

MARISA CRISTINA DA FONSECA

**PRODUÇÃO DE ESTREPTAVIDINA RECOMBINANTE PELA
LEVEDURA *Pichia pastoris***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós – Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

MARISA CRISTINA DA FONSECA

**PRODUÇÃO DE ESTREPTAVIDINA RECOMBINANTE PELA
LEVEDURA *Pichia pastoris***

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós –
Graduação em Microbiologia Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*

APROVADA: 20 de Fevereiro de 2006.

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Conselheiro)

Prof. Valéria Monteze Guimarães
(Conselheira)

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. Flávia Maria Lopes Passos
(Orientadora)

A maior felicidade é aprender a ultrapassar-se a si mesmo, a cada dia.
(Madre Valentina)

Dedico este trabalho à Deus, fonte de inspiração, vida, graça, que permitiu a conquista de mais uma etapa nessa longa caminhada que é a vida;

Aos meus pais, que foram alicerces e que com seu apoio, amor e orações permitiram que mais esse sonho se realizasse;

Às minhas irmãs e meu irmão, pelas orações e o apoio;

Ao meu namorado Flávio que me incentivou a todo tempo... pela cumplicidade e carinho dedicados;

À Professora Flávia que nos ensina a arte de aprender e empreender nossos conhecimentos com entusiasmo, dedico ao seu profissionalismo e amizade.

Aos amigos do LFM, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos dos outros laboratórios, pelo apoio e amizade.

Aos que trabalham com alegria e amam o que fazem...

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo gracioso dom da vida, pela força Nele encontrada e Dele concedida... que com infinito amor concedeu-me a oportunidade de aprender mais, de trabalhar com entusiasmo, em todos os experimentos..mesmo naqueles que por um motivo ou outro tiveram que ser repetidos..obrigada Pai..por não deixar-me desanimar nunca....e por estar comigo sempre...

Agradeço à CAPES pela grande oportunidade e pelo financiamento dos meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de crescer como profissional em meio a tantas limitações e ao respeito por nós alunos.

À Professora Flávia, que foi além de orientadora, amiga... que com paciência dedicou seu tempo nas etapas de orientação, obrigada por incentivar sempre um crescimento pessoal e profissional de seus alunos, obrigada pela oportunidade de aprender com você...

Aos professores que me acompanharam com quem aprendi mais sobre esse fantástico mundo da ciência, onde as disciplinas formam uma colcha de retalhos...e cada parte é fundamental para que a colcha exista, sou grata a todos.

Aos funcionários, pela amizade, pelo carinho e prontidão em ajudar..sou muito grata a vocês: Danilo, Evandro, Sr. Toninho e Sr. Paulo.

Aos conselheiros, Prof Frederico J. Vieira Passos e Prof. Valéria Monteze Guimarães, pelas sugestões, aconselhamentos valiosos e incentivo.

Ao Leonardo Damasceno pelo apoio inicial nesse trabalho.

Aos meus pais Paulo e Luzia pelo amor, dedicação, pelas orações e por dividirem comigo mais essa conquista. Obrigada, por entenderem e permitirem a continuidade dos meus estudos; admiro muito vocês pelo exemplo que são para nós filhos.

Às minhas irmãs e ao meu irmão, às minhas sobrinhas e sobrinho, por acreditarem, torcerem e rezarem por mim...

Ao meu namorado Flávio, pelo amor, respeito, companhia e por dividir esse sonho comigo, compartilhando de cada momento. Obrigada por entender que eu precisava ficar até mais tarde aqueles dias...por acreditar e confiar e por ser simplesmente especial na minha vida...

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia...vocês foram essenciais durante essa jornada e sabem o quanto sou grata a cada um pela colaboração, incentivo, pelas risadas... Obrigada pela companhia na reta da UFV...pelas músicas animadas... pela ótima convivência...

Ao amigo Fábio Coelho Sampaio, pelas críticas, sugestões, amizade, estímulo e originalidade.

À Tatiane Santos Guimarães (Taty) pelo auxílio, responsabilidade, companheirismo e amizade.

Aos amigos próximos e distantes que souberam entender um “hoje eu não posso ir”, mas que sempre estiveram disponíveis e que sempre estiveram comigo em lugar muito reservado..

Deus abençoe todos vocês!!!

BIOGRAFIA

Marisa Cristina da Fonseca, filha de Paulo Cristovam da Fonseca e Luzia Ferreira da Fonseca, nasceu no dia 11 de junho de 1981, na cidade de Divinópolis, MG. Em 2000 iniciou o curso superior na Universidade do Estado de Minas Gerais, *campus* da Fundação Educacional de Divinópolis e em dezembro de 2003 graduou-se no curso de Biologia. Durante a graduação participou do programa de monitoria da disciplina de Microbiologia Geral para os cursos de Biologia e Enfermagem, desenvolvendo habilidades teóricas e práticas. Participou de estágio voluntário na UFV durante o período de verão, realizado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos. Durante o curso também estagiou na UFMG no Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos. Participou do programa de pesquisa na UEMG fazendo trabalho interdisciplinar de entomologia e microbiologia. Em março de 2004, ingressou no curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da UFV, defendendo tese de mestrado em fevereiro de 2006.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. <i>Pichia pastoris</i> recombinante, condições de cultivo e manutenção.....	14
3.2. Ativação e condições de cultivo do pré-inóculo.....	14
3.3. Determinação do efeito da concentração inicial de células, de glicerol e do fluxo de alimentação na produção de biomassa.....	15
3.4. Efeito do sistema de aeração e agitação na produção de biomassa.....	16
3.5. Indução da síntese de estreptavidina.....	17
3.6. Métodos analíticos.....	19
3.7. Determinação da concentração de estreptavidina ativa.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. <i>Pichia pastoris</i> recombinante, confirmação genotípica.....	23
4.2. Determinação do efeito da concentração inicial de células, de glicerol e do fluxo de alimentação na produção de biomassa.....	24
4.3. Efeito da aeração e agitação na produção de biomassa em batelada alimentada.	28
4.4. Produção de estreptavidina por <i>P. pastoris</i> recombinante.....	30
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE.....	49
APÊNDICE A.....	50

APÊNDICE B.....	53
APÊNDICE C.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do DNA, produto de PCR, do genoma de *Pichia pastoris* KM71

FIGURA 2 – Velocidade específica de crescimento (μ) de *P. pastoris* KM71/Stp em função da concentração de glicerol

FIGURA 3 – Cultura em batelada de *P. pastoris* KM71/Stp em meio BMG com 0,67 moles L⁻¹ de glicerol

FIGURA 4 -Gel de eletroforese SDS- PAGE do sobrenadante de indução da biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp e KM71/pPIC9 (controle), na primeira utilização das células

FIGURA 5 – Ganho de biomassa de *P.pastoris* KM71/Stp durante a fase de indução da síntese de estreptavidina

FIGURA 6 - Concentração de proteína total no sobrenadante das culturas de *P. pastoris* KM71/Stp livres e imobilizadas após indução por metanol 0,5% (v/v).

FIGURA 7 – Produção de estreptavidina após 96 horas de indução com metanol 0,5% (v/v) por culturas recombinantes de *P. pastoris* KM71/Stp livre; imobilizada em partículas esféricas de gel de alginato e cultura controle.

FIGURA 8 - Gel de eletroforese SDS-PAGE do sobrenadante de indução das biomassas em suspensão livre e imobilizada de *P. pastoris* KM71/Stp após a primeira utilização.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Ganho em massa de *P. pastoris* KM71/Stp obtida por batelada alimentada a partir de uma cultura de 24 horas em meio BMG com A_{600} de aproximadamente 20 ($36,38 \text{ g L}^{-1}$)27
- TABELA 2** - Biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp (g L^{-1}) obtida em cultura alimentada com meio de sais e glicerol em duas diferentes concentrações e sob aeração.....29
- TABELA 3** -Teste HABA para detecção de estreptavidina no sobrenadante das culturas com 96 horas de indução (células em suspensão, imobilizadas e controle).....36
- TABELA 4** -Concentração (g L^{-1}) de estreptavidina produzida no sobrenadante da cultura de *P. pastoris* KM711/Stp em suspensão e imobilizada em três utilizações. Controle: *P.pastoris* KM71/pPIC9.....37

RESUMO

FONSECA, Marisa Cristina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006.
Produção de estreptavidina recombinante pela levedura *Pichia pastoris*.
Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Conselheiros: Frederico José Vieira e Valéria Monteze Guimarães.

Com o intuito de utilizar estreptavidina como alvo para isolar proteínas de interesse numa coluna biotinilada, *P. pastoris* KM71 recombinante contendo o gene do *core* da estreptavidina, foi cultivada em regime de batelada alimentada na fase de produção de biomassa, alcançando uma concentração de 150 g L⁻¹. Essa biomassa foi alcançada com um novo protocolo, que além de reduzir os passos, introduziu um aparato simples, mas eficiente de dispersão de ar. Um reator com capacidade para 1 L, com 200 mL de meio mínimo com glicerol, foi inoculado com uma pré-cultura para uma A₆₀₀ inicial de 0,2. Após 24 horas de incubação, a 25 °C, 500 rpm e injeção e dispersão de ar através de pedra porosa, a alimentação foi iniciada com meio de sais basais e glicerol até atingir um volume de 400 mL. A concentração de 2,0 moles L⁻¹ de glicerol e fluxo de 0,11 mL min⁻¹ utilizados na alimentação, permitiram obter máxima biomassa. Na fase de indução de estreptavidina, foi estudada a reutilização da biomassa na produção de estreptavidina em duas condições: livres em suspensão e imobilizadas em partículas de alginato de cálcio. Em ambos os casos a proteína produzida apresentou-se biologicamente funcional, exibindo ligação esperada à biotina. A concentração de estreptavidina no sobrenadante da cultura de células livres no período de máxima indução (96 horas) atingiu 4,0 g L⁻¹, reduzindo para 3,2 e 0,87 g L⁻¹ respectivamente em duas reutilizações. Quando comparada às concentrações de estreptavidina obtidas pelas células livres em cada utilização, a imobilização resultou na produção de 75% na primeira utilização, 50% na segunda, mas alcançando quase 80%

na terceira utilização. A imobilização e a reutilização da biomassa de *P. pastoris* recombinante ainda não haviam sido reportadas e a produção de estreptavidina nessas condições demonstrou ser uma técnica em potencial.

ABSTRACT

FONSECA, Marisa Cristina, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006.
Production of recombinant streptavidin by *Pichia pastoris* yeast. Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Committee Members: Frederico José Vieira and Valéria Monteze Guimarães.

Streptavidin has been exploited as affinity tag to isolate protein in biotinilated columns. Recombinant *Pichia pastoris* KM71/Stp strains containing the streptavidin *core* gene were cultured in fed-batch generating 150 g L⁻¹ biomass. This biomass was achieved with a simpler and shorter process that has never been reported. The yeast was pre-cultured into 50 mL minimum medium with glycerol as only carbon source at 25 °C and 250 rpm. After 12 hours incubation, the culture was transferred to a bioreactor with 200 mL of the same initial A₆₀₀ 0,2. After 24 hours incubation the culture was fed-batch with glycerol and basal salts medium to reach 400 mL. The glycerol concentration of 2.0 moles. L⁻¹ combined with a flow of 0.11 mL. min⁻¹ and aeration by air injection dispersed with a porous stone and magnetic stirring of 500 rpm were the set of conditions to yield maximum biomass. The streptavidin concentration at the supernatant of the free cell culture at 96 hours, the maximum induction period, has achieved 4.0 g. L⁻¹, reducing to 3.2 and 0.87 g. L⁻¹ with two reutilizations. At the same time period the immobilized culture yield 75 %, 50 % and 80% less at the first, second and third culture utilization, respectively. The immobilization and recycling of recombinant *P. pastoris* biomass can prove to be a potential strategy to improve volumetric productivity.

1. INTRODUÇÃO

Estreptavidina é uma proteína tetramérica de 60 kDa que possui alta afinidade de ligação à biotina. A vantagem de se ligar, com alta afinidade, à biotina e formar esse complexo estável, atrai o interesse de pesquisadores em construir proteínas quiméricas fundidas a um domínio da estreptavidina para facilitar o isolamento, purificação e imobilização da proteína de interesse (HENDRICKSON, et al., 1989; NAGARAJAN et al., 1993; SANO, et al., 1995; LEE, et al., 1998; PAZY, et al., 2003). As aplicações incluem ainda imunoenaios, testes de hibridização, imunoterapia, localização de antígenos, biorremediação e cromatografia de afinidade (PÄHLERT, et al., 1987, GREEN, et al., 1990, KIM, et al., 2005).

SWAISGOOD et al. (1998) empregaram uma matriz de sílica biotilada para o isolamento e imobilização em um único passo, de β -galactosidase fundida à estreptavidina produzidas em *Escherichia coli*. De modo similar, LEE, et al. (1998) utilizaram uma coluna cromatográfica biotilada para isolar uma lipase de *E. coli* fundida à estreptavidina. A estreptavidina ligada à coluna pode ser eluída utilizando uma solução de hidrocloreto de guanidina 6 M, pH 1,5, como proposto por CUATRECASAS, et al. (1968).

As bactérias são hospedeiras mais comuns para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, por não possuírem sistema de endomembranas, podem afetar o correto processamento de proteínas eucariotas (SUDBERY, 1996; HIGGINS, 1998; CREEG, 1999). Assim, a expressão de proteínas heterólogas em leveduras, tem atraído a atenção, por combinar a facilidade de manipulação genética e as características de crescimento de organismos procariotos permitindo o cultivo desses microrganismos em escala industrial (SMITH, et al, 1985; CREGG, et al., 1993).

O sistema *Pichia* de expressão foi construído utilizando o promotor AOX1 do gene da enzima álcool oxidase, reprimido no meio de cultura contendo glicerol, e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como única fonte de carbono (HINGGS, 1998; CREEG 1999; BOETTNER et al., 2002). Segundo CREEG, (1999) essa repressão do promotor AOX1 é importante porque proteínas heterólogas quando expressas em altos níveis no sobrenadante podem ser tóxicas para as células, assim, a habilidade em manter a cultura crescendo com o sistema de expressão desligado minimiza os efeitos inibitórios do crescimento celular.

Diversas estratégias têm sido propostas para aumentar a concentração de biomassa e proteína pelo sistema *Pichia*. CHAUHAN, et al. (2004) sugerem que ao atingir alta densidade celular, o crescimento de *Pichia pastoris* é limitado pela depleção de sais que diminui a utilização do glicerol e, portanto, propõem a adição de sais e cultivo em batelada alimentada para aumentar a biomassa. Outras fontes de carbono como sorbitol, e mesmo, glicerol, têm sido introduzidas com metanol na fase de indução, com o intuito de manter as células ativas e aumentar a expressão de proteínas (ZHANG, et al., 2003; ZHANG et al., 2004; XIE, et al. 2005).

ZHANG, et al. (2005) exploraram a oxigenação do meio e utilizaram um sistema de aeração por incorporação de microbolhas de oxigênio no reator para aumentar a biomassa e com isso, melhoraram a produção de soro albumina humana em *P. pastoris*. Eles comprovaram que a aeração é um fator diferencial para aumentar a concentração de biomassa e proteínas no sistema *Pichia* de expressão. Os autores obtiveram um valor quase três vezes maior de biomassa no sistema de microbolhas comparado ao sistema com somente agitação magnética.

DAMASCENO et al. (2004) cultivaram *Pichia* contendo o gene do anticorpo A33ScFv em reator empregando batelada com manutenção constante de 40% de oxigênio puro e alta agitação magnética para a produção de biomassa. Eles obtiveram uma biomassa de 170 mg.mL⁻¹ e a produção de 4,0 mg.mL⁻¹ do anticorpo.

