

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Lipase B de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris* utilizando Glicerina Loira

Julia de Macedo Robert¹, Antonio Carlos de Oliveira Machado^{1,2}, Francisco Valero Barranco³ e Denise Maria Guimarães Freire¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química Av. Athos da Silveira Ramos, 149 – CT – Bloco A, Sala 549-1 Cep 21941-909 Rio de Janeiro – RJ - E-mail: juliarobert601@gmail.com

²Instituto Senai de Inovação em Biossintéticos/ SENAI-CETIQT Unidade Riachuelo – Rua Magalhães Castro, 174 - Rio de Janeiro – RJ

³Universidade autônoma de Barcelona – Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental. EE. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

RESUMO

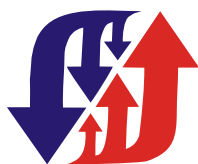
*Com o mercado de enzimas aquecido nos últimos anos o interesse para produção de enzimas recombinantes cresce também. A utilização de meios de baixo custo e que reutilizem subprodutos gerados por outras indústrias, como a de biocombustíveis, é vital para a expansão sustentável de novas tecnologias que agreguem valor aos seus produtos. Neste cenário a utilização da glicerina loira para produção de uma lipase recombinante une estas duas vertentes gerando um produto com ampla gama de utilização em diversos setores industriais. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de lipase B de *Candida antarctica* expressa em *Pichia pastoris* com a inserção do promotor constitutivo pPGK, o estudo da melhor concentração inicial de fonte de carbono (glicerina loira) juntamente com a alimentação em batelada por pulsos possibilitou um grande aumento na produção (8,3 vezes) desta enzima, chegando a atingir uma atividade lipásica de cerca de 50.000U/L em 76h de cultivo.*

Palavras-chave: *Pichia pastoris*, promotor constitutivo, pPGK, glicerina loira.

INTRODUÇÃO

O mercado de enzimas já movimentou 4,8 bilhões de dólares em 2013, segundo relatório do Business Communications Company Incorporated e a projeção é que cresça 6,3% ao ano até 2022. Dentre os diversos tipos de enzimas comercializadas, as lipases (EC 3.1.1.3) representam 5% deste montante e sua parcela deve aumentar para 6,2% em até 2017 (Grupo Freedomia, 2014). Para a expressão eucariótica da lipase B de *Candida Antarctica* a levedura *Pichia pastoris* foi escolhida pois é uma excelente plataforma, amplamente utilizada, que não requer meio de cultura complexos, pode atingir alta densidade celular, é capaz de realizar modificações pós-traducionais e, além disso, prefere o metabolismo aeróbio (Cregg et al., 2000).

O promotor mais utilizado em transformações de enzimas recombinantes em *Pichia pastoris* é o AOX1 (Macauley-Patrick et al., 2005), no entanto, a produção neste caso precisa ser induzida pela adição de metanol como fonte de carbono no meio de cultivo após o crescimento da biomassa. A necessidade da utilização de metanol é um fator preocupante



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

quando se considera o aumento de escala da produção, pois há necessidade de medidas de segurança mais restritas que, em geral, elevam o custo do bioprocessamento (Kim et al., 2013). Para contornar este problema, a utilização de promotores constitutivos, como o pGAP ou pPGK, podem ser excelentes opções (Wang et al., 2012; Garcia-Ortega et al., 2013).

Visando obter um meio de cultivo para este micro-organismo de baixo custo, com alta produtividade e em consonância com a química verde, torna-se interessante o uso de resíduos e/ou coprodutos agroindustriais. Neste contexto, apenas a produção de biodiesel no Brasil gera cerca de 300 mil toneladas por ano de glicerina loira com tendência de aumento de 5,7% a.a., segundo ANP. Este coproduto pode ser aproveitado como fonte de carbono em diversos bioprocessos aumentando seu valor agregado na cadeia do biodiesel. Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de lipase B de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris* visando a diminuição do custo de produção e aumento de produtividade utilizando este coproduto da indústria do biodiesel.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo: O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Pichia pastoris* da linhagem selvagem X-33 transformadas pela inserção de um vetor de expressão constitutiva pPGKΔ3_PRO_LIPB, construído a partir de um gene sintético de lipase B de *Candida antarctica* (LipB) (Castro et al, 2011).

