

Os diferentes sistemas biológicos usados na produção em larga escala de enzimas recombinantes

Adriano R. Azzoni - Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP.

Enzimas possuem inúmeras aplicações, que vão desde a utilização como biofármacos, produção de alimentos, até a hidrólise de biomassa na produção biocombustíveis. Hoje, muitas dessas enzimas são produzidas em larga escala por microrganismos e células modificadas geneticamente. No entanto, o desenvolvimento de processos de produção de enzimas recombinantes possui dificuldades que são inerentes ao caráter multidisciplinar e ainda novo desses processos. Uma dessas dificuldades diz respeito à escolha do sistema biológico de expressão da enzima recombinante, que impacta diretamente no desenvolvimento e viabilidade dos processos. O intuito deste artigo é apresentar, de forma resumida, alguns dos principais critérios utilizados nessa escolha.

Enzimas recombinantes produzidas industrialmente

Enzimas são, em geral, proteínas com atividade catalítica utilizadas pelo homem desde tempos remotos, a princípio na modificação e conservação de

alimentos, como o queijo, o picles, entre outros. Foram, ao longo dos séculos, extraídas em pequenas quantidades de plantas, animais ou microrganismos que naturalmente as produziam. Mas foi apenas na segunda metade do século passado que a produção industrial de enzimas, tanto nativas quanto recombinantes, floresceu, em parte embasada nos conhecimentos de fermentação de microrganismos em larga escala desenvolvidas anteriormente para a produção de acetona e butanol e, no caso das enzimas recombinantes, também embasada nos avanços da biologia molecular (Demain e Vaishnav, 2009). Hoje, parte considerável das enzimas são produzidas industrialmente em microrganismos recombinantes, como a bactéria *Escherichia coli*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e, no caso de proteínas e enzimas farmacêuticas, também em células animais cultivadas em biorreatores. No entanto, a ciência ainda nos apresenta muitos tipos de microrganismos, células (oriundas de organismos superiores), e até mesmo plantas que, manipulados geneticamente, oferecem real potencial de aplicação

na produção de enzimas em larga escala. Com todas essas possibilidades, quais seriam então os critérios que devem nortear a escolha de um ou outro “sistema biológico” para a produção de determinada enzima em larga escala, e quais seriam os possíveis impactos para a viabilidade do processo a ser desenvolvido? Finalmente, quais profissionais deveria participar dessa escolha?

A escolha do sistema biológico de expressão

O primeiro critério a ser levado em consideração na escolha do sistema de expressão diz respeito às características da proteína ou enzima a ser produzida, além de sua aplicação ou finalidade. Como regra geral, enzimas que contêm em sua estrutura modificações pós-traducionais complexas, em especial glicosilações, não podem ser produzidas por microrganismos bacterianos simples, como a *Escherichia coli*. Já leveduras bastante conhecidas, como a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris*, além de fungos filamentosos como o *Trichoderma reesei*, são capazes de fazer

grande parte das modificações pós-traducionais encontradas em proteínas, inclusive glicosilações. No entanto, o padrão de glicosilação, que diz respeito à sequência e aos tipos de carboidratos inseridos na proteína, costuma ser diferente dos encontrados em mamíferos, o que pode inviabilizar seu emprego na produção de proteínas farmacêuticas, devido à alta imunogenicidade. Para casos como esse, costuma-se empregar células de mamífero capazes de serem cultivadas em biorreatores, como as CHO (Chinese Hamster Ovary cells) (Schmidt, 2004). Ainda assim, mesmo não sendo capazes de “glicosilar”, bactérias como a *E. coli* e o *Bacillus subtilis* são muitas vezes utilizadas pela indústria quando a enzima a ser produzida não possui esse tipo de modificação, ou ainda, quando essa modificação não é essencial para a atividade esperada.

