

CULTIVO DE PICHIA PASTORIS GLYCOSWITCH PARA PRODUÇÃO DE UMA NOVA L-ASPARAGINASE HUMANIZADA DE ERWINIA CHRYSANTHEMI SOB UMA ÓTICA DE QUALITY BY DESIGN

Jordana Souza Fernandes

Gustavo Brandão

Aldo Tonso

Engenharia Química/Escola Politécnica/Universidade de São Paulo

jordanasf@usp.br

Objetivos

Foram realizados vários cultivos descontínuos da levedura *Pichia pastoris* GlycoSwitch® SuperMan5 (his-) produtora de L-asparaginase (ASNase) de *Erwinia chrysanthemi* com o intuito de gerar dados suficientes das variáveis selecionadas para posterior análise estatística, sob a ótica de Quality by Design (QbD), visando estabelecer relações entre elas e entre os lotes, obtendo informações sobre a variabilidade em sua produção.

Assim, essa proposta visa contribuir para a produção dessa enzima em escalas laboratorial e industrial e, consequentemente, diminuir a dependência do país quanto ao mercado externo e diminuir os custos do tratamento de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda.

Métodos e Procedimentos

Para produzir o inóculo, a cepa foi cultivada em shaker a 250 rpm e 30°C, por 20 horas. Em seguida, esse foi centrifugado e ressuspenso em meio BMGY fresco para obter concentração de 1g/L de levedura, inoculando-se o biorreator. Após 24 horas, adicionou-se o indutor metanol e após mais 24 horas, encerrou-se o cultivo. O meio então foi submetido à centrifugação a 1968 rcf por 10 minutos, separando o meio das células.

Os cultivos foram desenvolvidos em biorreator Biostat® B de 2 Litros (Sartorius Stedim Biotech) contendo 1,0L de meio complexo BMGY. O pH foi ajustado para 6,0 com solução de 28% NH₄OH. As condições do equipamento foram ajustadas para a temperatura de 35 °C,

com agitação de 700 rpm e aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Essa condição foi mantida por 4 horas com o propósito de condicionar o meio (para temperatura e oxigenação adequadas) e polarizar a sonda do sensor polarográfico de oxigênio para receber o inóculo.

O monitoramento da concentração celular foi realizado através de medida da densidade óptica. Ao final desse período, iniciou-se a fase de indução adicionando metanol ao meio de cultivo, a fim de expressar a ASNase humanizada em *Pichia pastoris*.

No processo de pré purificação, a enzima foi concentrada a partir do sobrenadante proveniente do meio de cultura utilizando-se o sistema de ultrafiltração tangencial com membrana de polietersulfona. Ao sobrenadante foi adicionado tampão acetato pH 5,2. Tal processo de ultrafiltração foi repetido até o meio atingir o pH do tampão. Ao atingi-lo, o concentrado foi refrigerado.

Com o intuito de obter a dosagem total de proteínas, um ensaio utilizando-se do kit de BCA da Sigma-Aldrich foi realizado. Com tubos do tipo eppendorf, foi feita a diluição das amostras padrão e, nestas, foram adicionados 200µL de BCA. Este procedimento foi feito em triplicata, e posteriormente a placa foi incubada e lida a 562 nm em espectrofotômetro.

Cálculo de média e coeficiente de variação das variáveis analisadas nos cultivos foram realizados para diferenciar a influência das condições de cultivo nos resultados obtidos a partir do cultivo lote-a-lote.

Resultados

Com o cultivo do microrganismo em meio BMGY no biorreator foi possível avaliar a cinética de crescimento da levedura. Na figura abaixo, é descrito o crescimento celular típico do microrganismo à temperatura de 35 °C e 700 rpm durante 48h de cultivo.

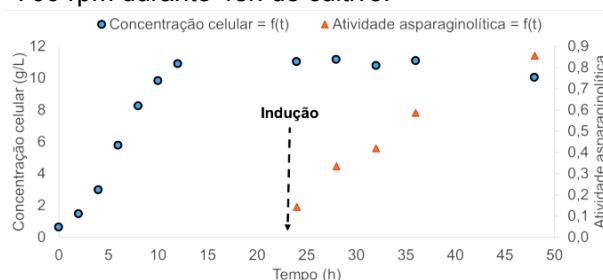


Figura 1: Curvas típicas de crescimento celular da cepa *Pichia Pastoris* e a atividade asparaginolítica ao longo do tempo em meio de cultivo BMGY.

Ao analisar os valores da concentração de biomassa (X) ao longo do tempo são percebidas as três fases de crescimento (fases exponencial, desaceleração e estacionária) da levedura no biorreator.

É observado nas primeiras horas que o cultivo inicia já em fase exponencial onde a velocidade específica de crescimento é constante. A fase de desaceleração está representada na figura pelo intervalo 6h-12h. Nessa fase ocorre um aumento no tempo de duplicação e diminuição da velocidade, motivados pelo esgotamento de componentes do meio de cultivo essenciais ao crescimento e, também, devido ao acúmulo de metabólitos inibidores produzidos pelo microrganismo. Em 12 horas de cultivo, é dado início à fase estacionária que se mantém até 48 horas. Ainda nessa fase, a concentração celular atinge o valor máximo de 10 g/L e se mantém relativamente constante.

Para a determinação da concentração celular foi usado um espectrofotômetro. Na tabela 1 tem-se os valores do volume necessário de inóculo para se ter a concentração inicial de 1g/L no início do cultivo em biorreator.

	ABS 600nm	Densidade Óptica	Concentração g/L	Vol (mL)
Ensaio 1	0,235	23,5	46,79	21,4
Ensaio 2	0,342	34,2	68,78	14,5
Ensaio 3	0,197	19,7	38,99	25,7
			CV (%)	53%

Tabela 1: Resultado da concentração celular.

Por fim, para a determinação de proteínas totais foi realizado o ensaio de BCA e os volumes totais da proteína obtidos e o coeficiente de variação dos dados estão expressos na tabela 2 abaixo.

Ensaios	Proteínas totais (g)			CV (%)
	1	2	3	
Pós dorna	21,6	26,9	25,2	11,0%
Pós 4000rpm	16,3	19,8	16,7	50,8%
Pós 10000rpm	15,2	18,7	15,5	11,9%
Pós 300 kDa	13	17,1	11,7	52,6%
Pós 30 kDa	1,9	1,9	2,2	50,4%
Pós troca	0,33	0,42	0,16	61,4%

Tabela 2: Resultado da massa de proteínas obtido por BCA após as várias etapas de purificação.

Conclusões

De acordo com o exposto, o coeficiente de variação do volume de inóculo é 53%, o que demonstra que no estudo da variação lote-a-lote esse é um dado importante para se obter um valor maior de massa de proteínas ao final do processo. Assim, em ensaios em que a massa de proteínas é maior ao final do cultivo, também é maior ao final da purificação, como evidenciado pelo ensaio 2. Além disso, o coeficiente de variação alto ao final do processo, como demonstrado na tabela 2, reforça que a concentração inicial é uma condição de cultivo que influencia diretamente na produção de proteínas.

Referências Bibliográficas

- ADARIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, v. 1, n. 2, p. 116–131, 2010.
- BRUMANO, L. P. et al. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, p. 1–22, 2019.
- DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 Biotech, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.