Meios de cultivo: O meio de cultivo utilizado para fermentação foi o utilizado por Maurer e colaboradores (2006) e a composição do traço de sal apresentada por Zhang e colaboradores (2007).

Processo fermentativo: O biorreator utilizado foi da marca New Brunswick, modelo Bioflo 310 de 7L. Durante o processo fermentativo tentou-se manter, por meio de um controle em cascata, o nível de saturação de oxigênio em 30%, com agitação variando entre 250-700 rpm e a vazão de gás entre 0-1 vvm. A temperatura foi mantida a 30°C e o pH de trabalho foi controlado em 7 com H₂SO₄ 5% e NH₄OH 20%.

Glicerina loira: O oriunda da produção de biodiesel de soja, foi cedida pela Petrobrás e possui 84% de pureza, menos que 1000 ppm de metanol e 7 g/L de NaCl em sua composição.

Análises, estocagem e inóculo: Medidas de biomassa, concentração de glicerol e atividade lipásica espectrofotométrica e titulométrica foram medidos de acordo com metodologia descrita por Robert (2015).

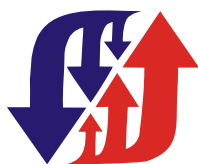
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Visando a utilização de materiais “ecofriendly”, a substituição do glicerol por outra fonte de carbono, a glicerina loira, foi estudada em concentrações crescentes partindo da concentração mais utilizada na literatura (Jahic et al., 2003), 40g/L, em bateladas distintas.

A Tabela 1 mostra a concentração celular final, os rendimentos, a produtividade, a atividade e taxa específica de crescimento obtido para as diferentes concentrações de glicerina loira utilizada.

Tabela 1: Parâmetros fermentativos obtidos da fermentação de *Pichia pastoris* para produção de lip B de *Candida antarctica* com meio mínimo utilizando glicerina loira como substrato em diferentes concentrações.

	40g/L	60g/L	80g/L	100g/L	150g/L
Biomassa (g/L)	15,7	33,9	39,6	50,3	62,9



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

$Y_{x/s}$ (g/g)	0,39	0,55	0,53	0,50	0,42
$Y_{p/x}$ (U/g)	383	493	480	546	392
Q_p (U/g.h)	18,24	18,97	15,02	13,33	8,71
Atividade (U _g /L)	6.013	16.745	19.042	27.491	24.662
μ (h ⁻¹)	0,21	0,18	0,17	0,23	0,19

A concentração celular aumentou progressivamente nas concentrações de 60, 80 e 100g/L, entretanto, o rendimento de biomassa por substrato ficou em torno de 0,5 g/g, que é o valor normalmente reportado para o crescimento desta levedura em glicerol como fonte de carbono (Çalik et al., 2015). Por outro lado, a produtividade decai com o aumento da concentração devido ao maior tempo de cultivo necessário para o esgotamento do glicerol (em torno de 21h até 60g/L chegando às 60h na fermentação de 150g/L). A atividade lipásica, aumenta gradualmente até a concentração de 100g/L de glicerina e sofre uma queda de 13% na concentração de 150g/L. A Figura 1 apresenta a cinética de crescimento de biomassa, atividade de lipB e consumo de glicerol em meio mínimo, no cultivo com 100g/L de glicerina loira (Tabela 1).

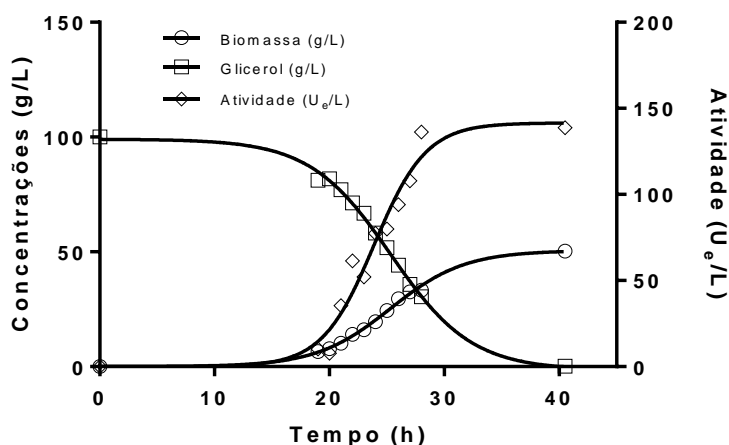


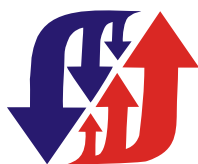
Figura 1: Progressão da fermentação de *Pichia pastoris* utilizando meio mínimo com 10% de glicerina loira como substrato a 30°C, pH 7 e controle em cascata variando agitação entre 250-700 rpm e aeração entre 0-1 vvm.

