



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Otimização do bioprocesso de produção do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui na levedura *Pichia pastoris*

Orientador

Edmar Vaz de Andrade

Aluno

Larissa Matos Batista

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

☐

SIM

☒

NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

☐

SIM

☒

NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

☐

SIM

☒

NÃO

2. 4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados? Especifique.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI NA LEVEDURA *Pichia pastoris*

Bolsista: Larissa Matos Batista, FAPEAM

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0038/2015

OTIMIZAÇÃO DO BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DO HORMÔNIO DE
CRESCIMENTO RECOMBINANTE DE TAMBAQUI NA LEVEDURA *Pichia pastoris*

Bolsista: Larissa Matos Batista, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

Coorientador: Prof. MSc. Elson Antonio Sadalla Pinto

MANAUS

2016

Sumário

Resumo	5
1. Introdução.....	6
2. Justificativa.....	11
3. Objetivos	12
4. Material e Métodos	13
4.1. Linhagem Hospedeira	13
4.2. Meios de cultivos.....	13
4.3. Seleção dos clones de <i>Pichia pastoris</i> produtores de rtGH (<i>blotting</i> de colônia)	14
4.4. Indução dos clones produtores de rtGH em frascos agitados	15
4.5. Determinação dos parâmetros ótimos de produtividade do rtGH em <i>Pichia pastoris</i>	16
4.6. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE.....	17
4.7. Análise <i>Western blotting</i>	18
4.8. Quantificação do rtGH.....	18
5. Resultados e Discussão	19
5.1. <i>Blotting</i> de colônia.....	19
5.2. Indução do hormônio de crescimento recombinante de <i>Pichia pastoris</i> em frascos agitados	20
5.3. Análise em gel SDS-PAGE do produto expresso dos clones Mut ⁺ e Mut ^S	20
5.4. Análise do produto expresso por <i>Western blotting</i> dos clones Mut ⁺ e Mut ^S	21
5.5. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE.....	22
5.6. Determinação dos parâmetros ótimos de produtividade do rtGH em <i>Pichia pastoris</i> recombinante.....	24
5.7. Indução nas condições otimizadas	29
6. Conclusão	29
7. Referências	31
8. Cronograma	35

Resumo

Na piscicultura os genes envolvidos nos processos endócrinos de crescimento estão em evidência, como o hormônio de crescimento (GH), que nos peixes, tem diversas funções e participa de quase todos os principais processos fisiológicos, no entanto, em momentos de estresse durante o cultivo a produção de GH é interrompida, prejudicando seu crescimento adequado, reprodução, imunidade etc. Somado a isto, com o crescente aumento da piscicultura teve-se a necessidade de se desenvolverem novas tecnologias visando acelerar o crescimento de peixes cultivados, a partir dos conhecimentos da biotecnologia como inovação perante as tecnologias tradicionais. Dentre as espécies de peixes existentes, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é evidenciado como o melhor candidato para ser cultivado no Amazonas e no Brasil, por apresentar crescimento rápido, facilidade no manuseio e o hábito alimentar diversificado. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi otimizar o bioprocesso de produção do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115. Para isto, primeiramente foi realizado um rastreio de clones de ambos os fenótipos (Mut⁺ e Mut^s) por meio do *Blotting* de colônia, os dois clones selecionados foram induzidos nas condições padronizadas de acordo com o manual de expressão gênica para verificar qual fenótipo possuía maior nível de expressão do rtGH, juntamente com a análise em SDS-PAGE e *Western blotting*, os resultados demonstram que o fenótipo Mut⁺ produz maior nível de rtGH do que o Mut^s. Após isto foi executado o planejamento fatorial, utilizando o delineamento de Plackett e Burman para otimização dos parâmetros físicos e químicos que poderiam ter efeito sobre a produção e rendimento do rtGH em *P. pastoris* do fenótipo Mut⁺, que foram: extrato de levedura, peptona, ureia, tampão fosfato, pH, biotina, metanol e inoculo, essa metodologia utiliza os conhecimentos da estatística permitindo otimizar através da interação dos fatores, visando conhecer quais parâmetros são significativos no crescimento e rendimento da proteína recombinante. O sobrenadante da cultura foi avaliado por meio do SDS-PAGE e o rtGH quantificado. Os resultados obtidos evidenciaram que o metanol e a peptona foram os principais parâmetros para maiores níveis de produção do rtGH, com níveis de concentração a 0,9% e 3% respectivamente. Com relação à biomassa, o metanol e o extrato de levedura foram significativos para o aumento da massa celular. Portanto a otimização do bioprocesso do rtGH foi uma estratégia empregada para viabilizar o produto de interesse biotecnológico, trazendo benefícios para a sua futura produção como produto que maximize o desempenho zootécnico do peixe e reduza o tempo de cultivo, que influenciará diretamente no preço final do pescado.

Palavras-chave: Tambaqui, hormônio do crescimento, *Pichia pastoris*, otimização.

1. Introdução

A pesca extrativista na Amazônia tem uma superprodução na época da seca e escassez durante a cheia que influencia no preço final do produto (Suframa, 2003). Por isso para diminuir os efeitos desta sazonalidade, a criação de peixes em cativeiro se tornou uma alternativa para a produção e consumo de peixes ao longo do ano.

Na Amazônia Ocidental, as áreas onde mais se concentra a atividade de piscicultura, se distribuem: no Amazonas, Rondônia, Acre e Roraima. Sendo o tambaqui a principal espécie criada (Suframa, 2003). Além disso, o pacu, o tambaqui e a pirapitinga, bem como alguns híbridos entre estas espécies, são os peixes redondos de maior importância para a piscicultura comercial no Brasil e em países vizinhos (Kubitza, 2004).

Com relação ao tambaqui, sua criação vem crescendo no País e os dados oficiais indicam que a produção nacional de tambaqui já corresponde a 22,6% da produção total da piscicultura brasileira, o que representa 88,7 mil toneladas/ano, das 392,5 mil toneladas/ano da piscicultura nacional. Os dados são da pesquisa Produção da Pecuária Municipal, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (Embrapa, 2015). Na capital de Manaus a produção do tambaqui no ano de 2014 chegou a 810.000 quilogramas do pescado (IBGE, 2014).

