de DNA de interesse. Os cosmídeos são plasmídeos recombinantes que combinam características tanto dos plasmídeos quanto do bacteriófago λ , são utilizados quando o fragmento de DNA é muito grande (45 kb) (Lehninger *et al.*, 1993).

A escolha do hospedeiro é baseada na habilidade de propagação da proteína de interesse em grande extensão. O hospedeiro deverá sintetizar a proteína de interesse com o mesmo molde de glicosilação, fosforilação e acetilação encontrado quando a proteína é isolada na sua forma nativa (Glick, 1995).

E. coli é o microrganismo mais utilizado e competente para transformação com DNA exógeno, por várias razões, por possuir métodos precisos e rápidos para modificação de seu genoma, rápido crescimento, facilidade de cultivo, facilidade de redução de protease, facilidade de evitar incorporação de aminoácidos análogos, facilidade de alterar o número de cópias, facilidade de formação de pontes de dissulfeto intracelulares, facilidade de crescer em altas densidades celulares, acumulação de proteína heteróloga acima de 50% de sua massa celular, sobrevivência em diferentes condições ambientais, não necessita de um meio de cultura caro, desempenho reprodutível, alto rendimento em produto, entre outras (Demain, 2001). Mas, nem todo gene pode ser expresso eficientemente neste organismo devido às características estruturais única e sutis da seqüência gênica, estabilidade e eficiência translacional do mRNA, a facilidade de enovelamento da proteína, degradação da proteína por proteases do hospedeiro, diferenças de códons entre o gene de interesse e da *E. coli* nativa, e a toxicidade potencial da proteína para o hospedeiro. As principais desvantagens da *E. coli* como sistema de expressão inclui a incapacidade de fazer modificações pós-translacionais encontradas em proteínas eucariotas, a falta de mecanismo de secreção da proteína para o meio de cultura e limitada capacidade de formar pontes dissulfeto (Makrides, 1996).

Todavia, muitas proteínas recombinantes têm sido produzidas com sucesso utilizando *E. coli* (Choi e Lee, 2004), tais como: interferons, interleucinas, hormônio de crescimento e insulina (Lee, 1996).

Um vetor de clonagem utilizado em *E. coli* deve ter as seguintes propriedades: habilidade para replicar na célula hospedeira, habilidade para acomodar insertos de vários tamanhos sem danificar as funções de replicação, facilidade de inserção na célula hospedeira depois de manipulação *in vitro*, conter marcador de seleção para selecionar rapidamente e positivamente as células que contém o vetor, conter só um sítio para uma ou mais endonucleases de restrição. Os vetores mais utilizados para clonagem de DNA em *E. coli* são plasmídeos e bacteriófagos, quando os insertos são fragmentos grandes de genoma eucariótico

é preferível o uso do bacteriófago como vetor. Um plasmídeo bastante popular é o pBR322, inclui um único sítio para enzima de restrição, possui genes resistentes à tetraciclina e ampicilina e uma origem de replicação (Bailey e Ollis, 1986). Os vetores bastante utilizados para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* são os da série pET (“plasmid for expression by T7 RNA polimerase”), estes requerem um hospedeiro que possa produzir a RNA polimerase do bacteriófago T7 sob o controle induzível do promotor lacUV5. Sob a jusante do promotor altamente específico T7 e um sítio de ligação do ribossomo. Estes vetores são mantidos por conferir resistência a antibióticos (ampicilina ou kanamicina) e a expressão do gene é iniciada por adição de IPTG (0,1 a 1 mM). Muitas proteínas overexpressadas em vetores pET são encontrados em corpos de inclusão (Hoffman *et al.*, 1995).

Embora muitas proteínas sejam expressas em forma insolúvel, biologicamente inativa em corpos de inclusão, sendo sua recuperação complicada e de custo elevado, muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para que proteínas recombinantes em *E. coli* estejam em forma solúvel e/ou secretadas (Lee, 1996). A formação de corpos de inclusão continua sendo uma barreira para expressão gênica no citosol. Os corpos de inclusão oferecem muitas vantagens, mas que acabam sendo pequenas, considerando a difícil tarefa de enovelar as proteínas agregadas, a incerteza de que a proteína enovelada retém a atividade biológica, e a redução do rendimento da proteína enovelada e purificada (Makrides, 1996). Makrides (1996) analisou 81 proteínas que formam ou não corpos de inclusão em *E. coli* e concluiu que 6 parâmetros são correlacionados com a formação de corpos de inclusão: carga média, fração de resíduo “turn forming”, fração de cisteína, fração de prolina, hidrofobicidade e o número total de resíduos.

Muitos experimentos têm sido realizados para minimizar a formação de corpos de inclusão e melhorar o enovelamento das proteínas. Estes incluem o crescimento de culturas bacterianas a baixas temperaturas, a seleção de diferentes linhagens, a substituição de aminoácidos, a co-produção de chaperonas, a utilização de tioredoxina como proteína de fusão, crescimento e indução sob stress osmótico na presença de sorbitol e glicil betaína, adição de açúcares não metabolizados no meio de crescimento, alteração do pH do meio e a utilização de linhagens deficientes em tioredoxina redutase (Makrides, 1996).

Há uma grande variedade de organismos e células utilizados como hospedeiro na expressão de genes, incluindo diferentes microrganismos, assim como também células animais, de plantas e insetos (Glick, 1995).

Um microrganismo bastante utilizado como hospedeiro para DNA recombinante é a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, por ser um microrganismo não patogênico, não

parasita e por secretar alguns dos produtos expressados. Muitas proteínas mamíferas são expressas em *Bacillus subtilis* incluindo insulina e interferons (Bailey e Ollis, 1986).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é, também, bastante utilizada para expressão de proteínas por ser capaz de expressar diretamente alguns genes eucarióticos e procarióticos. A levedura realiza algumas modificações pós-translacionais típicas de eucariotos e pode secretar algumas proteínas no meio (Bailey e Ollis, 1986).

A Figura 2.2 mostra um mecanismo molecular proposto para esta transformação de *E. coli*.

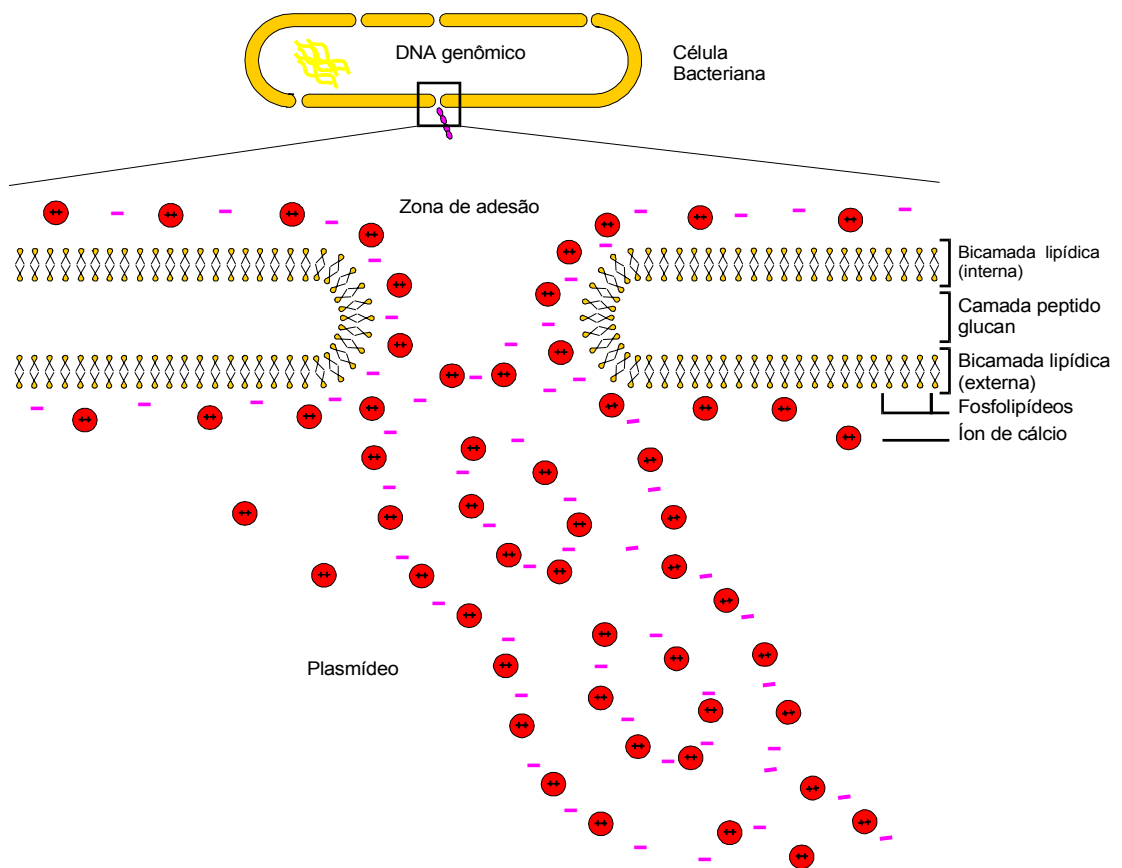


Figura 2.2: Mecanismo proposto para a transformação de *E. coli* com uma molécula de DNA exógeno

2.4. Expressão de proteínas heterólogas

A escolha de um sistema de expressão para a produção de altos níveis de proteína recombinante depende de muitos fatores, tais como: características de crescimento celular, níveis de expressão, expressão intracelular e extracelular, modificações translacionais e atividade biológica da proteína de interesse, assim como questões regulatórias na produção de

proteínas terapêuticas. A seleção de um sistema de expressão particular requer uma análise de custo em termos de processo, projeto e outras considerações econômicas (Makrides, 1996).

A introdução e expressão de DNA exógeno no hospedeiro fazem com que ocorram mudanças no metabolismo do organismo que pode prejudicar o funcionamento do metabolismo normal dos organismos. As mudanças no metabolismo ocorrem como consequência da carga metabólica, recursos da célula hospedeira (ATP, GTP, aminoácidos) necessários para manter e expressar DNA exógeno. A carga metabólica aumenta com o aumento do número de cópias de plasmídeos, pois uma certa quantidade de energia é necessária para manter o plasmídeo dentro da célula (Glick, 1995).

A magnitude da carga metabólica causada pela produção de proteínas heterólogas depende da extensão que a proteína é produzida, do número de cópias de plasmídeos, do tamanho do vetor de clonagem, do estado metabólico da célula, da composição do meio de crescimento e da concentração de oxigênio dissolvido (Glick, 1995).

A imposição de uma carga metabólica por introdução de DNA exógeno pode causar muitas mudanças na fisiologia e funcionamento do hospedeiro. A mudança mais observada é a diminuição da velocidade específica de crescimento e que se não houver antibióticos de seleção no meio, os plasmídeos serão perdidos (Glick, 1995). Isto é mais bem observado em cultivos contínuos, se a manutenção de plasmídeos de alta cópia é instável (Flickinger e Rouse, 1993). Uma simples estratégia para diminuir a carga metabólica no hospedeiro é a utilização de baixo número de cópias de plasmídeos (Glick, 1995). O número de cópias dos plasmídeos é determinado pela origem de replicação (Makrides, 1996).

Glick (1995) observou que a velocidade específica de crescimento celular e a expressão da proteína β -lactamase em *E. coli* HB101 diminuíram com o aumento do número de cópias de plasmídeos.

Muitos sistemas de expressão (instrumentos genéticos que possibilitam a síntese de proteínas de interesse biotecnológico em célula hospedeira) estão sob o controle de um promotor (seqüência de DNA onde a RNA polimerase se liga levando ao início da transcrição) e um repressor (proteína que se liga à seqüência operadora de um gene e bloqueia a sua transcrição), permitindo que o cultivo aconteça em duas fases: crescimento celular e síntese da proteína heteróloga (Gombert e Kilikian, 1998). Altos níveis de expressão são alcançados através do uso de promotores fortes e reguláveis (Glick, 1995).

O sistema mais utilizado para a expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza *E. coli* como célula hospedeira, devido à facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli* e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que se produz. A expressão de proteínas e a

clonagem de genes são controladas por um dado promotor. O promotor é posicionado aproximadamente 10 a 100 pb a montante do sítio de ligação do ribossomo e está sob o controle de um gene regulatório, que pode estar presente no vetor ou integrado ao cromossomo do hospedeiro (Makrides, 1996).

Promotores de *E. coli* consistem de uma seqüência hexanucleotídica localizada aproximadamente 35 pb a montante do início da transcrição (região – 35) separado por pequeno espaço de outro hexanucleotídeo (região –10) (Makrides, 1996).

Há muitos promotores disponíveis para a expressão gênica em *E. coli*, incluindo pequenos derivados de bactérias gram positivas e bacteriófagos. Um promotor útil exibe muitas características: é forte, possui baixos níveis de expressão basal, é facilmente transferido para outras linhagens, e a indução é simples e efetiva (Makrides, 1996).

Um promotor para ser utilizado em *E. coli* deve ter certas características para tornar apropriada a síntese de altos níveis de proteína. Primeiro, deve ser forte, resultando em um acúmulo de 10 a 30% ou mais do total da proteína celular; segundo, deve exibir um nível mínimo de atividade transcricional basal. Expressão gênica em larga escala preferencialmente emprega cultivos com alta densidade celular e mínima atividade do promotor, seguindo da indução e desrepressão do promotor. A regulação do promotor é essencial para sínteses de proteínas que podem ser prejudiciais para a célula hospedeira (Makrides, 1996).

Sistemas de expressão incompletamente reprimidos podem causar instabilidade do plasmídeo, diminuição da velocidade de crescimento celular e perda da produção de proteína recombinante (Makrides, 1996).

Uma terceira característica importante do promotor é que seja induzido de uma maneira simples e de baixo custo. Os promotores largamente utilizados para a produção de proteína recombinante utilizam indução térmica ou química (Makrides, 1996).

Kaprálék *et al.* (1991) observaram que a temperatura de cultivo influencia a velocidade específica de expressão do gene: a 30 °C a expressão do gene foi praticamente bloqueada, a 37 °C o gene foi expresso com uma diminuição na velocidade específica de crescimento e a 42 °C houve uma diminuição na expressão e o crescimento celular parou.

Em resumo, um eficiente vetor de expressão em procariotos deve conter um promotor forte e regulado, um sítio Shine Dalgarno (SD) posicionado 9 pb a 5' do início do códon de translação e é complementar a 3' do 16S rRNA e um eficiente terminador de transcrição posicionado a 3' do gene da seqüência codificadora. Em adição, os vetores requerem uma origem de replicação, um marcador de seleção, e um gene que facilita a regulação estridente da atividade do promotor (Makrides, 1996).

A expressão de proteínas pode ser indutível ou constitutiva. O sistema de expressão indutível é o mais utilizado e em *E. coli* o mais utilizado é o *operon lac*. Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em fago ou plasmídeo contendo o lac I (repressor, que quando ligado impede a ligação da RNA polimerase e a transcrição), lac P (promotor), lac Y (envolvido com o transporte de lactose) e lac Z (gene estrutural transcrito para o mRNA da β -galactosidase, catalisa a quebra de lactose em glicose e galactose). A indução da transcrição é obtida pela adição de lactose ou de IPTG (isopropiltio- β -d-galactosídeo, um análogo de lactose sintético e não degradável), o qual se associa ao repressor, inibindo-o, deixando o promotor livre para a interação da RNA polimerase e conseqüente transcrição do gene (Nascimento *et al.*, 2003). Apesar de o IPTG possuir alto custo e toxicidade, há poucos trabalhos publicados que utiliza lactose como indutor, provavelmente pela dificuldade em estabelecer condições ideais de cultivo, já que a lactose serve como indutor e fonte de carbono (Gombert e Kilikian, 1998). O *operon lac* só é transcrito quando no meio há lactose e ausência de glicose, a enzima β -galactosidase converte a lactose em galactose e glicose, que é então utilizada como fonte de energia. Quando *E. coli* cresce rapidamente em um meio contendo glicose, há a inibição da formação de AMP cíclico, que influencia a atividade do promotor no *operon lac*, cuja indução é bloqueada ou moderada quando o nível de AMP cíclico está baixo (Bailey e Ollis, 1986). Em bactérias, o AMP cíclico se liga ao CAP (proteína ativadora de genes por catabólitos); somente o complexo CAP-AMP é capaz de estimular a transcrição e se ligar a determinados promotores, CAP estimula a transcrição do *operon lac* por possuir uma região de ligação a RNA polimerase quando está ligado ao DNA. A Figura 2.3 mostra o funcionamento do *operon lac*.

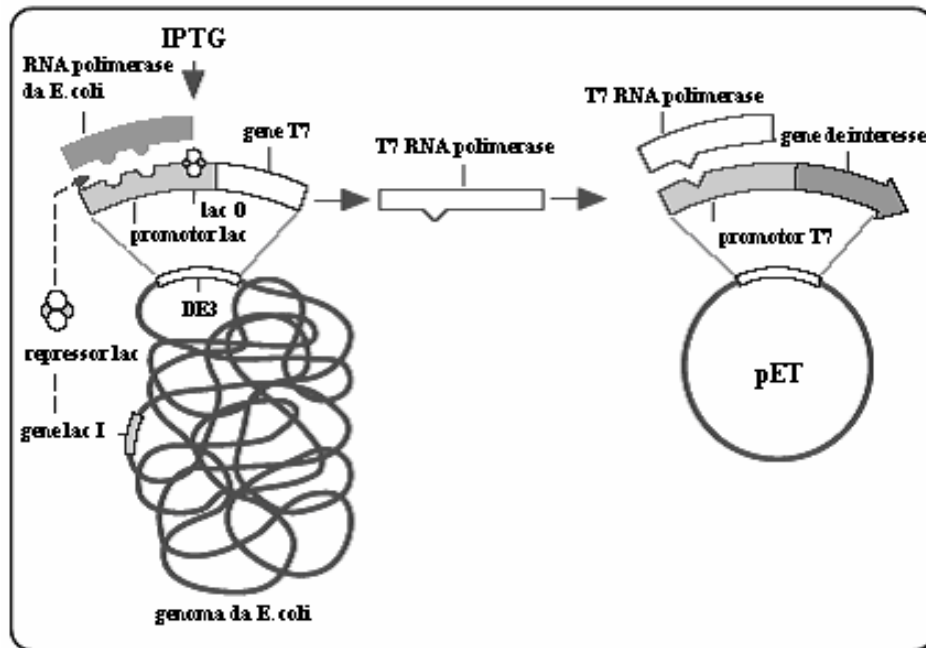


Figura 2.3: Esquema de funcionamento do *operon lac*.