É possível observar que a produção é associada ao crescimento, como esperado devido ao uso de um promotor constitutivo. A fase lag se estendeu por mais 7 horas quando comparado a batelada de 40 g/L.

Uma estratégia para aumentar a produtividade e manter o cultivo em elevadas densidades celulares é a implementação da alimentação em pulsos da fonte de carbono (Jahic et al., 2003). A fim de determinar se somente um pulso de alimentação geraria ou não alguma inibição celular foi feita a alimentação com um pulso de 100g/L e quatro pulsos separados de 25 g/L, partindo de uma batelada com 100 g/L iniciais de glicerina loira. Os resultados comparativos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros fermentativos obtidos da fermentação de *Pichia pastoris* para produção de lip B de *Candida antarctica* com meio mínimo utilizando 10% de glicerina loira inicial e pulsos somando 100 g/L.

	4 pulsos de 25 g/L	1 pulso de 100 g/L
Biomassa (g/L)	102,84	79,73
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,46	0,45
$Y_{p/x}$ (U/g)	561,34	472,96



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Qp (U/g.h)	7,74	10,26
Atividade (U_t/L)	50040	37709
μ (h⁻¹)	0,14	0,19

A divisão da concentração total (100g/L) de glicerina em quatro pulsos permitiu que o glicerol introduzido fosse consumido rapidamente e ocorreu um aumento de 18,6% no rendimento e na concentração celular. A atividade lipásica final foi 32,7% maior comparativamente a batelada com um pulso. Somente a produtividade decaiu cerca de 24,6% devido ao aumento do tempo total de fermentação.

CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a viabilidade de utilização de um coproduto da indústria do biodiesel para a obtenção de um bioproduto de alto valor agregado e ampla utilização industrial como a lipase B de *Candida antarctica*. O aumento da concentração inicial de glicerina loira nos cultivos para 100 g/L possibilitou um aumento de 357% na atividade lipásica quando comparada com o normalmente encontrado na literatura (40g/L). Além disso, a estratégia de batelada com quatro pulsos levou a um aumento de 32,7% na atividade comparativamente a batelada com um pulso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Çalık, P., Ata, Ö., Güneş, H., Massahı, A., Boy, E., Keskin, A., Öztürk, S., Zerze, G.H., Özdamar, T.H., 2015. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem. Eng. J.* 95, 20– 36.
- Castro, A.M. de, Bevilaqua, J.V., Freire, D.M.G., Torres, F.A., Sant'anna, L.M.M., Gutarra, M.L.E., Barbosa, C.A., Almeida, R.V., Menezes, R.R. de, Cunha, A.G., 2011. Process for production of lipases by genetic modification of yeast. US 20110183400 A1.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R., 2000. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16, 23–52.
- Garcia-Ortega, X., Ferrer, P., Montesinos, J.L., Valero, F., 2013. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. *Biochem. Eng. J.* 79, 172–181.
- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P., Enfors, S.-O., 2003. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb. Cell Fact.* 2, 6.
- Kim, S., Warburton, S., Boldogh, I., Svensson, C., Pon, L., d'Anjou, M., Stadheim, T. a., Choi, B.K., 2013. Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 166, 174–181.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249–270.
- Maurer, M., Kühleitner, M., Gasser, B., Mattanovich, D., 2006. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 5, 37.
- Robert, J., 2015. Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida Antarctica* em *Pichia pastoris*: avaliação de meio de cultivo e aumento de escala. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica.
- Wang, X., Sun, Y., Ke, F., Zhao, H., Liu, T., Xu, L., Liu, Y., Yan, Y., 2012. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1355– 1367.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M.M., 2007. Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations. *Methods Mol. Biol.* 389, 43–64.