No Amazonas, maior bacia hidrográfica do mundo, o constante aumento da pressão da pesca extrativista sobre os estoques de populações naturais de peixe, associado ao aumento da demanda pelo pescado, vem contribuindo para a propagação da piscicultura no estado. Com o aumento das criações em cativeiro, agrava-se a necessidade de se desenvolverem novas tecnologias de produção, buscando implementar o rendimento produtivo. Neste cenário, a principal espécie nativa dos rios Amazonas, Orinoco e seus afluentes, cultivada no Brasil, é o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o qual é destacado como o melhor candidato nativo para a piscicultura intensiva na Amazônia e em outras áreas do Brasil (Embrapa, 2012; Suframa, 2003).

Dentre as excelentes qualidades do tambaqui, suas características o colocam como um dos peixes mais apropriados para a piscicultura é um peixe redondo, apresenta crescimento rápido, fácil manuseio e o hábito alimentar diverso, sendo onívoro, é capaz de aproveitar diversos tipos de alimentos, desde frutas, caramujos,

pequenos peixes, plantas, sementes, entre outros, de acordo com a disponibilidade destes alimentos ao longo do ano (Kubitza, 2004b; Fernandes, 2005). É uma espécie rústica e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água. Em cativeiro aceita bem ração, grãos e subprodutos agroindustriais. Uma das razões do sucesso da adaptação do tambaqui para o cultivo em cativeiro é exatamente a sua capacidade de aproveitar vários tipos de alimentos disponíveis no viveiro, inclusive a sua capacidade de filtrado o plâncton (Suframa, 2003). É da Família Characidae, sendo um peixe de escamas, corpo romboidal, nadadeira adiposa curta com raios na extremidade, dentes molariformes e rastros branquiais longos e numerosos. Na natureza alcança porte máximo em torno de 100 cm e acima de 30 kg de peso. A coloração geralmente é parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo, mas pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água (Fernandes, 2005; Suframa, 2003).

Deste modo, o fato de estarmos localizados na bacia amazônica, que é a região que detém a maior parte da mais extensa bacia hidrográfica do mundo, com 6.112.000 Km² cujos moradores possuem o hábito alimentar de consumir peixes, sendo que um dos peixes mais apreciados na Amazônia e em outras regiões é o tambaqui, pelo seu sabor único, consistência, coloração branca da carne, facilidade para obtenção de filés e cuja tecnologia de reprodução e criação em cativeiro é conhecida, tem-se buscado desenvolver novas tecnologias de cultivo do tambaqui com vista ao aumento do seu rendimento (Sebrae, 2001; Souza, 2009; Ibama, 2009).

Este acontecimento faz com que cresça a demanda por novas tecnologias no cultivo de peixes possibilitado a abertura de uma importante porta para o uso da tecnologia do DNA recombinante na piscicultura regional. Neste aspecto, a expressão de um gene do tambaqui poderá abrir perspectivas para gerar produtos de interesse biotecnológico (Souza, 2009).

Na piscicultura, os genes envolvidos nos processos endócrinos de crescimento, têm um papel de destaque. O hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina é um olipeptídeo de aproximadamente 22 kDa, composto de 190 a 204 aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal). Sua estrutura proteica é globular sendo constituída de 4 alfa-hélices antiparalelas com 2 pontes dissulfeto entre as cadeias e uma porção aminoterminal invariável (Wallis, 1992).

Pesquisas intensas ao longo das últimas três ou quatro décadas tem demonstrado que a hormônio do crescimento (GH) tem uma posição central como um regulador do sistema endócrino e de funções fisiológicas nos peixes. O GH é um elemento essencial na regulação do crescimento, e é um hormônio com complexas funções metabólicas (Björnsson *et al.*, 2002). Nos peixes, tem muitas funções diferentes e participa de quase todos os principais processos fisiológicos do corpo, incluindo a regulação iônica e de lipídios, proteínas, equilíbrio osmótico, metabolismo de carboidratos, crescimento do tecido esquelético e tecidos moles, reprodução e a função imunitária (Yousefian e Shirzad, 2011), é um componente principal de um complexo sistema endócrino. Sinais neurais, neuroendócrinos e endócrinos estão integrados no sistema nervoso central e na hipófise para regular a taxa de secreção de GH (Björnsson *et al.*, 2002).

Por isso espera-se que alguma das aplicabilidades do uso do hormônio de crescimento recombinante seja a sua adição em rações de peixes, com vistas a um melhor rendimento no crescimento do peixe e diminuição no tempo de espera para comercialização do pescado (Souza, 2009). Pois, o mercado de rações para organismos aquáticos é o que mais cresce no mundo, dobrando a produção na última década. Esse aumento na produção ocorre principalmente devido aos avanços tecnológicos nos sistemas de produção de peixes e rações (Embrapa, 2014). Além disso, o sucesso da expressão heteróloga por meio das técnicas moleculares sugere a possibilidade de produção em larga escala do hormônio de crescimento de peixes, que pode ser utilizado como fator anabólico suplementar em rações comumente utilizadas em piscicultura, o que será uma inovação nas tecnologias de cultivo de pescados (Sadalla-Pinto, 2012).

Assim, estudos sugerem que o uso de leveduras pode trazer benefícios à produção animal, pois através da complementação ou suplementação da alimentação com a levedura *Pichia pastoris*, será possível introduzir outras proteínas no organismo dos animais como forma de estimular seu crescimento e sua imunidade, além de suprir eventuais deficiências nutricionais, que podem aparecer eventualmente em certas dietas (França, 2011).