Devido às inúmeras aplicações do domínio de estreptavidina que se liga à biotina e o potencial de *Pichia pastoris* como hospedeira para expressão de proteínas recombinantes, a levedura *P. pastoris* KM71 foi transformada com o gene que codifica para o *core* da estreptavidina (DAMASCENO, 2001). A transformação foi bem sucedida e a proteína expressa foi biologicamente ativa. No entanto, a concentração de

biomassa e proteína alcançadas não foram satisfatórias com relação ao que tem sido reportado na literatura para o sistema de expressão *P. pastoris*. Assim, este trabalho propõe desenvolver um sistema que reduz etapas no processo convencional de cultivo, incluindo batelada alimentada com injeção de ar e alta agitação, com o intuito de obter altas concentrações de biomassa e conseqüentemente de estreptavidina no sobrenadante da cultura de *P. pastoris* KM71/Stp. Além disso, propõe-se avaliar a reutilização da biomassa recombinante, pela imobilização em partículas de alginato de cálcio, como também da biomassa livre, contribuindo com informações inexistentes na literatura sobre a possibilidade de reutilização da biomassa de *P. pastoris* recombinante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A estreptavidina é uma proteína tetramérica de aproximadamente 60 kDa que se liga à biotina com uma constante de afinidade na ordem de 10^{-13} M^{-1} . Essa é uma das interações não-covalentes mais fortes que se conhece (WILKCHEK et al., 1990). A estreptavidina é produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*. Proteases intrínsecas clivam a proteína em resíduos de aminoácidos de 1-14 e 139-159. Essa clivagem resulta numa fração de 13.3 kDa referida como *core* da estreptavidina, que possui o domínio de ligação com biotina (WEBER et al., 1989; SWAISGOOD et al., 1994). Segundo HENDRICKSON, et al. (1989), nem sempre a clivagem natural da estreptavidina é completa e por não ser totalmente clivada, a proteína pode não tomar sua conformação correta o que dificulta sua secreção pela *S. avidinii* além de reduzir sua afinidade de ligação à biotina.

A molécula de estreptavidina integral, ou apenas parcialmente truncada, tem baixa solubilidade e tende a formar agregados que interferem na correta conformação, secreção e função da proteína. Enquanto, o *core* da estreptavidina, inteiramente truncado, é mais solúvel, facilitando sua obtenção e utilização. A ligação com biotina confere à estreptavidina o potencial para várias aplicações em diagnósticos laboratoriais e processos de separação com alta especificidade (GREEN, 1990; NAGARAJAN, et al., 1993; SANO et al., 1995; SWAISGOOD et al., 1998). Essa afinidade por biotina, motiva dois tipos principais de estudo: o primeiro, para entender a base química dessa interação de tão alta afinidade, e o segundo, para otimizar processos biotecnológicos explorando essa interação (HENDRICKSON, et al., 1989).

Pelos estudos cristalográficos realizados com a molécula de estreptavidina, foi verificado que quatro triptofanos estão em contato com cada molécula de biotina e que a ligação, biotina-estreptavidina envolve numerosas ligações de hidrogênio e forças de

van der Waals. Segundo PAZY, et al. (2003), os resíduos de triptofano na molécula de estreptavidina são muito importantes para sua alta interação com biotina. Os autores realizaram mutações substituindo triptofano por arginina, e verificaram que a afinidade por biotina reduz drasticamente. Eles identificaram ainda que o Trp 120 de estreptavidina é crítico no processo de ligação com biotina e que a presença deste aminoácido no monômero de estreptavidina, auxilia a manutenção da integridade da molécula. Cada monômero de estreptavidina consiste de oito folha- β conectadas entre si de forma antiparalela, formando uma estrutura em β -barril, que contém o sítio de ligação à biotina.

Segundo KWON, et al. (2002) o sítio de ligação de cada monômero de estreptavidina possui uma alça onde se liga a biotina. A reação da ligação de biotina-estreptavidina tem sido analisada termodinâmica, cinética e estruturalmente, para entender a função dessa alça no processo de ligação. Especificamente, a consequência da deleção da alça de estreptavidina para biotina desestabiliza a interação e reflete em uma grande energia para ligação.

Por ser forte essa ligação com biotina e sua dissociação depender de uma alta energia de ativação, a estreptavidina pode ser eficientemente isolada por cromatografia de afinidade biosseletiva numa coluna biotilada (JANOLINO, et al., 1996). Dessa forma, a estreptavidina pode servir como cauda de afinidade para isolar qualquer proteína de interesse. SWAISGOOD et al. (1994) empregaram uma matriz de sílica biotilada para o isolamento e imobilização, em um único passo, de β -galactosidase fundida a estreptavidina produzida como uma proteína heteróloga em *Escherichia coli*.

Cada subunidade da estreptavidina liga-se a uma molécula de biotina ou a uma matriz biotilada, assim, estreptavidina interage com várias superfícies incluindo poliestireno e silicato. A imobilização de estreptavidina fusionada a moléculas-alvo, favorece grandemente o isolamento em matriz biotilada por eliminar os passos como precipitação e centrifugação, reduzindo o tempo gasto para purificar a proteína (NGUYEN, et al. 2005).

Recentemente, um novo sistema utilizado para purificar estreptavidina foi reportado por KIM et al. (2005). Eles basearam na expressão da estreptavidina na superfície do esporo de *Bacillus subtilis*, tornando a estreptavidina exposta, mais susceptível à ligação com moléculas biotiladas. Os autores ainda propõem que esse

método de isolamento, pode futuramente, ser utilizado para isolar proteínas de interesse ligadas ao domínio de estreptavidina. Eles afirmam que a vantagem dessa purificação é porque o esporo pode ser facilmente separado da célula vegetativa por centrifugação.

Existe uma dificuldade em liberar a biotina ou o alvo-biotinilado ligado à estreptavidina, devido à alta constante de ligação. Por isso, métodos alternativos têm sido sugeridos para reverter a ligação de estreptavidina-biotina após a purificação da molécula de interesse. CUATRECASAS, et al (1968) propõem a eluição de estreptavidina, ou avidina, ligada a uma coluna biotinilada, empregando hidrócloro de guanidina 6 M em pH 1,5.

A produção de proteínas quiméricas contendo o *core* da estreptavidina tem sido possível com o advento das técnicas de DNA recombinante. Vários hospedeiros já foram clonados para a expressão e produção heteróloga de estreptavidina, dentre os quais as bactérias *E. coli* e *B. subtilis*. Em *E. coli* a produção foi intracelular nas formas solúvel e insolúvel. KIM, et al (2005) mencionaram que um problema na produção de estreptavidina em *B. subtilis*, foi o seqüestro da biotina intracelular pela estreptavidina, prejudicando o crescimento da bactéria hospedeira, por limitar a concentração da vitamina. Os autores sugerem que para resolver este problema a estratégia seria eliminar a expressão basal de biotina, pela clonagem do gene e expressão induzida da síntese de biotina, ou suplementar o meio de cultivo com biotina.

As bactérias são hospedeiras mais comuns para expressão de proteínas recombinantes. No entanto, não possuem sistema de endomembranas e não realizam modificações pós-traducionais, o que pode impedir o correto processamento de proteínas eucariotas (SUDBERY, 1996; CREEG, 1999). Assim, quando o interesse é produzir proteínas de organismos eucariotos, as leveduras destacam-se como hospedeiras alternativas, por serem unicelulares, deterem as vantagens do sistema bacteriano no que diz respeito à facilidade de manipulação e cultivo em escala industrial, além serem capazes de realizar modificações pós-traducionais adequadas de várias proteínas (HINGGS, 1998; CREEG 1999).

S. cerevisiae foi a primeira levedura utilizada com propósito de produzir proteínas exógenas devido ao conhecimento acumulado sobre a genética e a fisiologia desse organismo, além da aceitação dessa levedura em experiências para benefício humano. Entretanto *S. cerevisiae* apresenta algumas limitações, como a alta glicosilação,

tornando a proteína imunogênica, ou de conformação não-funcional; produção de etanol durante a fermentação que pode ser tóxico; e essas limitações pode torná-la uma hospedeira inadequada para expressão de algumas proteínas heterólogas (CREEG et al., 1993).

Vários estudos foram e estão sendo feitos no sentido de utilizar leveduras alternativas para a produção de proteínas recombinantes. *Pichia pastoris* cujo sistema de expressão foi engenheirado, mostra-se como uma eficiente hospedeira para a síntese e secreção de proteínas heterólogas para aplicações acadêmicas ou industriais (COS, et al, 2005). Essa levedura destaca-se de um pequeno grupo de leveduras alternativas que apresentam vantagens sobre aquelas descritas em *S. cerevisiae* para a produção de proteínas heterólogas (CREEG et al., 1993). Uma característica importante de *P. pastoris* é que essa levedura não é considerada uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae* e, portanto, rende mais biomassa e não gera etanol como produto, que acumulado atinge rapidamente níveis tóxicos.

O sucesso do sistema *Pichia* está relacionado em grande parte ao promotor AOX1 do gene codificador para a enzima álcool oxidase que é reprimido no meio de cultura contendo glicerol, e induzido quando as células são transferidas para um meio contendo metanol como única fonte de carbono (HINGGS, 1998; CREEG 1999; BOETTNER et al., 2002). A enzima AOX, é a primeira enzima na via de utilização de metanol e constitui cerca de 70% do total de proteínas solúveis nas células crescendo em meio com metanol como fonte de carbono. Isso permitiu constatar que a síntese da enzima AOX é regulada em nível transcricional e que o promotor desse gene pode ser eficientemente empregado para controlar a expressão de genes exógenos (CREEG et al., 1993; GELLISSEN, et al., 2005). Estudos do genoma *P. pastoris* revelaram a existência de um segundo promotor funcional para enzima álcool-oxidase, o gene AOX2, que codifica uma proteína que é 97% idêntica e tem a mesma atividade específica da AOX1. No entanto, em células de *Pichia* crescendo em metanol, AOX2 codifica a menor fração do total de álcool-oxidase durante a expressão. Assim o promotor de AOX1 tem sido incorporado em muitos vetores de expressão (CREEG et al., 1993; HINGGS, 1998).

De acordo com a inserção do gene para a síntese da proteína exógena no genoma da levedura, existem três possibilidades que caracterizam três fenótipos diferentes de *Pichia pastoris*. Os três fenótipos mutantes são: Mut⁺ (Methanol Utilization Positive),

Mut^S (Methanol Utilization Slow) e Mut⁻ (Methanol Utilization Negative). Mut⁺ apresenta genes AOX1 e AOX2 funcionais e crescem em metanol em níveis similares ao selvagem. O Mut^S (Methanol Utilization Slow), seu promotor AOX1 é reprimido. O metabolismo de metanol nessa linhagem é dependente da transcrição do gene AOX2 e por isso cresce lentamente em metanol. Eventualmente, esse mutante produz mais proteínas quando comparado ao Mut⁺. O Mut⁻ (Methanol Utilization Negative) os genes AOX1 e AOX2 estão inativos, como resultado, a linhagem não metaboliza metanol como as anteriores e, portanto, não cresce em metanol (HIGGINS, 1998; CHAUHAN et al., 1999).

Uma vez que uma cópia do gene da proteína de interesse está integrada por célula transformada, o aumento da densidade populacional aumenta o rendimento da proteína por massa de células (CREEG et al., 1993). Algumas proteínas heterólogas são glicosiladas quando secretadas em leveduras, porém eventos indesejáveis como processamento aberrante ou hiperglicosilação podem acontecer durante esse processo gerando proteínas não-funcionais (SMITH et al., 1985; CHEN et al., 1996; MONTESINO et al., 1998; NOHR et al., 2003).

Em muitas leveduras as cadeias de oligossacarídeos das proteínas são alongadas pela adição de resíduos de manose. Em *S. cerevisiae* essas cadeias consistem de 150 resíduos de manose, com ligações α -1,3, estranho ao sinal de secreção, podendo endereçar a proteína a rota de degradação via membrana trans-goli; já em *P. pastoris*, a adição desses resíduos é muito menor sendo similar àquelas deposições de resíduos de manose feitas por células de mamíferos e não há ligações α -1,3, o que torna as proteínas expressas em *Pichia* menos imunogênicas (VOZZA, et al., 1996; CREEG, 1999). Essa característica favorece a levedura *P. pastoris* como hospedeira alternativa para expressão e secreção de proteínas de eucariotos superiores. O sistema de expressão *P. pastoris* utiliza um sinal de secreção para secretar as proteínas heterólogas através da via de endomembranas. Isso permite modificações pós-traducionais, como a maturação proteolítica, a glicosilação e dobramento natural (Vozza, et al., 1996).

Além da baixa glicosilação realizada por *P. pastoris*, outras vantagens que esse sistema de expressão apresenta incluem: a alta regulação pelo promotor AOX1; a adaptabilidade de culturas de *Pichia* para altas densidades celulares, permitindo alcançar gramas por litro de proteínas recombinantes no meio de cultura; a simplicidade

da indução da expressão de proteínas por metanol; o baixo nível de secreção de proteínas nativas; além de crescer em meio simples ou definido, utilizando metanol como única fonte de carbono (CREEG et al., 1993; DIGAN et al., 1989; CHEN et al., 1996; NOHR et al., 2003; WITTAKER et al., 2004; COS, et al., 2005).

Segundo CHOI, et al. (2005) e COS et al (2005) a aquisição de altas concentrações de proteína heteróloga no sobrenadante da cultura depende também da estabilidade da proteína às condições ambientais, por exemplo, sua resistência a ação de proteases.

CREEG, et al., 1993 e BARRAL, et al, 2005, sugerem três estratégias efetivas para minimizar a instabilidade proteolítica de proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris*. A primeira é a adição de suplementos ricos em aminoácidos como peptona ou casaminoácidos no meio de cultura, que parecem reduzir a atividade proteolítica extracelular. A segunda é a mudança do pH do meio de cultura. O pH pode ser reduzido para valores entre 2 e 4,5 a fim de inibir as proteases. E a terceira é a utilização de uma linhagem de *P. pastoris* homóloga a *S. cerevisiae* na qual o gene PEP4, de uma protease vacuolar, proteinase A, ativadora de outras proteases vacuolar, seja deletado. Segundo CREEG, et al., 1993, já foi relatado um aumento de 50% na produção de IGF-1 em mutantes PEP4 de *P. pastoris*. Os autores propõem também que a aplicação das três estratégias combinadas pode surtir melhor efeito na inibição de proteases.

O processo de produção da proteína envolve duas fases: uma primeira fase de produção de biomassa e uma segunda fase de indução da síntese da proteína recombinante (DIGAN et al., 1989). A primeira fase no processo é o crescimento em batelada no meio contendo glicerol para gerar biomassa, uma vez que essa fonte de carbono reprime a expressão da proteína por reprimir o promotor AOX1 (HINGGS, 1998). Na segunda fase, é realizada a indução com metanol que deve ser mantido em fluxo constantemente monitorado no fermentador para evitar concentrações tóxicas (HIGGINS, 1998; SREEKRISHNA et al., 1989). O emprego de batelada alimentada pode manter o crescimento celular através do suplemento de fonte de carbono, o glicerol, no meio de cultivo em concentrações de substrato não inibitórias, e assim aumentar a concentração da biomassa antes da indução (CHOI, et al., 2005).