Um dos mais poderosos e amplamente utilizados sistemas de expressão em *E. coli* utiliza o promotor do fago T7. A atividade deste sistema depende da unidade de transcrição que fornece a T7 RNA polimerase, que a repressão é essencial para evitar o enfraquecimento do promotor T7 (Makrides, 1996).

Gombert *et al.* (1998) utilizaram lactose como indutor da proteína troponina C em *E. coli* e mostraram que a lactose possui vantagens por ser mais barata, menos tóxica e não requerer uma fonte de carbono extra. A indução foi realizada em 3 pulsos com o objetivo de evitar eventuais efeitos de inibição, devido à alta concentração residual no meio.

O processo de degradação do mRNA fornece um importante ponto de controle da expressão gênica em praticamente todos os organismos. Muitas diferentes RNAses participam da degradação do mRNA em *E. coli*, incluindo endonucleases, e 3' exonucleases, nenhuma 5' exonuclease foi identificada em procariotos. Alguns autores sugerem que a expressão gênica pode ser aumentada quando se utilizam hospedeiros que são deficientes em RNAses (Makrides, 1996).

E. coli BL21 são deficientes na protease lon e na protease de membrana ompT que pode degradar proteínas durante a purificação. A proteína de interesse deve ser mais estável nestas linhagens do que em hospedeiros que contêm estas proteases (Novagen, 2003).

Quando a proteína de interesse está localizada no citoplasma da *E. coli*, é muito provável que esta sofra degradação por causa do grande número de proteases localizadas no

citoplasma, além da dificuldade de purificar a proteína de interesse das proteínas intracelulares. O periplasma oferece muitas vantagens para proteínas heterólogas em contraste com o citoplasma, o periplasma contém só 4% da proteína celular total, assim a proteína de interesse fica concentrada e a purificação é consideravelmente mais fácil. O ambiente oxidativo do periplasma facilita o enovelamento correto das proteínas e a degradação é menor. Quando as proteínas heterólogas são secretadas no meio, as vantagens aumentam, mas infelizmente *E. coli* secreta poucas proteínas e a manipulação de vários caminhos de transporte para facilitar a secreção é uma árdua tarefa (Makrides, 1996).

Atualmente há uma larga variedade de proteínas de fusão utilizadas em pesquisas biológicas. Proteínas de fusão têm utilidade na produção, detecção e purificação de proteínas recombinantes. Fusões específicas podem aumentar o enovelamento, solubilidade, resistência a proteólises e secreção de proteínas recombinantes no meio de cultura, aumentando o rendimento da proteína de interesse (Makrides, 1996).

Proteólise é um seletivo e altamente regulado processo que tem um importante papel em fisiologia celular. *E. coli* contém um grande número de proteases que estão localizadas no citoplasma, periplasma e nas membranas internas e externas e que podem degradar as proteínas heterólogas. Há muitas estratégias para minimizar proteólises de proteínas recombinantes em *E. coli*, tais como: transporte da proteína para o meio de cultura, utilização de linhagens hospedeiras proteases deficientes, crescimento das células hospedeiras a baixas temperaturas, construção de proteínas de fusão no N- e/ou C- terminal, fusão “tandem” de múltiplas cópias do gene alvo, co-expressão de chaperonas, substituição de um resíduo de aminoácido específico para eliminar o sítio de clivagem da protease, modificação da hidrofobicidade da proteína alvo e otimização das condições de fermentação (Makrides, 1996).

2.5. Condições de cultivo

Muitos estudos estão sendo realizados para aumentar a produtividade de proteínas recombinantes utilizando bactérias como hospedeiro, tais como: manutenção de alta dosagem de gene, redução de toxicidade, aumento da estabilidade proteolítica da proteína, composição de meio de cultura, entre outros (Vila *et al.*, 1997).

Para a síntese de produtos heterólogos, algumas variáveis importantes das condições de fermentação devem ser otimizadas, tais como: condições de crescimento, métodos de

indução, inibição mínima por metabólitos, além da obtenção de sistemas genéticos bem adequados (Rossi, 2001).

Níveis de expressão gênica em *E. coli* dependem das características bioquímicas da proteína recombinante, mecanismo de indução da expressão, linhagens do hospedeiro e condições de cultivo (Lee *et al.*, 1997).

Para otimizar a produção da proteína recombinante é essencial entender a relação entre a fisiologia microbiana, sistema hospedeiro/vetor e a expressão gênica durante a fermentação; também é importante o entendimento da relação entre tempo de indução e o estado metabólico do hospedeiro durante o ciclo de fermentação. A otimização do processo freqüentemente envolve melhorias nas condições de fermentação, como composição do meio de cultura, condições de crescimento, método de indução e minimização de inibição por metabólito (Lee *et al.*, 1997).

A composição do meio de crescimento celular deve ser cuidadosamente formulada e monitorada, porque pode ter efeitos metabólicos significativos tanto nas células quanto na produção da proteína. A composição de nutrientes e a definição de variáveis de fermentação tais como temperatura, pH e outros parâmetros podem afetar a atividade proteolítica, secreção e os níveis de produção. A suplementação do meio de cultura com glicina aumenta a liberação da proteína do periplasma para o meio de cultura sem causar significativa lise celular, similarmente, crescimento celular sob stress osmótico na presença de sorbitol e glicil betaína aumenta mais de 400 vezes a produção de proteína solúvel e ativa (Makrides, 1996).

A utilização de um meio de cultura definido resulta em condições de cultivo reprodutíveis e é preferível ao meio de cultura complexo quando o controle da velocidade específica de crescimento é desejável, porque o nutriente limitante é conhecido e pode-se alcançar crescimento celular balanceado (Yee e Blanch, 1993). Yee e Blanch (1993) desenvolveram um meio de cultura definido para o cultivo de *E. coli* X90 recombinante e obtiveram uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,87 \text{ h}^{-1}$ e um rendimento de biomassa em glicose de $0,42 \text{ g/g}$.

Flickinger e Rouse (1993) sugerem que é possível limitar o crescimento celular enquanto mantém a síntese do produto, fornecendo substrato a uma velocidade mínima necessária para a manutenção celular e síntese do produto, mas a síntese de proteína em bactéria diminui quando a velocidade de crescimento se aproxima de zero por causa do controle de síntese de rRNA.

2.5.1. Ácido acético

Excreção e acúmulo de ácidos orgânicos é um problema no cultivo de muitas linhagens bacterianas. Dentre uma variedade de metabólitos, o ácido acético tem provado ser o principal componente responsável pela redução do desempenho do processo. Ele inibe o crescimento celular quando acumulado acima de certa concentração (Konstantinov *et al.*, 1990).

Konstantinov *et al.* (1990) estudaram o processo em batelada alimentada para a produção de fenilalanina em *E. coli* AT2471 e observaram que quando a concentração de ácido acético no meio de cultura foi alta, foi detectada também uma baixa concentração de etanol, principalmente durante o período de crescimento celular.

O acetato é o principal produto das vias fermentativas de *E. coli*, mas é um inibidor de crescimento e de síntese de produtos heterólogos, alguns autores citam que a formação de acetato é maior em meio de cultivo complexo do que em definido. Em meios de cultura complexos o microrganismo consome os nutrientes (aminoácidos e vitaminas presentes no extrato de levedura ou triptona) para biossíntese e glicose (fonte de carbono e energia) para obtenção de energia, utilizando as vias fermentativas como forma de regulação do fluxo de nutrientes. Uma maior concentração de extrato de levedura pode acarretar uma maior concentração de subprodutos no meio de cultura, como, por exemplo, o ácido acético (Rossi, 2001).

Kleist *et al.* (2003) observaram que quando a concentração de acetato no meio está acima de 5 g/L há uma redução na velocidade de crescimento e no rendimento em biomassa.

Konstantinov *et al.* (1990) observaram que o crescimento celular parou quando a concentração de ácido acético no meio estava em torno de 15 g/L e quando a concentração de ácido estava em 2 g/L, não houve inibição do crescimento.

O acetato é produzido quando *E. coli* está crescendo sob condições anaeróbicas ou quando há limitação por oxigênio, mas em culturas onde há excesso de glicose no meio, acetato pode ser produzido sob condições aeróbicas (Lee, 1996). Lee (1996) relata que não há produção de acetato quando se utiliza glicerol como fonte de carbono e energia. Korz *et al.* (1995) estudaram a utilização de glicose e glicerol como fontes de carbono e energia em cultivos com *E. coli* e a produção de acetato não foi observada quando se utilizou glicerol como fonte de carbono e energia devido à baixa velocidade de crescimento.

A concentração de glicose, oxigênio dissolvido e velocidade específica de crescimento são fatores chaves para a formação de ácido acético que podem ser controlados empregando

processos em batelada alimentada, que são utilizados para alcançar altas concentrações celulares, controlando a velocidade específica de crescimento, evitando redução de oxigênio dissolvido e formação de produtos fermentativos (Suárez e Kilikian, 2000).

Konstantinov *et al.* (1990) concluíram que a deficiência de oxigênio é um fator importante na excreção de ácido acético. A deficiência de oxigênio irá forçar a glicose a ir para o caminho fermentativo e o ácido acético é formado quando o fluxo de carbono excede a capacidade do caminho oxidativo.

A concentração de ácido acético mínima que inibe o crescimento de *E. coli* depende da cepa utilizada e das condições de cultivo e o valor da velocidade específica de crescimento em que ocorre a formação de ácido acético é chamada de velocidade específica de crescimento crítica. Para processos contínuos este valor está entre $0,3 \text{ h}^{-1}$ e $0,72 \text{ h}^{-1}$ e para processos em batelada entre $0,05 \text{ h}^{-1}$ a $0,4 \text{ h}^{-1}$ (Suárez e Kilikian, 2000).

Gombert *et al.* (1997) observaram que para *E. coli* BL21 (DE3) pLysS a concentração crítica de ácido acético para não haver inibição foi de $0,9 \text{ g/L}$.

Suárez *et al.* (2000) produziram troponina C em *E. coli* BL21 e observaram que para velocidades específicas de crescimento maiores que $0,30 \text{ h}^{-1}$, a velocidade de acúmulo de ácido acético aumentou bastante e a concentração de ácido acético que inibe o crescimento foi alcançada rapidamente. Para μ abaixo de $0,2 \text{ h}^{-1}$, houve uma redução de 17 % no rendimento de biomassa em glicose. Com estes resultados os autores concluíram que *E. coli* BL21 deve ser cultivada com velocidade específica de crescimento entre $0,2$ e $0,3 \text{ h}^{-1}$ para obter alto rendimento de biomassa com moderado acúmulo de ácido acético.

Durante o crescimento aeróbio ou anaeróbio em presença de excesso de fonte de carbono ocorrem eventos fisiológicos que levam ao acúmulo de ácido pirúvico, responsável pela formação de substâncias ácidas prejudiciais à célula, como o acetato (Aristidou *et al.*, 1995).

Estudos têm mostrado que ácidos de cadeias curtas podem reprimir a síntese de macromoléculas, incluindo DNA, RNA, proteínas, lipídios e peptidoglicano (Aristidou *et al.*, 1994)

Aristidou *et al.* (1995) introduziram o gene *alsS* de *Bacillus subtilis* que codifica a enzima acetolactate em *E. coli* e observaram uma redução na produção de acetato e um aumento na produção da proteína recombinante. Esta enzima é capaz de catalisar a conversão do piruvato em espécies não ácidas e menos prejudiciais ao crescimento celular, como a acetoina (Aristidou *et al.*, 1994).

O crescimento de *E. coli* é inibido quando os seguintes nutrientes estão presentes acima de certas concentrações (g/L): glicose (50), amônia (3), ferro (1,15), magnésio (8,7), fósforo (10) e zinco (0,038) (Lee, 1996).

Muitas técnicas de engenharia têm sido aplicadas para diminuir a excreção e acúmulo de ácido acético, incluindo diálises, método que remove fisicamente o ácido acético do meio de cultura, mas não é apropriado para aplicação industrial devido ao alto custo e dificuldades práticas em realizar este processo. Outra técnica é estabilizar o oxigênio dissolvido por controle do suprimento de oxigênio (DO-stat) e a terceira técnica é baseada na combinação do DO-Stat com uma política de alimentação correta de glicose (Konstantinov *et al.*, 1990).

2.5.2. Obtenção de alta concentração celular

Altas concentrações celulares em cultivos de *E. coli* recombinante são necessárias para melhorar a produtividade de produtos heterólogos quando a expressão do gene alvo é controlada por um promotor repressor (lac, trp, λ_{PL}) permitindo que o cultivo ocorra em duas fases: crescimento celular e expressão gênica (Gombert e Kilikian, 1997). Isto ajuda a manter a estabilidade dos plasmídeos e evita uma instabilidade estrutural por causa da redução da pressão seletiva durante a fase de crescimento (Curless *et al.*, 1990). Estes promotores podem ser ativados com mudanças no meio de cultura tal como, adição de indutor, esgotamento de repressor ou mudanças de temperatura.

As vantagens dos cultivos com alta densidade celular são: reatores de volume reduzido, menos esforço nos processos de “upstream” e “downstream”, produtividades volumétricas altas, facilidade de separação celular e melhora do rendimento na recuperação do produto, reduzida perda de água e menor custo para a produção (Riesenberg *et al.*, 1991).

Porém, culturas com alta densidade celular possuem muitas desvantagens, incluindo limitada disponibilidade de oxigênio dissolvido, níveis de dióxido de carbono que podem diminuir a velocidade de crescimento e produzir acetato, redução da eficiência de mistura da fermentação e geração de calor (Makrides, 1996).

Korz *et al.* (1995) obtiveram uma alta concentração celular em cultivos de *E. coli* em batelada alimentada quando se utilizou glicerol como fonte de carbono devido à alta concentração de glicerol na solução de alimentação. Quando se utilizou glicose, a concentração de glicose na solução de alimentação não pode ser aumentada devido à solubilidade limitada da glicose.

Além da obtenção de alta concentração celular, a técnica de batelada alimentada pode ser aplicada para produção de proteínas recombinantes, ou seja, durante o processo em batelada alimentada pode ser mantida a velocidade específica constante permitindo a investigação dos efeitos da velocidade de crescimento na interação vetor-hospedeiro em *E. coli* (Korz *et al.*, 1995).

Altos níveis de expressão de proteínas em culturas bacterianas com altas concentrações celulares são obtidos quando se estabelece um estado de crescimento balanceado e exponencial. Crescimento balanceado é obtido quando nutrientes são supridos em quantidades ótimas acima da concentração limite e abaixo da concentração tóxica (MacDonald e Neway, 1990).

A concentração celular no final da fase de crescimento depende das condições de cultivo, tais como composição do meio, tipo e concentração da fonte de carbono e concentração de oxigênio dissolvido (Kilikian *et al.*, 2000).

A glicose, uma fonte de carbono de fácil assimilação, é um repressor catabólito na biossíntese de antibióticos como penicilina, mitocina, bacitracina e streptomina. Aumento da produção de penicilina é alcançado quando se utiliza glicose mais uma fonte de carbono de metabolismo lento, como a lactose. O processo ocorre em duas fases, a primeira, crescimento celular, onde é consumida glicose e a segunda é a fase de produção do antibiótico com consumo de lactose. Uma outra alternativa é a adição lenta de glicose no meio (batelada alimentada) (Bailey e Ollis, 1986).

A glicose também leva a excreção de substâncias ácidas, como o acetato, que são prejudiciais ao crescimento celular e a produção de produtos heterólogos (Aristidou *et al.*, 1995).

E. coli consome preferencialmente glicose do que lactose e, como a lactose induz a produção de β -galactosidase, em um meio contendo glicose não haverá a produção desta enzima. Crescimento celular rápido em glicose inibe a produção de AMP cíclico, que influencia a atividade do promotor *operon lac* (Bailey e Ollis, 1986).

Gombert *et al.* (1997) obtiveram alta concentração celular (92 g/L) com alta produtividade (3,7 g/L.h) na produção de troponina C em *E. coli* BL21 recombinante através de cultivo em batelada alimentada em biorreator. A velocidade de crescimento foi mantida abaixo de $0,30 \text{ h}^{-1}$ para evitar o efeito Crabtree (inibição por excesso de glicose e alta velocidade de crescimento) e a concentração de oxigênio foi mantida numa saturação acima de 30% para evitar o efeito Pasteur (aumento da atividade fermentativa de *E. coli* por limitação de oxigênio).

Fass *et al.* (1989) cultivaram *E. coli* em batelada alimentada e obtiveram uma concentração celular de 45 g/L através de um sistema de ar enriquecido com oxigênio e mantendo uma velocidade específica de crescimento de $0,55 \text{ h}^{-1}$. Este resultado foi três vezes maior do que o obtido com ar comprimido. Concluíram que sobe condições que asseguram não limitação por oxigênio, não há inibição por acetato, apesar da alta concentração de glicose no início do crescimento exponencial.

Embora o melhoramento do meio de cultura favoreça o alcance de altas concentrações celulares e rendimento de proteínas recombinantes, a produção de ácido acético é também maior em meios complexos do que definidos (Suárez *et al.*, 1998).

Suárez *et al.* (1998) testaram um meio de cultura com diferentes concentrações de extrato de levedura na expressão de troponina C por *E. coli* BL21 e observaram que a concentração de extrato de levedura não afeta o crescimento celular ou a cinética em níveis significativos, mas afeta a concentração de ácido acético no meio, sugerindo que um meio de cultura sem extrato de levedura é a melhor opção para obter altas concentrações celulares e expressão de proteína recombinante mantendo a concentração de ácido acético baixa.

2.5.3. Síntese de proteína heteróloga

A quantidade de proteína alvo é manipulada através do tempo de indução, da disponibilidade do indutor e do controle da velocidade específica de crescimento antes da indução (Kilikian *et al.*, 2000).

O tipo de indutor, disponibilidade da fonte de carbono e a velocidade específica de crescimento no início da indução influencia no conteúdo de proteína celular e na velocidade específica de produção de proteína heteróloga. Em alguns casos alta velocidade específica de crescimento (μ) ajuda a indução, em outros casos baixo μ ajuda a indução e em alguns casos a indução independe de μ (Kilikian *et al.*, 2000).

Freqüentemente, quando a expressão da proteína é induzida em um estágio antes da fase exponencial de crescimento se obtém uma alta produtividade específica (concentração de proteína por concentração celular por tempo de cultivo), mas resulta em produção volumétrica (concentração de proteína por tempo de cultivo) insatisfatória devido à baixa concentração celular no final do cultivo (Lee *et al.*, 1997).

Lee *et al.* (1997) obtiveram maior produtividade específica na expressão de TGF- α -PE40 quando utilizaram glicerol como fonte de carbono ao invés de glicose. Observaram também que a utilização de diferentes quantidades de extrato de levedura no meio causou

diferenças na concentração celular final e na produtividade de proteína, sugerindo que a concentração de extrato de levedura no meio de produção foi fator limitante para alta concentração celular e expressão de TGF- α -PE40 sob condições fermentativas.