A *P. pastoris* representa um excelente modelo de expressão heteróloga a ser empregado quando se deseja produzir maiores quantidades de proteína recombinante (Cintra, 2010), tem muitas vantagens de eucariontes superiores, tais

como sistema de expressão, processamento e dobramento de proteína, modificação pós-traducionais que a tornam muito úteis como sistema de expressão de proteína (Invitrogen, 2010). Por ser um eucarioto possui a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, tais como processamento proteolítico, dobramento, formação de ponte de dissulfeto e glicosilação. Assim, muitas proteínas expressas no sistema procarioto com formas inativas podem ser produzidas com atividade biológica em *P. pastoris* (Yu et al., 2014).

Pichia pastoris tem sido descrita como um sistema adequado de expressão de proteínas heteróloga devido algumas propriedades favoráveis como: altos níveis de expressão sob o controle do promotor AOX1 que permite a transcrição dos produtos gênicos a ele fusionados sob regulação de metanol e integração do cassete de expressão no genoma da levedura de forma estável (Cereghino e Cregg, 2000; Cregg et al., 2009). Dessa forma, proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas quer intracelularmente ou extracelular. Porque esta levedura segrega apenas baixos níveis de proteínas endógenas, ou seja, a proteína heteróloga secretada constitui a maior parte da proteína total no meio (Cereghino e Cregg, 2000). Sendo assim, a expressão de qualquer gene estranho em *P. pastoris* exige três passos básicos: (1) a inserção do gene para um vetor de expressão; (2) introdução do vetor de expressão no genoma de *P. pastoris*; e (3) o exame de expressão do potencial de estirpes para o produto do gene estranho (Cereghino e Cregg, 2000).

Além do mais, existem fenótipos associados ao metabolismo do metanol, como Mut⁺ (*methanol utilization plus*) o qual se refere a capacidade da estirpe em metabolizar metanol como única fonte de carbono, pela presença dos genes AOX1 e AOX2, contudo o AOX1 é o produto do gene responsável pela maior parte da atividade de oxidase de álcool na célula. A expressão do gene AOX1 é fortemente regulada e induzida por metanol a níveis muito elevados. As estirpes que apresentam fenótipo Mut^s (*methanol utilization slow*) mostram pouco crescimento em meio de metanol pela perda do gene AOX1, resultando em uma redução da capacidade das células em metabolizar metanol (Cereghino e Cregg, 2000; Invitrogen, 2010).

Assim, é imprescindível a realização de teste com clones recombinantes de ambos os fenótipos, para a verificação do rendimento do rtGH na otimização dos

parâmetros físicos e químicos do meio de cultivo. Pois a otimização dos processos biotecnológicos é um passo fundamental para o estabelecimento de estratégias racionais visando à melhoria de rendimento, seja por meio de engenharia genética, ambiente com os ajustes das condições de funcionamento, ou ambos (Marin-Sanguino *et al.*, 2007). Logo, a otimização de processos de cultura depende em grande parte do equilíbrio entre a viabilidade da cultura em longo prazo e aumento da produtividade. Portanto, existe uma necessidade de identificar e quantificar esta troca entre crescimento e formação de produto, a fim de obter as condições ótimas do cultivo (Koutinas *et al.*, 2012).

Os parâmetros de bioprocessos, incluindo composição do meio, pH, temperatura, taxa de arejamento, e a indução da alimentação são estratégias de extrema importância, uma vez que afeta diretamente o rendimento da produção. Estes parâmetros variam de acordo com o genótipo da estirpe produtora e/ou da proteína recombinante (Fickers, 2014).

Diante disto, numerosos estudos vem demonstrado que otimizar utilizando os conhecimentos da estatística, como o planejamento de Plackett-Burman e a metodologia da superfície de resposta (RSM) podem ser mais eficiente, pois é possível conhecer a resposta obtida através da interação entre os fatores e não apenas a otimização de um fator de cada vez (Batra, Beri e Mishra, 2014; Ma *et al.*, 2014; Ping, Yuan e Yun-Ping, 2011; Vellanki, Potumarthi e Mangamoori, 2009; Vellank *et al.*, 2013). A partir desses resultados, alguns fatores são descritos como influenciadores na produção/rendimento da proteína recombinante, entre eles estão o pH, concentração do metanol, composição do meio de cultura e a temperatura.

Portanto, o objetivo deste trabalho é otimizar o bioprocesso de produção do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115. Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de inovações biotecnológicas, visando ser utilizadas no melhoramento do rendimento do rtGH, aumentando com isso a produtividade do tambaqui, tornando-o uma espécie mais rentável à piscicultura, pois, vários estudos têm demonstrado que a administração do hormônio de crescimento recombinante tem acelerado a taxa de crescimento de diversas espécies de peixes (Jia *et al.*, 2014; Acosta *et al.*, 2009).

2. Justificativa

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, espécie de peixe endêmica e amplamente distribuída nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, ocorrendo no Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia e Venezuela (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Costa et al., 2001), é o segundo maior peixe de escamas da América do Sul (Isaac & Ruffino, 2000), atrás apenas do pirarucu, *Arapaima gigas*.

Por reunir características que o tornam apropriado à piscicultura (Woynarovich, 1986; Araújo-Lima & Goulding, 1998), o tambaqui é atualmente a espécie nativa mais cultivada e produzida no Amazonas e no Brasil: em 2010 foi responsável por 13,77 % da produção nacional (394.340,0 toneladas) ficando atrás somente das espécies exóticas carpa e tilápia, que juntas somaram 63,4 % (MPA, 2012). Atualmente, de cada cinco tambaqui consumidos no Amazonas, quatro são provenientes de cativeiro (Jacometo et al., 2010).

Em 2012 foi anunciado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária que o tambaqui e a cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) serão as primeiras espécies brasileiras de peixe a terem seu genoma sequenciado (Embrapa, 2012). Além disso, o tambaqui é uma das poucas espécies amazônicas que possuem pacotes tecnológicos de cultivo e manejo bem estabelecidos (Melo et al., 2001; Izel & Melo, 2004).

Assim com a realização desse projeto foi possível obter estratégias e tecnologias para melhorar o potencial produtivo desta importante espécie da piscicultura brasileira, além de oferecer um conhecimento abrangente para a produção de um produto biotecnológico para piscicultura da região amazônica.