O meio de crescimento para *P. pastoris* na produção de proteínas recombinantes é definido, de baixo custo e ideal para produção em alta escala. Consiste de uma única

fonte de carbono (glicerol ou metanol), biotina, sais, elementos traços e água. O meio é livre de ingredientes complexos, que poderiam gerar toxinas, sendo por isso, facilmente aceito para emprego na produção de fármacos. Consideráveis esforços vêm sendo feitos para otimização das técnicas de produção de proteínas heterólogas em alta escala por *P. pastoris* e para isso protocolos detalhados de cultivo empregando batelada alimentada e cultura contínua vem sendo propostos (CHEN, et al., 1996; GELLISSEN, et al, 2005).

BOETHNER et al.(2002); LEE et al.(2003) sugerem que estratégias de mistura de metanol e glicerol sejam feitas durante a fase de indução. Além de aumentar a biomassa, a mistura parece favorecer a expressão de proteínas.

COS, et al., 2005 afirmam que o processo de produção da proteína de interesse, o nível de metanol deve ser controlado no reator. Eles ainda afirmam que durante o metabolismo de metanol as células requerem altas concentrações de oxigênio e que a expressão de proteínas heterólogas é negativamente afetada pela limitação de oxigênio.

CHAUHAN et al. (1999) sugerem que a cultura experimenta uma limitação de sais no meio mínimo, em alta densidade celular, limitando a assimilação de carbono. Os autores, numa cultura conduzida como batelada alimentada com glicerol, adicionaram uma solução de sais basais e elementos traços, na fase de produção de biomassa. Eles observaram um aumento significativo na biomassa quando comparado ao controle. Na etapa de indução verificaram que a adição de casaminoácidos em concentrações de 0,1% (v/v) aumentou duas vezes a produção da proteína recombinante.

RAMCHURAN, et al. (2005) utilizaram metanol como única fonte de carbono durante a indução da síntese de uma termoxilanase e obtiveram 3 g L^{-1} da enzima com máxima atividade biológica de 3.130 U L^{-1} . Eles ainda sugerem que em meio com pH, aeração e taxa de alimentação controlados um aumento na concentração de proteína heteróloga extracelular pode ser conseguido, possibilitando sua utilização em processos de produção industrial. Trabalhando nessas condições a atividade biológica da enzima aumentou 200 vezes.

Durante a fase de produção de biomassa, a cultura requer oxigênio para oxidar o glicerol, assim vários autores, para garantir saturação com oxigênio adotaram um sistema de injeção contínua de oxigênio puro (CHEN et al.,1997; CHAUHAN et al., 1999; LEE, et al., 2003; DAMASCENO et al., 2004). ZANGH et al. (2005) utilizaram um sistema de aeração empregando dois reatores. O primeiro para crescimento da

levedura, de onde partia uma bomba peristáltica que conduzia, em um fluxo mais baixo, a cultura até o segundo reator, onde essa cultura era aerada por injeção de oxigênio puro e agitação mecânica, formando microbolhas. Desse segundo reator partia outra bomba peristáltica que conduzia o caldo de cultivo de volta ao primeiro reator. As microbolhas aumentavam a concentração de oxigênio dissolvido no meio, o que elevou mais de duas vezes a produtividade tanto da biomassa celular quanto da proteína, quando comparada ao sistema de agitação magnética.

Pichia pastoris suporta variações no pH de 3-7 com efeitos mínimos em sua velocidade de crescimento, entretanto, na etapa de indução o pH pode contribuir para aumentar a estabilidade de proteínas recombinantes por reduzir a atividade de proteases no sobrenadante mantendo as proteínas secretadas estáveis (HIGGINS, et al., 1998; CREGG, 1999; CEREGINO, et al., 2002; DAMASCENO, et al., 2004; ZHANG et al., 2004; CHOI, et al., 2005, XIE et al., 2005). O pH ótimo para manter a estabilidade da proteína varia de acordo com a proteína heteróloga de interesse secretada pelo sistema *Pichia*.

PENG, et al. (2004) verificaram que a produção de uma enteroquinase bovina (EK_L) expressa em *P. pastoris* foi maior quando utilizado o pH 6.0 na indução. Esses autores também testaram o efeito da adição de glicerol ou sorbitol durante a indução e verificaram que a concentração de proteína expressa era maior quando glicerol era adicionado em concentrações menores junto ao metanol para indução alcançando 350 mg.L⁻¹ e 250 mg.L⁻¹ quando adicionados glicerol e sorbitol respectivamente. Eles constataram que a adição de glicerol aumentava em 2.3 vezes a concentração de enteroquinase se comparada à produção quando somente metanol foi utilizado.

CHOI et al., 2005 sugerem que a manutenção das culturas de *Pichia* em pH 3,0 durante a indução com metanol normalmente estabiliza a proteína em seu estado final, o que foi constatado em experimentos anteriores realizados com irudina, que é um inibidor de protrombina. Essa estabilização ocorria porque a proteólise era minimizada em pH 3,0. no entanto, em seus experimentos, verificaram que maior produção de α -amilase era conseguida em pH 6,0. Esses autores adicionaram peptona e extrato de levedura durante a indução e observaram que a atividade de α -amilase aumentava 1.6 vezes em relação ao meio contendo somente metanol na indução.

A temperatura convencional para o crescimento de *Pichia pastoris* em diversos experimentos é de 30°C, mas uma temperatura mais baixa pode ser empregada também para reduzir a degradação proteolítica, além de reduzir a formação de agregados de proteínas mal-dobradas (BOETTNER et al, 2002; CEREGHINO et al., 2002; WITTAKER et al., 2004; DAMASCENO et al, 2004).

CHOI et al. (2005) investigaram o efeito da temperatura para a produção de α -amilase. Para isso, as células foram cultivadas e induzidas em várias temperaturas durante dois dias. As temperaturas testadas variaram de 24 a 34° C. Eles observaram que a maior biomassa era obtida com temperaturas de 26 a 28° C e que maior produção de α -amilase era obtida a 28° C, mostrando que a expressão desta proteína pode ser afetada pela temperatura.

Outra alternativa para aumentar a produtividade volumétrica da proteína, pode ser a imobilização da biomassa. Segundo ALTERIIS et al.(2004), a imobilização da biomassa pode favorecer sua reutilização, minimizando os custos no processo de produção. Ainda não há relatos na literatura de experiências com a imobilização de biomassa de *Pichia pastoris* recombinante com esse propósito. Essa alternativa pode ser investigada, pois uma eventual perda na eficiência de síntese pode ser compensada pela reutilização da biomassa.

Encapsulação em alginato de cálcio é um procedimento simples e de baixo custo, podendo ser controladas algumas características da partícula gelatinosa, que permitem, por exemplo, alterar sua densidade e permeabilidade a diferentes solutos, além de mudanças fisiológicas de interesse (SWAISGOOD e PASSOS, 1996; BLANDINO et al., 2000; CHAN et al., 2002).

SWAISGOOD e PASSOS (1996) imobilizaram células viáveis em alginato de cálcio para aumentar o número de células por unidades de volume de meio no biorreator operado em regime contínuo, permitindo desacoplar a taxa de diluição da velocidade de crescimento. A imobilização potencialmente restringe a atividade da célula e permite manter as células numa condição fisiológica desejada.

ALTERIIS et al. (2004) imobilizaram a biomassa de *Kluyveromyces lactis* recombinante em esferas de alginato de cálcio para produzir glicoamilase. As células foram cultivadas em reator em condições ótimas para obtenção de biomassa e em seguida imobilizadas. As células mostraram ser ativas mesmo após três meses estocadas

a 4°C sem perda significativa de sua atividade metabólica e o nível de produção de enzima foi inalterado durante os testes semanais. Eles sugerem, entretanto, que aeração nos reatores deve ser observada para otimizar a produção.

Condições fisiológicas vem sendo destaque na adaptação e melhoria do rendimento e produtividade de proteína recombinante por linhagens de *Pichia pastoris*. Devido à eficiência do sistema *Pichia* de expressão e a aplicabilidade tecnológica da estreptavidina, a levedura *Pichia pastoris*, linhagem KM71 fenótipo Mut^s, foi transformada no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da UFV com o gene da estreptavidina por inserção mediada por um plasmídeo integrativo pPIC9/Stp. DAMASCENO (2001) demonstrou que essa levedura apresenta produção da proteína heteróloga em 24 horas de indução, sendo que um maior acúmulo pode ser verificado após 96 horas de indução, com subsequente redução da expressão até o tempo de 144 horas.

Apesar do sucesso na transformação e expressão da proteína, as concentrações obtidas não alcançaram as expectativas relatadas para o sistema *Pichia* de expressão. É importante ser realizado um estudo abordando as etapas do processo de cultivo da linhagem *Pichia pastoris* KM71/Stp, para determinar estratégias de produção de biomassa e expressão de estreptavidina. Estes conhecimentos podem contribuir ainda, para o estabelecimento das condições ótimas de produção em *Pichia pastoris* de demais proteínas de interesse da pesquisa, que atualmente são alvos da cristalografia e análise estrutural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Pichia pastoris* recombinante, condições de cultivo e manutenção

As células das leveduras *Pichia pastoris* KM71/ Stp e seu controle, *P. pastoris* KM71/pPIC9, transformadas anteriormente por Damasceno (2001), tiveram seus genótipos confirmados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cujo programa de amplificação foi realizado como descrito por DAMASCENO (2001) e foram cultivadas em meio YPD [1% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glicose]. Posteriormente, foram mantidas a -80° C para utilização.

3.2. Ativação e condições de cultivo do pré-inóculo

O meio BMG [1,34 % (v/v) Yeast Nitrogen Base, 100 mM tampão fosfato de potássio, (pH 5.0); 4×10^{-5} % (v/v) de biotina e glicerol nas concentrações a serem testadas] foi utilizado para ativar as culturas recombinante (*P. pastoris* KM71/Stp) e seu controle (*P. pastoris* KM71/pPIC9) a fim de determinar o efeito do glicerol na produção de biomassa. O meio de Sais Basais suplementado com elementos traços (PTM1), como descrito por DAMASCENO, et al. (2004), foi utilizado na batelada alimentada durante a fase de produção de biomassa. No cultivo em batelada alimentada, foram estudadas aeração, fluxo de alimentação e agitação. Todas as etapas de cultivo para obtenção de biomassa foram realizadas em pH 5 e temperatura de 25° C. Uma colônia foi utilizada para inocular um erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio BMG com 0,27 M de glicerol. A cultura permaneceu incubada por 12 horas sob agitação orbital de 250 rpm, a uma temperatura de 25° C.

Células foram estriadas em placa contendo meio YPD ágar e incubadas por 24 horas a 25 °C até o aparecimento das colônias. Uma colônia foi utilizada para inocular um erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio BMG com 0,27 M de glicerol. A cultura permaneceu incubada por 12 horas sob agitação orbital de 250 rpm e temperatura de 25 °C. Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo para erlenmeyers com capacidade volumétrica de 250 mL contendo 50 mL de meio BMG com concentrações variáveis de glicerol.

3.3. Determinação do efeito da concentração inicial de células, de glicerol e do fluxo de alimentação na produção de biomassa

Foram utilizadas as concentrações de: 0,03; 0,05; 0,11; 0,13; 0,27 e 0,40 moles L⁻¹ de glicerol para definir a velocidade de crescimento e concentrações de: 0,67; 1,07; 1,34; 1,62; 2,0 e 2,67 moles L⁻¹ de glicerol para verificar a ocorrência de inibição por substrato, e assim, definir o modo de operação do biorreator. A concentração que permitiu alcançar maior biomassa ao final de 24 horas de cultivo foi utilizada para construir a curva da cinética de crescimento da levedura. A curva permitiu calcular os fluxos de alimentação a serem testados, considerando para isso, a velocidade de crescimento igual à taxa de diluição e calculando pela equação $D = F/V$ (onde, D é a taxa de diluição em h⁻¹, F é o fluxo em L h⁻¹ e V o final em L).

A fim de definir o modo de operação do reator na etapa de produção de biomassa foram testadas três variáveis: fluxo de alimentação, agitação e concentração de glicerol. A alimentação foi realizada em todos os experimentos até atingir o volume interno de 400 mL. Para isso, *P. pastoris* KM71/Stp inicialmente pré-cultivada em erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 50 mL de meio BMG, com 0,67 moles L⁻¹ de glicerol, foi incubada sob agitação orbital de 250 rpm e 25° C por 12 horas. Esses 50 mL de cultivo foram utilizados para inocular o reator com capacidade volumétrica de 1 L contendo como volume de trabalho 200 mL do mesmo meio da pré-cultura. A concentração inicial foi A₆₀₀ 0,2, esse valor equivale a 0,36 g L⁻¹ de células da levedura.

Antes de testar os fluxos escolhidos a partir da curva de crescimento, foi preliminarmente verificada qual deveria ser a concentração de células para iniciar a

alimentação. Na literatura, vários autores utilizam a concentração inicial para alimentação igual a $A_{600} 20$. A fim de verificar se essa também seria a condição de maior produtividade na obtenção de biomassa, células de *P. pastoris* recombinante foram pré-cultivadas em reatores de 1 L com 200 mL de BMG e então alimentadas com concentrações de 0,67; 1,34 e 2,0 moles L^{-1} de glicerol. Foram testadas concentrações iniciais de células correspondentes a $A_{600} 20$, 40 e 60, com 24 horas. A concentração de $A_{600} 20$ era obtida em um único erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio BMG e 0,67 moles L^{-1} de glicerol, com 24 horas de cultivo. As concentrações de $A_{600} 40$ e 60 foram obtidas cultivando a levedura em dois e três erlenmeyers respectivamente, de mesma capacidade e volume utilizado para o cultivo até $A_{600} 20$ já descrito. A combinação da concentração de 0,67 moles L^{-1} de glicerol com a biomassa inicial que exibiu $A_{600} 20$ foram as condições selecionadas para iniciar a alimentação

A escolha do fluxo de alimentação foi feita pela curva de crescimento da levedura na concentração de maior biomassa (0,67 moles L^{-1}). Pela curva foram identificadas três regiões de maior crescimento e estas foram utilizadas para determinar os fluxos a serem testados calculados pela equação $D=F/V$. Foram testados os três fluxos de alimentação pré-determinados 0,11; 0,22 e 0,5 $mL\ min^{-1}$, concomitante com diferentes concentrações de glicerol: 1,07; 1,34; 2,0 e 2,67 moles L^{-1} . Essas concentrações de glicerol foram escolhidas por serem as maiores que 0,67 moles L^{-1} avaliadas nos testes preliminares. E que poderiam garantir a reposição do glicerol consumido pelas células à medida que a cultura fosse alimentada. Ao final da alimentação, as duas concentrações de glicerol e os dois fluxos que permitiram maior biomassa foram escolhidos para serem testados com uma outra variável, a aeração, que foi obtida por injeção de ar e por agitação magnética.

3.4. Efeito do sistema de aeração e agitação na produção de biomassa

P. pastoris KM71/Stp e controle foram cultivadas por 12 h sob agitação orbital de 250 rpm e 25° C em 50 mL de meio BMG com 0,67 M de glicerol em Erlenmeyer com capacidade para 250 mL (como citado no item 3.2.2 de Material e Métodos). Essa cultura foi então inoculada em um reator Wheaton® com capacidade de 1 L contendo 150 mL do mesmo meio. No reator foram testados dois sistemas de aeração: o primeiro

utilizando uma mangueira de silicone repleta de orifícios na parte localizada no interior do reator; e o segundo utilizando uma mangueira de silicone sem orifícios, aderida à parede interna do reator e contendo, na sua extremidade, uma pedra porosa. O processo de aeração adotado nos demais experimentos foi aquele utilizando a pedra porosa. Foram estudadas duas velocidades de agitação: 250 e 500 rpm, para verificar o efeito sobre a biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp. As células foram então cultivadas utilizando o sistema com pedra porosa, no reator com capacidade de 1L, com 200 mL de meio BMG com 0,67 moles L⁻¹ de glicerol e A₆₀₀ inicial de 0,2. A cultura foi alimentada com fluxos de: 0,11 e 0,22 mL min⁻¹, com o meio de sais basais e PTM1 contendo glicerol nas concentrações de 1,34 e 2,0 moles L⁻¹ até atingir um volume interno de 400 mL. Esse volume final foi definido por ser o volume máximo que o reator comportava permitindo aeração, já que compreende metade da capacidade total do frasco. A combinação desses fatores: fluxo de alimentação, concentração de glicerol, agitação e aeração, foi investigada na busca pela melhor estratégia de operação do biorreator na etapa de obtenção de biomassa, que foi posteriormente induzida à síntese de estreptavidina.