MacDonald *et al.* (1990) expressaram interleucina-2 humana em *E. coli* K-12 e induziram a diferentes densidades celulares e observaram que quando a cultura foi induzida a densidades celulares mais baixas, houve uma maior produção de interleucina-2.

Riesenberg *et al.* (1991) observaram que a velocidade de expressão de produtos recombinantes em *E. coli* é mais alta a velocidades de crescimento baixas, como foi provado na produção de α -interferon-1.

Para alcançar tanto alta concentração celular e alta expressão do produto, estratégias de cultivos de *E. coli* a velocidades de crescimento reduzidas são necessárias, isto é, abaixo do valor crítico para geração de bioprodutos e ótimo para a expressão do produto. A velocidade de crescimento apropriada depende da linhagem e das condições de cultivo (Riesenberg *et al.*, 1991).

A indução da expressão de genes exógenos pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, tais como mudança da temperatura de cultivo ou adição de um indutor específico e, dependendo do promotor utilizado, resulta em diminuição das atividades celulares, fenômeno conhecido como “metabolic burden” (Kilikian *et al.*, 2000).

Condições de estresse da célula (“metabolic burden”) podem ser desfavorecidas por mudanças na composição do meio de cultivo, como a suplementação de aminoácidos durante a fase de crescimento (no caso de cepas auxotróficas, que são incapazes de sintetizar um ou mais fatores nutricionais de crescimento) e na fase de síntese de produtos heterólogos (Rossi, 2001).

Kilikian *et al.* (2000) testaram IPTG (isopropiltio- β -d-galactosídeo) e lactose como indutor para a expressão da proteína troponina C e observaram um rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) três vezes maior quando se utiliza lactose como indutor ao invés de IPTG, significando um efeito tóxico do IPTG no metabolismo celular, ou seja, a carga metabólica é mais pronunciada quando se utiliza IPTG do que lactose. A carga metabólica é maior quando se têm altos valores de velocidades específicas de produção, que foi observado quando utiliza IPTG.

Kaprálék *et al.* (1991) testaram diferentes fontes de carbono e indutores na produção de prochimósina de bezerro em *E. coli* HB101 e observaram que utilizando glicerol como fonte de carbono e IPTG como indutor houve uma diminuição na velocidade específica de crescimento de 0,81 h⁻¹ para 0,45 h⁻¹ após a indução e que depois de 4 h de indução 100 % das

células com diâmetro médio de 1 μ m continham prochimolina. Observaram também que em meio complexo contendo triptona e extrato de levedura não houve diferença no crescimento para diferentes fontes de carbono (lactose, glicose e glicerol).

Vila *et al.* (1997) expressaram β -galactosidase em *E. coli* MC1061 em batelada e observaram que a síntese da proteína foi máxima em uma fase intermediária de crescimento, diminuindo no início da fase estacionária, mas recuperando progressivamente. Já a produção de biomassa permanece constante em toda a fase estacionária.

Lim *et al.* (1998) expressaram γ -interferon em *E. coli* controlado pelo promotor P_L, termosensível induzido à 42°C, e induziram a diferentes fases de crescimento. Observaram que é necessário que a velocidade específica de crescimento após indução seja maior que um valor crítico para se obter alta produção de γ -interferon e que foi maior quando a indução foi realizada antes da fase exponencial de crescimento. Houve uma redução na velocidade específica de crescimento após a indução, o que é explicado pelo fato de que altas temperaturas causam danos a células.

Curless *et al.* (1990) investigaram diferentes vazões específicas de diluição (D) na produção de α -interferon em *E. coli* K-12 sob o controle de um promotor termosensível e observaram uma aumento de quatro vezes na expressão quando se aumentou D de 0,025 h⁻¹ a 0,200 h⁻¹, concluindo que a expressão depende da velocidade específica de crescimento antes da indução. Obtiveram um rendimento máximo após 3 h de indução.

Marcadores de seleção são importantes. Quando um gene no plasmídeo é resistente a antibióticos pode-se selecionar rapidamente e positivamente as células que contêm o plasmídeo com a adição de antibióticos no meio de cultura. Estes marcadores facilitam pesquisas, pois rapidamente são identificadas colônias que contêm o vetor e minimiza competições com plasmídeos livres na célula que podem ter surgido durante o crescimento celular (Bailey e Ollis, 1986).

Em cultivos nas quais a concentração de oxigênio dissolvido é reduzida rapidamente, o número de cópias de plasmídeos dentro das células diminui cerca de 1 %, mesmo que no meio de cultura haja antibióticos. Em cultivos em grandes escalas é difícil manter altos e uniformes níveis de oxigênio dissolvido e quando isto ocorre, o plasmídeo introduzido pode se tornar instável e se perder da célula recombinante, reduzindo desta maneira o rendimento da proteína de interesse. Esta consideração é importante quando o cultivo é realizado a grandes volumes e não se consegue uma boa mistura, ou quando em cultivos contínuos, onde as células selvagens irão predominar (Glick, 1995).

Lim *et al.* (1998) observaram que durante a batelada alimentada, os plasmídeos se tornam instáveis e desta maneira é necessário obter alta concentração celular antes da perda dos plasmídeos para obter altos níveis de expressão, e isto foi alcançado com uma alimentação exponencial antes da indução.

Spiegeleer *et al.* (2004) cultivaram *E. coli* MG1655 em meio Luria Bertani (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl) e observaram que dependendo da origem da triptona deste meio há diferenças na sensibilidade do stress oxidativo da célula. Este stress oxidativo em culturas bacterianas é causado quando a conversão de oxigênio em água na respiração celular é incompleta, e cerca de 1% do oxigênio utilizado é liberado não como água, mas como espécies reativas de oxigênio, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical superóxido (O₂⁻), o radical hidroxil (OH) e O₂. Concentrações baixas destas espécies reativas de oxigênio têm uma função fisiológica, concentrações altas, que são originadas pelo stress oxidativo são perigosas. O stress pode causar danos subletais às células e células danificadas podem ser sensíveis a condições que não afetam células não danificadas (Spiegeleer *et al.*, 2004).

Uma alternativa para aumentar a produtividade e o rendimento de produção de proteínas heterólogas inclui a adição de metabólitos e nutrientes no meio, principalmente durante a fase de expressão (Ramírez e Bentley, 1993).

Ramírez *et al.* (1993) testaram diferentes aminoácidos no meio de cultura para a expressão de cloranfenicol-acetil-transferase em *E. coli* RR1 e JM105. Primeiramente a fenilalanina, pois a cloranfenicol-acetil-transferase é rica em fenilalanina, sugerindo o uso deste aminoácido como precursor. Os autores observaram que as adições de IPTG e fenilalanina em níveis intermediários aumentam a produção de cloranfenicol-acetil-transferase e, que a adição de fenilalanina em culturas não induzidas não causa alteração na velocidade específica de crescimento celular, ao contrário de culturas induzidas, nas quais o crescimento é aumentado com a adição de fenilalanina. Observaram também, que a atividade enzimática pode ser estabilizada com a adição de fenilalanina em níveis intermediários e concluíram que a adição de um precursor intermediário pode aumentar de 2 a 6 vezes o rendimento em produto recombinante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), disponível no laboratório de Biologia Molecular do DGE/UFSCar, mantida em glicerol 10% m/v e cloreto de cálcio 0,1M a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e transformada com o plasmídeo pET28a contendo o gene da canacistatina (pET28canecys).

3.2. Meios de cultura

No ensaio denominado “padrão” foi utilizado como meio de cultura de reativação o meio LB (Luria Bertani) descrito por Spiegeleer *et al.* (2004) e como meios de inóculo e de produção, o meio comercial Circlegrow[®] à concentração de 40 g/L. Tal meio de cultura é atualmente utilizado no DGE/UFSCar no bioprocessamento de expressão de canacistatina.

Alternativamente aos meios utilizados no cultivo padrão foi utilizado meio de cultura descrito por Kaprálek *et al.* (1991), variando-se a fonte de carbono e ajustando o pH em 7,0.

3.2.1. Meio de cultura de reativação

O meio de cultura de reativação LB proposto por Spiegeleer *et al.*, 2004 teve a seguinte composição:

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10,0
Extrato de levedura	5,0
NaCl	5,0
Kanamicina	25 $\mu\text{g/mL}$

3.2.2. Meios de cultura de inóculo

Os meios de cultura de inóculo tiveram a seguinte composição:

Componente	Concentração (g/L)
Fonte de carbono	10,0

Triptona	10,0
Extrato de levedura	2,0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,6
KH ₂ PO ₄	2,7
Kanamicina	25 µg/mL

3.2.3. Meios de cultura de produção

Os meios de cultura de produção empregados tiveram a seguinte composição:

Componente	Concentração (g/L)
Fonte de carbono	5,0
Triptona	10,0
Extrato de levedura	2,0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,6
KH ₂ PO ₄	2,7
Kanamicina	25 µg/mL

Como fontes de carbono e energia foram avaliadas glicerol e os carboidratos glicose, frutose, galactose, lactose, sacarose e sacarose invertida (frutose + glicose).

3.3. Indutores

Como indutores da expressão da canacistatina foram avaliados IPTG (isopropiltio-β-D-galactosídeo) à concentração de 0,4 mM (Soares-Costa *et al.*, 2002) e lactose nas concentrações de 0,4 mM, 4 mM e 40 mM.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo método da massa seca por centrifugação a 11000 rpm e 4°C por 15 min de um volume conhecido de amostra, lavagem e filtração do precipitado e determinação da massa de células por secagem em estufa a 60 °C por 20 h.

3.4.2. Determinação das concentrações de substratos

As concentrações de glicerol, glicose, lactose, sacarose, frutose, galactose foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado à 80°C com uma vazão de 1 mL/min. As concentrações de substrato foram determinadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções com concentrações inferiores a 1 g/L de substrato. Os picos foram detectados utilizando-se um medidor de índice de refração das substâncias modelo W410 da Waters.

3.4.3. Determinação da concentração de carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Este método consiste na adição de fenol e ácido sulfúrico concentrado que resultam numa coloração alaranjada na presença de carboidratos.

Transferiu-se 1 mL de amostra para tubos de ensaio, seguido de adição de 1 mL de fenol 5% m/V e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos e depois colocados em banho com aquecimento a 30°C por 15 minutos. A absorvância foi lida em 488 nm e a curva de calibração foi obtida com solução de lactose em água com concentrações variando de 10 a 160 mg.L⁻¹.

3.4.4. Determinação da concentração de nitrogênio

A concentração de nitrogênio foi determinada pelo método de Kjeldahl, seguindo-se procedimento descrito no boletim técnico da Micronal, 1985. Nestes ensaios foram utilizadas uma unidade digestora (B-435) e uma unidade de destilação (Büchi, modelo 323). Inicialmente, as amostras foram digeridas, adicionaram-se 5 mL de amostras, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e 2 g de catalisador misto (preparado com uma parte de CuSO₄ e três partes de K₂SO₄) nos tubos de digestão. Em seguida, esta mistura de coloração marrom escuro foi colocada para ser digerida até que atingisse uma tonalidade verde claro. Em seguida as amostras eram destiladas.

Para a destilação das amostras foram preparadas soluções de ácido bórico 2 % e NaOH 32 %. Erlenmeyers contendo 100 mL de ácido bórico 2 % e 3 gotas de indicador misto cada foram, juntamente com os tubos contendo as amostras já digeridas, devidamente posicionadas

na unidade de destilação. 30 mL de água destilada e solução de NaOH foram adicionados ao tubo até que estes atingissem novamente a coloração marrom escuro. A partir daí, as amostras foram destiladas por um período de seis minutos. Posteriormente, o destilado coletado no Erlenmeyer foi então, submetido á titulação.

O conteúdo dos Erlenmeyers foi titulado com HCL padronizado na concentração de aproximadamente 0,1 N. A concentração de nitrogênio contida nas amostras foi determinada utilizando a equação descrita abaixo.

$$C_N(g/L) = \frac{V_{HCL} \cdot C_{HCL} \cdot 14}{V_{amostra}} \quad \text{Equação 3.1}$$

3.4.5. Avaliação da expressão de canacistatina

A expressão da proteína recombinante foi avaliada por eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3.4.6. Purificação da canacistatina

O método utilizado para a purificação da canacistatina foi o de cromatografia por afinidade. Vários dos vetores da série pET possuem uma seqüência de aminoácidos que codifica uma “cauda” de 6 histidinas (His-tag) que é utilizada como parceira de fusão. As proteínas a serem expressas são clonadas em fusão com o His-tag e podem ser purificadas em coluna de níquel, o qual apresenta afinidade pelas histidinas. Na maioria dos casos, as histidinas não interferem na estrutura ou função da proteína purificada.

Foi utilizada uma coluna que contém uma resina de níquel ácido nitrilotriacético (Ni-NTA Superflow) adquirida da empresa Quiagen. O caldo de fermentação foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado foi resuspendido em tampão de lise (NaCl 100mM; Tris HCl 10mM; NaH₂PO₄ 50mM, pH 8,0), sonicado e centrifugado. O sobrenadante foi passado na coluna Ni-NTA previamente equilibrada com 25mL de tampão de lise. A proteína foi eluida utilizando o mesmo tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (10 mM, 25 mM, 50 mM e 500 mM), pois o imidazol possui afinidade pelo níquel e compete com as histidinas, liberando a proteína recombinante ligada à resina. A eluição dos tampões na coluna foi realizada em duas frações de 5mL cada, com exceção do eluente com concentração de 500 mM que foi passado três vezes. Os eluentes de concentrações 10, 25 e 50 mM foram

descartados, por não apresentarem a proteína totalmente pura. A concentração de proteína purificada foi determinada nos eluentes de 500 mM.

3.4.7. Determinação da concentração de canacistatina

Após purificação, a concentração de canacistatina foi determinada pelo método químico proposto por Bradford (1976), que se baseia na interação entre o corante “Comassie Brilliant Blue” G 250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas e leitura de absorvância no comprimento de onda de 595 nm.

Preparação do reativo:

1. Dissolver 100 mg de “Comassie Brilliant Blue” G 250 em 50 mL de etanol 95 % m/v sob vigorosa agitação;
2. Adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85 % m/v em balão volumétrico e completar com água destilada até 1L;
3. Agitar por 1h;
4. Filtrar a solução em sistema Millipore com papel de filtro Wathman 113.

Com o reativo preparado, a análise foi realizada adicionando-se 5 mL do reativo e 100 μ L de amostra. Após 20 minutos à temperatura ambiente, leu-se a absorvância. A leitura “zero” do espectrofotômetro foi ajustada adicionando 2,5 mL do reativo e 100 μ L de água.

A curva de calibração foi realizada através de uma solução mãe de albumina bovina na concentração de 800 mg/L.

3.5. Metodologia experimental

Foram realizados cultivos descontínuos, primeiramente em mesa incubadora rotativa da NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Co., modelo G-25 e posteriormente, os melhores resultados foram repetidos em um biorreator airlift de volume útil de 6 L, provido de sistemas de controle de temperatura, pH e medida de concentração de O₂ dissolvido, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em condições de não limitação por oxigênio.

3.5.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa

Inicialmente, foi adicionado 1 μL de uma suspensão de plasmídeo pET28canecys em 200 μL de suspensão de *E. coli* BL21 (DE3) competentes mantidas em glicerol 10 % m/v e cloreto de cálcio 0,1M, sendo a mistura mantida em banho térmico a 42 °C por 90 s para a transformação. Um volume de 800 μL de meio LB foi transferido para esta mistura e a mesma foi mantida a 37 °C por 1 h. Transferiu-se, 200 μL para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio LB sólido (com presença de ágar) e 20 μL de kanamicina (antibiótico de seleção) previamente preparada. A placa foi mantida à 37 °C “overnight” (\approx 16 h). Colônias desta placa foram transferidas para uma outra placa contendo o mesmo meio de cultura e incubada “overnight” a 37 °C. Com alça de platina, foram transferidas células de uma das colônias formadas para 50 mL de meio de reativação em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Este frasco foi deixado em mesa incubadora rotativa a 37 °C e 250 rpm por 10 h. Transferiram-se 0,5 mL da suspensão para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de inóculo, os quais foram incubados em mesa incubadora rotativa a 37 °C e 250 rpm por 6 h. Foram inoculados, então, 5 mL da suspensão em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de produção e incubados a 37 °C e 250 rpm. A Figura 3.1 ilustra o procedimento experimental utilizado.

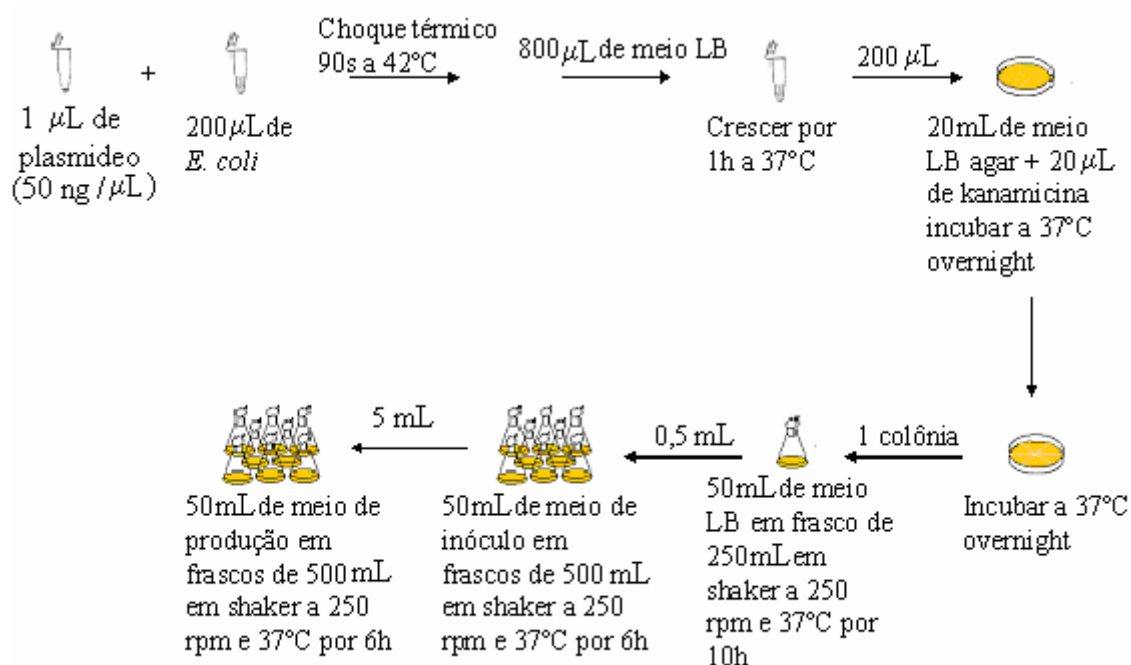


Figura 3.1: Procedimento experimental utilizado nos cultivos em mesa incubadora rotativa

O trabalho foi dividido em quatro etapas experimentais, descritas a seguir.