3. Objetivos

Geral:

Otimizar o bioprocesso de produção do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui (rtGH) na levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115.

Específicos:

- ✓ Realizar planejamento fatorial para otimização dos seguintes parâmetros físicos e químicos que podem ter efeito sobre a produção e rendimento do rtGH em *P. pastoris*: (a) concentração do extrato de levedura, (b) peptona, (c) ureia, (d) tampão fosfato, (e) biotina, (f) metanol, (g) densidade celular do inoculo e (h) pH.
- ✓ Realizar a indução do rtGH nas condições otimizadas em sistema de frascos agitados.

4. Material e Métodos

4.1. Linhagem Hospedeira

- ***Pichia pastoris* GS115**: linhagem de genótipo *his4* e fenótipo Mut⁺. Possui mutação no gene *his4* codificador da enzima histidinol desidrogenase, o que conferi incapacidade de sintetizar o aminoácido histidina (His⁻), não crescendo em meio auxotrófico para esse aminoácido. Os transformantes são selecionados por sua habilidade de crescer em meio sem histidina (Invitrogen, 2010). Essa linhagem será utilizada como controle negativo nos experimentos de indução do rtGH.

- ***Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut⁺**: linhagem recombinante produtora de rtGH de fenótipo Mut⁺. Esta linhagem possui em seu genoma o cDNA codificador do GH de tabaqui e a habilidade de sintetizar o aminoácido histidina (Sadalla-Pinto, 2012).

- ***Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut^s**: linhagem recombinante produtora de rtGH de fenótipo Mut^s. Esta linhagem possui em seu genoma o cDNA codificador do GH de tabaqui e a habilidade de sintetizar o aminoácido histidina (Sadalla-Pinto, 2012).

Essas células compõem o acervo de células recombinantes do Laboratório de Tecnologias do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.2. Meios de cultivos

Meio de cultura para manutenção da linhagem de <i>P. pastoris</i>	
YPD (<i>Yeast Extract, Peptone, Dextrose Medium</i>)	Concentração
Extrato de levedura	1%
Peptona	2%
Glicose	2%
Ampicilina	100µg/ml
Agar	2%

Meio de cultura para o aumento de massa celular		Meio de cultura para a indução da expressão da proteína heteróloga	
BMGY-U (Buffered Glycerol Complex Medium)	Concentração	BMMY-U (Buffered Methanol Complex Medium)	Concentração
Extrato de levedura	1%	Extrato de levedura	1%
Peptona	2%	Peptona	2%
Tampão fosfato	100mM	Tampão fosfato	100mM
YNB	1,34%	YNB	1,34%
Glicose	1%	Metanol	0,5%
Ampicilina	100µg/ml	Ampicilina	100µg/ml

Meio de cultura para seleção de células transformantes		Meio de cultura para determinação fenotípica	
MD (<i>Minimal Dextrose Medium</i>)	Concentração	MM (<i>MinimalMethanol Medium</i>)	Concentração
Agar	2%	Agar	2%
YNB	1,34%	YNB	1,34%
Glicose	2%	Metanol	0,5%
Biotina	4x10 ⁻⁵ %	Biotina	4x10 ⁻⁵ %
Ampicilina	100µg/ml	Ampicilina	100µg/ml

4.3. Seleção dos clones de *Pichia pastoris* produtores de rtGH (*blotting* de colônia)

A seleção dos clones produtores de rtGH foi realizada por meio de *blotting* de colônia de acordo com os procedimentos descritos abaixo.

Dois clones de *P. pastoris* recombinante de ambos os fenótipos da linhagem mencionada acima foram separadamente repicados em duas placas: uma com o meio de cultura MD, *Minimal Dextrose Medium* (YNB 1,34%; biotina 4 x 10⁻⁵ %; glicose 2%; ágar 20 g/L) e a outra com o meio de cultura MM, *Minimal Methanol Medium* (YNB 1,34%; biotina 4 x 10⁻⁵ %; metanol 0,5%; ágar 20 g/L). Esta etapa foi realizada com o auxílio de palitos estéreis, e as mesmas colônias foram repicadas nas duas placas, sendo, portanto réplicas entre si. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas. A placa com meio MD foi estocada a 4 °C e a placa com meio MM

foi utilizada para a seleção de clones secretores de rtGH, conforme os procedimentos a seguir.

Uma membrana de nitrocelulose foi colocada sobre as colônias na placa. Em seguida foram colocadas três camadas de papel de filtro, seguida de várias camadas de papel toalha. A placa foi tampada com o auxílio de um peso (aproximadamente 500 g), e novamente incubada por 3 horas a 30 °C para transferência das proteínas do meio à membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi lavada com tampão PBST (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ pH 7,2 10 mM; Tween20 0,1%) para retirar o excesso de células e de meio de cultura. Após, a membrana foi incubada com solução de bloqueio (leite desnatado 5 %, p/v, em PBST). A incubação foi por 1 hora a temperatura ambiente ou por 16 a 20 horas a 4 °C sob agitação branda. Após, a membrana saturada foi lavada 3 vezes com o tampão PBST. Em seguida, a membrana foi embebida em solução contendo o primeiro anticorpo (anti-His-tag C-terminal) e o sistema incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes com PBST. Em seguida, a membrana, foi embebida em solução contendo o segundo anticorpo conjugado com fosfatase alcalina e o sistema incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes com PBST e uma vez com APB (Tris-HCl pH 9,5 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM). Em seguida foram adicionados 10-20 mL das soluções reveladoras BCIP e NBT (Invitrogen, *BCIP/NBT Kit*) dissolvidos em APB, conforme recomendações do fabricante. Após a incubação de 5 a 15 minutos, sob leve agitação, a reação foi parada através da retirada dos reagentes por sucessivas lavagens com água destilada.

A intensidade e o tamanho das manchas ao redor de cada colônia reflete aproximadamente o nível de secreção da proteína recombinante (rtGH) pelos diferentes clones. Os clones correspondentes aos maiores níveis de secreção foram selecionados para os experimentos posteriores.