Outro critério importantíssimo de escolha é o desempenho do sistema biológico em condições de crescimento em larga escala. De nada adianta produzir enzimas com a qualidade esperada mas em quantidades e custos incapazes de viabilizarem economicamente a produção em larga escala. A literatura apresenta artigos científicos, inclusive revisões, que podem nos fornecer, ainda que de forma parcial, informações sobre a capacidade de vários sistemas, incluindo velocidades específicas de crescimento celular, fatores

de conversão de substrato a célula ou produtos, além de valores de produtividade. Nesse quesito, a bactéria *E. coli*, além das leveduras *S. cerevisiae* e *P. pastoris* são candidatas interessantes, em especial pelas altas velocidades de crescimento, robustez e altos rendimentos, com necessidades nutricionais mais simples que os de células oriundas de organismos superiores (Demain e Vaishnav, 2009). Também os fungos filamentosos como o *T. reesei* são interessantes, em especial para a produção de enzimas (nativas e recombinantes) utilizadas na hidrólise de biomassa lignocelulósica em processos de produção de biocombustíveis (Nevalainen e Peterson, 2014).

Um outro critério importante a ser considerado na escolha do microrganismo ou célula é a capacidade de secretar a enzima recombinante para o meio de cultivo durante o processo de produção em biorreator. Ao evitar-se, ao final do cultivo, o rompimento celular para a extração da enzima acumulada, ao menos duas operações unitárias do processo de purificação são evitadas (rompimento celular e remoção dos debrís celulares), o que pode ter um grande impacto sobre a viabilidade econômica do processo (Mergulhão et al., 2005). Nesse quesito, a bactéria *E. coli* costuma ser incapaz de secretar as proteínas recombinantes produzidas, ou o faz apenas de maneira parcial.

Finalmente, os sistemas de

expressão que já são conhecidos e empregados industrialmente costumam ter vantagens no momento da escolha, em parte pelo conhecimento já adquirido e disponível na literatura, nas universidades, na indústria, e também pela pronta disponibilidade de equipamentos por parte de fornecedores, no caso da implantação do processo industrial. Novos sistemas de expressão, ainda que potencialmente interessantes quando avaliados pelos critérios apresentados acima, podem ser preteridos por este último critério, em especial na indústria farmacêutica, onde as normas de certificação de processos e produtos pelas agências reguladoras são muito exigentes.

De quem é a escolha?

O desenvolvimento de um processo de produção de enzimas recombinantes em larga escala envolve, além de um amplo conhecimento do sistema biológico de expressão, o conhecimento necessário ao desenvolvimento de bioprocessos em larga escala. A esses devem se somar conhecimentos relativos aos métodos analíticos, além de aspectos regulatórios e de mercado. Tratam-se, portanto, de projetos multidisciplinares, onde engenheiros químicos ou bioquímicos precisam interagir e compartilhar conhecimentos com biólogos moleculares, microbiologistas, químicos, farmacêuticos e/ou engenheiros de alimentos, além de outros

profissionais. Nesse contexto, o mais amplo compartilhamento de conhecimentos entre professores, alunos e profissionais da indústria, ainda durante os cursos de graduação, é imprescindível para a formação dos novos profissionais que atuam na área.

Referências

Demain, A.L.; Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 297–306.

Mergulhão, F.J.M.; Summers, D.K.; Monteiro, G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23 (2005) 177–202.

Nevalainen, H e Peterson, R. Making recombinant proteins in filamentous fungi - are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*, v.5, 75 (2014) 1–10.

Schmidt, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65 (2004) 363–372. ●

Tabela 1: Potencial de utilização em larga escala de alguns diferentes sistemas de expressão de enzimas recombinantes.

Sistema de expressão	Modificação genética*	Produtividade	Custo de produção	Qualidade da enzima**
<i>E. coli</i>	++++	++++	++++	++
<i>S. cerevisiae</i>	++++	+++	+++	+++
<i>T. reesei</i>	++	+++	++++	+++
Células <i>CHO</i>	++	++	+	++++
Milho transgênico	+	++++	++++	+++

Legenda: (++++)= ótimo; (+++)= bom; (++)= regular; (+)= ruim. * Facilidade de obtenção de clones com alta produtividade. ** Qualidade em termos de enovelamento correto e modificações pós-traducionais.