

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE PAOLP DE *Physalis angulata* EM *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE

Rayane Alexandre de Abreu¹, Magnólia Araújo Campos², Francisco Canindé de Sousa Junior³,
Carlos Eduardo de Araújo Padilha³, Franklin Ferreira de Farias Nóbrega⁵, Michelle Rossana
Ferreira Vaz⁵

¹Estudante de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos na Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento, Luiz Grande, s/n, Bairro Frei Damião, Sumé PB, 58.540-000.

²Professor Adjunto da Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Educação, Olho D'Água da Bica, s/n, Cuité PB, 58175-000.

³Doutorando em Biotecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN.

⁵Professor Adjunto da Universidade Federal de Campina Grande/Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento, Luiz Grande, s/n, Bairro Frei Damião, Sumé PB, 58.540-000. mrossanavaz@gmail.com

RESUMO

Atualmente com os avanços da Biotecnologia, nas suas diferentes áreas de atuação como indústria farmacêutica, alimentícias, cosméticos, agricultura, o desenvolvimento de novas proteínas recombinantes tem sido uma área de grandes avanços na produção em larga escala para diferentes fins. Devido a sua importância, recentemente um gene PR-5 foi isolado e denominado PaOLP, codifica uma nova possível proteína antifúngica que poderia ser usada em estratégias biotecnológicas na agricultura e/ou farmacêuticas, visando controlar doenças fúngicas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da composição de meios de cultivos a fim de otimizar a produção da proteína recombinante PR-5 PaOLP de *Physalis angulata* utilizando a *Escherichia coli* M15 como hospedeira. O crescimento e expressão dessa proteína recombinante foi avaliado pelo método massa seca e através da avaliação dos parâmetros cinéticos pela planilha Zajic. Pode-se concluir que a expressão proteína PaOLP não interferiu no metabolismo da bactéria e demonstrou maior crescimento e expressão em um meio sem a fonte de carbono.

Descritores: Proteínas Recombinantes, PaOLP, *Escherichia coli* M15.

EVALUATION OF COMPOSITION IN THE MEDIUM OF CROP PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN OF PAOLP *Physalis angulata* IN *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANT

ABSTRACT

Currently with advances in biotechnology, in its different areas such as pharmaceuticals, food, cosmetics, agriculture, the development of new recombinant proteins has been an area of great advances in large-scale production for different purposes. Because of their importance recently PR-5 gene was isolated and designated PaOLP, encodes a novel antifungal protein that can be used in agricultural biotechnology strategies and / or dosage in order to control fungal diseases. In this context, the present work aimed to evaluate the influence of the composition of the culture medium in order to optimize the production of recombinant protein PR-5 PaOLP of *Physalis angulata* using *Escherichia coli* M15 as a host. The growth and expression

of recombinant protein was evaluated by dry weight method and by evaluating the kinetic parameters for the spreadsheet Zajic. It can be concluded that the protein expression PaOLP not interfere with the metabolism of the bacteria and demonstrated increased growth and expression in a medium without carbon source.

Keywords: Recombinant Proteins, PaOLP, *Escherichia coli* M15.

INTRODUÇÃO

Atualmente com os avanços da Biotecnologia, nas suas diferentes áreas de atuação como indústria farmacêutica, alimentícias, de cosméticos, na agricultura com o desenvolvimento de novas técnicas. Com o isso o desenvolvimento de novas proteínas recombinantes tem sido uma área de grandes avanços na produção em larga escala para diferentes fins (1).

A *Escherichia coli* é o hospedeiro mais usado para produção de proteínas recombinantes e o mais estudado também, desde do advento da tecnologia do DNA recombinante que é amplamente estudado e utilizado embora exista uma gama de organismos que são usados como hospedeiros. Entretanto, *E. coli* possui algumas limitações em seu sistema de expressão incluindo a incapacidade de realizar modificações pós-tradução, comum em eucariotos, ausência de um sistema de secreção para eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura e limitada capacidade de produzir algumas proteínas complexas (2).

Dentre a variedade de moléculas que têm sido identificadas, recentes avanços da biotecnologia incluem a descoberta de que membros de uma família de proteínas relacionadas com a patogênese, a PR-5 do tipo osmotina, atua como agentes terapêuticos também em humanos (Patent Document Number WO/2006/036871: *Plant PR-5 proteins as mammalian therapeutic agents*), além da bem caracterizada aplicação na engenharia genética de plantas visando resistência a doenças (3). Portanto, genes que codificam proteínas antimicrobianas do tipo PR-5 representam candidatos importantes para aplicações biotecnológicas. A proteína recombinante estudada nesse trabalho é uma proteína da família de proteínas PRs (pathogenesis related) que agem contra patógenos. Entre elas se destacam as PR5- proteínas similares a taumatina, que têm como característica principal apresentarem atividade antifúngica, glucanólítica e de ligação a açúcares. Estudos mostram que é uma proteína antifúngica muito estudada, atualmente, que tem grande importância na agricultura, na indústria farmacêutica e diversas outras aplicações biotecnológicas (4).