4.4. Indução dos clones produtores de rtGH em frascos agitados

Para se determinar quais os clones recombinantes produtores de rtGH são mais produtivos, foi realizado um experimento de indução em frascos agitados nas

condições padronizadas pelo manual de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010). Foram testados clones recombinantes de ambos os fenótipos Mut⁺ e Mut^s.

Para aumento de massa celular, os clones selecionados e o controle negativo GS115/pPIC9 foram inoculados em 30 mL de meio de cultura BMGY-U, *Buffered Glycerol Complex Medium* (extrato de levedura 1%; peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100mM; YNB ou uréia 1,34%, biotina 4×10^{-5} %; glicerol 1%; 100 µg/mL de ampicilina) em *erlenmeyer* de 250 mL e incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm até que a cultura atingisse D.O.₆₀₀ (Densidade Óptica a 600 nanômetro) entre 2-6, em tempo aproximado de 18 a 24 horas. Ao atingir a D.O.₆₀₀ necessária, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm/10 minutos a 4 °C e ressuspensas em 50 mL de meio BMMY-U, *Buffered Methanol Complex Medium* (extrato de levedura 1%; peptona 2%, tampão fosfato pH 6,0 100mM; YNB ou uréia 1,34%, biotina 4×10^{-5} %; metanol 0,5%; 100 µg/mL de ampicilina) em frascos *erlenmeyer* de 500 mL a D.O.₆₀₀ = 1,0. A indução do promotor AOX1 foi realizada por adição de metanol absoluto a cada 24 horas às culturas celulares, mantendo uma concentração final de 0,5 % (v/v). A indução da expressão gênica foi realizada durante 120 horas a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm.

Durante a indução foi realizada coleta das culturas nos intervalos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução. As alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 minutos a 4°C e os sobrenadantes imediatamente conservados a -80 °C para posteriores análises.

4.5. Determinação dos parâmetros ótimos de produtividade do rtGH em *Pichia pastoris*

Os clones de *P. pastoris* mais produtivos selecionados no experimento acima foram testados em diferentes condições de indução em frascos agitados a fim de se verificar os valores ótimos de cada parâmetro testado, conforme a metodologia de Plackett e Burman. Os experimentos foram realizados na forma de planejamento fatorial com oito fatores com auxílio do *software statistica 6.0*. Os parâmetros testados foram:

- Extrato de levedura (0,5%; 1%; 1,5%);

- Peptona (1%; 2%; 3%);
- Ureia (0,67%; 1,34%; 2,01%);
- Tampão fosfato (50mM; 100mM; 150mM);
- Biotina (2×10^{-5} ; 4×10^{-5} ; 6×10^{-5})
- Metanol (0,1%; 0,5%; 0,9%)
- Densidade do Inoculo (0,5; 1; 1,5)
- pH (5,5; 6; 6,5)

Após a indução dos parâmetros acima, foi analisado quais parâmetros foram significativos para o crescimento e rendimento do rtGH, em seguida será executado a indução em frascos agitados nas condições otimizadas.

4.6. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE

Os sobrenadantes das culturas coletadas durante o experimento dos itens 4.4 e 4.5 foram analisados em gel desnaturante SDS-PAGE, conforme modificações da metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989).

Alíquotas de aproximadamente 4mL dos sobrenadantes coletados nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de indução foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final 10 %. Após a centrifugação em 12000 rpm a 4 °C, os *pellets* das proteínas precipitadas foram lavados com acetona 100 % gelada e em seguida ressuspensos em 100 μ L de tampão de amostra 1X SDS-PAGE (200 mM Tris pH 6,8; 0,1 % azul de bromofenol (p/v); 4 % SDS (v/v); 4 % β -mercaptoetanol; 20 % glicerol (v/v)). Em seguida, as amostras foram fervidas a 100 °C em banho-maria por 5 minutos e prontamente incubadas em gelo até a aplicação no gel SDS-PAGE. As amostras foram aplicadas em um sistema de minigel com gradientes de poliacrilamida de 5 % concentrador e 15 % separador. A eletroforese foi realizada em tempo aproximado de 2-4 horas nas seguintes condições: tensão 200 volts, corrente 50 mA e potência 30W. O marcador molecular utilizado foi o GH de humano isoforma de 20 kDa, gentilmente cedido pela empresa Cristália-Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA.

Após a corrida eletroforética, o gel com as proteínas separadas foi submerso por 30 minutos em solução fixadora (ácido acético 10 %, metanol 40 %) e em

seguida corado com azul brilhante de *Coomassie* (0,1 % de *Coomassie*G-250 (p/v), ácido fosfórico 2 % (v/v), sulfato de amônio 10 % (p/v), metanol 20 % (v/v)) por incubação *overnight*. Após esse período, o gel foi submerso em água destilada para perder o excesso de corante para que sua imagem fosse então documentada por digitalização em *scanner* (LabScan 5.0, GE Healthcare).

4.7. Análise *Western blotting*

Para confirmação do rtGH nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* recombinantes induzidas por metanol foi realizado *Western blotting* utilizando um anticorpo primário que reage especificamente com a cauda de seis resíduos de histidina fusionada em C-terminal da proteína recombinante.

Após a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema de transferência semi-seco (Trans-Blot®SD, Semi-DryTransfCell, Bio-Rad) durante aproximadamente uma 1 h nas seguintes condições: 10 volts, 0,13 A, 1 W. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose com as proteínas imobilizadas foram tratadas com o anticorpo primário na diluição de 1:2000. O anticorpo secundário e os demais reagentes utilizados foram componentes do *kit Western Breeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen), cujos procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle negativo foi utilizado *P. pastoris* GS115/pPIC- α AMY. Após a revelação das amostras na membrana, a imagem foi documentada por digitalização em *scanner*.

4.8. Quantificação do rtGH

A quantificação dos níveis de produção do rtGH obtidos durante a indução no sistema de frascos agitados foi realizada através do método BSA, como proteína padrão.

