

PRODUÇÃO DE FITASE DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE

Autores: FLÁVIA ECHILA RIBEIRO BATISTA, CAMILLA MARQUES CRUZ, WILLIAM JAMES NOGUEIRA LIMA, DEMERSON ARRUDA SANGLARD, EDERSON PAULO XAVIER GUILHERME, SANDRO BRAGA SOARES, MARIA DE FÁTIMA GONÇALVES FERNANDES

Introdução

Animais monogástricos, como suínos, aves e peixes, não são capazes de metabolizar o ácido fítico, uma vez que eles não produzem, pelo menos em quantidade suficiente, fitase gastrointestinal. Assim, fosfato inorgânico é adicionado à ração para atender às necessidades fisiológicas do animal. Isso aumenta o custo de produção e contribui para problemas ambientais relacionados com o fosfato.

A suplementação da ração animal com fitase permite a assimilação do fosfato nos ingredientes da ração e diminui a presença deste nas fezes e subsequente contaminação do ambiente (PANDEY et al., 2010 e BRANDÃO, 2009). Essas enzimas possuem a capacidade de degradar o ácido fítico indigesto, disponibilizando o fósforo, assim como outros nutrientes complexados nas moléculas de ácido fítico, um fator antinutricional amplamente encontrado nos alimentos de origem vegetal (LEI & PORRES, 2003). Dessa forma, a utilização dessas enzimas em dietas para animais permite reduzir a inclusão de fontes inorgânicas de fósforo, assim como melhorar a digestibilidade e absorção de outros nutrientes.

Dentre os organismos mais empregados na produção de proteínas recombinantes a *E. coli* se destaca por dispor de várias cepas com genótipo amplamente conhecido, crescimento rápido, altas concentrações celulares e utilização de substratos de baixo custo (CHOI et al., 2006). A presente proposta envolveu o desenvolvimento de um sistema de expressão economicamente viável e aplicável a indústria de rações de animais monogástricos, produzindo-se fitase de *Yersinia intermedia* expressa em *E. coli* em escala laboratorial.

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de fitase recombinante em escala laboratorial. Além disso, objetivos específicos envolveram: realizar fermentações submersas para a produção da fitase recombinante com dois meios distintos; selecionar o melhor meio de fermentação para a produção da fitase pela bactéria recombinante; estudar a cepa de melhor expressão gênica e avaliar a atividade enzimática da fitase recombinante produzida.

Material e métodos

As cepas, PlyS1+ PHy (S1) e PlyS2+PHy (S2), de *Escherichia coli* recombinadas de *Yersinia intermedia* com o gene produtor da fitase foram cedidas pelo Departamento de Bioquímica da UFSJ e mantidas em freezer -20°C. 100 µL de cada uma das cepas foram inoculadas em 50mL dos meios de cultura LB e JUNG, separadamente. Adicionou-se 500 µL glicose 50% como substrato e a expressão do gene foi induzida com 500 µL lactose 50%.

O Meio de Fermentação Luria Bertani (LB) foi preparado com 10g de Peptona de Caseína, 5g de Extrato de Levedura, e 10g de Cloreto de Sódio, água destilada q.s.p. para 1000mL (SAMBROOK). Já o Meio de Fermentação Complexo (JUNG) foi preparado com 4g de Fosfato Bibásico de Potássio, 3,15 g de Fosfato monobásico de Potássio, 2,13 g de Fosfato bíbasico de sódio bihidratado, 0,75 g de Sulfato de amônio, 0,13 g de Cloreto de amônio, 1,16 g de Sulfato de Magnésio Hepta hidratado, 2,214 g de Ácido Cítrico, 3,0 g de Extrato de Levedura, 40,0 g de Peptona de caseína e Água destilada q.s.p. para 1000mL de AGU (JUNG, 2000).

Para ambos os meios de fermentação foram coletadas amostras de 3 mL em intervalos de tempos distintos. O pH foi monitorado durante toda a fermentação. Para a análise de densidade ótica (OD) das células, 100µl de cada uma das amostras coletadas foram misturadas à 900mL de solução salina 0,9%. As mesmas foram lidas na faixa de 540 nm no Espectrofotômetro Marca Micronal e Modelo B582.

Para a quantificação das concentrações de glicose e lactose na fermentação utilizou-se o protocolo de açúcar dinitrissalissílico (DNS). Para a verificação da presença da proteína fitase as amostras foram submetidas à ensaios de eletroforese. O protocolo seguido foi o da Amersham Biosciences. A atividade enzimática da fitase foi determinada pelo protocolo de FISKE & SUBBAROW.