3.5.1.1. Etapa 1: Avaliação de diferentes fontes de carbono no crescimento da *E. coli* BL21 (DE3)

Nessa etapa foi avaliado o crescimento celular de *E. coli* BL21 (DE3) em meio de cultura principal proposto por Kaprálek *et al.* (1991) utilizando 5 g/L de diferentes fontes de carbono e energia, a saber, glicerol, glicose, frutose, galactose, lactose, sacarose e sacarose invertida (glicose + frutose). Tal como descrito no item anterior (3.5.1), foram inoculados vários Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio de cultura principal, com 5 mL de suspensão de inóculo. A cada 1 hora de cultivo, um frasco considerado como uma amostra era retirado da mesa incubadora rotativa, sendo analisadas as concentrações de substrato (C_S) e de células (C_X). A partir dos valores de C_S e C_X , foram calculados os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) e o coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}$) de acordo com as equações 3.2 e 3.3. Obteve-se também, relações entre as concentrações celulares (C_X) e as densidades óticas (DO) à 600 nm para cada substrato utilizado.

$$\ln \frac{C_x}{C_{x_0}} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t - t_0) \quad \text{Equação 3.2}$$

$$C_x = C_{x_0} + Y_{X/S} \cdot (C_{S_0} - C_S) \quad \text{Equação 3.3}$$

Nesta etapa foram realizados no total oito cultivos, incluindo o cultivo padrão, onde o meio utilizado foi o meio comercial Circlegrow[®]. Estes cultivos estão apresentados na Tabela 3.1 juntamente com seus códigos e substratos utilizados.

Tabela 3.1: Cultivos realizados para obtenção de parâmetros relacionados com o crescimento celular

Cultivo	Substrato
C0_1	Circlegrow [®]
C1_1	Glicerol
C1_2	Glicose
C1_3	Frutose
C1_4	Frutose + Glicose
C1_5	Galactose
C1_6	Lactose
C1_7	Sacarose

3.5.1.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina em caldos de fermentação com diferentes substratos – Avaliações do momento e tempo de indução

Após a avaliação do crescimento celular nos diferentes substratos estudados, procedeu-se a avaliação qualitativa da expressão de canacistatina.

Com base nas curvas de crescimento celular nos diferentes substratos e conhecendo-se as equações que relacionam as densidades óticas (DO) dos caldos de fermentação a 600 nm, com as concentrações celulares (em g/L), os cultivos realizados na etapa 1 foram repetidos, sendo a expressão da canacistatina induzida com a adição de IPTG, perfazendo nos caldos uma concentração de indutor de 0,4 mM tal como proposto por Soares-Costa *et al.* (2002). As induções foram realizadas em diferentes momentos dos cultivos; no início (I1), intermédio (I2) e final (I3) das etapas de crescimento celular.

Após as induções, as expressões qualitativas de canacistatina foram avaliadas após períodos de 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente.

Como os crescimentos celulares foram diferentes nos diferentes meios de cultura estudados e, sabendo-se que a canacistatina é uma proteína intracelular, as expressões de canacistatina foram avaliadas qualitativamente em termos volumétricos e específicos.

Nesta etapa do trabalho foram realizados 21 cultivos, incluindo os cultivos utilizando Circlegrow[®] como fonte de carbono, sendo os mesmos induzidos com IPTG nos três momentos de indução (I1, I2 e I3). A Tabela 3.2 apresenta as condições experimentais empregadas nesta etapa.

Tabela 3.2: Condições experimentais empregadas nos cultivos realizados para avaliação qualitativa da expressão de canacistatina com 0,4 mM de IPTG

Cultivo	Substrato	momento indução
C0_2	Circlegrow [®]	I1
C0_3	Circlegrow [®]	I2
C0_4	Circlegrow [®]	I3
C2_1	Glicerol	I1
C2_2	Glicose	I1
C2_3	Frutose	I1
C2_4	Frutose + Glicose	I1
C2_5	Galactose	I1
C2_6	Lactose	I1
C2_7	Glicerol	I2
C2_8	Glicose	I2
C2_9	Frutose	I2
C2_10	Frutose + Glicose	I2
C2_11	Galactose	I2
C2_12	Lactose	I2
C2_13	Glicerol	I3
C2_14	Glicose	I3
C2_15	Frutose	I3
C2_16	Frutose + Glicose	I3
C2_17	Galactose	I3
C2_18	Lactose	I3

3.5.1.3. Etapa 3: Avaliação da indução por lactose

Frente aos resultados de indução da expressão de canacistatina com IPTG e com a finalidade de se reduzir o custo da expressão e a toxicidade, foram realizados ensaios de indução com lactose.

Como os cultivos contendo glicerol, glicose, frutose + glicose e galactose foram os que forneceram melhores resultados em relação à expressão de canacistatina, estes foram induzidos com lactose na concentração de 0,4 mM. Com a finalidade de avaliar a concentração do indutor (lactose) na expressão de canacistatina, os cultivos contendo glicerol, glicose e galactose foram induzidos com lactose também nas concentrações de 4 mM e 40 mM.

Nessa etapa do trabalho foram realizados 18 cultivos que estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições experimentais empregadas nos cultivos induzidos com lactose

Cultivo	Substrato	momento indução	conc. indutor
C3_1	Glicerol	I1	0,4 mM
C3_2	Glicose	I1	0,4 mM
C3_3	Frutose + Glicose	I1	0,4 mM
C3_4	Galactose	I1	0,4 mM
C3_5	Glicerol	I2	0,4 mM
C3_6	Glicose	I2	0,4 mM
C3_7	Frutose + Glicose	I2	0,4 mM
C3_8	Galactose	I2	0,4 mM
C3_9	Glicerol	I3	0,4 mM
C3_10	Glicose	I3	0,4 mM
C3_11	Frutose + Glicose	I3	0,4 mM
C3_12	Galactose	I3	0,4 mM
C3_13	Glicerol	I1	4 mM
C3_14	Glicerol	I1	40 mM
C3_15	Glicose	I1	4 mM
C3_16	Glicose	I1	40 mM
C3_17	Galactose	I1	4 mM
C3_18	Galactose	I1	40 mM

3.5.1.4. Etapa 4: Avaliação quantitativa da expressão de canacistatina

Pelo fato do objetivo deste trabalho ser o estudo da expressão de canacistatina, torna-se muito importante quantificar esta expressão. Foram, então, realizados cultivos para avaliação quantitativa da expressão de canacistatina.

Os cultivos que forneceram os melhores resultados qualitativos da expressão de canacistatina foram repetidos para obtenção da concentração de canacistatina (C_{cc} em g/L) no caldo de fermentação, a saber, os cultivos C2_1, C2_2, C2_3, C2_5, C3_17 e C3_18, e para fins de comparação foi repetido o cultivo padrão C0_2, com meio comercial Circlegrow[®].

Foram realizados nesta etapa mais dois cultivos, um contendo soro de queijo hidrolisado com uma concentração de 10 g/L de açúcares redutores (C4_1), subproduto normalmente descartado pela indústria de leite, que contém entre 4,5 e 5 % m/v de lactose (Siso, 1996), e um outro cultivo utilizando soro hidrolisado simulado, contendo 5 g/L de galactose e 5 g/L de glicose (C4_2), respectivamente. Como descrito no item 3.5.1, foram inoculados 5 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio de cultura principal, com 5 mL de suspensão de inóculo. Os cultivos foram induzidos no momento I1 (no início da fase de crescimento) e após 1 h de indução o conteúdo dos frascos foi centrifugado. Como a

proteína é intracelular, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi congelado para posterior análise quantitativa da proteína.

Para análise da quantidade de proteína no caldo de fermentação, o precipitado foi resuspenso e sonificado, seguindo de purificação em coluna de afinidade como descrito no item 3.4.6. Após a purificação, a concentração da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.5.2. Cultivos em biorreator airlift de bancada

Com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em maior escala e em condições de não limitação por oxigênio, os melhores resultados obtidos em termos de concentração de canacistatina no caldo de fermentação foram repetidos em biorreator airlift de bancada de 6 L de volume útil, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, provido de sistemas de controle de temperatura e pH e medida de concentração de O₂ dissolvido.

Inicialmente, foi adicionado 1 µL de uma suspensão de plasmídeo pET28canecys em 200 µL de suspensão de *E. coli* BL21 (DE3) competentes mantidas em glicerol 10 % m/v e cloreto de cálcio 0,1M, sendo a mistura mantida em banho térmico a 42 °C por 90 s para a transformação. Um volume de 800 µL de meio LB foi transferido para esta mistura e mantido a 37 °C por 1 h. Transferiu-se 200 µL para uma placa de Petri contendo 20 mL de meio LB sólido (com presença de ágar) e 20 µL de kanamicina (antibiótico de seleção) previamente preparada. A placa foi mantida à 37 °C “overnight” (≈ 16 h). Colônias desta placa foram transferidas para uma outra placa contendo o mesmo meio de cultura e incubada “overnight” a 37 °C. Com alça de platina transferiram-se células de uma das colônias formadas para 50 mL de meio de reativação em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Este frasco foi deixado em mesa incubadora rotativa a 37 °C e 250 rpm por 10 h. Transferiram-se 0,5 mL da suspensão para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de inóculo, os quais foram incubados em mesa incubadora rotativa a 37 °C e 250 rpm por 6 h. Foram inoculados, então, 600 mL da suspensão no biorreator airlift contendo 5,4 L de meio de cultura de produção (10 % v/v).

Em todos os cultivos a temperatura foi mantida em 37 °C, o pH em 7,0 e a vazão específica de aeração em 3 vvm. A Figura 3.2 ilustra o procedimento experimental utilizado.

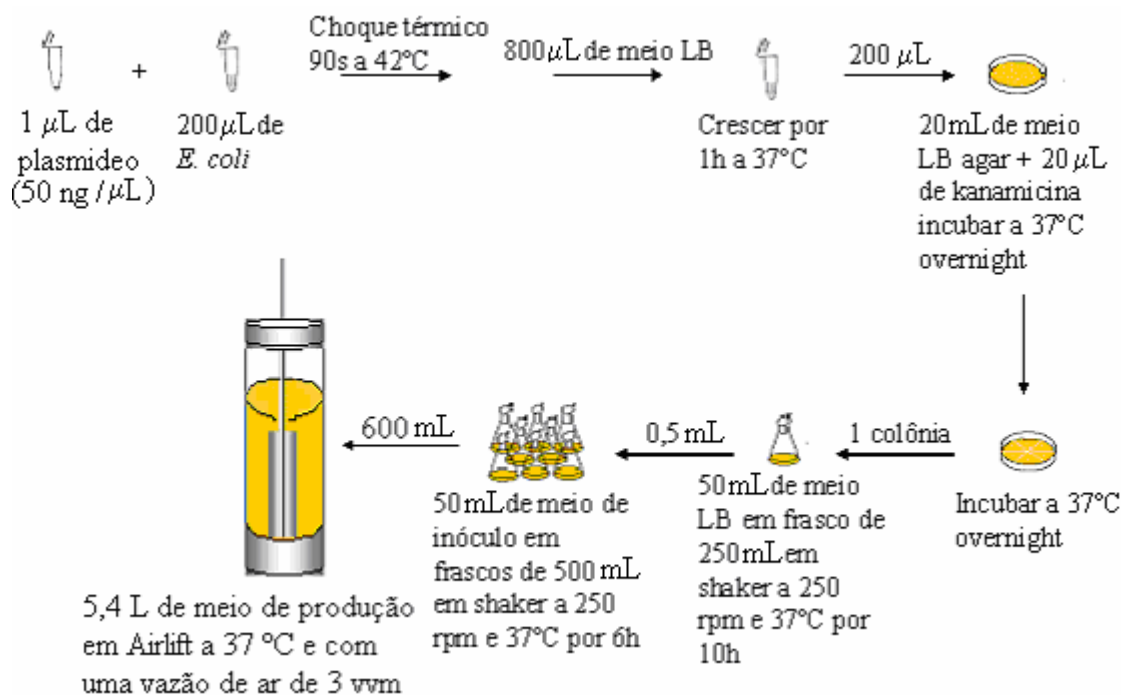


Figura 3.2: Procedimento experimental utilizado nos cultivos em biorreator airlift de bancada

No primeiro cultivo em biorreator airlift, foi avaliado o crescimento celular de *E. coli* BL21 (DE3) utilizando o meio de cultura principal proposto por Kaprálek *et al.* (1991) contendo 5g/L de glicose como fonte de carbono e energia. Tal cultivo foi denominado A1.

Tal como descrito no item anterior (3.5.2), foram inoculados 600 mL da suspensão no biorreator Airlift contendo 5,4 L de meio de cultura de produção. A cada 1 hora de cultivo, foi retirada uma amostra de 20 mL, sendo analisadas as concentrações de glicose (C_S) e de células (C_X). Foram medidos, também, valores de DO e de oxigênio dissolvido. A partir dos valores de C_S e C_X , foram calculados parâmetros relacionados com o crescimento celular, como a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e o coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}$) de acordo com as equações 3.2 e 3.3. Obteve-se também, relações entre a concentração celular (C_X) e a densidade ótica (DO) à 600 nm.

Após avaliar o crescimento celular de *E. coli* BL21 (DE3) no biorreator airlift em meio contendo glicose procedeu-se à avaliação quantitativa da expressão de canacistatina.

Nesta etapa foram realizados três cultivos cuja indução foi realizada no momento II (no início da fase de crescimento). Após a indução foram retirados 250 mL de amostra a cada 1 h ao longo de 3 h, para avaliação quantitativa da expressão de canacistatina. A concentração de canacistatina no caldo foi determinada como descrito nos itens 3.4.6 e 3.4.7. Nos primeiros dois cultivos foram utilizados glicerol e glicose como fonte de carbono e energia, sendo a indução realizada com 0,4 mM de IPTG. No último cultivo, com base nos resultados obtidos

em mesa incubadora rotativa, utilizou-se galactose como fonte de carbono, sendo a indução realizada com 40 mM de lactose, metabolizada também como fonte de carbono.

A Tabela 3.4 ilustra as condições experimentais empregadas nos cultivos realizados no biorreator Airlift de bancada.

Tabela 3.4. Condições experimentais empregadas nos cultivos realizados no biorreator

Cultivo	Substrato	Indutor	momento indução	conc. indutor
A1	Glicose	-	-	-
A2	Glicose	IPTG	I1	0,4 mM
A3	Glicerol	IPTG	I1	0,4 mM
A4	Galactose	Lactose	I1	40 mM

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivos em mesa incubadora rotativa

4.1.1. Etapa 1: Avaliação de diferentes fontes de carbono no crescimento de *E. coli* BL21 (DE3)

Inicialmente, foi realizado um cultivo padrão com o meio de cultura comercial Circlegrow[®] (C0_1) para avaliar o crescimento celular. Este meio de cultura tem uma composição desconhecida, logo não foi possível obter a curva de consumo de substrato. No entanto, a partir da análise de carboidratos totais (Dubois *et al.*, 1956) obteve-se o valor de 4,55 g/L. Foi analisada, também, a quantidade de nitrogênio total neste meio pelo método tradicional de Kjeldahl (Micronal, 1995) e obteve-se um total de aproximadamente 4 g/L, que é aproximadamente 3 vezes superior à quantidade de nitrogênio no meio utilizado nos demais cultivos. O crescimento celular deste cultivo foi relativamente alto comparado com os dos cultivos subsequentes, alcançando-se uma concentração celular de 3,27 g/L após 12 h de cultivo. A Figura 4.1 ilustra o crescimento celular obtido no cultivo C0_1.

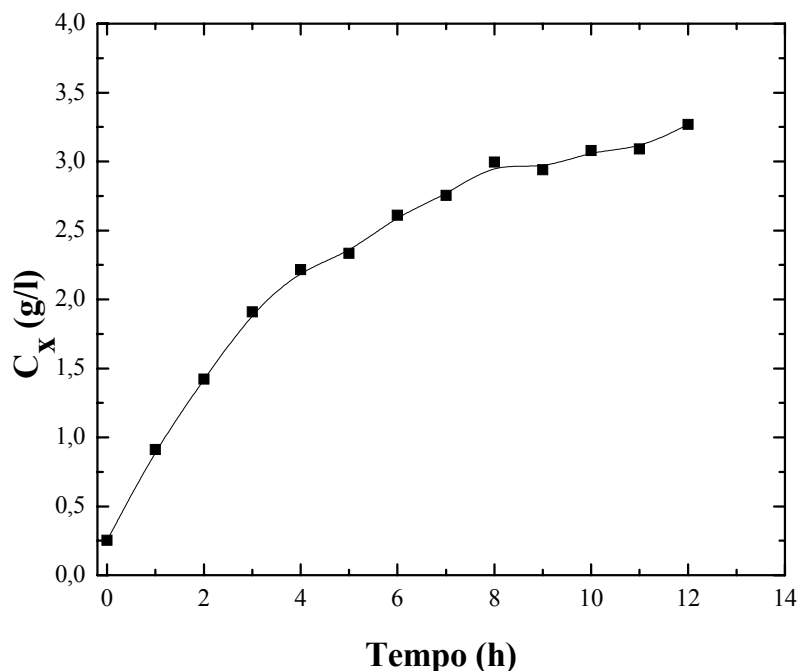


Figura 4.1: Curva de crescimento celular do cultivo padrão (C0_1)

Os cultivos C1_1 a C1_7 foram conduzidos de forma idêntica e tiveram como objetivo avaliar o crescimento celular com a utilização de diferentes fontes de carbono e energia. Os cultivos tiveram duração de 12 h, com exceção do cultivo C1_7 que teve duração de 6 h.

As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram os perfis de crescimento celular e de consumo de substrato, respectivamente para as diferentes fontes de carbono estudadas.