Para o preparo do BSA, foi retirado 2 μ L de BSA e solubilizado em 198 μ L de tampão de amostra, o qual foi aplicado no gel SDS-PAGE nas concentrações de 0,1 μ g; 0,4 μ g; 0,7 μ g; 1 μ g; 1,3 μ g de BSA.

A quantidade de rtGH no sobrenadante das culturas induzidas foi estimada por densitometria de bandas no gel SDS-PAGE utilizando *software* Image Master

2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Um gradiente de 0,1 a 1,3 μ g de BSA foi aplicado no gel, juntamente com as amostras, para obtenção da curva padrão e equação da reta utilizada para calcular a quantidade de rtGH nas amostras.

5. Resultados e Discussão

5.1. *Blotting* de colônia

Na figura 1 é apresentado os resultados obtidos de alguns clones transformantes dentre os 135 com diferentes níveis de intensidade das manchas. Desse total, alguns clones de ambos os fenótipos foram selecionados aleatoriamente para a etapa de indução do rtGH. Os sobrenadantes do meio de cultura foram analisados em gel SDS-PAGE e *Western blotting*, os resultados evidenciaram que os clones com níveis mais elevados de expressão do rtGH não fora os clones com manchas mais intensas no *blotting* de colônia. Assim, pode-se inferir que a técnica do *blotting* de colônia é um método que confirma a expressão, porém, quando se refere ao nível de produção do rtGH, não é evidenciado um resultado real e confirmatório, assim a intensidade e o tamanho ao redor da colônia nem sempre possui correlação linear com o nível de expressão (Cregg *et al.*, 2009).

Assim, dos 135 transformantes positivos para a produção do rtGH realizados na etapa anterior, os que se destacaram foram os clones 2 Mut^s e 32 Mut⁺ apresentando os melhores resultados na produção do rtGH, os quais foram selecionados para os experimentos posteriores de indução do rtGH em frascos agitados, análise em gel de proteínas e a confirmação por *Western blot*, etapas que serão discutidas a seguir.



Figura 1: Blotting de Colônia dos clones de *P. pastoris* GS115 pPIC-tGH/Mut^s/ Mut⁺, indicando o clone 32 Mut⁺ e clone 2 Mut^s. O controle negativo esta indicado por uma seta vermelha na parte superior central da placa.

5.2. Indução do hormônio de crescimento recombinante de *Pichia pastoris* em frascos agitados

Os clones de *Pichia pastoris* GS115 Mut⁺/Mut^s selecionados no experimento acima foram induzidos em frascos agitados de acordo com as condições padronizadas pelo manual de expressão gênica em *P. pastoris* (Invitrogen, 2010), apresentando crescimento durante o processo de indução. Com esse experimento foi possível comparar o crescimento e produção da proteína recombinante, que nesse caso é o hormônio de crescimento recombinante de tabaqui em ambos os fenótipos, com o objetivo de detectar o melhor fenótipo para a produção do rtGH.

A partir do projeto executado anteriormente pode-se observar que no tempo de 72 horas de indução a cultura atinge um padrão de crescimento adequado, assim como a produção do rtGH. Confirmando esse resultado, Souza (2009) descreve que nesse mesmo tempo atingiu um nível máximo de expressão/secreção do hormônio de crescimento recombinante de tabaqui na levedura *P. pastoris*, por isso esse tempo foi escolhido para serem realizadas todas as análises posteriores.

5.3. Análise em gel SDS-PAGE do produto expresso dos clones Mut⁺ e Mut^s

Na figura 2 é possível visualizar o perfil eletroforético dos clones Mut⁺ e Mut^s em gel SDS-PAGE, com a presença de uma banda proteica correspondente ao

hormônio de crescimento recombinante de tabaqui, entre 25 e 15 KDa, com ausência da mesma no controle negativo, com esse resultado fica nítido a diferença na produção do rtGH dos clones de ambos os fenótipos, a partir da intensidade das bandas. O resultado evidencia que o clone 32 Mut⁺ é melhor produtor do que o clones 2 Mut^S.

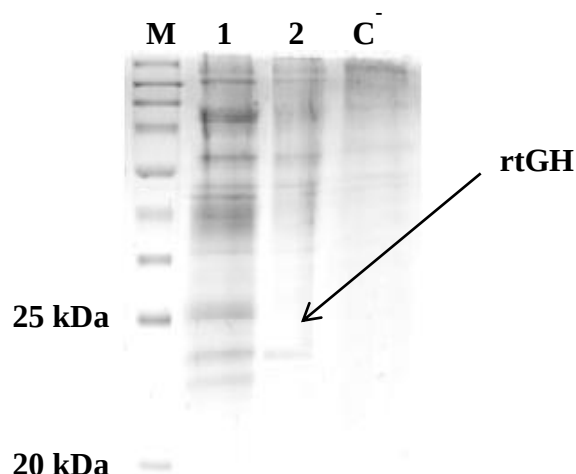


Figura 2: Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tabaqui (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/Mut^S/Mut⁺). M: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Poço 1: Clone 32 Mut⁺; Poço 2: Clone 2 Mut^S; C: Controle negativo (GS115/pPIC-GLA/Mut^S). Todos os clones no tempo de 72h de indução.

5.4. Análise do produto expresso por *Western blotting* dos clones Mut⁺ e Mut^S

Para confirmação da detecção do rtGH nos sobrenadantes das culturas de *P. pastoris* de ambos os fenótipos induzidos por metanol, após a eletroforese foi realizado *Western blotting* utilizando um anticorpo primário que reage especificamente com a cauda de seis resíduos de histidina fusionada em C-terminal da proteína recombinante. A análise em *Western blotting* confirmou a presença do tGH recombinante mostrando uma banda de proteína de peso molecular aproximado entre 20 e 25 KDa, indicando que os clones estão expressando a proteína desejada pela presença de bandas coradas na faixa de aproximadamente 23 KDa e a ausência desta banda no controle negativo.