Devido a esta importância, recentemente um gene PR-5 foi isolado e denominado PaOLP, codifica uma nova possível proteína antifúngica que poderia ser usada em

estratégias biotecnológicas na agricultura e/ou farmacêuticas, visando controlar doenças fúngicas. Entretanto, para comprovar a possível atividade da proteína PaOLP se faz necessário sua produção em larga escala. Neste sentido, uma alternativa relevante é a produção da proteína recombinante expressa *in vitro* em sistema heterólogo de procaríotos, usando como hospedeira a cepa *Escherichia coli* M15. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição do meio de cultivo a fim de otimizar a produção da proteína recombinante PR-5 PaOLP de *Physalis angulata* utilizando a *Escherichia coli* M15 como hospedeira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e estratégia de expressão

A cepa M15 de *Escherichia coli* (QiaGen) conduzindo a construção pQE30-PaOLP foi cedida pela Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos, do Centro de Educação e Saúde, Campus Cuité da UFCG. Nesta construção, o vetor de expressão pQE-30 (QiaExpressionist-QiaGen), que contém uma extensão His-6, está ligado ao fragmento do gene PaOLP que codifica a proteína.

Cultivos dos microrganismos em *shaker*

Meios de cultivo

Os meios de cultivos (I e II) utilizados foram preparados com água destilada, esterilizados e suplementados com antibióticos (Kanamicina e Ampicilina). O clone foi ativado em meio LB (Luria-Bertani) suplementado com antibióticos em *shaker Over Night* sob agitação e temperatura controlada (200 rpm e 37°C). Os meios de cultivos I e II estudados foram compostos por 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de glicose, pH 7. O meio de cultivo II apresentou a mesma composição do meio de cultivo I, entretanto, caracterizou-se pela ausência de Glicose.

Tabela 1- Composição dos Meios de Cultivo

Meio de Cultivo I	Meio de Cultivo II
5 g/L Peptona	5 g/L Peptona
3 g/L Extrato de Levedura	3 g/L Extrato de Levedura
10 g/L Glicose	-

Inóculo

O estoque da cepa *Escherichia coli M15* com e sem o gene que codifica a proteína PR-5 foi armazenado em microtubos com 50% de glicerol. Para a ativação da célula sem o gene foram transferidos em condições assépticas 200 µL do stock para *Erlenmeyer* de 50 mL de meio suplementado com kanamicina (25 µg/ µL) e para a ativação da célula contendo o gene PR-5 foram transferidos em condições assépticas 200 µL do stock para *erlenmeyer* com 50 mL de meio suplementado pelos antibióticos kanamicina (25 µg/ µL) e ampicilina (100 µg/ µL). As células foram ativadas em incubador rotativo a temperatura de 37°C e agitação de 200 rpm over night (14-16 horas).

Avaliação da composição dos meios de cultivos realizados em *shaker*

Foram realizados experimentos pra determinação da curva de calibração da *Escherichia coli M15* conduzindo o gene PaOLP. Foram coletados 7 pontos para determinação da curva, 1,0 mL de inóculo em 50 mL de meio suplementados com antibióticos em *erlenmeyer* 250 mL, sob temperatura e agitação controlados (37°C e 200 rpm). Posteriormente, a cada hora foram retiradas uma amostra, para a verificação da massa seca conforme estudos realizados (5). Para essa avaliação foram utilizados dois meios de cultivo (I e II).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estudo da influência da composição do meio de cultivo em cultivos realizados em *shaker*