3.5. Indução da síntese de estreptavidina

Ao atingir o volume de 400 mL de cultura no reator, a alimentação foi interrompida e a biomassa centrifugada a 9000 rpm e 4° C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, a biomassa lavada duas vezes e ressuspendida em 200 mL de água peptonada 0,01 % (p/v) . Esses 200 mL foram distribuídos em dois tubos de centrifuga previamente pesados, de modo a se obter 100 mL em cada um deles. A biomassa de um dos tubos foi centrifugada e ressuspendida em uma solução de alginato de sódio autoclavada na concentração de 1 grama de alginato para cada 4 gramas de células. As células foram imobilizadas em esferas de gel de alginato de aproximadamente 1-1,5 mm de diâmetro formadas pelo gotejamento da solução de alginato de sódio contendo as células, em uma solução de cloreto de cálcio 2 % (p/v) como proposto por Jordão et al. (2001). As partículas esféricas permaneceram nessa solução por 1 hora a 4° C para que adquirissem consistência. A biomassa do segundo

tubo de ensaio permaneceu em água peptonada nas mesmas condições, isto é, 1 hora em geladeira a 4° C.

Para a indução da síntese de estreptavidina pelas células imobilizadas foi montado no reator um sistema de aerar através de duas pedras porosas aderidas no fundo do reator de modo a aerar e ao mesmo tempo agitar as esferas. As esferas eram impelidas através do ar. Essa estratégia foi adotada porque as esferas de alginato foram destruídas pela barra magnética do reator em testes preliminares, e assim a agitação pela barra magnética foi feita somente para as células livres. Entretanto, a aeração pode ter sido menor no sistema imobilizado.

Para iniciar a indução as esferas de gel de alginato formadas foram inoculadas no biorreator contendo 400 mL de meio BMM modificado [1,34 % (v/v) de Yeast Nitrogen Base; 1 M tampão citrato de sódio (pH 3.0); 4×10^{-5} % (v/v) biotina e metanol para concentração final de 0,5 % (v/v)]. Esse meio foi modificado, pois o tampão antes utilizado (tampão fosfato) provocava a degradação das esferas de alginato e por esse motivo, foi substituído pelo tampão citrato de sódio. A cada 24 horas, 2 mL do sobrenadante da cultura em indução foram amostrados e metanol adicionado para uma concentração final de 0,5% (v/v) (Damasceno, 2001). Aliquotas de 2 mL amostradas a cada 24 horas por um período de 144 horas foram centrifugadas; o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado para as análises de proteína total e ligação com avidina. Ao final da primeira batelada de indução as células imobilizadas foram lavadas com água peptonada e deixadas por 24 horas em cloreto de cálcio, para que mantivessem a estabilidade estrutural. O cloreto de cálcio foi descartado e as partículas ressuspensas em outros 400 mL de meio BMM com concentração final de 0,5% (v/v) de metanol. Essa etapa foi realizada nas duas reutilizações das partículas esféricas contendo *P. pastoris* recombinante.

A indução das células livres em suspensão foi feita utilizando o meio BMG com os mesmos constituintes que o meio empregado para as células imobilizadas. No entanto, o reator utilizado continha uma pedra porosa e uma barra magnética para agitar a solução. As amostras foram coletas como detalhado para as células imobilizadas e ao final da primeira e segunda batelada de indução da biomassa suspensa, o meio de cultivo com as células foi centrifugado e o sedimento lavado com água peptonada e

estocado por 24 horas a 4° C. Após esse período o sedimento ressuspendido em meio BMM com 0,5% (v/v) de metanol e realizadas as reutilizações da biomassa suspensa.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Determinação da concentração de biomassa

Células da linhagem *P. pastoris* KM71/Stp foram ativadas em 10 mL de meio YNB (Yeast Nitrogen Base) e incubadas a 250 rpm e a 25° C por aproximadamente 12 horas. Após esse período, essa pré-cultura foi inoculada em 100 mL do mesmo meio, resultando uma A_{600} inicial de 0,1 e incubado nas mesmas condições citadas. Ao completar 14 horas de cultivo as células foram centrifugadas a 5000 rpm, por 5 minutos, a 15° C. Posteriormente as células foram lavadas e ressuspendidas em 6 mL de água destilada, 4 alíquotas de 1 mL foram colocadas em cadinhos na estufa a 105° C por 24 horas e após esse período pesados. Concomitantemente foram diluídas três alíquotas de 300 μ L a partir dos 2 mL restantes, acrescentando 2,7 mL de água destilada. A partir dessa diluição foram feitas novas diluições partindo de 1×10^{-2} até 6×10^{-2} , nas quais foram medidas as absorvâncias a 600 nm. Uma curva padrão A_{600} pelo peso seco em mg.mL^{-1} , fatorado com a respectiva diluição, foi construída (Apêndice B). Pela regressão linear dos dados foi determinado o valor que 1 (uma) unidade A_{600} corresponde em mg.mL^{-1} .

3.6.2. Proteínas totais e gel poliacrilamida (SDS-PAGE)

A concentração de proteína total em amostras do sobrenadante das culturas na fase de indução foi avaliada periodicamente com intervalos de 24 horas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Proteínas totais de amostras do sobrenadante de 2 mL das culturas na fase de indução foram precipitadas com 10% (v/v) de ácido tricloroacético, e centrifugadas a 8000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 0,3 mL de acetona gelada. Nova centrifugação foi feita e o precipitado seco à temperatura ambiente foi

ressuspendido em tampão de amostra para SDS-PAGE. O gel SDS-PAGE foi realizado como proposto por PÄHLERT, et al. (1987).

3.6.3. Análise funcional da estreptavidina recombinante

Para a análise da capacidade de ligação da estreptavidina em biotina, e assim verificar sua atividade, foram construídas colunas de sílica biotinizadas como descrito por JANOLINO, 1996.

A funcionalidade da estreptavidina recombinante produzida foi determinada pela capacidade de se ligar à molécula de biotina presente na sílica biotinizada. O princípio do método baseia-se no deslocamento de estreptavidina ligada ao reagente HABA (Ácido-2'-hidroxiaminobenzeno-4'-carboxílico; PIERCE®) pela biotina presente nas partículas de sílica. A biotina compete com o HABA pela ligação à estreptavidina, no entanto, a afinidade de biotina por estreptavidina é maior que a afinidade do HABA. Assim, as partículas de sílica biotinizadas ao serem adicionadas em solução deslocam a estreptavidina do HABA e esse deslocamento é medido por uma redução no valor da absorvância lida previamente para o complexo HABA-estreptavidina. Para a realização do teste, as colunas foram preparadas e grupamentos amino da sílica biotinizados. O grau de biotinilação foi determinado, e posteriormente avaliada a ligação das moléculas de estreptavidina às partículas de sílica biotinizadas. Foram preparadas três colunas biotinizadas para analisar a atividade da estreptavidina produzida pelas células em suspensão, imobilizadas em alginato de cálcio e cultura controle (sem estreptavidina). O preparo e derivatização das partículas de sílica seguiram os procedimentos descritos por JANOLINO et al. (1996).

Uma solução de sulfosuccinimidil-6-(bioninamido) hexanoato (NHS-LC-biotina - PIERCE®) 5 mg.mL⁻¹ foi preparada em tampão de 50 mM bicarbonato de sódio, pH 8,5. Essa solução biotinizadora foi recirculada em uma coluna contendo as partículas de sílica aminopropil (PIERCE®), a 4° C por 20 horas, utilizando uma bomba peristáltica. Após esse tempo o reagente NHS-LC-biotina foi drenado da coluna, e as partículas de sílica lavadas extensivamente com uma solução de 50 mM de tampão fosfato, pH 7,0, contendo 0,02% (p/v) de azida sódica. As partículas de sílica biotinizadas foram mantidas nessa solução tampão a 4° C até o momento de uso.

Para determinar o grau de biotilação das partículas de sílica, foram seguidos os procedimentos descritos por JANOLINO et al. (1996). Amostras do sobrenadante das culturas em suspensão (células livres), imobilizada e controle no tempo de 96 horas, foram re-circulados pelas colunas de sílica biotilada, por 18 horas a 4 °C. Inicialmente, foram misturados 25 µL do reagente HABA com 1 mL de uma solução de avidina 0,5 mg mL⁻¹ registrando-se a absorvância inicial (A₁) a 500 nm. Adicionou-se, então, 50 µL de partículas de sílica biotiladas, pela qual foi re-circulado o sobrenadante da indução de cada cultura. Após 5 minutos, centrifugou-se a solução e o sobrenadante foi submetido à leitura da A₅₀₀ (A₂). A diferença entre A₁ e A₂, corresponde ao deslocamento de avidina do reagente HABA pela biotina imobilizada nas partículas. A concentração de biotina imobilizada, em µmol de biotina por mL de partículas, empregando a equação:

$$\begin{aligned} \mu\text{mol biotina/mL partículas} &= \frac{[(A_1 - A_2) \times 1,025]}{34 \times 0,05}, \text{ assim:} \\ &= 0,603 \times (A_1 - A_2), \text{ onde:} \end{aligned}$$

- 1,025 é o volume total em mL, da solução;
- 34 é a absorvitividade milimolar do complexo avidina-HABA;
- 0,05 é o volume em mL, de partículas biotiladas adicionado;
- A₁ é a absorvância medida a 500 nm antes da adição das partículas;
- A₂ é a absorvância medida a 500 nm após adição das partículas.

Outro teste com o reagente HABA foi realizado para detectar se estreptavidina era secretada pelas culturas recombinantes. O teste demonstra deslocamento de estreptavidina recombinante e avidina do reagente HABA (ácido 2 - hidroxiazobenzeno- 4 -carboxílico) após adição de partículas de sílica biotiladas. Dois controles além da linhagem sem o gene da estreptavidina foram utilizados, a água (controle negativo) e avidina (controle positivo). HABA em contato com estreptavidina (ou avidina) interage exibindo uma coloração alaranjada. Partículas de sílica biotiladas e adicionadas, competem com o HABA pela ligação à estreptavidina e seqüestram a mesma, que se desliga do HABA e a coloração reduz para amarelo-alaranjado.

3.7. Determinação da concentração de estreptavidina ativa

Para quantificar a estreptavidina presente no sobrenadante da cultura de *P. pastoris* KM71/Stp uma curva padrão de avidina foi construída (Apêndice C), como proposta por JANOLINO, 1996. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante das culturas induzidas foram misturados a 50 μL de HABA. Essa mistura reagiu por 5 minutos à temperatura ambiente e a absorvância a 500nm A_{1S} foi medida. Nessa reação foi adicionado 50 μL de biotina, a mistura reagiu por 5 minutos à temperatura ambiente, foi centrifugada e leu-se a A_{2S} . O valor de $A_{1S} - A_{2S}$ forneceu a variação ΔA_S . Essa variação foi utilizada na equação linear da curva padrão de avidina para calcular a concentração de estreptavidina presente no sobrenadante das culturas de indução. Os valores foram obtidos em $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Pichia pastoris* recombinante, confirmação genotípica

Os genótipos das leveduras transformantes *P. pastoris* KM71/Stp (com o gene para a expressão de estreptavidina) e *P. pastoris* KM71/pPIC9 (controle, sem o gene para a expressão de estreptavidina) foram inicialmente confirmados por extração do DNA total seguido de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos específicos para a seqüência codificadora do *core* da estreptavidina. O resultado dos produtos do PCR em gel de agarose é apresentado na Figura 1. Pelo padrão de bandas apresentado no gel foi possível comprovar que o DNA da levedura demonstrado na canaleta 2, apresentou uma banda de aproximadamente 350 pares de base correspondente ao gene truncado da estreptavidina. A linhagem *P. pastoris* KM71/pPIC9, mostrou ser apropriada como controle pela ausência do gene para estreptavidina (canaleta 3).

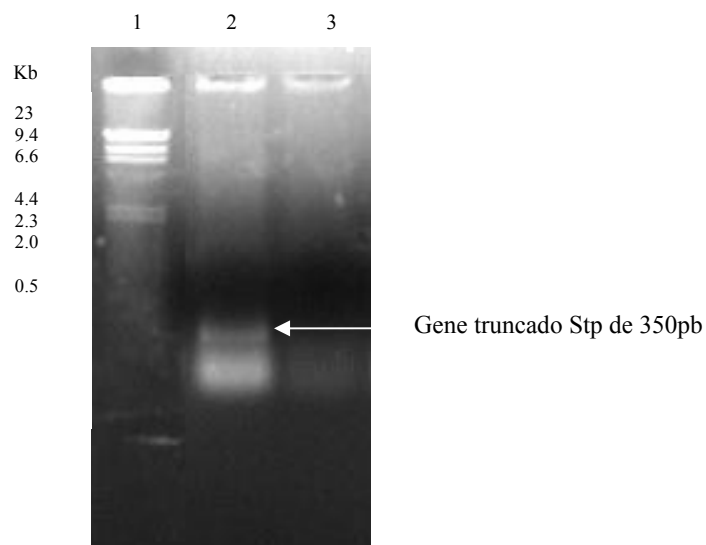


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do DNA, produto de PCR, do genoma de *Pichia pastoris* KM71 com os oligonucleotídeos CORESTP-F e CORESTP-R. 1: DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição *Hind* III. 2: DNA total de *P. pastoris* KM71/Stp. A banda corresponde ao gene truncado da estreptavidina da linhagem de *P. pastoris* KM71/Stp. 3: *P. pastoris* KM71/pPIC9, sem o gene da estreptavidina.

4.2. Determinação do efeito da concentração inicial de células, de glicerol e do fluxo de alimentação na produção de biomassa

A produção de biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp no meio BMG em concentrações de glicerol que variaram de 0,03 a 2,67 moles L⁻¹, (Apêndice A) após 24 horas de cultivo, quando a cultura atingiu a fase estacionária é apresentada na Figura 2. A concentração máxima de biomassa foi obtida com 0,67 moles.L⁻¹ de glicerol. A redução na concentração de biomassa, quando a concentração no meio de cultivo foi maior que 0,67 moles L⁻¹ apresenta inibição por substrato e o emprego de batelada alimentada para obtenção de biomassa, a fim de introduzir glicerol na cultura à medida que a biomassa aumenta.

