

Meio de cultivo definido versus complexo para produção de fotoliase em cultivo de *Escherichia coli* recombinante

Felipe Gobbi Gonçalves

Karin Mariana Torres-Obreque, Gisele Monteiro

Carlota de Oliveira Rangel-Yagui

Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, Universidade de São Paulo

felipe.gobbi@usp.br

Objetivos

Proteínas recombinantes são de alta relevância para indústria farmacêutica devido às suas potencialidades terapêuticas nas mais diversas áreas da saúde humana. A comercialização desses potenciais medicamentos implica a necessidade de produção em escala industrial e de um rígido controle de qualidade lote a lote. O meio de cultura é a fonte de substrato necessária para o desenvolvimento do organismo produtor da proteína de interesse. A escolha de um meio de cultura adequado pode afetar drasticamente o rendimento de sua produção. Este projeto refere-se ao estudo comparativo entre um meio de cultura complexo (Luria-Bertani) e um meio quimicamente definido em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) para produção da enzima fotoliase, que possui grande potencial dermatológico e cosmético como um instrumento de fotoproteção ativa, por sua capacidade de reparar danos causados ao DNA pela exposição à radiação ultravioleta (UV).

Métodos e Procedimentos

Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante expressando fotoliase foram realizados para os dois meios de cultura e os parâmetros cinéticos dos cultivos, velocidade específica de crescimento (μ_x), concentração total de biomassa (X_{max}) e produtividade de biomassa

(Px), foram determinados. A fotoliase intracelular foi extraída e purificada por cromatografia de afinidade em AKTA FPLC, com eluição de imidazol. Uma tentativa de determinar a atividade da fotoliase foi realizada analisando a sobrevida de *E. coli* BL21 produtora da enzima recombinante após exposição à radiação UV.

Resultados

Os cultivos celulares em meio complexo exibiram alta velocidade específica de crescimento ($1,008\text{ h}^{-1}$), baixa concentração celular total ($1,99\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e baixa produtividade de biomassa ($0,39\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) quando comparados aos cultivos celulares em meio definido que apresentaram baixa velocidade específica de crescimento ($0,668\text{ h}^{-1}$), mas atingiram alta concentração celular total ($3,614\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e superior produtividade em biomassa ($0,51\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), ambos apresentaram parâmetros cinéticos de crescimento em concordância com dados da literatura. Uma banda clara correspondente à fotoliase foi observada por eletroforese em gel, confirmando a expressão da proteína. Além disso, o rendimento de purificação foi maior no cultivo em meio definido, atingindo uma concentração de $15,6\text{ mg/L}$ em contraste aos $3,25\text{ mg/L}$ atingido no meio complexo. Não foi observado crescimento de colônias na placa de cultivo com células de *E.*

coli produzindo a enzima recombinante exposta à radiação UV.

Conclusões

Os resultados demonstraram que a produção de fotoliase é vantajosa em cultivos de meio de cultura quimicamente definido, levando em conta a capacidade de atingir altas concentrações celulares, o rendimento de purificação 5 vezes maior do que o em meio complexo e a reprodutibilidade dos cultivos por conta da caracterização de seus componentes químicos. Os resultados do ensaio de atividade enzimática em bactérias foram inconclusivos e, portanto, outro método para medir a atividade enzimática da fotoliase é necessário.

Referências

MARIZCURRENA, Juan José et al. A highly efficient and cost-effective recombinant production of a bacterial photolyase from the Antarctic isolate *Hymenobacter* sp. UV11. **Extremophiles**, v. 23, n. 1, p. 49-57, 2019.

RIESENBERG, D. et al. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. **Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17-27, 1991.