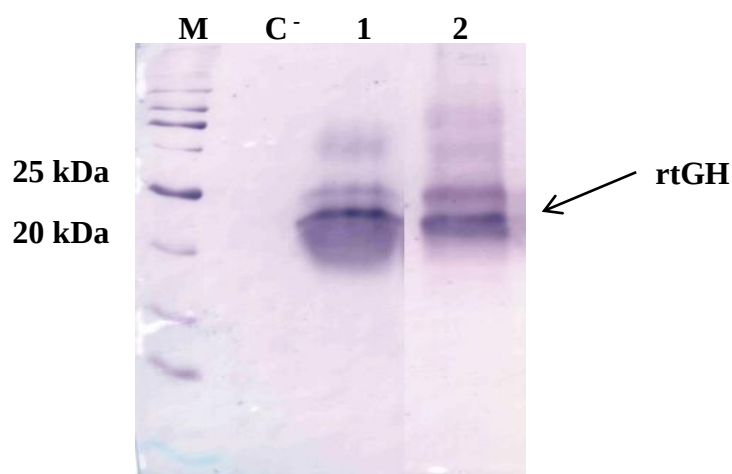


Figura 3: Análise por *Western blotting* da expressão do GH recombinante de tambaqui dos clones de *Pichia pastoris* pPIC-tGH/Mut^S/Mut⁺. M: marcador com cauda histidina (Invitrogen); C⁻: (GS115/pPIC- α AMY, controle negativo); Poço 1: Clone 2 Mut^S; Poço 2: Clone 32 Mut⁺. Todos os clones no tempo de 72h de indução.

A partir dos resultados obtidos no gel eletroforético SDS-PAGE e *Western blotting* foi possível comparar o nível de expressão dos clones de ambos os fenótipos. Com isso, o clone 32 Mut⁺ foi selecionado para a etapa de otimização por meio do planejamento de Plackett-Burman.

5.5. Análise do produto expresso em gel desnaturante SDS-PAGE

O clone 32 Mut⁺ selecionado foi induzido em frascos agitados de acordo com a metodologia de Plackett-Burman, a qual é composta por 15 ensaios, que será discutido a seguir. Os sobrenadantes foram determinados e medidos pelo método BCA. Nas figuras 4 e 5 é possível visualizar a banda correspondente ao rtGH próximo a 25 KDa e ausência desta no controle negativo.

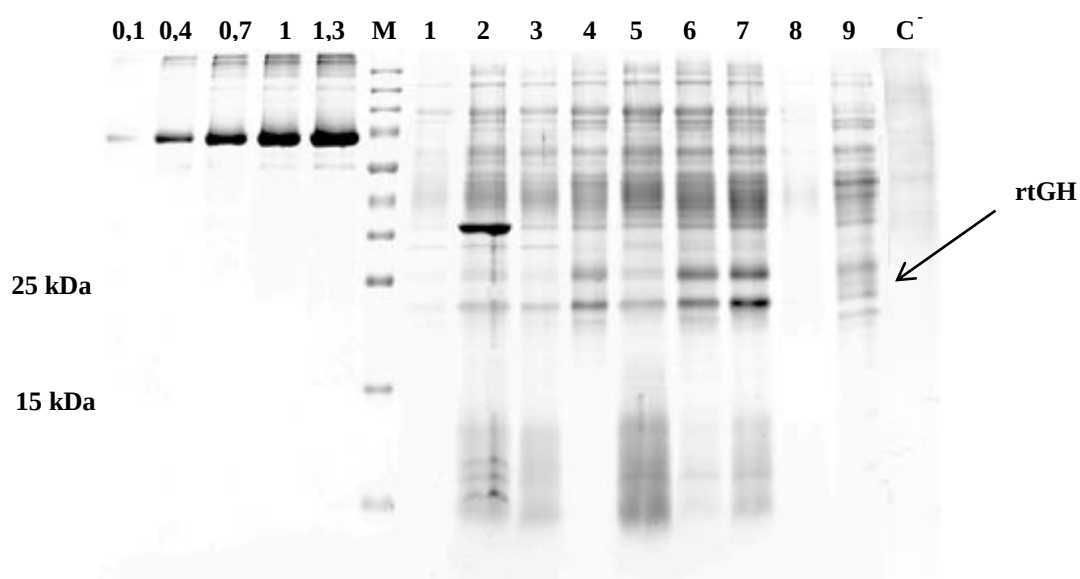


Figura 4: Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tabaqui do clone 32 (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/ Mut⁺). 0,1-1,3: µg de BSA; M: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; 1-9: Ensaios das variáveis estudadas; C-: Controle negativo. Todos os ensaios no tempo de 72h de indução.

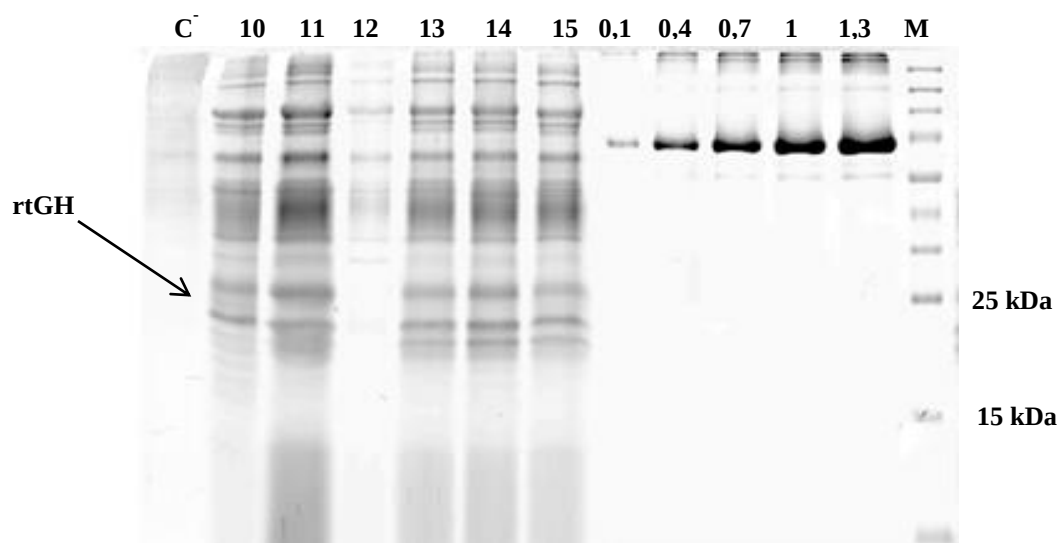


Figura 5: Perfil eletroforético de proteínas em gel SDS-PAGE 15 % da expressão do GH recombinante de tabaqui do clone 32 (*Pichia pastoris* GS115/pPIC-tGH/ Mut⁺). C-: Controle negativo; 10-12: Ensaios das variáveis estudadas; 0,1-1,3: µg de BSA; M: Marcador Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. Todos os ensaios no tempo de 72h de indução.