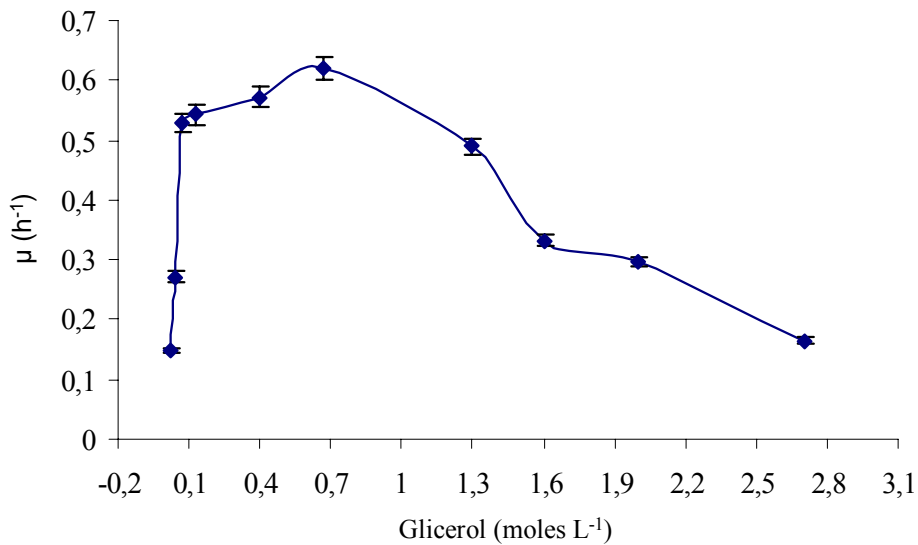


Figura 2: Velocidade específica de crescimento (μ) de *P. pastoris* KM71/Stp em função da concentração de glicerol a partir de uma cultura de 24 horas de cultivo em BMG. Cada ponto na curva representa a média de três repetições.

A Figura 3 mostra a curva de crescimento de *P. pastoris* KM71/Stp em meio BMG com 0,67 moles L⁻¹ de glicerol. Os fluxos de alimentação para a batelada alimentada foram selecionados a partir das velocidades de crescimento (μ), em três diferentes etapas de crescimento. A taxa de diluição escolhida foi igual a velocidade de crescimento e o fluxo de alimentação igual à taxa de diluição dividida pelo volume inicial da cultura. Para cada uma das etapas escolhidas. Verifica-se que após a fase exponencial de crescimento máximo, a população desacelera o crescimento. Foram selecionados três fluxos de alimentação que permitira maior biomassa ao final de 24 horas: 0,11 mL min⁻¹; 0,22 mL min⁻¹ e 0,5 mL min⁻¹.

Em vários trabalhos na literatura, a fase de alimentação é iniciada após a cultura atingir uma concentração de biomassa equivalente $A_{600} 20$. A fim de verificar se essa também seria a condição de maior produtividade na obtenção de biomassa, células de *P. pastoris* recombinante foram pré-cultivadas em reatores de 1 L com 200 mL de BMG e então alimentadas com concentrações de 0,67; 1,34 e 2,0 moles L⁻¹ de glicerol. Foram testadas concentrações iniciais de células correspondentes a $A_{600} 20$, 40 e 60, com 24 horas. A concentração de $A_{600} 20$ crescendo em 0,67 moles L⁻¹ de glicerol foram as

condições selecionadas para iniciar a alimentação, por permitirem maior ganho de biomassa ao final de 24 horas.

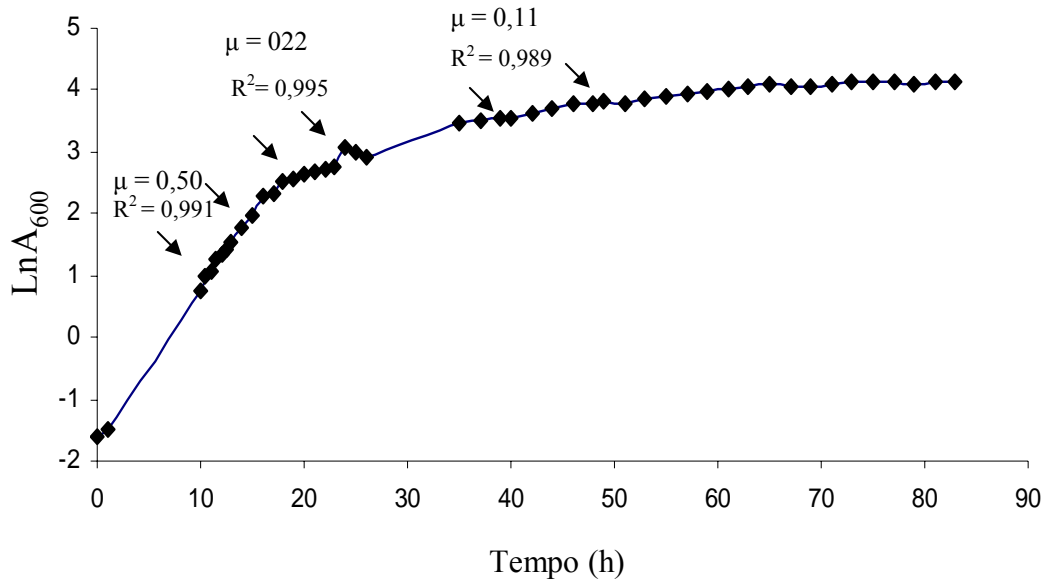


Figura 3: Cultura em batelada de *P. pastoris* KM71/Stp em meio BMG com 0,67 moles. L⁻¹ de glicerol. As velocidades de crescimento indicadas foram consideradas na determinação dos fluxos da batelada alimentada pela equação $D(\mu) = F/V$. As setas apontam os intervalos utilizados para determinar as velocidades de crescimento.

Uma cultura da levedura recombinante foi conduzida em reator, com inóculo inicial correspondente a A_{600} 0,2 até atingir a A_{600} 15 e então alimentada com meio de sais e PTM1, com os fluxos de 0,11; 0,22; e 0,5 mL min⁻¹ e concentrações finais de 1,06; 1,34; 2,0; e 2,67 moles L⁻¹ de glicerol. Os resultados apresentados na Tabela 1, demonstraram que ao final da alimentação, as combinações de fluxos 0,11 e 0,22 mL min⁻¹ e as concentrações de glicerol de 1,34 e 2,0 moles L⁻¹, resultaram no maior ganho de biomassa. Essas condições foram selecionadas para avaliar o efeito da aeração e agitação na produção de biomassa final.

Tabela 1: Ganho em massa de *P. pastoris* KM71/Stp obtida por batelada alimentada a partir de uma cultura de 24 horas em meio BMG com A_{600} de aproximadamente 20 ($36,38 \text{ g L}^{-1}$). A alimentação foi realizada com meio de sais e glicerol até o volume final de 400 mL.

Glicerol (moles L^{-1})	Fluxo (mL min^{-1})	Ganho em biomassa (mg mL^{-1})
1,06	0,11	9,95
1,34	0,11	15,38
2,0	0,11	59,8
2,67	0,11	24,41
1,06	0,22	18,3
1,34	0,22	30,23
2,0	0,22	15,03
2,67	0,22	12,92
1,06	0,50	9,12
1,34	0,50	6,16
2,0	0,50	11,05
2,67	0,50	7,79

4.3. Efeito da aeração e agitação na produção de biomassa em batelada alimentada

As duas concentrações de glicerol e dois fluxos de alimentação pré-determinados foram selecionados para analisar o efeito da aeração e agitações de 250 e 500 rpm.

Reatores com capacidade de 1 L, contendo 200 mL do mesmo meio foram inoculados com células para obter uma A_{600} inicial de 0,2 e incubados até a cultura alcançar $A_{600} = 20$ (36,38 g L⁻¹). Concentrações de glicerol de 1,34 moles L⁻¹ e 2,0 moles L⁻¹, combinadas com fluxos de 0,22 mL min⁻¹ e 0,11 mL min⁻¹ e agitação de 250 e 500 rpm foram avaliados.

A biomassa máxima obtida expressa como peso seco foi de 150 g L⁻¹ para alimentação com fluxo de 0,11 mL min⁻¹, com 2,0 moles L⁻¹ de glicerol e com agitação magnética em torno de 500 rpm (Tabela 2). Esta combinação da agitação e aeração com o fluxo de alimentação favoreceu consideravelmente a formação de biomassa da levedura, que mostrou ser limitada não somente pela concentração de glicerol, mas principalmente pela aeração. Este método de cultivo e aeração mostrou-se mais eficiente quando comparado aos experimentos de ZANGH, et al. (2005). Esses autores utilizaram um dispersor de microbolhas como um reator secundário utilizado para aerar o meio. No entanto, a biomassa obtida por aqueles autores foi de 137 mg mL⁻¹. Apesar de utilizarem aparatos mais complexos e onerosos, o valor de biomassa obtido por eles não supera os encontrados no presente trabalho, cujo dispositivo de aerar foi uma simples pedra porosa.

O processo de cultivo em batelada alimentada com meio de sais e glicerol sugerido neste trabalho mostrou-se melhor do que o sistema utilizado por DIGAN et al. (1989), que utilizaram um sistema de cultivo de batelada alimentada e cultura contínua com glicerol obtendo 120 mg mL⁻¹ e 100 mg mL⁻¹ de biomassa respectivamente.

Com os experimentos aqui realizados, foi possível alcançar uma alta concentração de biomassa, após a ativação em BMG com a posterior alimentação, realizada diretamente no reator. Assim, as etapas sugeridas por Damasceno, et al. (2004) iniciando pela ativação das células de *Pichia* em meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) e posterior cultivo em BMG como etapas prévias ao inóculo no reator, podem ser substituídas por apenas uma etapa de ativação seguida pela inoculação no reator,

contribuindo para aumentar a produtividade neste trabalho. Além disso, a biomassa de 150 g L^{-1} , foi obtida em reator com meio mínimo, injeção de ar e agitação, incluindo alimentação, enquanto resultados comparáveis (170 mg mL^{-1}) apresentados por Damasceno, et al. (2004), foram obtidos em um reator em batelada, mantendo taxas constantes de oxigênio puro com 30% de saturação e alta agitação.

Tabela 2: Biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp (g L^{-1}) obtida a partir de uma cultura em meio BMG, com A_{600} inicial de aproximadamente 20 ($36,38 \text{ g L}^{-1}$) e alimentada com meio de sais e glicerol, sob aeração (injeção e dispersão de ar com o auxílio de pedra porosa na extremidade do tubo de aeração) e agitação magnética. O volume final de 400 mL foi atingido no reator.

Glicerol (moles L^{-1})	Agitação (rpm)	Biomassa (g L^{-1})	
		Fluxo $0,11 \text{ mL min}^{-1}$ (33 horas)	Fluxo $0,22 \text{ mL min}^{-1}$ (16 horas)
1,34	250	* $X_1 = 30,77$	* $X_1 = 31,85$
		$X_2 = 68,78$	$X_2 = 46,87$
	500	$X_1 = 30,77$	$X_1 = 31,85$
		$X_2 = 72,4$	$X_2 = 65,88$
2,0	250	$X_1 = 43,62$	$X_1 = 36,38$
		$X_2 = 118,5$	$X_2 = 96,40$
	500	$X_1 = 47,06$	$X_1 = 38,01$
		$X_2 = 150,0$	$X_2 = 107,6$

* X_1 e X_2 referem-se à biomassa (g L^{-1}) inicial e final respectivamente.

4.4. Produção de estreptavidina por *P. pastoris* recombinante

A biomassa total (150 g L^{-1}) obtida sob as condições pré-selecionadas, isto é, alimentação com meio de sais e PTM1 contendo $2,0 \text{ moles L}^{-1}$ de glicerol, agitação de 500 rpm e aeração por dispersão através de pedra porosa, foi utilizada para a síntese de estreptavidina, na forma livre em suspensão ou na forma imobilizada em partículas esféricas de alginato de cálcio. O perfil da proteína extracelular é mostrado na figura 4.

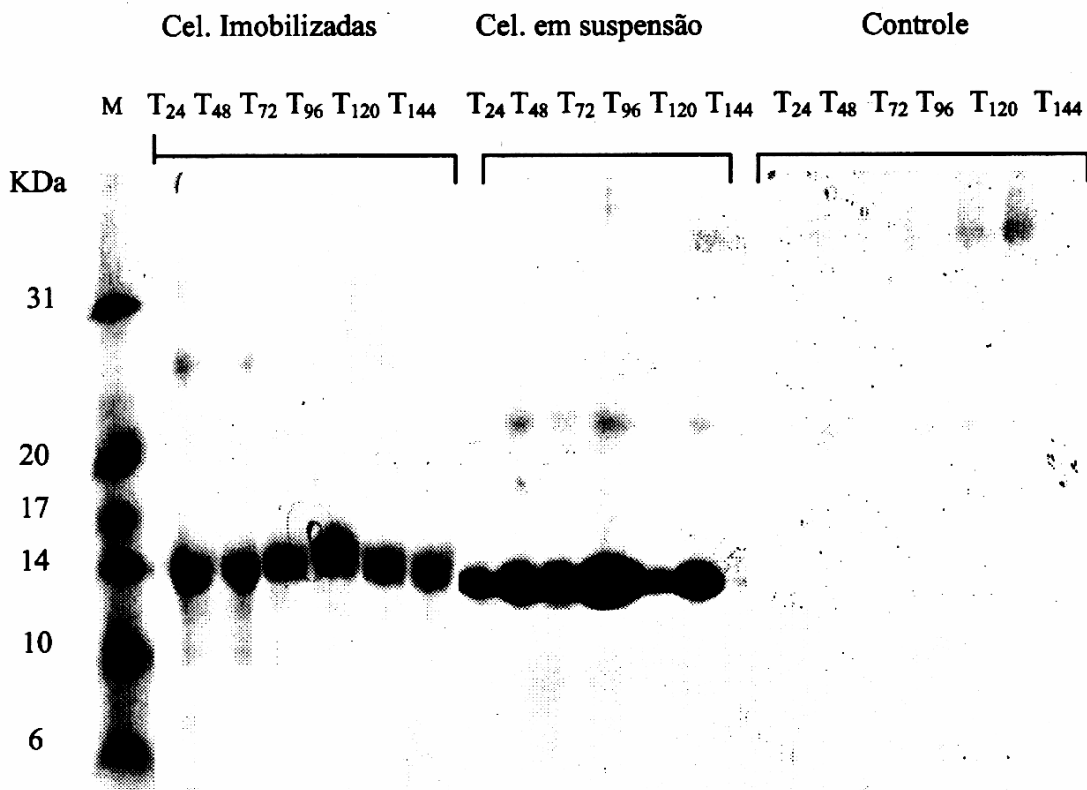


Figura 4: Gel de eletroforese SDS- PAGE do sobrenadante da biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp e KM71/pPIC9 (controle), submetida à indução pela adição diária de metanol para uma concentração de 0,5% (v/v). Padrão de bandas de aproximadamente 14 kDa referente a estreptavidina na primeira utilização da biomassa em suspensão ou imobilizada em partículas esféricas de (~ 1,5 mm) produzida sob batelada alimentada e induzida com metanol após vários tempos (T₂₄ a T₁₄₄ horas) de indução. M: marcador de baixo peso molecular.

Em ambos os tratamentos (células imobilizadas e em suspensão) verificou-se a produção de estreptavidina, como pode ser visto pelas bandas de aproximadamente 14

kDa referente à estreptavidina no gel. Para a linhagem controle, transformada com o plasmídeo pPIC9, não foram observadas bandas, o que confirma a proteína como produto do gene clonado na linhagem estudada, enquanto afirma a ausência ou baixa concentração de proteínas no meio extracelular.

Não foi avaliado o efeito da concentração de metanol no processo de indução, assim a concentração de metanol [0,5% (v/v)] utilizada neste trabalho, foi escolhida com base em dados na literatura (HIGGINS, 1998; DAMASCENO, et al., 2004) que afirmam ser essa concentração a mais efetiva para indução da biomassa em valores próximos a 100 mg mL^{-1} de células de *P. pastoris* para produção de proteína.