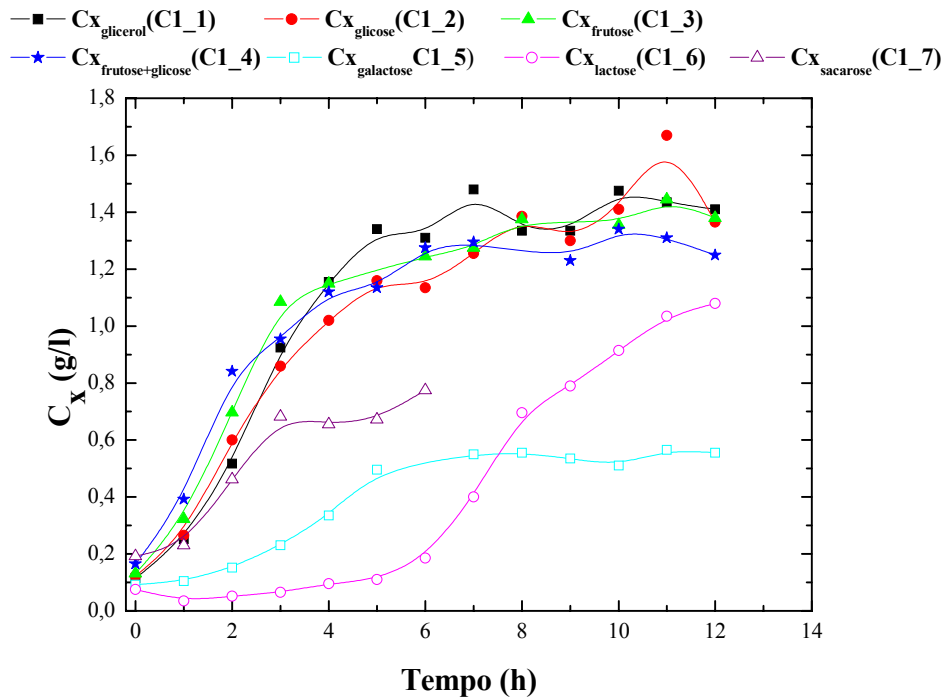


Figura 4.2: Curva de crescimento celular

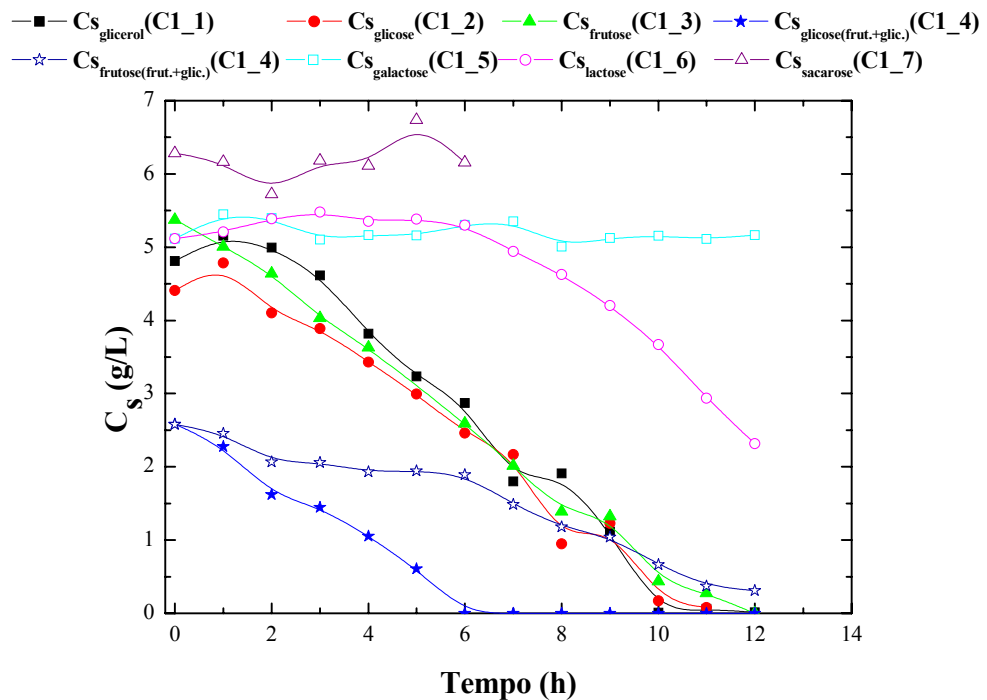


Figura 4.3: Curva de consumo de substrato

Pela Figura 4.2 pode-se observar que houve crescimento celular em todos os cultivos realizados. Observaram-se crescimentos semelhantes quando se utilizou glicerol (C1_1), glicose (C1_2), frutose (C1_3) e frutose + glicose (C1_4), com consumos similares de substrato. Quando galactose foi utilizada como fonte de carbono (cultivo C1_5), o crescimento foi o menor de todos e não houve consumo desse substrato, como observado na Figura 4.3. Provavelmente, aminoácidos livres e peptídeos presentes na triptona e no extrato de levedura, que também contém uma pequena quantidade de carboidratos, foram utilizados como fontes de carbono e de nitrogênio. Quando se utilizou sacarose como fonte de carbono (cultivo C1_7), observou-se que também não houve consumo desta fonte de carbono, embora tenha havido crescimento celular. Isto se deve ao fato de *E. coli* não sintetizar invertase. Quando foi utilizada lactose (C1_6), o crescimento foi lento, devido à necessidade das células sintetizarem β -galactosidase para hidrolisar esse dissacarídeo e, com isso, disponibilizar a glicose mais lentamente no caldo fermentativo para ser metabolizada, já que a galactose não é consumida por este microrganismo. Foi também realizado um cultivo isento de fonte de carbono e foi observado um crescimento celular maior do que o observado no cultivo contendo galactose (C1_5), o que sugere que esta fonte de carbono inibe o crescimento celular de *E. coli*.

Foram obtidos, também, relações entre as concentrações celulares (C_X) e as densidades óticas (DO) a 600 nm. Os gráficos de C_X em função da DO para os diversos cultivos estão ilustrados nas Figuras A.1 a A.8 do Apêndice A e na Tabela 4.1 são apresentadas as equações de reta que relacionam C_X com DO para os diversos meios de cultura utilizados.

Tabela 4.1: Equações de C_X em função de DO obtidas nos cultivos

Cultivo	Fonte de carbono	Equação	R²
C0_1	Circlegrow [®]	$C_X = 0,707DO$	0,977
C1_1	Glicerol	$C_X = 0,501DO$	0,982
C1_2	Glicose	$C_X = 0,517DO$	0,994
C1_3	Frutose	$C_X = 0,547DO$	0,981
C1_4	Frutose + Glicose	$C_X = 0,580DO$	0,983
C1_5	Galactose	$C_X = 0,392DO$	0,991
C1_6	Lactose	$C_X = 0,590DO$	0,991
C1_7	Sacarose	$C_X = 0,163DO$	0,996

A Tabela 4.2 apresenta os valores de velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) e do coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}$) obtidos nos

cultivos. No Apêndice B encontram-se os gráficos a partir dos quais pôde-se determinar os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$ dos cultivos (Figuras B.1 a B.8).

Tabela 4.2: Parâmetros de crescimento celular de *E. coli* em diferentes fontes de carbono

Cultivo	Fonte de carbono	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g/g)
C1_1	Glicerol	0,498	0,429
C1_2	Glicose	0,668	0,514
C1_3	Frutose	0,709	0,607
C1_4	Frutose + Glicose	0,472	0,608
C1_5	Galactose	0,352	-
C1_6	Lactose	0,313	0,757
C1_7	Sacarose	0,543	-

Quanto ao coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}$), fica evidente a superioridade do ensaio realizado com lactose (0,757 g/g). No entanto, parece que nesse caso o microrganismo utilizou parte da fonte de nitrogênio como fonte de carbono e energia. Nota-se, também, que os crescimentos celulares em termos de consumo de substrato foram similares.

Foi observado também um crescimento celular quase linear nos cultivos realizados com glicerol e sacarose. Isto deve ter ocorrido, provavelmente, pela limitação por falta de oxigênio frequentemente observada em cultivos em mesa incubadora rotativa.

Em linhas gerais, pode-se notar que houve crescimento celular satisfatório em todos os substratos utilizados, ficando a escolha do mesmo a ser definida pelo custo da matéria prima e, principalmente pela quantidade expressada da proteína de interesse.

4.1.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina em caldos de fermentação com diferentes substratos – Avaliações do momento e tempo de indução

Após a etapa de avaliação do crescimento celular, procedeu-se a etapa de avaliação comparativa da expressão de canacistatina nos diferentes substratos utilizados. Cabe salientar que após a indução houve uma diminuição significativa na velocidade de crescimento celular em todos os cultivos realizados. Frente aos resultados de crescimento celular da etapa anterior e com a finalidade de se avaliar a relação entre momento de indução e expressão de canacistatina, houve a indução da expressão com IPTG em 3 momentos ao longo do cultivo; a primeira no início da fase de crescimento (I1), a segunda no meio da fase de crescimento (I2) e uma última indução no final da fase de crescimento ou no início da fase estacionária (I3). Estabeleceu-se 4 h como tempo (ou período) máximo de indução, sendo retiradas amostras de

1 em 1 h e analisadas em gel tipo SDS-PAGE. Com o objetivo de se comparar as expressões com base na mesma quantidade de células, utilizou-se a seguinte metodologia: após as retiradas de amostras, foram lidas as densidades óticas (DO) e, a partir da estimativa da concentração celular (C_x) pelas relações entre C_x e DO (Tabela 4.1), foram utilizados volumes diferentes de caldo, de tal modo a se ter uma massa constante e igual de células de 0,0003 g (0,3 mg). Esses volumes foram aplicados no gel e as expressões qualitativas em termos de intensidade da banda foram avaliadas. Esses resultados com base na mesma massa celular tiveram como objetivo verificar e comparar as produções específicas, ou seja, quantidade expressada de canacistatina com base na mesma quantidade de células. Outro procedimento similar, utilizando agora volume constante de 1mL de caldo, nos diferentes momentos de indução teve como objetivo verificar e comparar as produções volumétricas, ou seja, quantidade expressada de canacistatina por volume de caldo.

Para fins comparativos em termos de expressão de canacistatina, os géis obtidos estão ilustrados na Figura 4.4. Para facilitar o entendimento da Figura 4.4, a primeira letra que define o código da amostra indica o substrato utilizado no cultivo (CG = Circlegrow[®], G = glicerol, GL = glicose, F = frutose, FG = frutose +glicose, GA = galactose e L = lactose). O primeiro número indica o momento da indução; (1) início da fase de crescimento celular (após 1 h de cultivo para os cultivos C0_2, C1_1, C1_2, C1_3 e C1_4, e após 2 h para os cultivos C1_5 e C1_6), (2) meio da fase de crescimento (3 h para os cultivos C0_3, C1_1, C1_2, C1_3 e C1_4, 4 h para o cultivo C1_5 e 7 h para o cultivo C1_6) e (3) início da fase estacionária (6 h para todos os cultivos, exceto para o C1_6 cujo momento de indução foi igual a 12 h). O segundo número indica o tempo de indução, que variou de 1 a 4 h após o momento de indução. Por fim, as letras M ou V indica se a avaliação foi à massa de células constante ou com volume de caldo constante que define massas diferentes de acordo com a concentração celular no momento da amostragem.

Pode-se observar através dos resultados da eletroforese, que houve expressão de canacistatina em todas as condições de cultivo pesquisadas, obtendo-se uma maior expressão nos cultivos realizados com galactose (C2_5, C2_11 e C2_17) que foram qualitativamente semelhantes aos cultivos C0_2, C0_3 e C0_4 (cultivos padrão).

Em todos os ensaios realizados observa-se uma maior expressão de canacistatina quando a indução foi realizada no início da fase de crescimento (C2_1, C2_2, C2_3, C2_4 e C2_6), resultados que corroboram com informações relatadas por Lee *et al.* (1997), que afirmam que a indução antes da fase exponencial de crescimento celular gera altos valores de produção específica (massa de canacistatina por unidade de massa celular em $\text{mg}_{cc}/\text{g}_x$) de

proteínas heterólogas. Já a indução em cultivos em fase adiantada de crescimento celular gera maior produção volumétrica (concentração de proteína em $\text{mg}_{\text{cc}}/\text{L}$), pois a concentração celular é maior, no entanto, a produção específica é baixa.

Quando se utilizou galactose como fonte de carbono (C2_5), foi observado um comportamento diferente. A expressão de canacistatina foi crescente em relação ao momento de indução. Estes resultados estão de acordo com as informações relatadas por Riesenber *et al.* (1991), que observaram que velocidades de expressão de produtos recombinantes em *E. coli* são mais altas a velocidades de crescimento baixas.

Pode-se observar, também, que não houve aumento significativo das expressões de canacistatina após 1 h de indução, o que sugere que 1 h de indução seja suficiente para se obter boa expressão desta proteína. No entanto, deve-se considerar que após 4 h de indução, mesmo que o crescimento seja prejudicado pelo indutor, a produção volumétrica é maior uma vez que se tem mais células no caldo fermentativo.

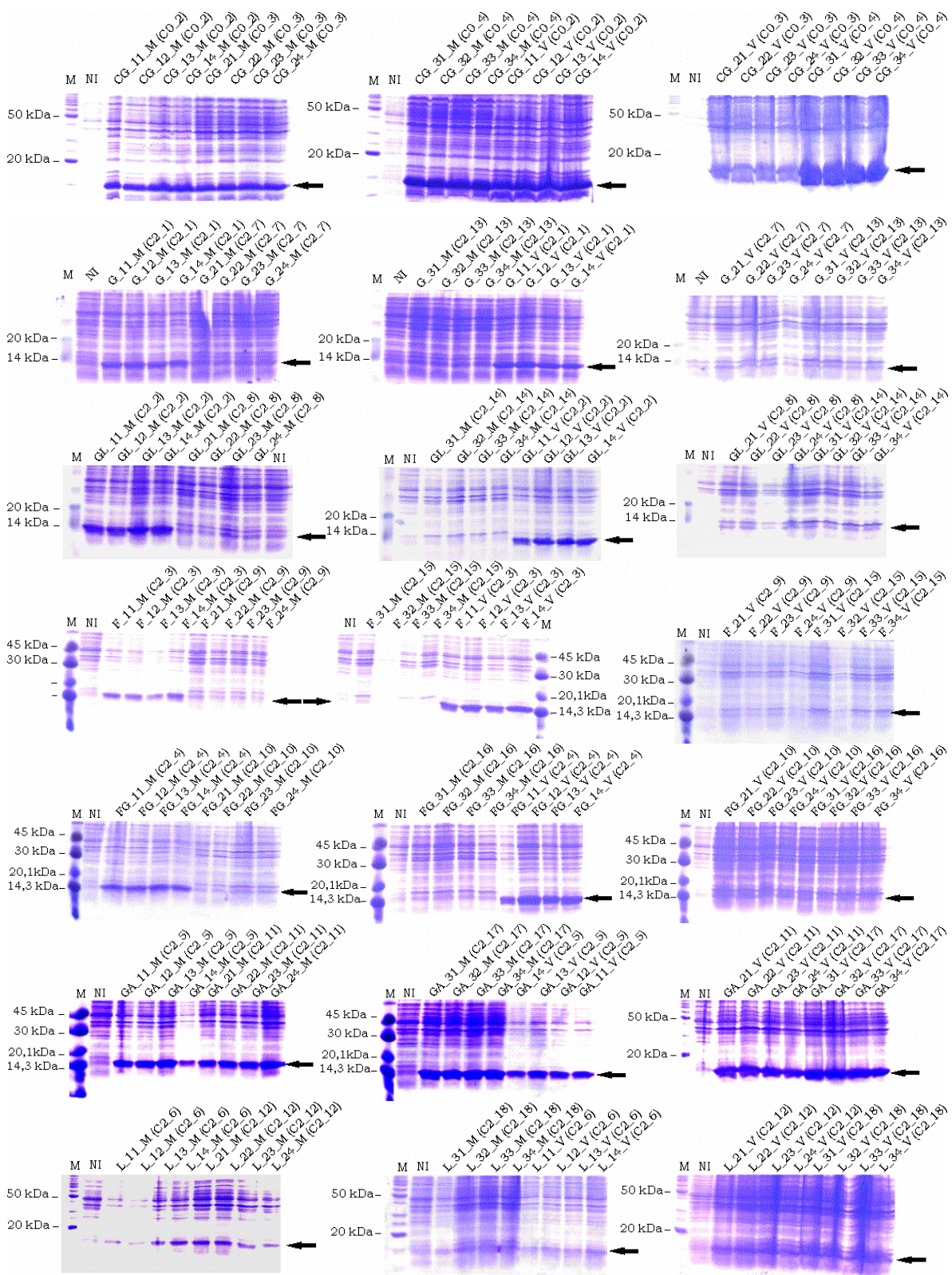


Figura 4.4: Análise da expressão da canacistatina com 0,4 mM de IPTG sob várias condições de cultivo. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.

Para melhor classificar os substratos e condições de indução empregadas em relação à expressão qualitativa de canacistatina, é apresentado na Figura 4.5 um resumo dos resultados

das expressões ilustradas na Figura 4.4, onde foi aplicado no gel as amostras cujo cultivos foram induzidos no período I1 com 1 h de indução para as diferentes fontes de carbono e energia utilizadas.

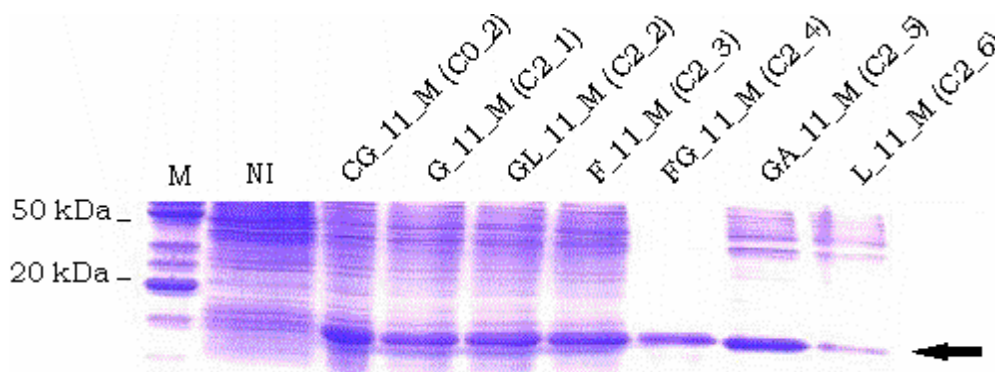


Figura 4.5: Gel comparativo da expressão da canacistatina com 0,4 mM de IPTG para as diferentes fontes de carbono utilizadas. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.

Observando-se a intensidade das bandas geradas na Figura 4.5, os ensaios em que se obtiveram as melhores expressões em canacistatina podem ser classificados na seguinte ordem: glicose > frutose > galactose > glicerol > frutose + glicose > lactose. É importante observar que qualitativamente, a expressão em meio de cultura Circlegrow® foi similar às expressões nos meios de cultura utilizando glicose, frutose, galactose e glicerol.