Resultados e discussão

De acordo com a Figura 1, ambas as cepas apresentam comportamentos de pH semelhantes quando inoculadas em meios idênticos. No entanto, o meio LB sugere um comportamento de pH diferente do meio JUNG com o passar do tempo. O meio LB apresenta pH mais ácido, pois um acúmulo de ácido acético, como produto da fermentação, é mais pronunciado em meios de cultivo com elevadas concentrações de extrato de levedura. Já o meio JUNG é mais tamponado, o que justifica a sua estabilidade em pH em torno da neutralidade. Essa maior concentração ácida gera um efeito inibidor no crescimento celular e na expressão da proteína de interesse. Por sua vez, o pH alcalino é considerado mais apropriado por neutralizar os ácidos gerados pelo metabolismo da *E. coli*.

A Figura 2 representa a identificação da expressão da proteína de interesse feita através da análise de eletroforese, SDS-PAGE, com fotografia do gel de poliacrilamida a 12%. A massa molecular da fitase recombinante em estudo é predita com valores entre 45 e 50 kDa. Na primeira coluna adicionou-se o marcador de massa molecular. Na coluna 2 adicionou-se fitase comercial concentrada. Nas colunas 3, 4, 5 e 6 adicionou-se as amostras do caldo fermentado no meio LB com as cepas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Já nas colunas 7, 8, 9 e 10 adicionou-se as amostras do caldo fermentado no meio JUNG também com as cepas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Em todas as colunas em que se injetou amostras do caldo fermentado em meio LB não detectou-se a presença de bandas de proteínas. Ao contrário, no meio JUNG, bandas são nitidamente vistas nas colunas 7, 8 e 9. Por interpolação das distâncias do marcador padrão, pode-se calcular que as bandas presentes nos poços JG1, JG2, e JG3 correspondem a proteínas de peso aproximado à 49,08 kDa. Este peso é associável à proteína em estudo. Logo, pode-se dizer que fitase foi detectável no meio JUNG e pode ser produzida através desta metodologia pelas cepas 1, 2 e 3 neste meio de cultivo.

Pela análise de DNS obteve-se um intervalo de 12 horas após o início da fermentação para a adição do indutor, para a garantia de uma indução segura sem interferências. Análises de peso seco, densidade ótica e concentração celular são de comportamentos análogos. Vê-se que as cepas 1 e 2 apresentam crescimento celular semelhantes quando inoculadas tanto no meio JUNG quanto no meio LB. No entanto, apenas no meio JUNG é detectável a expressão da proteína de interesse. Isso justifica-se pois nos cultivos de *E. coli* recombinante, a maximização do rendimento volumétrico do produto heterólogo nem sempre é uma função exclusiva da concentração celular, mas depende também do rendimento celular específico. Por isso, mesmo apresentado altas concentrações celulares é justificável que o meio LB não produza a fitase de forma considerável. Ou seja, o rendimento específico deste produto pode estar relacionado com a influência das condições de cultivo que podem não terem sido favoráveis para este meio de cultivo. Uma possibilidade para a ausência da enzima fitase no meio de cultivo LB e presença no meio JUNG é que a composição do meio de cultivo tem significativo impacto metabólico sobre o desenvolvimento de obtenção de alta produção da proteína recombinante. Por ser complexo o meio JUNG proporciona maior velocidade específica de crescimento, devido à presença de triptona que supre as bactérias com aminoácidos e pequenos peptídeos. Além disso, a adição de uma fonte mais rica em nutrientes complexos

A Tabela 1 apresenta as medidas da atividade em FYT/g para a fitase comercial, Cepas 1 e 2 inoculadas no meio LB e Cepas 1 e 2 inoculadas no meio JUNG. As atividades medidas para as cepas S1 e S2 crescidas no meio LB e JUNG foram 93,20, 124,02, 231,57 e 253,45 FYT/g, respectivamente. As atividades no meio LB são mais baixas, a acidez do meio pode ter gerado um efeito inibidor no crescimento celular e na expressão da proteína de interesse. De forma geral, a atividade enzimática da proteína recombinante apresentou resultados bem inferiores quando comparada à fitase comercial, uma vez que proteínas produzidas na forma insolúvel dentro da célula da *E. coli* podem estar biologicamente inativadas em corpos de inclusão e a produção da proteína recombinante acontece no meio intracelular. Assim, a ausência de uma lise completa da célula microbiana faz com que a atividade medida esteja subestimada.

Considerações finais

Embora apresentando crescimento celular semelhante, no meio JUNG houve expressão da proteína recombinante de interesse, enquanto no meio LB não se detectou presença da fitase pela análise SDS-PAGE. Compreende-se que a composição do meio de cultivo teve significativo impacto metabólico sobre o desenvolvimento de obtenção da enzima almejada. Concluiu-se que pode-se produzir a fitase recombinante para ser inserida em ração animal utilizando a lactose como indutor, porém, a atividade medida está subestimada pelo fato da produção da proteína ser intracelular e não houve lise efetiva das células. A cepa S2 propõe maior eficiência na expressão gênica.