A produção extracelular de estreptavidina pôde ser detectada já com 24 horas de indução, e atingindo a concentração máxima em 96 horas de indução. Em seguida ocorreu uma redução até as 144 horas como também constatado por DAMASCENO, (2001) para a proteína A33scFv e por PENG, et al. (2005) na produção de enteroquinase bovina por *P. pastoris*. A diluição do meio pela adição manual de metanol, durante a indução, não deve ser considerada como fator na redução da concentração de proteína, uma vez que a adição foi de cerca de 2 mL para 400 mL de meio, o que eleva o volume cerca de 0,5 %.

Outros autores constataram uma redução na produção de proteínas heterólogas após 96 horas de indução e sugeriram algumas explicações para essa observação, incluindo: o efeito de proteases no sobrenadante da cultura; o possível efeito tóxico do metanol sobre as células, inibindo a expressão de estreptavidina; a expressão intracelular de estreptavidina em baixos níveis, devido ao seqüestro da biotina produzida afetando a atividade das células (DAMASCENO, et al., 2004; ZANGH, et al., 2004; KIM, et al., 2005; PENG, et al., 2005). Nenhuma dessas hipóteses foram, até então, investigadas. Apesar da fase de indução ter sido realizada em pH 3,0 e em baixa temperatura, para reduzir o efeito de proteases, ainda assim, algumas proteases podem estar ativas no meio de indução. Assim, o tempo de 96 horas foi comprovado aqui como o de maior acúmulo de estreptavidina.

Foi observado o aumento de $55,9 \text{ g L}^{-1}$ na biomassa de *Pichia pastoris* durante a fase de indução das células livres, indicando a capacidade das células metabolizarem metanol como fonte de carbono para crescimento (Figura 5). Esse aumento na biomassa de *Pichia pastoris* durante a fase de indução já foi reportado em vários trabalhos

(DAMASCENO, et al., 2004; ZANGH, et al., 2004; XIE, et al. 2005). DAMASCENO, et al. (2004) constataram um aumento da biomassa de *Pichia pastoris* na fase de produção da proteína recombinante em 260 mg mL^{-1} ao final da indução, possivelmente pela indução contínua com meio de sais e metanol durante a indução, permitindo assim maior ganho em massa de *P. pastoris*. O aumento na biomassa sugere que um ajuste na concentração de metanol poderia aumentar a expressão das proteínas nos tempos posteriores a 96 horas.

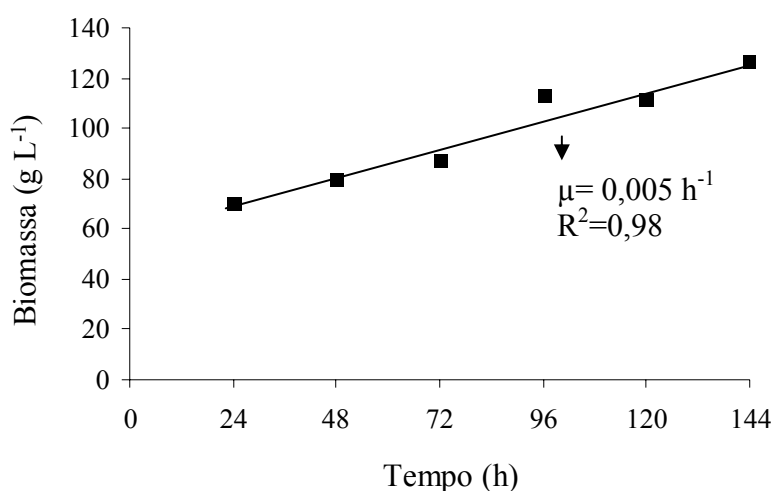


Figura 5: Ganho de biomassa de *P.pastoris* KM71/Stp durante a fase de indução da síntese de estreptavidina pela adição de metanol a cada 24 horas na cultura de células livres.

As células em suspensão produzem mais proteínas recombinantes que as células imobilizadas, pelas limitações de difusão de substratos e produtos inerentes do sistema (Swaisgood, et al., 1996). Foram observadas células livres no sistema imobilizado no final da indução ($0,69 \text{ g L}^{-1}$), provavelmente, devido ao desprendimento das células imobilizadas, em consequência do crescimento entre os poros da matriz.

A concentração de proteínas totais de amostras da suspensão sob indução de células livres e imobilizadas (Figura 6), mostra um maior acúmulo de proteínas em 96 horas de indução e redução da produção após esse tempo.

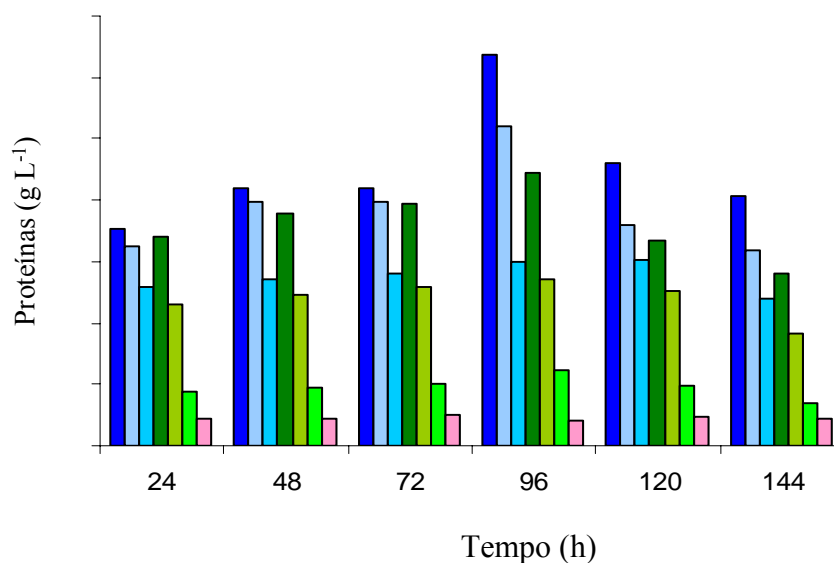


Figura 6: Concentração de proteína total no sobrenadante das culturas de *P. pastoris* KM71/Stp livres e imobilizadas após indução por metanol 0,5% (v/v). ■ Célula livre, primeira utilização. ■ Célula livre, segunda utilização. ■ Célula livre, terceira utilização. ■ Célula imobilizada, primeira utilização. ■ Célula imobilizada, segunda utilização. ■ Célula imobilizada, terceira utilização. ■ Controle: *P. pastoris* KM71/pPIC9.

As biomassas de *P. pastoris* KM71/Stp livre e imobilizada, foram reutilizadas duas vezes, mantendo o perfil de concentração de proteínas no sobrenadante do meio de indução, mas com uma perda de 30% no tempo de máxima concentração de proteínas (96 horas) na primeira utilização. A Figura 7 apresenta a concentração de estreptavidina no tempo de 96 horas de indução nas três utilizações da biomassa.

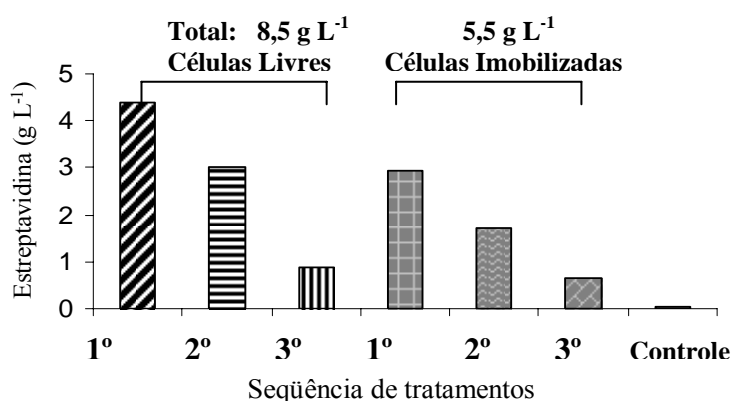


Figura 7: Produção de estreptavidina após 96 horas de indução com metanol 0,5% (v/v) por culturas recombinantes de *P. pastoris* KM71/Stp livre e imobilizada em partículas esféricas de gel de alginato. Controle: *P. pastoris* KM71/pPIC9.

A perda da produção da proteína recombinante com a reutilização da biomassa é esperada e pode ser, entre outras razões, devido a perda da viabilidade da cultura, embora isso não tenha sido avaliado, é comum em culturas de leveduras a perda de atividade após várias gerações. Apesar da menor produção de estreptavidina nas reutilizações, o reaproveitamento da biomassa uma vez produzida é uma alternativa viável, permitindo a obtenção da proteína recombinante mesmo após a terceira reutilização. A figura 8 apresenta o perfil de proteínas nas reutilizações da biomassa.

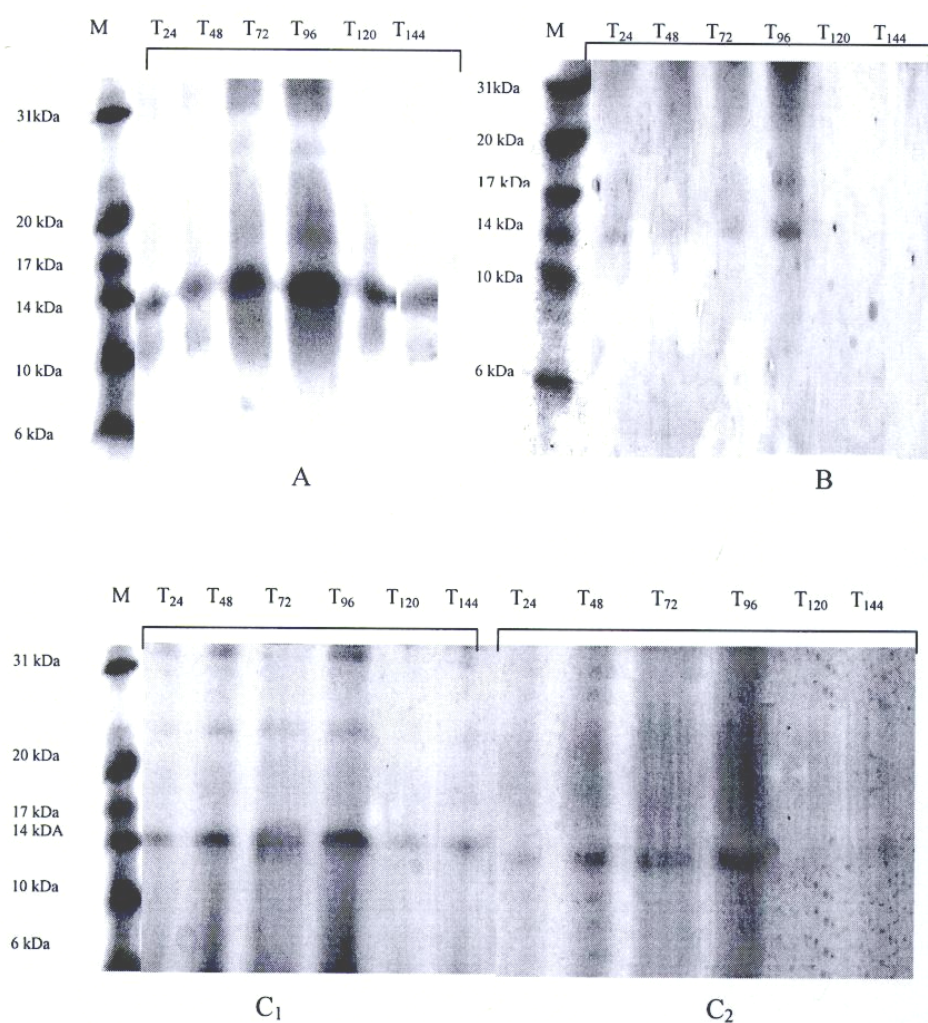


Figura 8: Gel de eletroforese SDS-PAGE do sobrenadante de indução das biomassas em suspensão livre e imobilizada de *P. pastoris* KM71/Stp após a primeira utilização. **(A)** primeira reutilização da biomassa imobilizada. **(B)** segunda reutilização da biomassa imobilizada. **(C₁)** primeira reutilização da biomassa em suspensão. **(C₂)** segunda reutilização da biomassa em suspensão.

Em 96 horas de indução a atividade biológica da estreptavidina do sobrenadante de ambas as biomassas recombinantes foi verificada pela ligação à uma matriz de sílica biotinizada. A concentração de biotina imobilizada nas partículas de sílica resultou em 0,351 e 0,38 $\mu\text{mol biotina.mL}^{-1}$ de partículas. Esses valores se referem respectivamente à coluna 1 e 2 e estão dentro da faixa de 0,253 a 0,500 $\mu\text{mol biotina/mL}$ de partículas de sílica determinada por Green (1965). Uma terceira coluna foi preparada para recircular o sobrenadante da linhagem controle e a concentração de biotina imobilizada foi 0,32 $\mu\text{mol biotina/mL}$ de partículas.

Neste teste, o deslocamento da avidina do complexo HABA-avidina pela biotina imobilizada na matriz, mostra se ocorreu ligação de estreptavidina na coluna, uma vez que a avidina da reação só será deslocada se houverem sítios disponíveis na matriz biotinizada tratada com sobrenadante da cultura de indução. Pela leitura da absorvância (1) a 500 nm do complexo HABA - avidina obteve-se $A_{1\text{imob}} = 0,723$ e $A_{1\text{livre}} = 0,741$. A absorvância A_2 foi determinada após a adição das partículas de sílica tratadas com os sobrenadantes das culturas recombinantes à mistura HABA-avidina, foi $A_{2\text{imob}} = 0,695$ e $A_{2\text{livre}} = 0,712$. A menor diferença entre os valores de A_1 e A_2 , mostra que moléculas de estreptavidina ligaram-se à biotina. Foi feita uma reação controle, onde foram misturados o complexo HABA-avidina $A_{1\text{Controle}} = 0,709$ e adicionadas partículas de sílica tratadas com o meio de cultura controle (*P. pastoris* KM71/pPIC9) e o valor A_2 para essa reação foi de 0,330 mostrando que estreptavidina não estava presente neste sobrenadante. Os resultados mostram que a estreptavidina produzida em ambos os casos, tanto livre quanto imobilizada foi biologicamente ativa.

Em outro teste com o reagente HABA para detectar se estreptavidina era secretada pelas culturas recombinantes (Tabela 3). Pode ser observado o deslocamento de estreptavidina recombinante e avidina do reagente HABA (ácido 2 - hidroxiazobenzeno- 4 -carboxílico) após adição de partículas de sílica biotinizadas.

Tabela 3: Teste HABA para detecção de estreptavidina no sobrenadante das culturas com 96 horas de indução (células em suspensão, imobilizadas e controle). A absorvância foi lida a 500 nm e os valores representam a média de três repetições

AMOSTRA	A ₁	A ₂	A ₁ - A ₂
H ₂ O destilada + HABA	0,196	0,194	0,002
Avidina (0,5mgmL ⁻¹) + HABA	1,048	0,128	0,868
Sobrenadante Cel. Livre com cStp + HABA	0,824	0,074	0,750
Sobrenadante Cel. Imob com cStp + HABA	0,768	0,077	0,691
Sobrenadante Cel. controle + HABA	0,163	0,144	0,019

Os resultados mostraram uma redução na absorvância, tanto para as células livres quanto imobilizadas, após adição de sílica biotinizada (A₂). Essa redução na absorvância aumenta a diferença entre A₁ para A₂ e mostra que ocorreu o deslocamento de estreptavidina para as partículas de sílica biotinizadas. Nas amostras de água destilada e sobrenadante da cultura controle, esse deslocamento não foi observado. Apesar do pequeno deslocamento observado para a amostra controle transformada com o pPIC9, o valor não é significativo. Com base nesses dados, pode-se inferir que a proteína secretada pelas culturas recombinantes possui afinidade pela biotina como a proteína da *S. avidinii*.