4.1.3. Etapa 3: Avaliação da indução por lactose

Frente aos resultados de indução da expressão com IPTG e com a finalidade de reduzir o custo da expressão e a toxicidade do indutor, foram realizados ensaios de indução com lactose.

Como os cultivos contendo glicerol, glicose, frutose + glicose e galactose foram os que forneceram melhores resultados qualitativos em relação à expressão de canacistatina, estes foram induzidos com lactose na mesma concentração utilizada de IPTG (0,4 mM). O tempo de indução foi de 1 h. Os géis obtidos nesta etapa estão ilustrados na Figura 4.6.

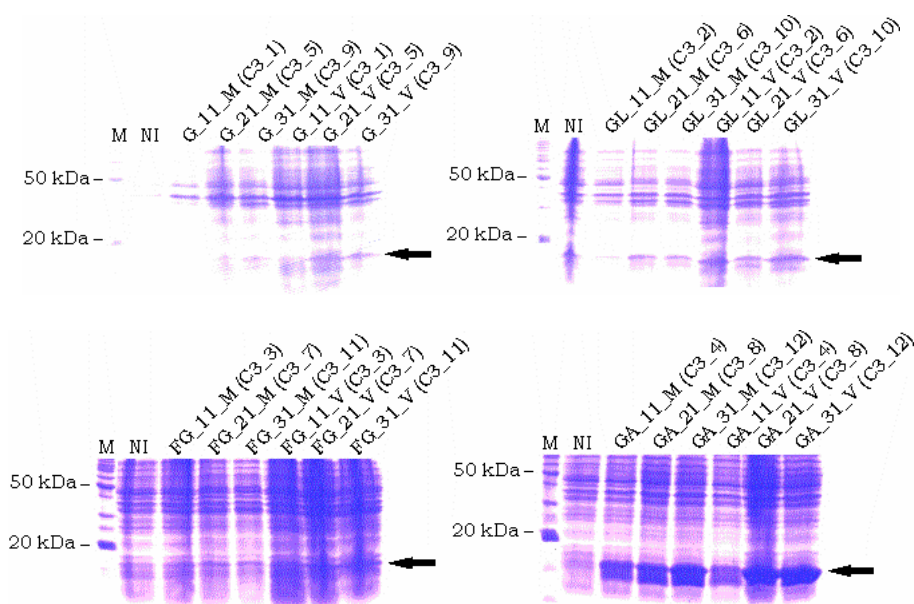


Figura 4.6: Análise da expressão da canacistatina com 0,4 mM de lactose sob várias condições de cultivo. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.

Pode-se observar baixas expressões de canacistatina para todas as fontes de carbono, exceto quando se utilizou galactose (C3_4, C3_8 e C3_12). Isto pode ser explicado pelo fato da lactose servir simultaneamente como indutor e como fonte de carbono, havendo a necessidade, portanto, de se induzir com uma concentração mais alta de lactose ou por um período de indução maior.

Nesse caso, o fato do cultivo contendo galactose ter resultado em uma boa expressão de canacistatina pode ser explicado com base na Figura 4.7 (Lehninger *et al.*, 1993). A lactose entra na célula por intermédio de uma permease (galactosídeo permease). Dentro da célula a β -galactosidase catalisa duas reações: a quebra da lactose em glicose e galactose, e a conversão de lactose em alolactose, que é o verdadeiro indutor do *operon lac*. Provavelmente, quando se tem galactose no meio de cultura, a reação intermediária de conversão da lactose em alolactose é favorecida, havendo uma maior expressão de canacistatina. A presença do produto final das reações paralelas pode inibir as conversões dos substratos havendo um consumo mais lento desses. No caso os substratos são a lactose (reação 1) e a alolactose (reação 3).

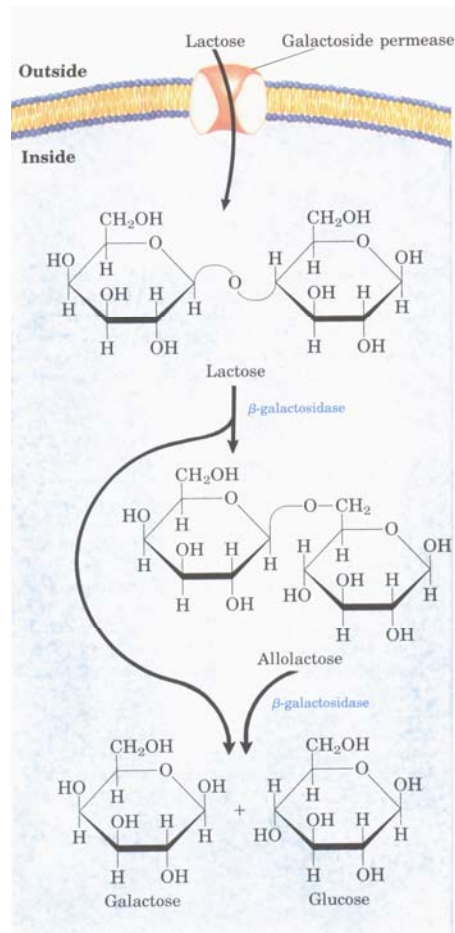


Figura 4.7: Atividades da galactosídeo permease e β -galactosidase no metabolismo da lactose em *E. coli*

Foram, então realizados cultivos com lactose (como indutor) à concentração de 4 mM (C3_13, C3_15 e C3_17) e de 40 mM (C3_14, C3_16 e C3_18) com um período de indução de 5 h, retirando amostras a cada hora para serem analisadas em gel. Esses resultados estão ilustrados na Figura 4.8.

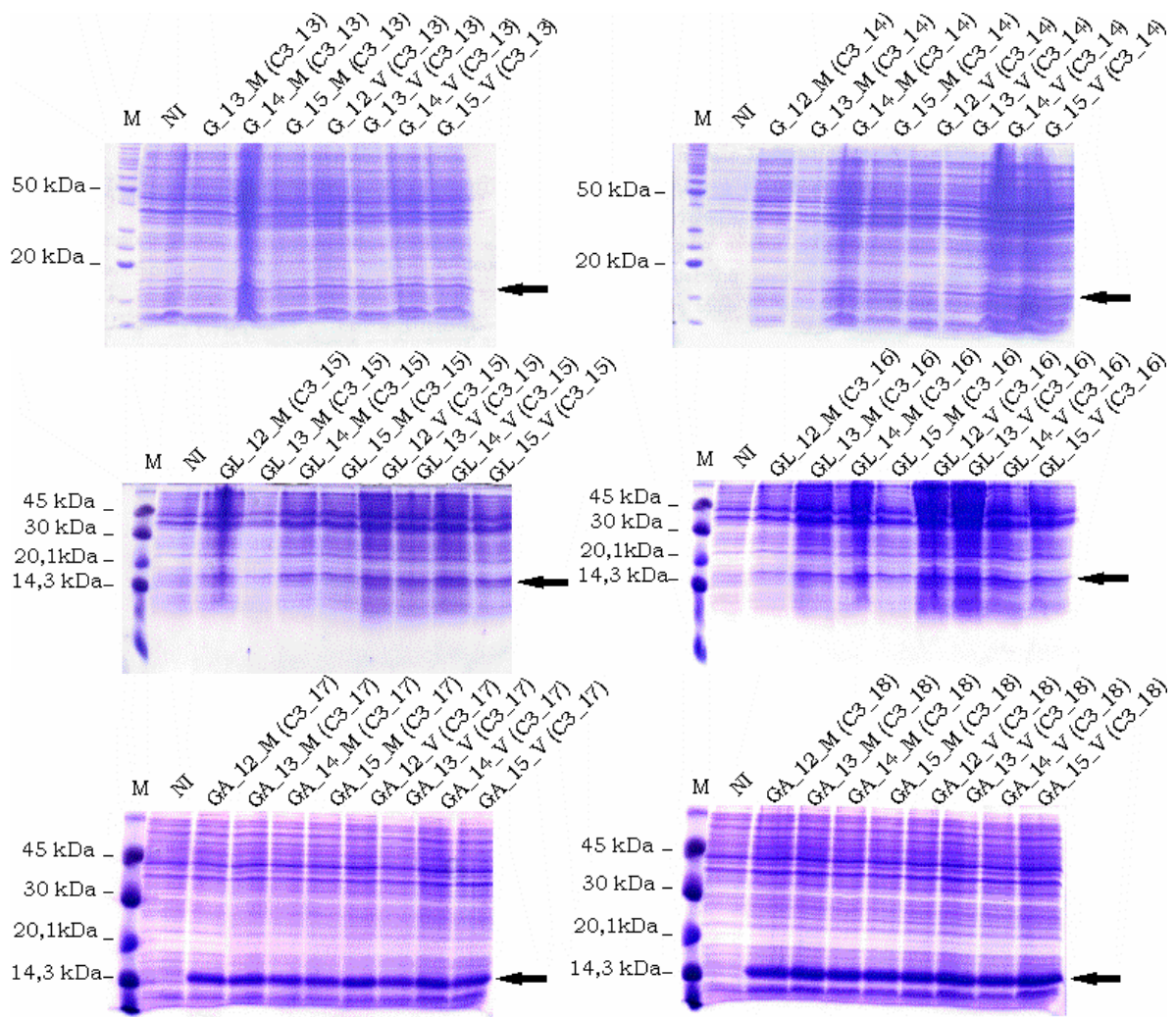


Figura 4.8: Análise da expressão da canacistatina, induzido com 4 mM e 40 mM de lactose. SDS-PAGE mostrando em M, marcador de massa molecular e nas demais canaletas as amostras oriundas das induções nas diferentes condições. A seta indica a banda de aproximadamente 13 kDa relativa à canacistatina recombinante.

Pode-se observar na Figura 4.8 que não houve expressão significativa nos cultivos contendo glicose e glicerol, mesmo quando se aumenta a concentração de indutor (lactose) e o tempo de indução. Já quando se utilizou galactose como fonte de carbono pode-se observar um aumento na expressão de canacistatina quando induzido com concentrações maiores de lactose.

Estes resultados mostram que é possível induzir a expressão de canacistatina com lactose, um indutor não tóxico e de baixo custo. Foi observado no cultivo contendo galactose como fonte de carbono, expressões semelhantes quando induzido com IPTG ou lactose, porém há a necessidade de estudos mais aprofundados, para melhor entendimento do mecanismo de indução.

4.1.4. Etapa 4: Avaliação quantitativa da expressão de canacistatina

Após a etapa de avaliação qualitativa da expressão de canacistatina, procedeu-se a etapa de avaliação quantitativa da expressão. Os cultivos que forneceram os melhores resultados qualitativos da expressão de canacistatina foram repetidos para obtenção da concentração de canacistatina no caldo de fermentação. Foram, portanto, realizados novamente os cultivos C2_1, C2_2, C2_3, C2_5, C3_17 e C3_18, e para fins de comparação foi repetido o cultivo padrão C0_2 contendo o meio comercial Circlegrow[®].

Foram, também realizados cultivos contendo soro de queijo hidrolisado e soro hidrolisado simulado (C4_1 e C4_2).

Como descrito no item 3.5.1, foram inoculados 5 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 50 mL de meio de cultura principal, com 5 mL de suspensão de inóculo. Os cultivos foram induzidos no momento I1, isto é, após 1 h de cultivo para os ensaios C0_2, C2_1, C2_2, C3_3, C4_1 e C4_2 e após 2 h para os ensaios C2_5 e C3_17 e C3_18. Após 1 h de indução o conteúdo dos frascos foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado utilizado para a determinação da concentração de proteína, já que esta é intracelular. O precipitado foi resuspendido e sonicado para a liberação da proteína para o meio externo. Depois que amostra foi sonicada, ela foi centrifugada e o sobrenadante foi passado na coluna de afinidade para a purificação conforme descrito no item 3.4.6. A concentração da canacistatina purificada foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A Tabela 4.3 mostra a concentração de canacistatina obtida para todos os cultivos realizados, bem como a concentração celular (C_x) e a produção específica ($P_{C_c/x}$ em mg de canacistatina / g de células).

Tabela 4.3: Concentração de canacistatina obtida para diferentes fontes de carbono

Cultivo	Fonte de carbono	Indutor	C_c (mg/L)	C_x (g/L)	$P_{C_c/x}$ (mg/g)
C0_2	Circlegrow [®]	0,4 mM de IPTG	50,8	0,79	64,3
C2_1	Glicerol	0,4 mM de IPTG	33,1	0,62	53,4
C2_2	Glicose	0,4 mM de IPTG	32,0	0,62	51,3
C2_3	Frutose	0,4 mM de IPTG	32,2	0,65	49,8
C2_5	Galactose	0,4 mM de IPTG	16,0	0,35	45,1
C3_17	Galactose	4 mM de lactose	14,0	0,20	70,2
C3_18	Galactose	40 mM de lactose	28,1	0,20	140,7
C4_1	Soro hidrolisado	0,4 mM de IPTG	23,8	0,20	119,0
C4_2	Soro hidr. simulado	0,4 mM de IPTG	42,5	0,82	51,8

Em termos de produção volumétrica, com exceção dos cultivos C2_5, C3_17 e C4_1, foram obtidos resultados bastante semelhantes para todos os cultivos, que foi de aproximadamente 61 % da concentração de canacistatina obtida no cultivo padrão com o meio comercial Circlegrow[®]. No entanto, deve-se observar a maior concentração celular obtida neste cultivo.

Com relação à produção específica desses cultivos (C2_1, C2_2, C2_3, C2_5 e C4_2), os resultados foram ainda melhores, obtendo-se valores superiores a 75 % daquele obtido no cultivo padrão. Os cultivos C3_17, C3_18 e C4_1 superaram a produção específica do cultivo padrão em 10 %, 120 % e 85 % respectivamente.

Pode-se perceber uma baixa produção volumétrica quando se utilizou soro de queijo hidrolisado, mas com uma alta produção específica. Este ensaio pode ser melhorado utilizando permeado de soro de queijo, que contém somente lactose e sais (sem lipídios e outras proteínas que podem interferir na indução da canacistatina). Foi observado em uma análise em HPLC, um resíduo de lactose, ou seja, o que evidencia que o soro não estava totalmente hidrolisado. Siso (1996) relata que uma das desvantagens da hidrólise enzimática da lactose é que às vezes ocorre a polimerização da galactose ou lactose formando oligossacarídeos, sendo difícil obter mais que 75 % de hidrólise. Além do mais, a β -galactosidase pode ser inibida por lactose.

Estes resultados mostram a possibilidade de expressar a canacistatina em meios de cultura menos dispendiosos como os que utilizam glicerol e glicose como fontes de carbono e energia, que são matérias primas de baixo custo em relação a outros substratos. Além do mais, a utilização de meios de cultura de composição conhecida permite a otimização do tipo e das condições de cultivo em biorreatores.

A Tabela 4.4 mostra a massa de canacistatina obtida por custo de matéria prima total empregada ($\text{mg}_{\text{cc}}/\text{R}\mp), para os cultivos induzidos com 0,4 mM de IPTG (C0_2, C2_1, C2_2, C2_3 e C2_5).

Tabela 4.4: Massa de canacistatina produzida por custo de matéria prima (meio de cultura)

Cultivo	Fonte de carbono	C _C (mg/L)	$\text{mg}_{\text{cc}}/\text{R}\mp
C0_2	Circlegrow [®]	50,8	1,22
C2_1	Glicerol	33,1	9,11
C2_2	Glicose	32,0	8,93
C2_3	Frutose	32,2	8,03
C2_5	Galactose	16,0	1,90

4.2. Cultivos em biorreator airlift

4.2.1. Etapa 1: Avaliação do crescimento celular

Com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em condições de não limitação por oxigênio, foi realizado um cultivo contendo glicose como fonte de carbono e energia em um biorreator airlift de bancada de 6 L, provido de sistemas de controle de temperatura e pH e medida de concentração de O_2 dissolvido, disponível no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar.

Nesta etapa foi avaliado o crescimento celular de *E. coli* ao longo de um cultivo que teve duração de 7 h. A Figura 4.9 ilustra o perfil de crescimento celular e na Figura 4.10 estão apresentados os perfis de consumo de substrato e de oxigênio dissolvido (OD).

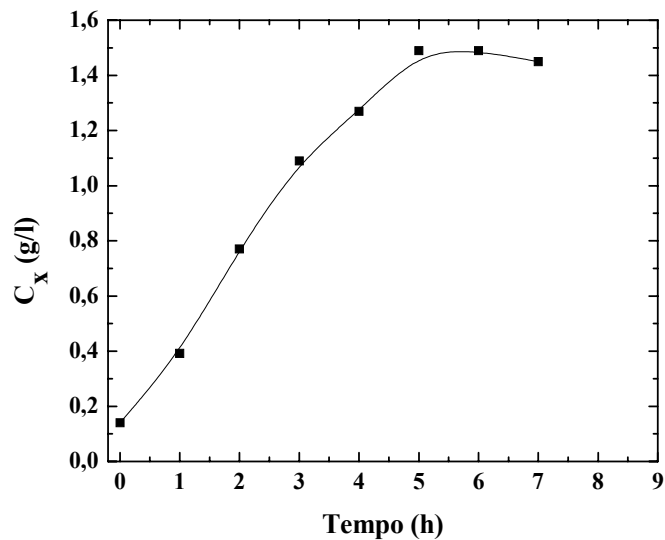


Figura 4.9: Curva de crescimento celular para o cultivo realizado no biorreator airlift

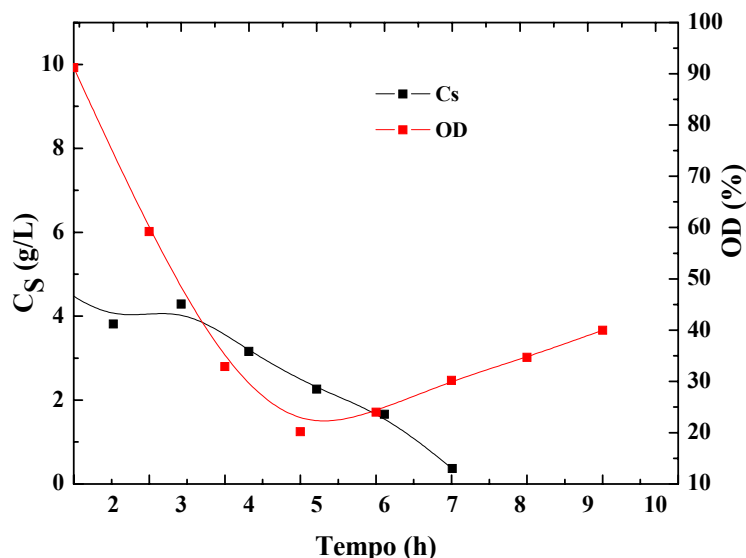


Figura 4.10: Curva de consumo de substrato e de oxigênio dissolvido no cultivo A1 realizado no biorreator airlif

Pela Figura 4.9 pode-se observar que houve um crescimento celular bastante semelhante ao cultivo realizado em mesa incubadora rotativa quando utilizado o mesmo meio de cultura, o que mostra que não houve limitação por falta de oxigênio. Foi obtido uma velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,683 \text{ h}^{-1}$, o que não diferiu muito do valor obtido no cultivo em mesa incubadora rotativa ($0,668 \text{ h}^{-1}$).

