

CULTIVO CELULAR EM ALTA DENSIDADE PARA EXPRESSÃO DE HORMONIO DE CRESCIMENTO BOVINO EM *Escherichia coli*

João Cláudio P. Batista¹; Mauro Aparecido de Sousa Xavier².

Resumo: Desenvolvimento de processo fermentativo em alta densidade celular para expressão da proteína recombinante rBGH em *Escherichia coli*, utilizando a técnica de fermentação batelada alimentada em fermentadores de bancada e utilizando IPGT/lactose como agentes indutores. Foram avaliados diversos meios de cultivo disponível na literatura, sendo escolhido o meio selecionado aquele que apresentou melhor crescimento e menor custo de preparação. Os cultivos foram realizados utilizando a técnica de alimentação exponencial e indução pela adição de IPTG e/ou lactose. Foram obtidos crescimento celulares de 35 a 48 g/L de massa seca e produção de proteína de 12 a 31% de expressão da proteína.

Palavras-chave: Alta densidade Celular. Meio de cultivo. IPTG. Proteína recombinante.

Introdução

A produção de proteínas recombinantes utilizando processos fermentativos tem importante aplicação industrial na obtenção de produtos farmacêuticos e veterinários em larga escala como insulina, vacinas, vitaminas e aminoácidos. A produção economicamente viável de uma proteína recombinante requer a obtenção de alta densidade celular pois a maioria das proteínas recombinantes é acumulada no citoplasma e/ou espaço periplasmático dos microrganismos hospedeiros (SARGO, 2011). Os meios de cultivos utilizados podem ser complexos (STUDIER, 2005) ou definidos (KORZ, 1994). Os meios definidos são ideais para o cultivo de alta densidade celular, pois possuem a característica de facilitar o controle de nutrientes e fonte de carbono, propiciando o controle da velocidade específica de crescimento, tornando possível a minimização dos efeitos de inibição por substrato ou metabólicos indesejáveis (SARGO, 2011). Além disso, a *Escherichia coli* por apresentar facilidade na manipulação genética tem sido a escolha preferencial para a produção de proteínas recombinantes, sobretudo na produção em escala industrial e em alta densidade celular. A produção de hormônio de crescimento bovino através de modernas técnicas de cultivo celular em fermentadores é de suma importância para a área veterinária, uma vez que este insumo aumenta a produção leiteira. O objetivo deste trabalho é a produção de hormônio de crescimento bovino em alta densidade celular pelo desenvolvimento do processo fermentativo e com elevada expressão da proteína recombinante.

1 Mestrando do curso de Biotecnologia industrial da Unimontes, Campus de Montes Claros. Email: jclaudiopb@gmail.com

2 Doutor em biologia molecular, docente da Unimontes, Campus Montes Claros. Curso de Biologia. Email: mauroxavier_mxav@yahoo.com.br

Material e Métodos

O microrganismo utilizado foi a *Escherichia coli* carregando o plasmídeo pET28a::bGH e os reagentes de maior grau de pureza disponível no laboratório. Os testes iniciais foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura (37°C; 250 RPM) e as fermentações foram em reatores de bancada contendo 5L de meio de cultura (37°C, 600 RPM, DO > 20% com enriquecimento do ar quando necessário).

A determinação da curva de crescimento celular foi realizada através de análise espectrométrica utilizando comprimento de onda a 600nm. Para ensaio da quantidade de proteína recombinante, foi utilizada a técnica de eletroforese SDS-PAGE e a quantificação das bandas, realizada pelo software IQuant da General ELetricos, GE®.

Resultados e Discussão

Os meios de cultivos foram selecionados da literatura com modificações na composição dos mesmos em função da disponibilidade de reagentes no laboratório. Conforme pode ser observado na figura 01, os meios de cultivos R e YE apresentaram melhores resultados no crescimento celular dentre os meios previamente escolhidos (figura 01). O crescimento observado para os meios R e YE foi bastante similar, porém o meio R foi selecionado por possuir menos componentes quando comparado com o meio YE, favorecendo o custo final do processo fermentativo.