As concentrações de estreptavidina produzida pela linhagem transformante de *P. pastoris* KM71/Stp, ao longo da indução foram determinadas e estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração (g L⁻¹) de estreptavidina produzida no sobrenadante da cultura de *P. pastoris* KM711/Stp em suspensão e imobilizada em três utilizações. Controle: *P.pastoris* KM71/pPIC9.

Tempo de indução (h)	Células livres						Células imobilizadas			Controle
	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Célula livre 1ª utilização (g L ⁻¹) ^a	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Célula livre 2ª utilização (g L ⁻¹) ^a	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Célula livre 3ª utilização (g L ⁻¹) ^a	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização	Estreptavidina (g L ⁻¹) 1ª utilização
24	0,90	70,6	0,65	123,6	0,52	267,4	0,83	0,516	0,640	0,02
48	1,20	79,45	1,02	173,7	0,58	285,9	0,96	0,92	0,642	0,029
72	2,13	87,24	1,18	213,5	0,73	289,6	1,069	1,020	0,657	0,03
96	4,38	113,3	3,02	301,8	0,87	374,6	2,94	1,70	0,66	0,033
120	1,98	112,1	1,30	402	0,71	416,3	1,071	0,792	0,621	0,014
144	1,24	126,5	0,94	474,2	0,63	427,16	1,01	0,849	0,546	0,028

^a Massa seca (g L⁻¹)

Maior produção foi obtida pela biomassa livre centrifugada e novamente induzida. Apesar de serem diferentes os reatores, no momento da indução, o que pode ter levado a uma menor aeração do sistema imobilizado comparado ao livre, a produção de estreptavidina foi verificada nas células imobilizadas até a segunda reutilização, o que já viabiliza a utilização de um sistema imobilizado. Uma alternativa seria melhorar a aeração do sistema a fim de verificar se ocorreria um aumento na produção de estreptavidina, podendo alcançar valores próximos ou maiores que o sistema livre.

Outra alternativa para melhorar a reutilização da biomassa poderia ser a forma de armazenamento das células. Um método que poderia ser utilizado seria armazenar em glicerol até a próxima reutilização ao invés de armazenar em água peptonada.

A reutilização da biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp para a obtenção de estreptavidina, sugere que outras proteínas já expressas pelo sistema *Pichia* poderiam também ser obtidas com a reutilização da biomassa. A reutilização da biomassa em suspensão e imobilizada de *P. pastoris* KM71 ainda não havia sido relatada na literatura como alternativa de reaproveitamento das células para melhorar a produtividade de proteínas heterólogas. Pelos resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que a reutilização da biomassa de *Pichia* e as sucessivas induções podem aumentar a produção de estreptavidina sem a necessidade de um novo cultivo para alcançar biomassa e posterior indução da síntese da proteína recombinante. Esses resultados demonstraram a expressão de estreptavidina funcional pela levedura *P.pastoris*, e motivam a fusão do gene da estreptavidina com o gene de uma enzima de interesse industrial de modo à engenheirá-la e tornar possível sua separação e imobilização em colunas biotiniladas.

Os dados obtidos contribuem ainda, para a adequação de protocolos de otimização da produção de outras proteínas heterólogas pelo sistema de expressão *P. pastoris*. No entanto, novos estudos devem ser realizados a fim de testar a viabilidade da biomassa reutilizada, buscando alternativas que retardem a perda da viabilidade pelas células de *Pichia* ao longo das reutilizações para que maior reaproveitamento da biomassa seja feito, aumentando a produtividade do sistema. Além de testar outras formas de armazenamento das células para aumentar a produção de proteína, deve ser também averiguada a possibilidade da estreptavidina ficar retida na membrana celular

da levedura, o que poderia estar causando a redução da concentração da proteína após 96 horas de produção.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A levedura *Pichia pastoris* KM71/Stp revelou ser um sistema eficiente para produção de estreptavidina, alcançando aproximadamente 4 g L⁻¹ de proteína no sobrenadante.

A concentração de 0,67 moles L⁻¹ de glicerol foi a melhor concentração para o pré-cultivo em batelada de *P. pastoris* KM71/stp. E a concentração de 2,0 moles L⁻¹, com fluxo de alimentação de 0,11 mL min⁻¹, aeração com dispersão utilizando uma pedra porosa e 500rpm de agitação magnética foi uma estratégia simples e econômica que permitiu a concentração de 150 g L⁻¹ de biomassa da levedura.

A etapa usual de reativação, no processo de produção de biomassa de *P.pastoris* pode ser excluída sem afetar a obtenção de altas concentrações celulares (g L⁻¹).

A reutilização da biomassa de *P. pastoris* KM71/Stp pode favorecer o aumento da produtividade volumétrica de proteínas heterólogas por eliminar etapas improdutivas de obtenção de biomassa.

A maior produção de estreptavidina foi observada em 96 horas de indução em todos os tratamentos, com redução na concentração após esse tempo. A mesma biomassa pôde ser utilizada duas vezes com produção total em g L⁻¹ de estreptavidina (4,38 e 3,02 g L⁻¹ para o sistema livre e 2,94 e 1,70 g L⁻¹ pela biomassa imobilizada) no tempo de 96 horas. Em todos os casos a proteína foi biologicamente ativa.

A maior produção foi obtida pelo sistema livre e sugere-se a reutilização dessa biomassa para aumentar a produção de outras proteínas heterólogas de interesse utilizando o sistema *P.pastoris* de expressão.

P. pastoris recombinante capaz de secretar estreptavidina biologicamente ativa, pode ser útil na indústria de alimentos pela clonagem adjacente ao gene da estreptavidina de genes de enzimas hidrolíticas, tais como pectinases, β -glucosidases, β -galactosidases, que permitam sua purificação e imobilização dessas enzimas em colunas biotinizadas. Essas colunas seriam úteis na clarificação de sucos, na obtenção de xarope de milho e na hidrólise de leite ou soro de queijo.

A produção de estreptavidina pelas culturas de *P. pastoris* KM71/Stp foi obtida com sucesso, no entanto, trabalhos futuros devem ser realizados com o intuito de verificar se a secreção e produção dessa mesma proteína fundida a uma enzima de interesse, seguiriam o mesmo perfil dos resultados obtido neste trabalho. Análises feitas pela fusão com GFP podem auxiliar o entendimento desse perfil de secreção e também contribuir para determinar algum fator que pode levar à redução na concentração de proteína no sobrenadante após as 96 horas de indução.

6. REFERÊNCIAS

ALTERIIS, E., SILVESTRO, G., POLETTI, M., ROMANO, V., CAPITANIO, D., COMPAGNO, C., PARASCANDOLA, P. *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Calcium alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase. **Journal of Biotechnology**, 109: 83–92, 2004.

ARVAN, P., ZHAO, X., CASTANEDA, J. R., CHANG, A. Secretory pathway quality control operating in golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. **Blackwell Munksgaard**, 3: 771- 780, 2002.

BARRAL, P, BATANERO, E., VILLALBA, M., RODRÍGUEZ, R. Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: Evidence of post-translational modifications. **Protein Expression and Purification** – In press – 2005.

BOETTNER, M., PRINZ, B., HOLZ, C., STAHL, U., LANG, C. High-throughput screening for the expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, 99: 51-62, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochemistry**, 72: 248 – 254, 1976.

CEREGHINO, G.P.L., CEREGHINO, J.L., ILGEN, C., CREGG, H.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* – a review- **Current Opinion Biotechnology**, 13:329-332, 2002.

CHAN, L.W., JIN, Y., HENG, P.W.S. Cross-linking mechanisms of calcium and zinc production of alginate microspheres. **Int. Journal of Pharmaceutics**, 242: 255-258, 2002.

CHAUHAN, A. K., ARORA, D., KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, 34:139-145, 1999.

CHEN, Y., CINO, J., HART, G., FREEDMAN, D., WHITE, C., KOMIVES, E.A. High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. **Process Biochemistry**, 32: 107-111, 1997.

CHOI D.B., PARK, E.Y. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry** - In press- 2005.

CLARE, D.A., VALENTINE, V.W., CATIGNANI, G.L., SWAISGOOD, H.E. Molecular design, expression, and affinity immobilization of a trypsin-streptavidin fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, 28:483 - 491, 2001.

CREEG, J.M., VEDVICK, T.S., RASCHKE, W.C. Recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris* - a review – **Biotechnology**, 11: 905 – 910, 1993.

CREEG, J.M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of expression**. Edited by Joseph M. Fernandez e James P Hoeffler. Academic Press, 1999, p.157 – 209.

COS, O., RESINA, D., FERRER, P., MONTESINOS, J.L., VALERO, F. Heterologous production of *Rhizopus orizae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, 26: 86 – 94, 2005.

COS, O., SERRANO, A., MONTESINOS, J.L., FERRER, P., CREEG, J.M., VALERO, F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-batch culture **Journal of Biotechnology**, 116: 321 – 335, 2005.

CUATRECASAS, , WILCHEK, M. Single-step purification of avidin from egg white by affinity chromatography on biocytin-sepharose columns, **Biochem.and Biophys Research Communications**, 33 :235 – 239, 1968.

DAMASCENO, L. M. Produção de estreptavidina em *Pichia pastoris* e sua imobilização em sílica biotinilada. **Dissertação. Viçosa, UFV**, 2001.

DAMASCENO, L.M., PLA, I., CHANG, H., COHEN, L., RITTER, G., OLD, L.J., BATT, C.A. An optimized fermentation process for high-level production of single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 37: 18-26, 2004.

DIGAN, M.E., LAIR, S.V., BRIERLEY, R.A., SIEGEL, R.S., WILLIAMS, M.E., ELLIS, S. B., KELLARIS, P.A., PROVOW, S.A., CRAIG, W.S., VELIÇELEBI, G., HARPOLD, M.M. THILL, G.P. Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, 7: 160 - 164, 1989.

GELLISSSEN, G., KUNZE, G., GAILLARDIN, C., CREGG, J.M., BERARDI, E., VEENHUIS,M., KLEI, I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. **FEMS Yeast Research** – In press – 2005.

GREEN, N.M. A spectrophotometric Assay for Avidin and Biotin Based on Binding of Dyes by Avidin, **Biochemistry. Journal**, 94: 23 – 26, 1965.

GREEN, N.M. Avidin and streptavidin. **Methods Enzymology**, 184: 51-67,1990.

HENDRICKSON, W.A., PÄHLER, A., SMITH, J. L., SATOW, Y., MERRITT, E. A., PHIZACKERLEY, R.P. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction synchrotron radiation, **Biophysics**, 86 : 2190 – 2194, 1989.

HIGGINS, D. R., CREGG, J. M. **Methods in Molecular Biology**. 1 ed. Vol. 103. Humana Press-Totowa, New Jersey, 1998, 270p.

HOLKERI, H., MAKROW, M. Different degradation pathways for heterologous glycoproteins in yeasts. **FEBS Letter**, 429: 162-166, 1998.

HOLLENBERG, C.P. GELLISSEN, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current Opinion Biotechnology**, 8: 554-556,1997.

JANOLINO, V. G, SWAISGGOOD, H.E. Analysis and optimization of methods using water-soluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. **Biotechnology and Bioengineer.**, 24: 1069-1080, 1982.

JANOLINO, V. G, FONTECHA, J., SWAISGGOOD, H.E. A spectrofotometric assay for biotin-binding sites of immobilized avidin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 56 : 1 – 7, 1996.

JORDÃO, R.B., BRANDI, I.V., PASSOS, F. M. L. Stabilization of the activity of β -galactosidase in permeabilized immobilized cells for hydrolysis of lactose in milk. **Journal of Food Biochemistry**, 25: 257 - 266, 2001.

- KIM, J.H., LEE, C.S., KIM, B.G. Spore-display streptavidin: A live diagnostic tool in biotechnology. **Biochemical and Biophysical research Communications**, 331 :210 – 214, 2005.
- KWON, K., STREAKER, E.D., BECKETT, D. Binding specificity and ligand dissociation process in the *E. coli* biotin holoenzyme synthetase. **Protein Science**, 11: 558 – 570, 2002.
- LEE, C. Y., NAKANO, A., SHIOMI, N., LEE, E. K., KATOH, S. Effects of substrate feed rates on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, 33: 358-365, 2003.
- MONTESINO, R., GARCIA, R., QUINTERO, O., CREMATA, J. A. Variation in N-linked oligosaccharide structure on heterologous protein secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, 14: 197-207, 1998.
- NAGARAJAN, V., RAMALEY, R., ALBERTSON, H., CHEN, M. Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**, 59: 3894-3898, 1993.
- NGUYEN, G.H., MILEA, J.S., RAI, A., SMITH, C.L. Mild conditions for releasing mono and bis-biotinylated macromolecules from immobilized streptavidin. **Biomolecular Engineering – In press**- 1 - 3, 2005.
- NOHR, J., KRISTIANSEN K., KROGSDAM, A., M. Protein expression in yeasts. **Methods Molecular Biology**, 232: 111-25, 2003.
- PÄHLER, A., HENDRICKSON, W. A, KOLSKS, M. A. G., ARGARAÑA, C. E., CANTOR, C. R. Characterization and Crystallization of Core Streptavidin, **Journal Biology Chemistry**, 262: 13933 – 13937, 1987.

PAZY, Y., EISENBERG-DOMOVICH, Y., LAITINEN, O.H., KULOMMA, M.S., BAYER, E.A., WILCHEK, M., LIVNAH, O. Dimer-tetramer transition between solution and crystalline states of streptavidin and avidin mutants, **Journal of Bacteriology**, 185: 4050 – 4056, 2003.

ROMANOS, M.A., SCORER, C.A., CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, 8: 423 – 488, 1992.

SANO, T., PADORI, M.W., CHEN, X., SMITH, C. L., CANTOR, C. R. Recombinant core streptavidins. **Journal Biology Chemistry**, 270(47): 28204-28209, 1995.

SMITH, R. M. DUNCAN, M. J. MOPIR, D. T. Heterologous protein secretion from yeast. **Science Direct**, 229: 1219-1224, 1985.

SOLOMON, B., HOLLANSER, Z. KOPPEL, R., KATCHALSKI-KATZIR, E. Use of monoclonal antibodies for the preparation of highly active immobilized enzymes. **Methods Enzymology**, 135: 160-170, 1987.

SREEKRISHNA, K., NELLES, L., POTENZ, R., CRUZE, J, MAZZAFERRO, P., FISH, W., FUKU, M., HOLDEN, K., PHELPS, D., WOOD, P., PARKER, K. High-level expression, purification, and characterization of recombinant Human Tumor Necrosis Factor synthesized in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Reprinted from Biochemistry**, 28: 4117-4125, 1989.

SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion Biotechnology**, 7: 517-524, 1996.

SWAISGOOD, H.E., LEE, P. Cloning and expression of a streptavidin-lipase fusion gene in *Escherichia coli* and characterization of the immobilization fusion protein. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 246-254, 1998;

SWAISGOOD, H.E, WALSH, M.K. An *Escherichia coli* plasmid vector system for production of streptavidin fusion proteins: Expression and biosselective adsorption of streptavidin- β -galactosidase. **Biotechnology and Bioengineering**, 44: 1348-1354, 1994.

SWAISGOOD, H.E., PASSOS, F.M.L. Calcium alginate film formed don a stainless steel mesh. **Methods in Biochemistry**, Vol. 1. Humana Press-Totowa, New Jersey, 1996. p.237-242.

VOZZA, L.A., WITTEWER, L., HIGGINS, D.R., PURCELL, T.J., BERGSEID, M., COLLINS-RACLE, L.A., LAVAILLE, E.R., HOEFFLER,J.P. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, 14: 77 – 81, 1996.