Quanto ao substrato, este foi quase totalmente consumido em aproximadamente 7 h de cultivo, como observado na Figura 4.10. No cultivo em mesa incubadora rotativa este tempo foi de 10 h. O coeficiente de rendimento de substrato a células ($Y_{X/S}$) obtido neste cultivo foi de $0,439 \text{ g/g}$. No Apêndice B encontram-se os gráficos a partir dos quais pôde-se determinar os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$ deste cultivo (Figura B.9).

Obtiveram-se também, relações entre a concentração celular (C_X) e a densidade ótica (DO) à 600 nm. O gráfico de C_X em função da DO deste cultivo está ilustrado na Figura A.9 do Apêndice A.

Pode-se observar também pela Figura 4.10 que houve um rápido consumo de oxigênio dissolvido neste cultivo, caindo a concentração de OD para aproximadamente em 20 % em 3 h de cultivo, permanecendo entre 20 e 30 % até o final do cultivo.

4.2.2. Etapa 2: Expressão de canacistatina

Com a finalidade de aumentar a produção de canacistatina, procedeu-se a etapa de expressão de canacistatina em biorreator airlift de bancada. Os melhores resultados obtidos

em termos de concentração de canacistatina no caldo de fermentação e produção específica em mesa incubadora rotativa foram repetidos em biorreator.

Foram realizados três cultivos cuja indução foi realizada no momento I1 (após 1 h de cultivo para os cultivos A2 e A3 e após 2 h para o cultivo A4). Após a indução foram retirados 250 mL de amostra a cada 1 h durante 3 h de cultivo, para avaliação quantitativa da expressão de canacistatina. As Tabelas 4.5 e 4.6 mostram os resultados obtidos de concentração de canacistatina e produção específica para os três cultivos realizados.

Tabela 4.5: Concentração de canacistatina obtida no cultivo realizado em biorreator airlift

Cultivo	Fonte de carbono	Indutor	Tempo de indução	C_c (mg/L)
A2	Glicose	0,4 mM de IPTG	1 h	40,1
			2 h	47,3
			3 h	42,9
A3	Glicerol	0,4 mM de IPTG	1 h	26,6
			2 h	35,5
			3 h	29,1
A4	Galactose	40 mM de lactose	1 h	17,9
			2 h	26,2
			3 h	41,0

Tabela 4.6: Produção específica de canacistatina obtida nos cultivos realizados em biorreator airlift

Cultivo	Fonte de carbono	Tempo de indução	C_x (g/l)	P (mg/g)
A2	Glicose	1 h	0,587	68,3
		2 h	0,592	79,9
		3 h	0,591	72,6
A3	Glicerol	1 h	0,797	33,4
		2 h	0,801	44,3
		3 h	0,799	36,4
A4	Galactose	1 h	0,246	72,8
		2 h	0,337	77,8
		3 h	0,46	89,1

Observa-se pelos dados da Tabela 4.5 que o cultivo A2 foi superior ao realizado em mesa incubadora rotativa utilizando o mesmo meio de cultura, chegando-se ao valor de 80 % da concentração de canacistatina obtida no cultivo padrão (meio de cultura Circlegrow[®]) depois de 1 h de indução, chegando a mais de 90 % na segunda hora de indução. Já nos cultivos A3 e A4 a indução foi um pouco mais lenta em relação ao cultivo realizado em mesa incubadora rotativa, para mesma fonte carbono, obtendo-se depois de 2 h de indução

aproximadamente a mesma concentração de canacistatina obtida depois de 1 h de indução em mesa incubadora rotativa.

Em relação às produções específicas, a Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos. Nos cultivos A3 e A4 foram obtidos resultados inferiores aos obtidos em mesa incubadora rotativa. No cultivo A2 foi superior até mesmo ao cultivo padrão após 2 horas de indução (79,9 mg/g).

Os resultados inferiores observados nos cultivos A3 e A4 devem-se ao fato que estes tiveram um crescimento celular mais rápido em relação aos cultivos em mesa incubadora rotativa para o mesmo meio de cultura, o que estão de acordo com as informações relatadas por Riesenberg *et al.* (1991), que observaram que velocidades de expressão de produtos recombinantes em *E. coli* são mais altas a velocidades de crescimento baixas.

5. CONCLUSÕES

Quanto à avaliação do crescimento celular, exceto quando utilizadas galactose e sacarose houve crescimento celular com consumo das respectivas fontes de carbono. Nos cultivos com galactose e sacarose os peptídeos, aminoácidos e carboidratos presentes no extrato de levedura e na triptona foram utilizados como fonte de carbono.

A utilização de glicose como fonte de carbono forneceu uma expressão de canacistatina alta, indicando que não houve inibição ou repressão da produção da proteína heteróloga por catabólitos do crescimento celular, observado em algumas condições quando se utiliza glicose como fonte de carbono.

Independente da fonte de carbono utilizada, o tempo de indução não afetou a expressão, sendo esta mantida constante durante os períodos avaliados (1 a 4 h).

Confirmando informações prévias de literatura, as maiores expressões foram obtidas em condições de baixo crescimento celular.

A expressão com galactose como fonte de carbono e IPTG como indutor apresentou os melhores resultados qualitativos, na mesma intensidade de expressão observada no cultivo padrão utilizando meio de cultura comercial Circlegrow[®], devido ao baixo e lento crescimento.

A expressão em meio de cultivo com lactose como indutor foi detectada apenas na presença de galactose, o que mostra que essa fonte de carbono tem papel importante nesse processo de expressão.

Nos ensaios quantitativos em mesa incubadora rotativa obteve-se uma produção volumétrica de no máximo 61 % da concentração de canacistatina obtida no cultivo padrão, a exceção dos cultivos contendo galactose induzido com 0,4 mM de IPTG e 4 mM de lactose (C2_5 e C3_17). Obteve-se, ainda, produção específica com valores superiores a 75 % daquele obtido no cultivo padrão, cultivos contendo glicerol, glicose, frutose e galactose induzidos com 0,4 mM de IPTG (C2_1, C2_2, C2_3 e C2_5). Os cultivos contendo galactose e induzido com 4 mM e 40 mM de lactose (C3_17 e C3_18) superaram a produção específica do cultivo padrão em 10 % e 120 %, respectivamente.

O crescimento celular do cultivo A1 realizado em biorreator airlift foi bastante semelhante ao cultivo realizado em mesa incubadora rotativa quando utilizado o mesmo meio de cultura, concluindo-se que não houve limitação por falta de oxigênio nos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa.

No ensaio A2 realizado no biorreator airlift obteve-se um valor de concentração de canacistatina superior ao àquele obtido em mesa incubadora rotativa utilizando o mesmo meio de cultura, chegando-se ao valor de 80 % da concentração de canacistatina obtida no cultivo padrão (meio de cultura Circlegrow[®]) depois de 1 h de indução, chegando-se a mais de 90 % na segunda hora de indução. Já nos cultivos A3 e A4 a indução foi um pouco mais lenta em relação ao cultivo realizado em mesa incubadora rotativa, para mesma fonte de carbono, obtendo-se depois de 2 h de indução aproximadamente a mesma concentração de canacistatina obtida depois de 1 h de indução em mesa incubadora rotativa.

A metodologia analítica proposta utilizada para a avaliação qualitativa de canacistatina possibilitou a avaliação de uma grande quantidade de resultados, permitindo a avaliação de diferentes fontes de carbono e condições de indução para a otimização da expressão de canacistatina.

Os resultados mostraram que as diferentes fontes de carbono estudadas foram capazes de induzir a expressão da canacistatina, sendo possível o estabelecimento de meios de cultura menos dispendiosos, como os que utilizam glicerol e glicose como fontes de carbono, que são matérias primas de baixo custo em relação a outros substratos.

6. SUGESTÕES

Para continuidade do trabalho, sugere-se as seguintes etapas de desenvolvimento:

- realização de cultivos em batelada utilizando meios de cultura contendo glicose e glicerol em maiores concentrações e avaliar a expressão de canacistatina em estágios mais avançados induzindo com IPTG 0,4 mM.
- realização de cultivos em batelada alimentada utilizando meios de cultura contendo glicose ou glicerol em diferentes condições de operação, que definem diferentes velocidades de crescimento celular, com indução com IPTG 0,4 mM.
- avaliar a influência da concentração de ácido acético nos cultivos e verificar a relação com a expressão de canacistatina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Abe K.; Emori Y.; Kondo H.; Arai S.; Suzuki K., The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (1988) 7655-7659.
- (2) Abrahamson M.; Ritonja A.; Brown M.A.; Grubb A.; Machleidt W.; Barrett A.J., Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987) 9688-9694.
- (3) Aristidou A.A.; San K.; Bennett G.N., Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. *Biotechnology Progress* 11 (1995) 475-478.
- (4) Aristidou A.A.; San K.; Bennett G.N., Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnology and Bioengineering* 14 (1994) 944-951.
- (5) Bailey J.E.; Ollis D.F., *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill. 2^a Edição. 1986.
- (6) Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
- (7) Choi J.H.; Lee S.Y., Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (2004) 625-635.
- (8) Curless C.; Pope J.; Tsai L., Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 6 (1990) 149-152.

- (9) Demain A.L., Genetics and microbiology of industrial microorganisms - Molecular genetics and industrial microbiology – 30 years of marriage. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27 (2001) 352-356.
- (10) Dubois M.; Gilles K.A; Hamilton J.K; Rebers P.A; Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (1956) 350-355.
- (11) Fass R.; Clem T.R.; Shiloach J., Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (1989) 1305-1307.
- (12) Flickinger M.C.; Rouse M.P., Sustaining protein synthesis in the absence of rapid cell division: an investigation of plasmid-encoded protein expression in *Escherichia coli* during very slow growth. *Biotechnology Progress* 9 (1993) 555-572.
- (13) Glick B.R., Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances* 13 (1995) 247-261.
- (14) Gombert A.K.; Kilikian B.V., A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 14 (1997) 185-190.
- (15) Gombert A.K.; Kilikian B.V., Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *Journal of Biotechnology* 60 (1998) 47-54.
- (16) Gruden K.; Strukelj B.; Popovic T.; Lenarcic B.; Bevec T.; Brzin J.; Kregar I.; Herzog-Velikonja J.; Stiekema W.J.; Bosch D.; Jongsma M.A., The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitor, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28 (1998) 549-560.
- (17) Heath R.L.; McDonald G.; Christeller J.T.; Lee M.; Bateman K.; West J.; Heeswijck R.V.; Anderson M.A., Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *Journal Insect Physiology* 43 (1997) 833-842.

- (18) Hellberg A.; Nowak N.; Leippe M.; Tannich E.; Bruchhaus I., Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification* 24 (2002) 131-137.
- (19) Hoffman B.J.; Broadwater J.A.; Johnson P.; Harper J.; Fox B.G.; Kenealy W.R., Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated soluble protein. *Protein Expression and Purification* 6 (1995) 646-654.
- (20) Joshi B.N.; Sainami M.N.; Bastawade K.B.; Gupta V.S.; Ranjekar P.K., Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246 (1998) 382-387.
- (21) Kaprálek F.; Jecmen P.; Sedláček J.; Fábry M.; Zadrazil S., Fermentation conditions for high level expression of the tac promoter controlled calf prochymosin cDNA in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnology and Bioengineering* 37 (1991) 71-79.
- (22) Kessler A.; Baldwin I.T., Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291 (2001) 2141-2144.
- (23) Kilikian B.V.; Suárez I.D.; Liria C.W.; Gombert A.K., Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry* 35 (2000) 1019-1025.
- (24) Kleist S.; Miksch G.; Hitzmann B.; Arndt M.; Friehs K.; Flaschel E., Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61 (2003) 456-462.
- (25) Konstantinov K.; Kishimoto M.; Seki T.; Yoshida T., A balanced DO-Stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990) 750-758.

- (26) Korz D.J.; Rinas U.; Hellmuth K.; Sanders E.A.; Deckwer W.D., Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 39 (1995) 59-65.
- (27) Laemmli, V.K., Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- (28) Lee C.; Sun W.J.; Burgess B.W.; Junker B.H.; Reddy J.; Buckland B.C.; Greasham R.L., Process optimization for large-scale production of TGF- α -PE40 in recombinant *Escherichia coli*: effect of medium composition and induction timing on protein expression. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18 (1997) 260-266.
- (29) Lee S.Y., High cell density culture of *Escherichia coli*. *TIBTECH* 14 (1996) 98-105.
- (30) Lehninger A.L.; Nelson D.L.; Cox M.M., Principles of biochemistry. Worth Publishers. 2^a Edição. 1993.
- (31) Lim H.; Jung K., Improvement of heterologous proteins productivity by controlling posinduction specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* under control of P_L promotor. *Biotechnology Progress* 14 (1998) 548-553.
- (32) MacDonald H. L.; Neway J.O., Effects of medium quality on expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1990) 640-645.
- (33) Makrides S.C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 60 (1996) 512-538.
- (34) Margis R.; Reis E.M.; Villeret V., Structural and phylogenetic relationship among plant and animal cystatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 359 (1998) 24-30.
- (35) Micronal – Boletim. A determinação do nitrogênio de acordo com o método de Kjeldahl, pp. 2-9, 1995.

- (36) Nascimento A.A.C.; Espreafico E.M.; Larson M.L.P.; Monesi N.; Rossi N.M.M.; Rodrigues V., Tecnologia do DNA recombinante. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (2003).
- (37) Ojima A.; Shiota H.; Higashi K.; Kamada H.; Shimma Y.; Wada M.; Satoh S., Na extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds carrot. *Plant Molecular Biology* 34 (1997) 99-109.
- (38) Oliva M.L.V.; Carmona A.K.; Andradre S.S.; Cotrin S.S.; Soares-Costa A.; Henrique-Silva F., Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (2004) 1082-1086.
- (39) Oliveira A.S.; Xavier Filho J.; Sales M.P., Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46 (2003) 91-104.
- (40) Peng C.; Shyu D.J.H.; Chou W.; Chen M.; Tzen J.T.C., Method for bacterial expression and purification of sesame cystatin via artificial oil bodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 3115-3119.
- (41) Ramírez D.M.; Bentley W.E., Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition. *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993) 557-565.
- (42) Reis E.M.; Margis R., Sugarcane phytocystatins: identification, classification and expression pattern analysis. *Genetics and Molecular Biology* 24 (2001) 291-296.
- (43) Riesenber 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. *Journal of Biotechnology* 20 (1991) 17-28.
- (44) Ritonja A.; Kopitar M.; Jerala R.; Turk V., Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. *FEBS* 255 (1989) 211-214.

- (45) Rizzardi M.A.; Fleck N.G.; Agostinetto D.; Baldinot Jr. A.A., Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. *Ciência Rural* 33 (2003) 957-965.
- (46) Rossi M., Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado). São Paulo 2001.
- (47) Shuler M.L.; Kargi F., *Bioprocess engineering, basic concepts*. PTR Prentice Hall. 1992.
- (48) Shyu D.J.H.; Chou W.; Yiu T.; Lin C.P.C.; Tzen J.T.C., Cloning functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 1350-1356.
- (49) Silva F.B.; Oliveira M.G.A.; Brumano M.H.N.; Pires C.V.; Almeida F.T.; Oliveira J.A.; Pilon A.M.; Silva C.H.O.; Moreira M.A., Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolii*). *Ciência e Agrotecnologia* 28 (2004) 409-416.
- (50) Siso M.I.G., The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57 (1996) 1-11.
- (51) Soares-Costa A.; Beltramini L.M.; Thiemann O.H.; Henrique-Silva F., A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 296 (2002) 1194-1199.
- (52) Spiegeller P.; Sermon J.; Lietaert A.; Aertsen A.; Michiels C.W., Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 97 (2004) 124-133.
- (53) Suárez D.C.; Kilikian B.V., Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 35 (2000) 1051-1055.
- (54) Suárez D.C.; Liria C.W.; Kilikian B.V., Effect of yeast extract on *Escherichia coli* growth and acetic acid production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14 (1998) 331-335.

(55) Turk V.; Bode W., The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. FEBS 285 (1991) 213-219.

(56) Vila P.; Corchero J.L.; Cubarsi R.; Villaverde A., Enhanced fitness of recombinant protein synthesis in the stationary phase of *Escherichia coli* batch cultures. Biotechnology Letters 19 (1997) 225-228.

(57) Yee L.; Blanch H.W., Defined media optimization for growth of recombinant *Escherichia coli* X90. Biotechnology and Bioengineering 41 (1993) 221-230.

(58) Novagen, pET System Manual, 2003.

(59) www.biologico.sp.gov.br

(60) www.cib.org.br

(61) www.jornalcana.com.br

APÊNDICE A

As Figuras A.1 a A.9 relacionam as concentrações celulares (C_x) com as densidades óticas (DO) para os diversos cultivos realizados.