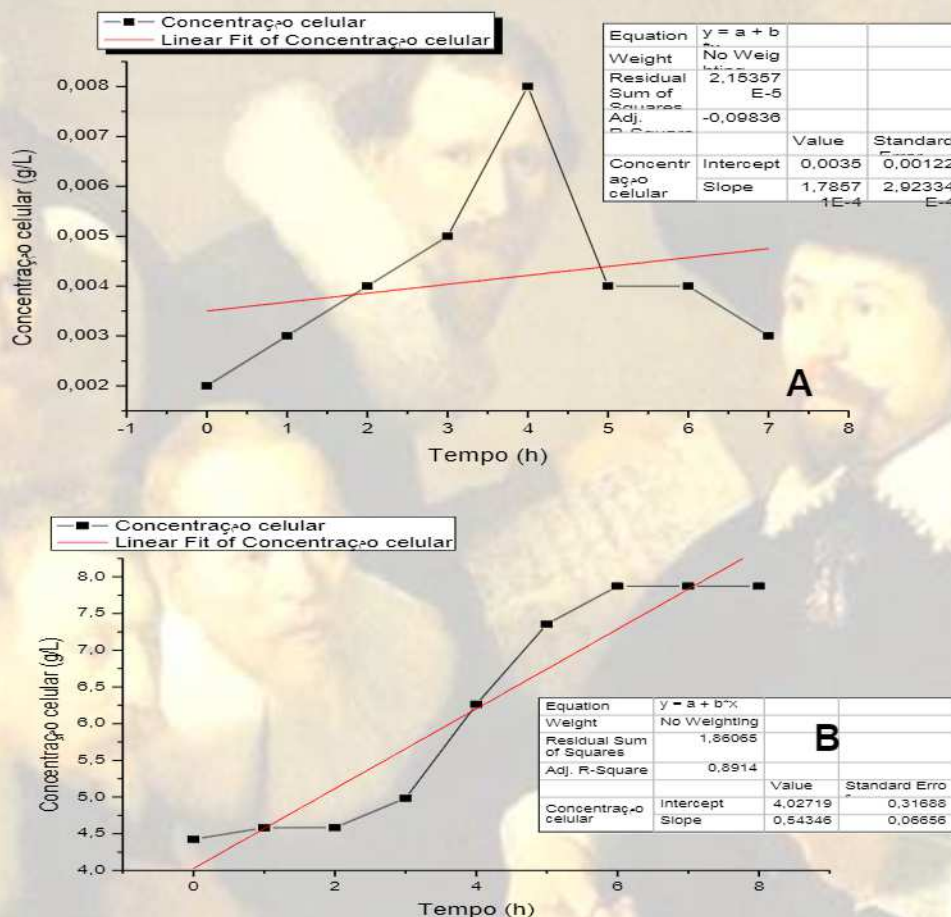
Foram testados dois meios de cultivo (I e II), para a avaliação e determinação da melhor composição do meio para o crescimento e expressão da *Escherichia coli M15* contendo o gene PaOLP.

Tabela 2-Crescimento do clone PaOLP nos dois meios de cultivos

Meio I (com fonte de carbono)	Meio II (sem fonte de carbono)
0,002	4,42378
0,003	4,58218
0,004	4,58548
0,005	4,98478
0,008	6,26188
0,004	7,35418
0,004	7,87228
0,003	7,87228
-	7,87228

A partir dos resultados supracitados, podem-se verificar diversos parâmetros cinéticos os quais retratam que o meio de cultivo II é o ideal para o crescimento e expressão da proteína de interesse.