WEBER,P. C., OHLENDORF, D. H., WENDOLOSKI, J. J., SALEMME, F. R. Strutural origins of hight-affinity biotin binding to streptavin. **Science Direct**, 243: 85-88, 1989.

WILKCHEK, M & BAYER, E. A. Avidin-biotin technology. Methods in Enzimology, Vol 184, **Academic Press**, San Diego, CA, 1990.

WITTAKER, M.M., WITTAKER, J.W. Construction and characterization of *Pichia pastoris* strains for labeling aromatic amino acids in recombinant proteins, **Proteins Expression and Purification - In Press** – 2004.

WU, J., CHIENG, L., HSU, T., LEE, C. Sequential expression of recombinant proteins and their separate recovery from a *Pichia pastoris* cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, 16: 9-16, 2003.

XIE, J., Z. Q., DU, P., GAN, R., YE, Q. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 210-216, 2005

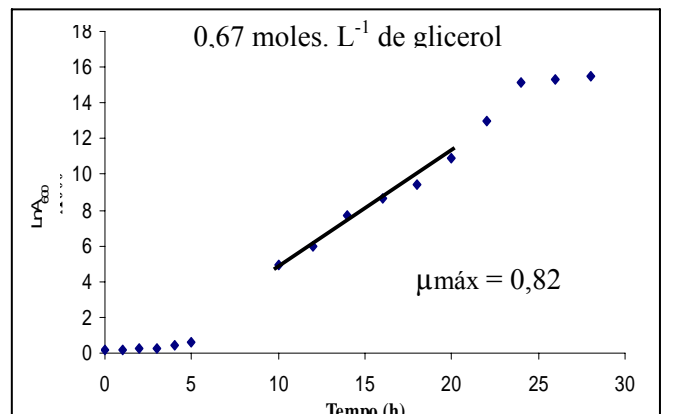
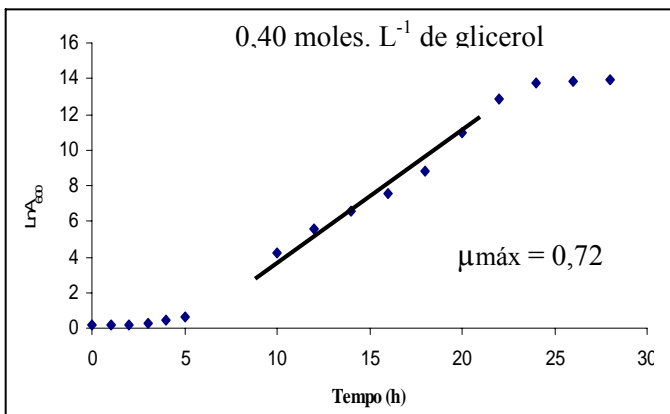
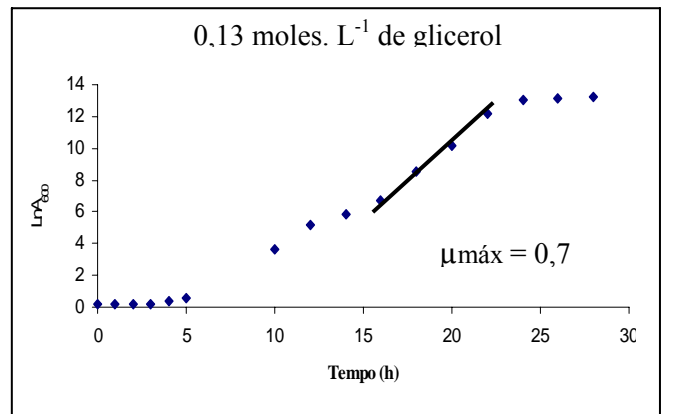
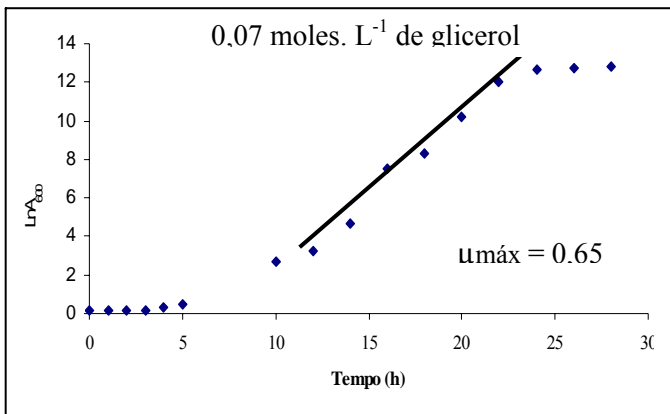
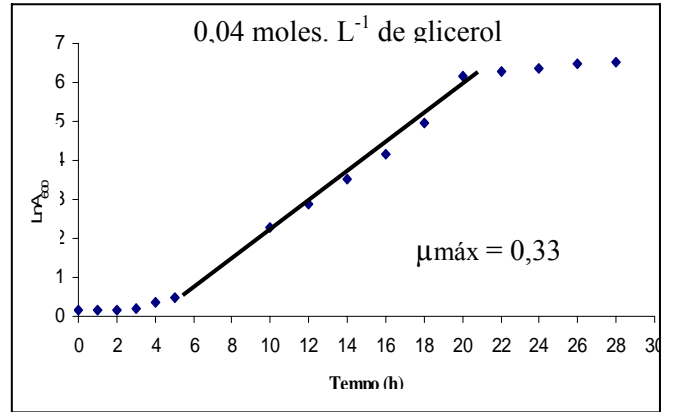
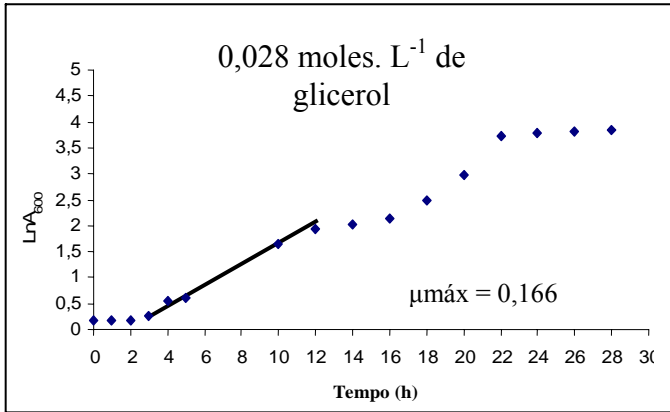
ZHANG, W. POTTER, K. J. H., PLANTZ, B. A., SCHLEGED, V. L., SMITH, L. A., MEAGHER, M. M. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, 30: 210- 215, 2003.

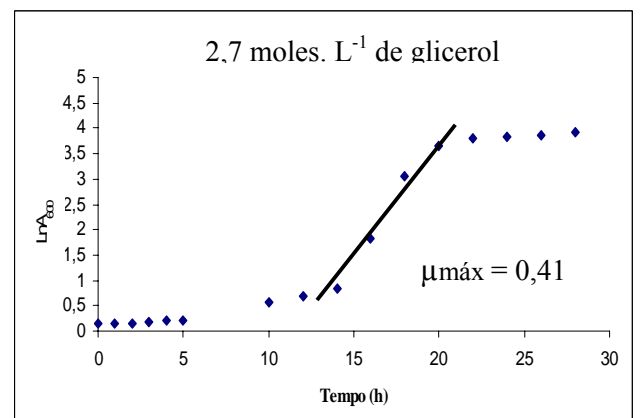
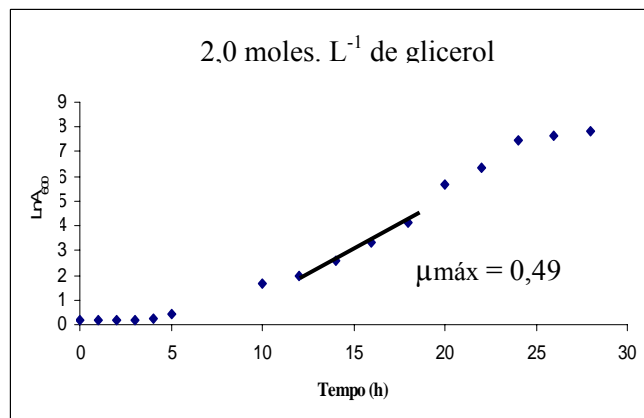
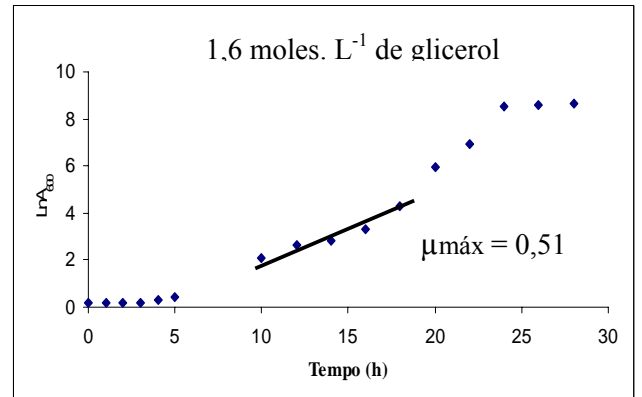
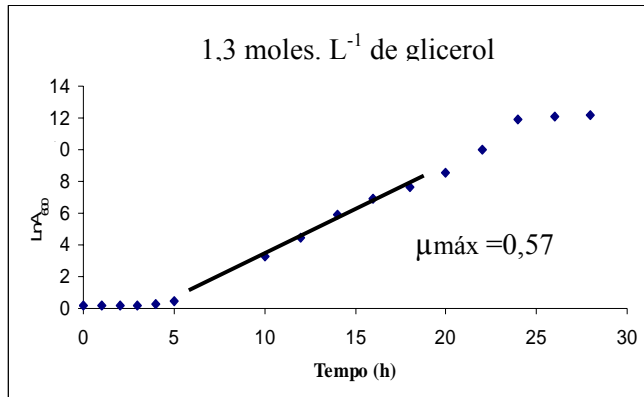
ZHANG, W., LIU, C. L., INAN, M., MEAGHTER, M.M. Optimization of density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, 31: 330-334, 2004.

ZHANG, W., LI, Z. J., AGBLEVOR, F.A. Microbubble fermentation of recombinant *Pichia pastoris* for human serum albumin production. **Process Biochemistry**, 40: 2073-2076, 2005.

APÉNDICE

APÊNDICE A





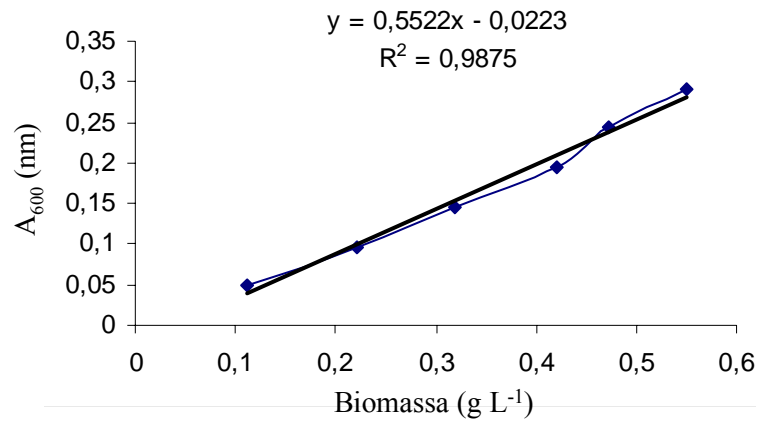
Apêndice A: Cinética do crescimento da levedura *P. pastoris* KM71/Stp em diferentes concentrações de glicerol. Abaixo desses gráficos encontra-se uma Tabela (A) com os dados que deram origem às curvas.

APÊNDICE A

Tabela A: Medidas da A_{600} de cultura em batelada de *P. pastoris* KM71/Stp em meio BMG a 25 °C em diferentes concentrações de glicerol.

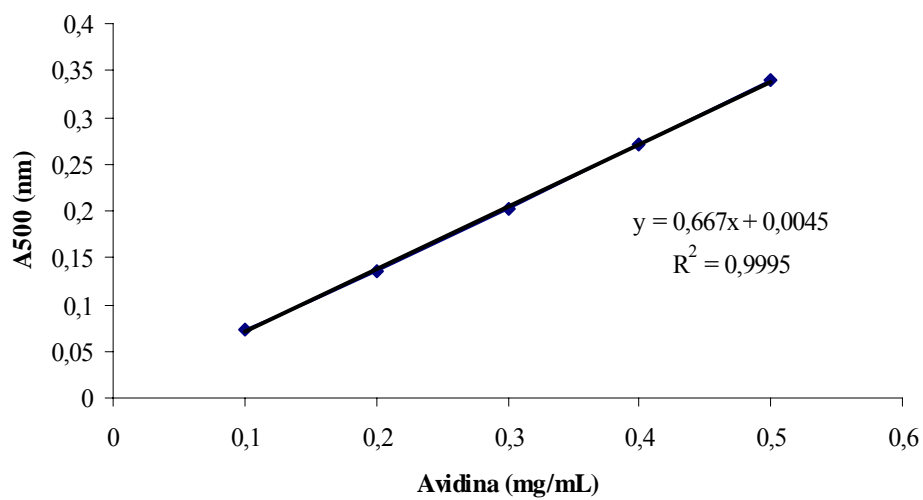
Tempo (h)	A_{600} (nm)									
	Glicerol (moles L ⁻¹)									
	0,02	0,04	0,07	0,13	0,40	0,67	1,30	1,60	2,00	2,70
0	0,173	0,1599	0,166	0,169	0,181	0,166	0,17	0,16	0,165	0,153
1	0,178	0,1688	0,1712	0,17	0,185	0,171	0,178	0,168	0,17	0,155
2	0,18	0,172	0,182	0,18	0,22	0,241	0,183	0,17	0,187	0,16
3	0,25	0,183	0,195	0,2	0,24	0,282	0,21	0,18	0,19	0,192
4	0,54	0,35	0,324	0,35	0,48	0,396	0,31	0,28	0,25	0,203
5	0,6	0,5	0,491	0,58	0,59	0,61	0,48	0,4	0,43	0,224
10	1,64	2,3	2,68	3,68	4,231	4,91	3,2438	2,06	1,6777	0,565
12	1,944	2,893	3,25	5,144	5,5474	5,98	4,42	2,618	1,9467	0,7
14	2,02	3,52	4,68	5,85	6,5424	7,68	5,89	2,83	2,5867	0,833
16	2,15	4,147	7,5	6,76	7,58	8,65	6,95	3,304	3,3367	1,83
18	2,5	4,97	8,3	8,49	8,78	9,42	7,65	4,32	4,1	3,05
20	2,98	6,16	10,2	10,16	10,95	10,9191	8,52	5,98	5,65	3,66
22	3,7265	6,28	12,01	12,2	12,86	12,992	9,97	6,92	6,35	3,79
24	3,79	6,36	12,637	13,027	13,7694	15,11	11,9	8,53	7,462	3,82
26	3,81	6,48	12,7	13,15	13,86	15,35	12,08	8,61	7,67	3,86
28	3,85	6,51	12,81	13,22	13,91	15,5	12,22	8,68	7,81	3,92

APÊNDICE B



Apêndice B: Curva padrão da biomassa seca de *P. pastoris* KM71/ Stp. A massa da levedura foi calculada com base na equação linear da reta. Uma A₆₀₀ de *P. pastoris* KM71/Stp é igual a 1,81 g L⁻¹.

APÊNDICE C



Apêndice C: Curva padrão de avidina para determinar a concentração de estreptavidina no sobrenadante das culturas de indução de *P. pastoris* KM71/Stp.