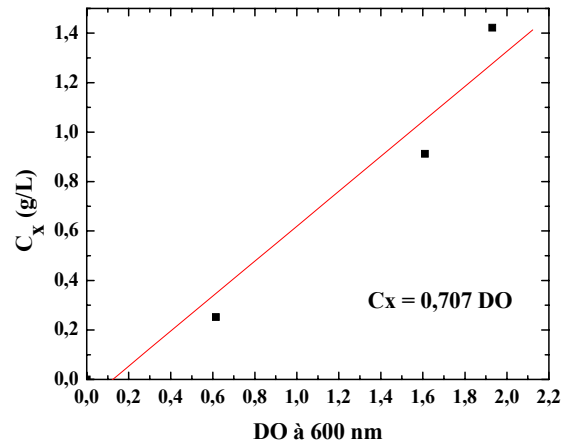


Figura A.1: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo padrão (C0_1)

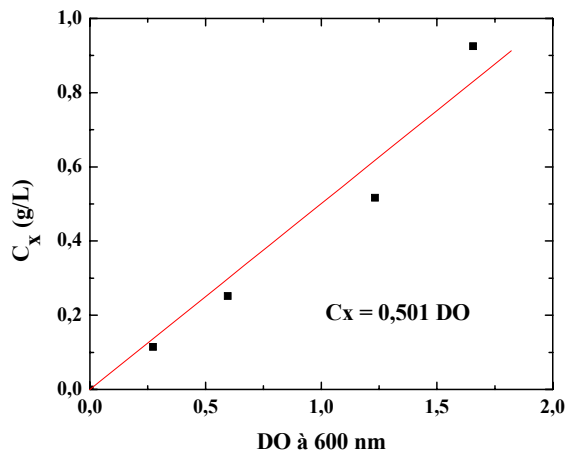


Figura A.2: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando glicerol (C1_1)

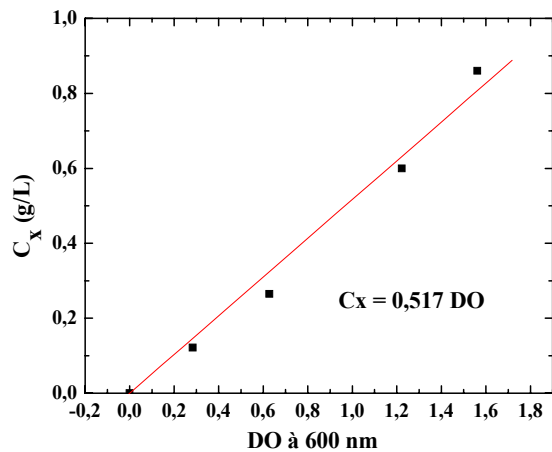


Figura A.3: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando glicose (C1_2)

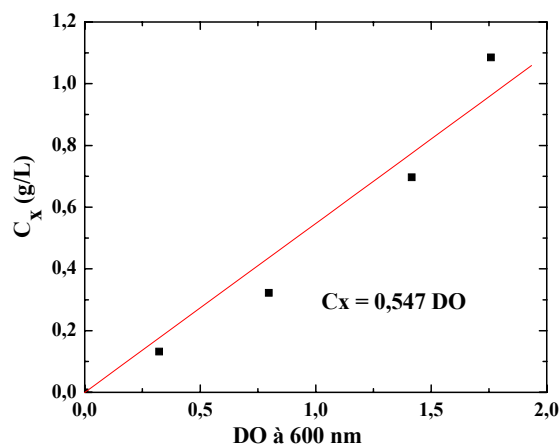


Figura A.4: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando frutose (C1_3)

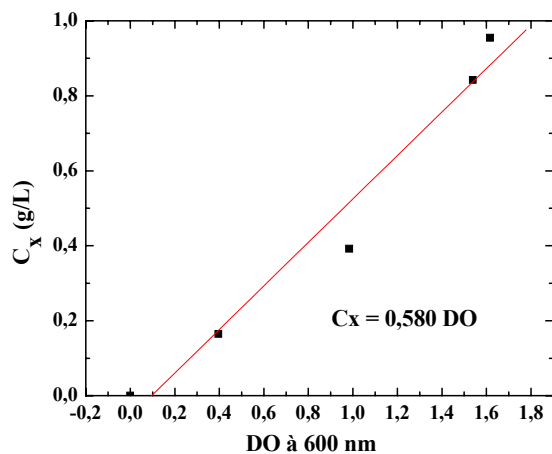


Figura A.5: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando frutose + glicose (C1_4)

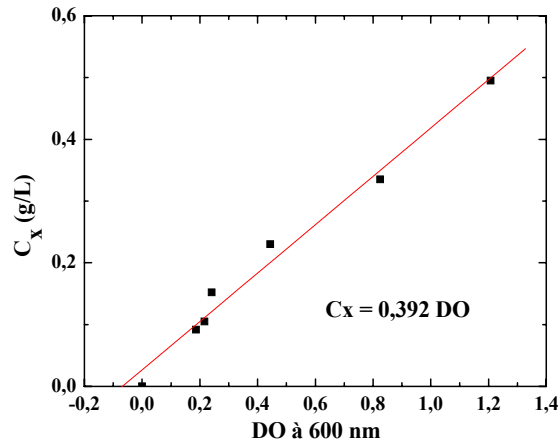


Figura A.6: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando galactose (C1_5)

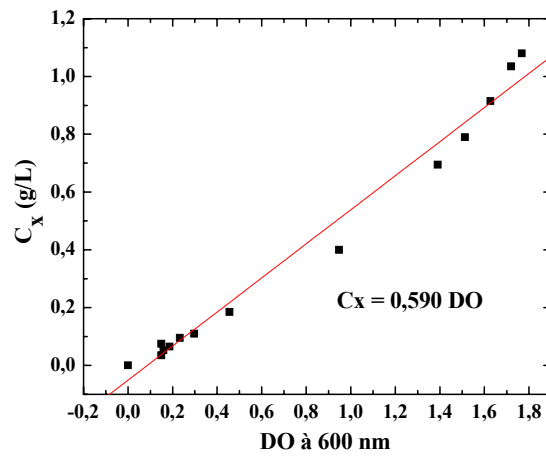


Figura A.7: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando lactose (C1_6)

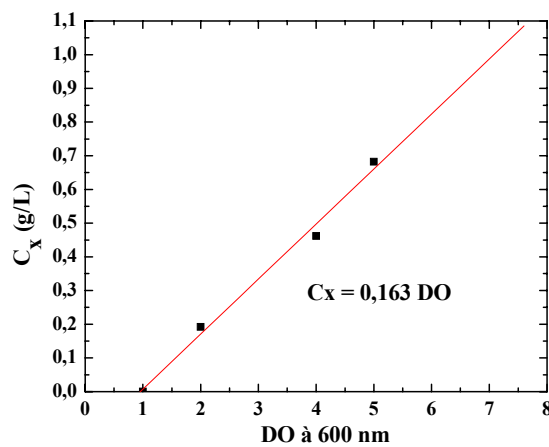


Figura A.8: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo utilizando sacarose (C1_7)

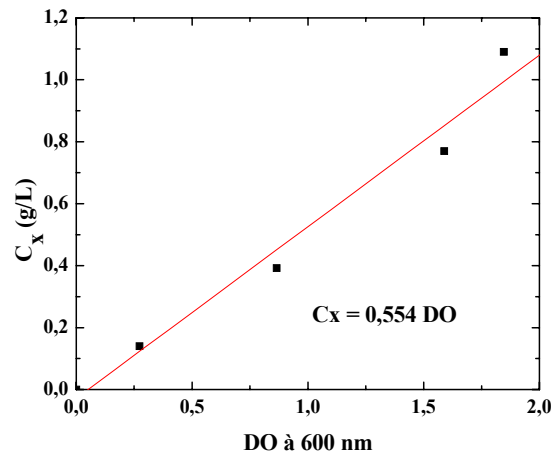


Figura A.9: Relação entre a concentração celular e a densidade ótica para o cultivo no Airlift

APÊNDICE B

As Figuras B.1 a B.9 ilustram os gráficos a partir dos quais pôde-se determinar os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para os diferentes cultivos.

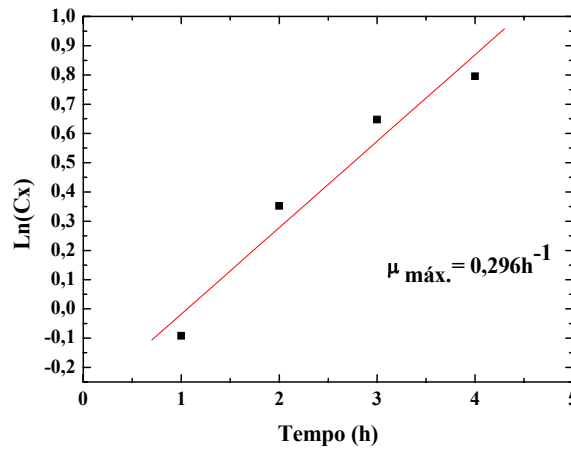


Figura B.1: Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo padrão (C0_1)

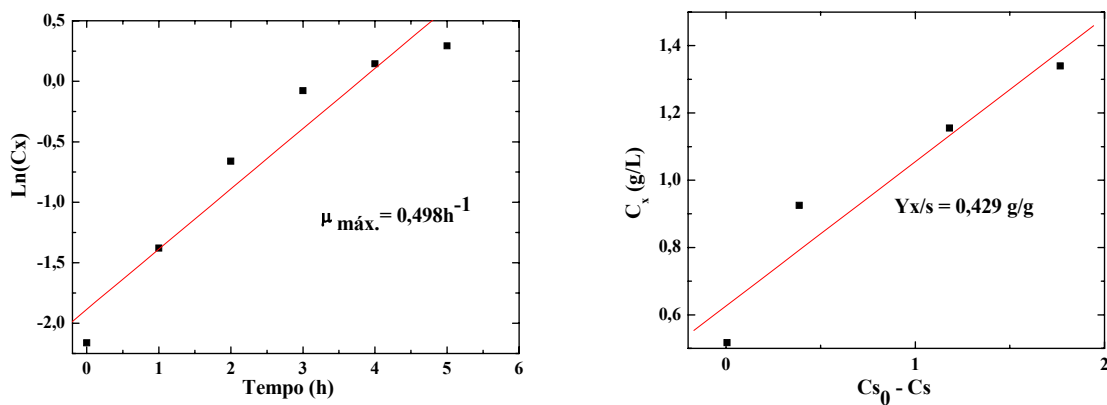


Figura B.2: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando glicerol (C1_1)

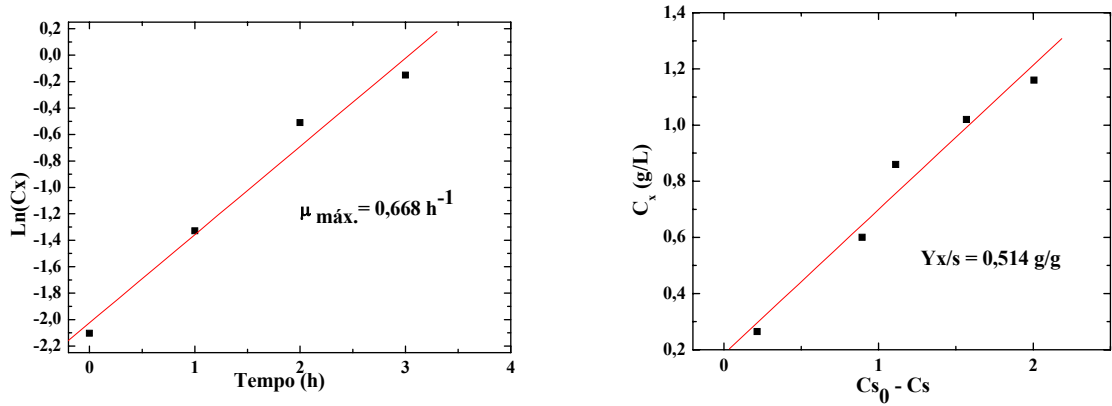


Figura B.3: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$) para o cultivo utilizando glicose (C1_2)

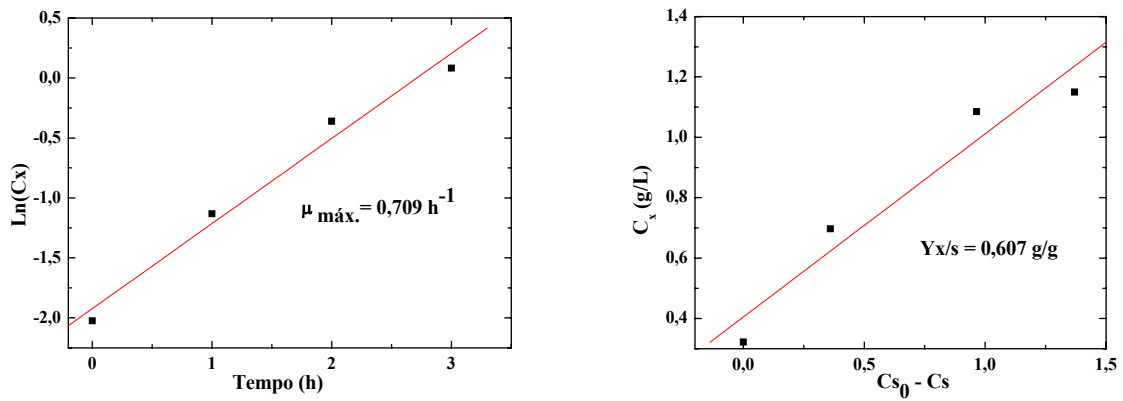


Figura B.4: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$) para o cultivo utilizando frutose (C1_3)

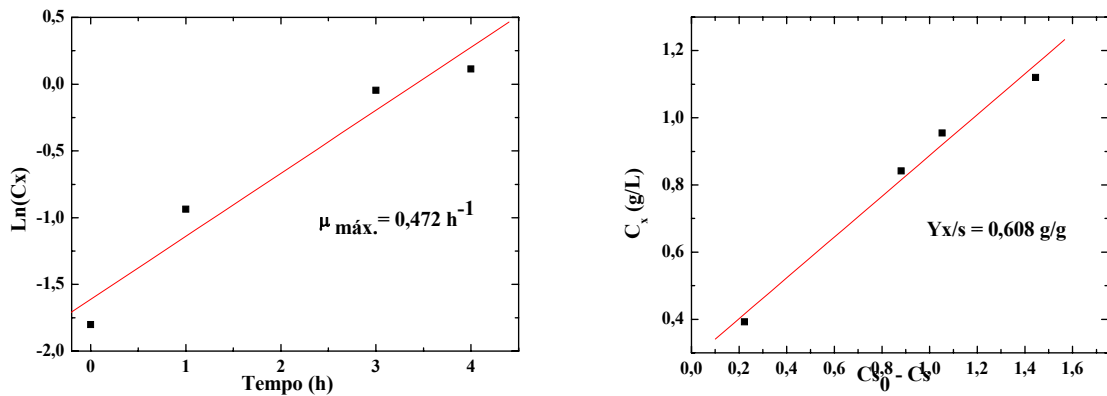


Figura B.5: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$) para o cultivo utilizando frutose + glicose (C1_4)

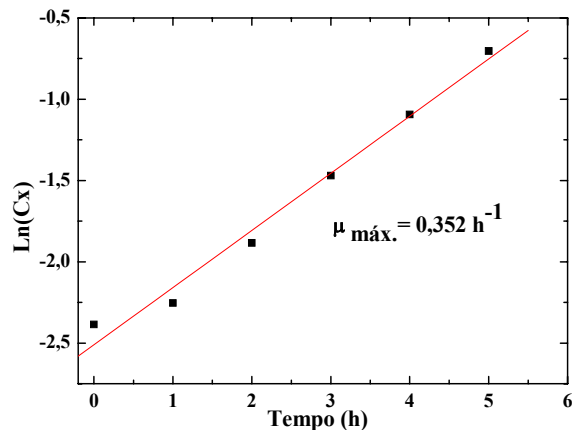


Figura B.6: Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo utilizando galactose (C1_5)

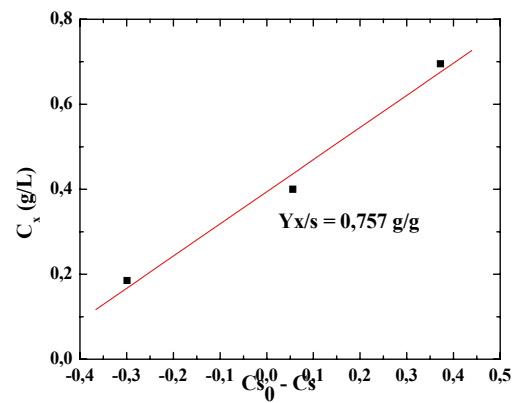
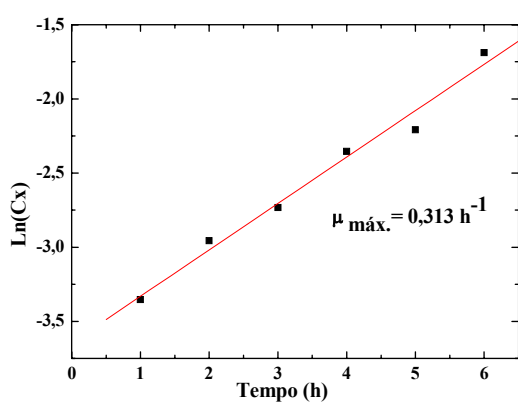


Figura B.7: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$) para o cultivo utilizando lactose (C1_6)

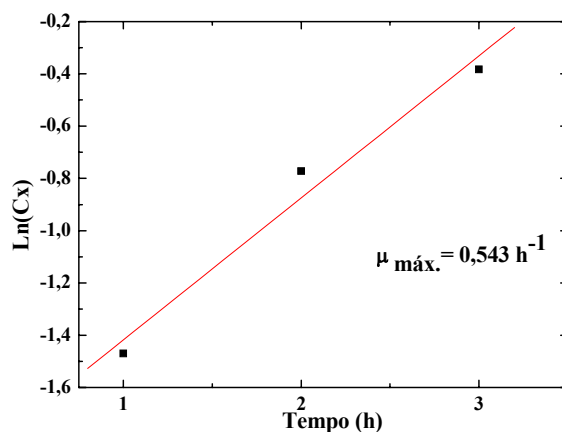


Figura B.8: Curva para determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) para o cultivo utilizando sacarose (C1_7)

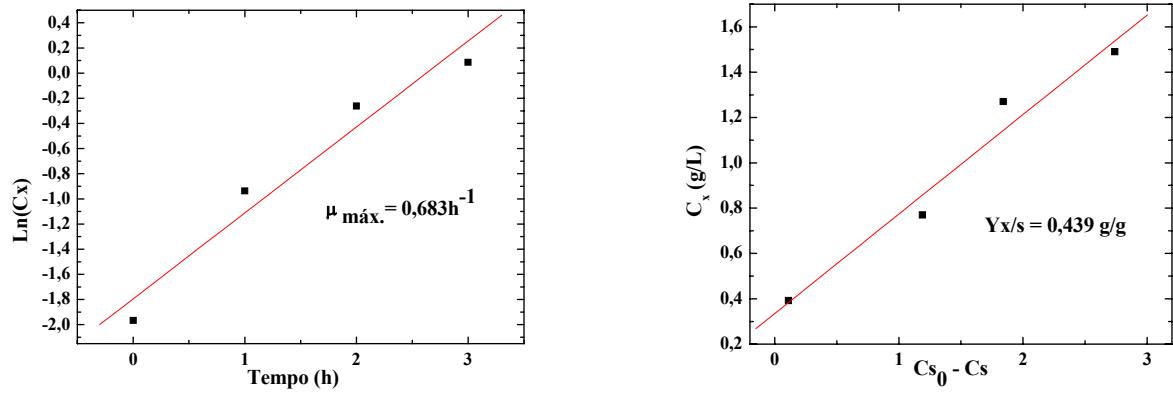


Figura B.9: Curva para determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$) para o cultivo no Airlift