Figura 1- Crescimento celular do clone PaOLP. (A) Meio I; (B) Meio II



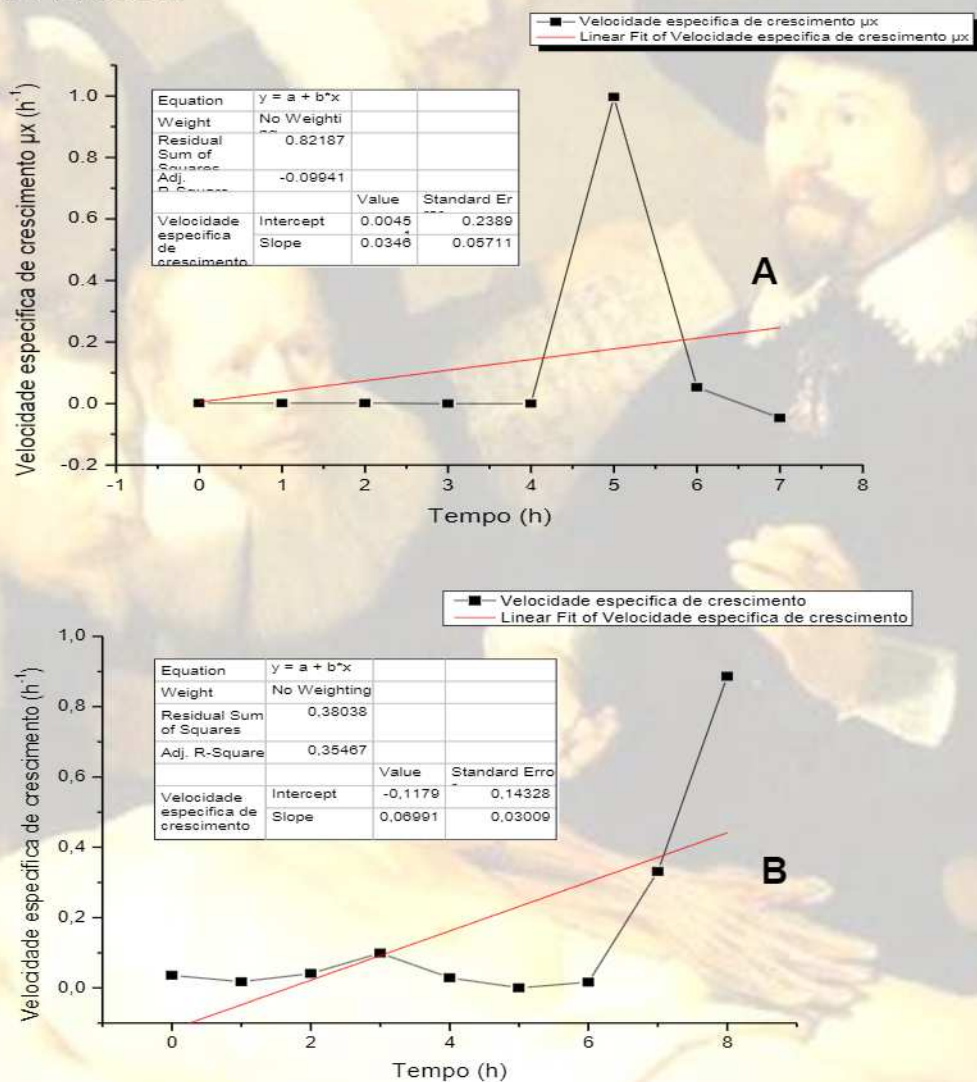
Observando o comportamento da Figura 1 (A e B), percebe-se o clone atingiu a máxima concentração celular no valor de 8 g/L no instante de 6 horas de cultivo, 100 vezes superior a máxima concentração celular (0,008 g/L) obtida na Figura 1 (A).

Percebe-se que no meio de cultivo I (Figura 1 A), a ausência da fase "Lag", a fase de adaptação do microrganismo no meio. Isso ocorreu porque foi feita a ativação "over night" em meio nutricional idêntico ao meio de cultivo usado para a incubação, portanto, a *E. coli* já estava em alta atividade metabólica, assim, a fase lag foi excluída. A fase log ou exponencial é influenciada pelas condições ambientais e pelas características morfológicas do organismo estudado.

A partir da planilha de Zajic foi possível determinar as velocidades específicas de crescimento apresentada na Figura 2 (A e B). Ainda com os dados obtidos na curva de crescimento (Figura 1), pode-se calcular o tempo de geração para os dois meios de