Referências bibliográficas

AMERSHAM Biosciences UK Limited Amersham Place Little Chalfont Buckinghamshire England HP7 9NA Acesso: www.amershambiosciences.com

BRANDÃO, L.V. 2009 Utilização de fitase em dietas para peixes. PUBVET. Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia, 3(5): 10p. Art.#501. [on line] URL: <http://www.pubvet.com>.

CHOI, Jong Hyun; KEUM, Ki Chang; LEE, Sang Yup. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli. Chemical Engineering Science, v. 61, n. 3, p. 876-885, 2006.

FISK, C. H.; SUBBAROW, Yellapragada. The colorimetric determination of phosphorus. J. biol. Chem, v. 66, n. 375, p. 30, 1925.

JUNG, K-H Ia; parj, d-h.; chung; s-i.; Production characteristics of interferon a using an L-arabinose promoter system in a higt-cell-density cultura.; Appl. Microbil. Biotechnol.;53:201-208, 2000.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. Biotechnology Letters, v.25, p.1787-1794, 2003.

PANDEY, A., SZACAKS, G., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A., SOCCOL, V.T. Production purification and properties of microbial phytases. Bioresource technology. V.77, p.203 – 214, 2010.

SAMBROOK and Russel 3.ed., Meio Luria-Bertani Volume 3 Apêndice A2.2

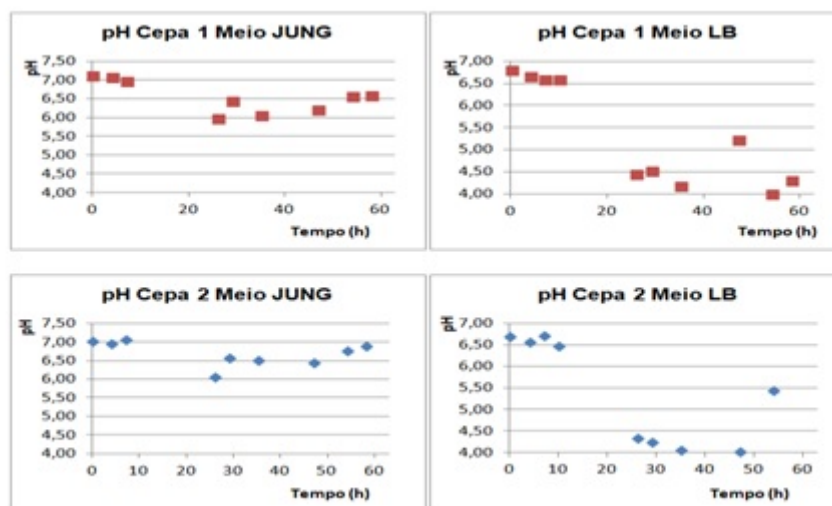


Figura 1. a) pH Cepa 1 Meio JUNG b) pH Cepa 1 Meio LB c) pH Cepa 2 Meio JUNG d) pH Cepa 2 Meio LB

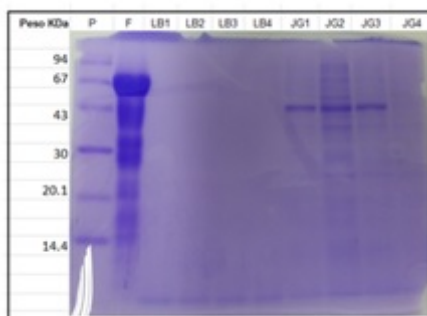


Figura 2. Análise SDS-PAGE 12% (p/p) para os caldos fermentados após indução: (coluna 1) Marcador de massa molecular; (coluna 2) fitase comercial pura concentrada; (coluna 3) Cepa 1 inoculada no meio LB; (coluna 4) Cepa 2 inoculada no meio LB; (coluna 5) Cepa 3 inoculada no meio LB; (coluna 6) Cepa 4 inoculada no meio LB; (coluna 7) fitase comercial pura concentrada; (coluna 8) Cepa 1 inoculada no meio JUNG; (coluna 9) Cepa 2 inoculada no meio JUNG; (coluna 10) Cepa 3 inoculada no meio JUNG; (coluna 6) Cepa 4 inoculada no meio JUNG;

Tabela 1. Medidas de Atividade das fitases

Amostras	A ($\mu\text{mol/mL.min}$)	Atividade (FYT/g)
FITASE Comercial	7462.44	6091.79
LB 1	114.17	93.20
LB 2	151.93	124.02
JUNG 1	283.68	231.57
JUNG 2	310.48	253.45