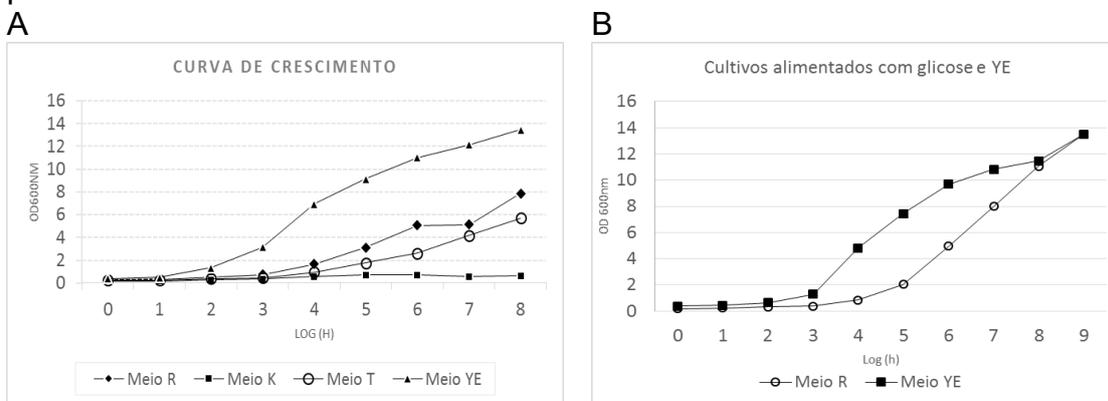


Figura 01: Curva de crescimento para cultivos realizados em frascos agitados para os 4 meios de cultura propostos. **Painel A** – Comparação do crescimento entre os 4 meios propostos e **Painel B** – comparação da curva de crescimento entre os meios R e YE. Fonte: autor.

Os testes em fermentadores de bancada foram realizados para verificação do crescimento celular e produção da proteína recombinante (figura 02). Conforme observado na figura 02, os valores de peso seco (g/L) foram de 35 a 49 g/L e a expressão da proteína recombinante de 10 a 31% em relação as proteínas totais. Estas concentrações são similares aquelas desenvolvidos por Son (SON, 2007).

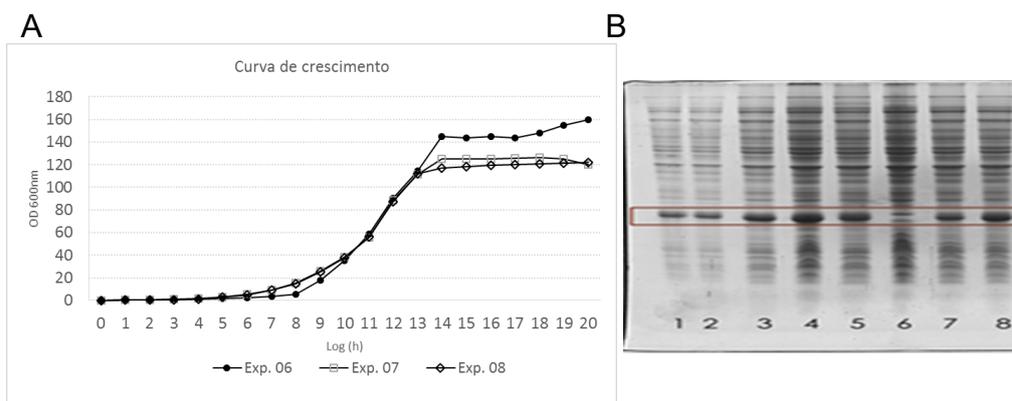


Gráfico 02: Curvas de crescimento para cultivos realizados em fermentadores de bancada e expressão da proteína recombinante. **Painel A** – Curva de crescimento para para o meio R e **Painel B** – Perfil das proteínas totais em SDS-PAGE. A proteína recombinante desejada está indicada pelo retângulo. Poços (% da proteína recombinante): 1- Teste 6 após 6 h de indução (22,2%); 2- Teste 6 após 8 h de indução (30,5%); 3- Teste 7 após 2 h de indução (18,0%); 4- Teste 7 após 5 h de indução (15,0%); 5 - Teste 7 após 9 h de indução (15,4%); 6- Teste 8 após 0 h de indução (0,1%); 7- Teste 6 após 2 h de indução (10,9%) e 1- Teste 8 após 5 h de indução (15,0%). Fonte: autor

Conforme pode ser observado pela figura 02 painel B, diferentes concentrações de proteína recombinantes foram produzidas em função na diferenças entre os testes realizados. Nos testes 06, 07 e 08 foram utilizados como agente indutor o composto químico IPTG nas concentrações de 0,87mM + sais minerais, 0,4mM + sais minerais e 0,4mM.

Conclusões

O meio de cultivo desenvolvido aliado a estratégia de alimentação foram suficientes para alcançar o objetivo de produção de alta densidade celular. A produção da proteína recombinante foi obtida em diferentes concentrações demonstrando que a estratégia de alimentação utilizada na etapa de produção da proteína exerce influência na produção da mesma. Sugere-se como trabalho futuro uma análise de superfície de resposta para o comportamento de fatores críticos na produção da proteína recombinante.

Referências

- SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivo de alta densidade celular de *rE.coli* utilizando glicerol como fonte de carbono**. Dissertação (Mestrado em engenharia química). Programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2011.
- STUDIER, F.W. **Protein production by auto-induction in high cell density shaking**. Protein expression and purification, 2005, v.41 (1), 207-234.
- KORZ, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A. **Simple fed-batch technique**

for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. J Biotechnol. 1995, 21;39(1):59-65.
SON, Y.J.; PARK, K.H.; LEE, S.Y. Effects of temperature shift strategies on human preproinsulin production in the fed-batch fermentation of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioprocess engineering, 2007, 12:556-561.