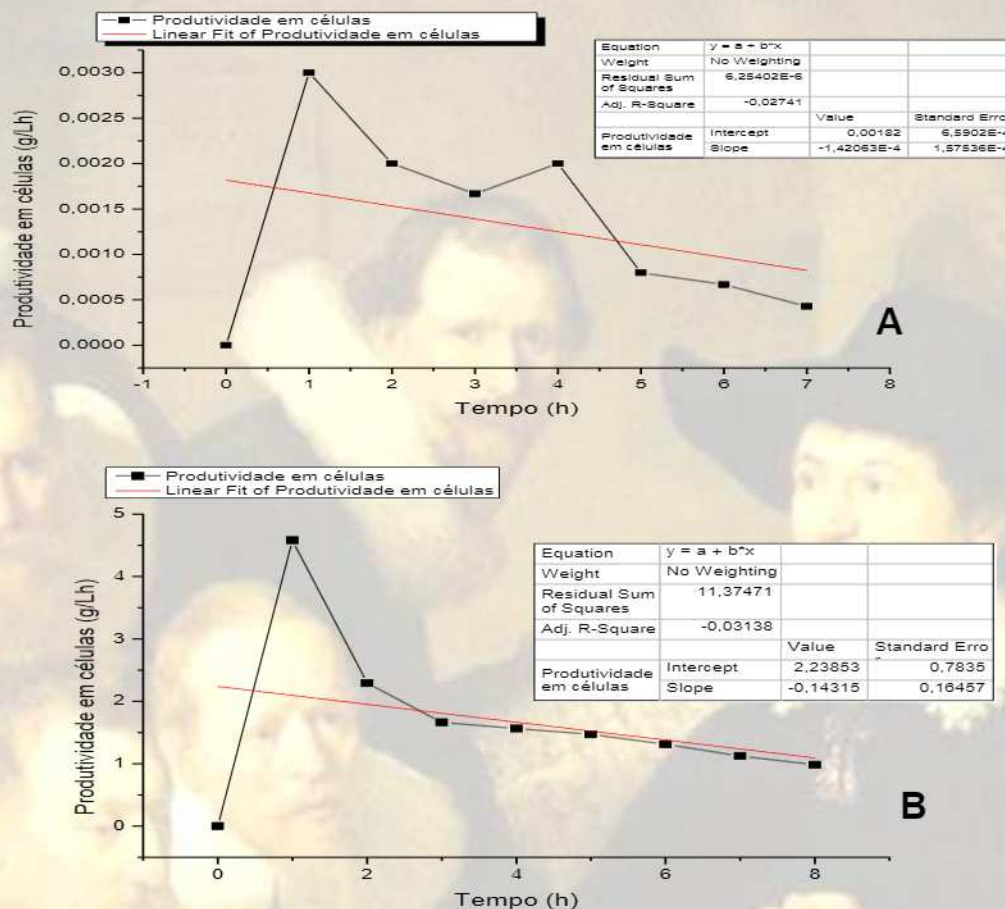
cultivo. Onde: g : Tempo de duplicação ou geração microbiana (h); μ_x : Velocidade específica de crescimento microbiano (h^{-1}), μ_x é o coeficiente angular da equação da reta de crescimento microbiano ($y = ax + b$). Os cálculos são feitos a partir da fórmula: $g = \ln 2 / \mu_x$. O tempo de geração para o meio I é de 3,8 h e o tempo de geração para o meio II é de 1,2 h, isso demonstra que o meio II é mais adequado quando comparado com o meio I.

Figura 2- Velocidade específica de crescimento do clone PaOLP para os dois meios de cultivos: (A) Meio I; (B) Meio II.



A partir dos resultados supracitados, pode-se observar valores idênticos para a máxima velocidade específica de crescimento μ_x foi de $0,9 h^{-1}$, no instante de 5 h e 8 h, respectivamente para os dois meios de cultivo (I e II). Ainda utilizando a planilha Zajic, pode-se calcular o parâmetro produtividade em células para os dois meios de cultivos (I e II) apresentada na Figura 3 (A e B).

Figura 3- Produtividade em células do clone PaOLP. (A) Meio I; (B) Meio II.



Em se tratando do parâmetro produtividade em células, pode-se verificar a máxima produtividade em células foi de 0,003 g/L.h para o meio de cultivo I quando comparado com o meio II a máxima produtividade foi obtida no valor de 4,5 g/Lh, no instante de tempo 1 h. Esse incremento no parâmetro produtividade pode estar relacionado com ausência da fonte de carbono (glicose), o que pode ter favorecido o metabolismo da *Escherichia coli*.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir:

Nota-se a presença da fase lag no meio de cultivo II não impactou no crescimento celular da *E. coli*;

A ausência da fonte de carbono (glicose) favoreceu o metabolismo da *Escherichia coli*;

Pode-se verificar, a partir dos parâmetros cinéticos estudados, que o meio de cultivo II é o ideal para o crescimento e expressão da proteína de interesse.

Com base nos resultados supracitados, concluiu-se que a seleção do microrganismo e a composição do meio de cultivo foram determinados nas suas melhores condições de cultivo, portanto, pode-se iniciar testes em maior escala (reatores) a fim de otimizar o processo de produção de proteínas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Ao PIBIC/CNPq/UFCG pelo incentivo científico e financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rossi M. Desenvolvimento do Processo de Cultivo de *Escherichia coli* RR1. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.
2. Tomazetto G, Ayub MAZ, Carlini Crrs. Estudo Da Estabilidade do Plasmídeo e da Expressão de Jaburetox- 2ec em *Escherichia Coli* BL 21 utilizando Lactose Como Indutor. UFRGS, Porto Alegre, 2006.
3. Van Loon LC, Rep M, Pieterse, CMJ. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2006; 44:135-162.
4. Campos MA., Silva MS, Magalhães CP, Ribeiro SG, Sarto R, Vieira, EA, Grossi De Sá MF. Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microbial Cell Factories.* 2008; 7:1-10.
5. Vaz MRF, Franca RLS, Andrade SSL, Sousa JFC, Santos ES, Martins DRA, Macedo GRM. Influence of culture medium on the production of eif antigen from *Leishmania chagasi* in recombinant *Escherichia coli*. *Braz J Microbiol.* 2011;42:1390-1396