Em trabalho de expressão do GH de tabaqui em *P. pastoris*, foi observado a partir de 48 horas de indução a presença de bandas inferiores a banda corresponde do tGH recombinante, sugerindo a ocorrência de degradação proteolítica ou a

formação de isoformas do tGH resultantes de diferentes processamentos pós-traducionais (Sadalla-Pinto, 2012). Do mesmo modo é possível observar a presença dessas bandas inferiores em vários ensaios, principalmente nos ensaios da Figura 5, por isso o rtGH ficou com a massa molecular aproximadamente em 23KDa.

Os resultados obtidos demonstraram que a produção do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui expresso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* foi satisfatório, assim como Souza (2009) e Sadalla-Pinto (2012), os quais clonaram e expressaram esse hormônio no mesmo sistema eucarioto.

5.6. Determinação dos parâmetros ótimos de produtividade do rtGH em *Pichia pastoris* recombinante

O delineamento de Plackett e Burman é uma metodologia para a triagem inicial, com um pequeno número de ensaios, tornando possível determinar a influência de vários fatores (Terrazas, 2012). As técnicas que utilizam o método de controle e otimização dos processos, é considerada como alternativa para a produção bem sucedida de proteínas recombinantes (Gao e Shi, 2013). Pois atualmente existe um aumentando quanto a importância dos processos biotecnológicos devido aos benefícios que eles proporcionam, tais como rendimento elevado e baixo custo, no entanto, esses benefícios são dependentes dos nutrientes e das condições do meio de cultura, como o inóculo, pH, agitação, entre outros (Mata-Gómez, 2014). Além de que o método clássico se baseia na otimização de um fator por vez enquanto os outros fatores se matem fixos pode levar a resultados poucos confiáveis e conclusões imprecisas, portanto ele não garante a determinação das condições ideais, sendo incapaz de detectar as interações que ocorrem entre dois ou mais fatores (Ping, Yuan e Yun-Ping, 2011). O delineamento de Plackett e Burman foi composto por oito variáveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Triagem dos fatores que afetam a produção de biomassa e rtGH por meio do delineamento **Plackett & Burman (Screening Design)**

Variável	Código	Intervalo de variação	Nível		
			-1	0	+1
EL	X1	0,5	0,5	1	1,5

Pep	X2	1	1	2	3
Ureia	X3	0,67	0,67	1,34	2,01
T Fosfato	X4	50	50	100	150
Biot	X5	2×10^{-5}	2×10^{-5}	4×10^{-5}	6×10^{-5}
Met	X6	0,4	0,1	0,5	0,9
Inoculo	X7	0,5	0,5	1	1,5
pH	X8	0,5	5,5	6	6,5

Para a triagem dos fatores que afetam a produção e rendimento do rtGH foram realizados quinze ensaios (Tabela 3), sendo doze ensaios com concentração diferentes de todas as variáveis estudadas, variando para mais ou para menos e três ensaios com pontos centrais segundo as recomendações do protocolo de *P. pastoris* (Invitrogen, 2010). Na tabela abaixo é apresentada a matriz de dados com os quinze ensaios e as respostas obtidas através da interação das variáveis, com relação a biomassa e a produção do rtGH em *P. pastoris* fenótipo Mut⁺, após 72 horas de indução. O resultado mostrado também foi representado em forma de gráfico, conforme figura a seguir.

Tabela 3 – Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas.

Ensaios	X1 EL (%)	X2 Pep (%)	X3 Ureia (%)	X4 T.Fosfato (mM)	X5 Biot (%)	X6 Met (%)	X7 Inóculo (D.O.)	X8 pH	Y1 Produção de rtGH (µg/mL)	Y2 Biomassa (g/L)
1	1,5	1	2,01	50	2×10^{-5}	0,1	1,5	6,5	0,2193	1,1330
2	1,5	3	0,67	150	2×10^{-5}	0,1	0,5	6,5	0,2917	1,5642
3	0,5	3	2,01	50	6×10^{-5}	0,1	0,5	5,5	0,2424	0,7744
4	1,5	1	2,01	150	2×10^{-5}	0,9	0,5	5,5	0,5091	2,9986
5	1,5	3	0,67	150	6×10^{-5}	0,1	1,5	5,5	0,4007	1,5092
6	1,5	3	2,01	50	6×10^{-5}	0,9	0,5	6,5	0,7237	2,6202
7	0,5	3	2,01	150	2×10^{-5}	0,9	1,5	5,5	1,3516	2,5674

8	0,5	1	2,01	150	6×10^{-5}	0,1	1,5	6,5	0	0,9306
9	0,5	1	0,67	150	6×10^{-5}	0,9	0,5	6,5	0,3579	2,3672
10	1,5	1	0,67	50	6×10^{-5}	0,9	1,5	5,5	0,4750	2,6598
11	0,5	3	0,67	50	2×10^{-5}	0,9	1,5	6,5	1,0125	2,4046
12	0,5	1	0,67	50	2×10^{-5}	0,1	0,5	5,5	0,1473	0,8646
13	1	2	1,34	100	4×10^{-5}	0,5	1	6	0,4868	2,0966
14	1	2	1,34	100	4×10^{-5}	0,5	1	6	0,6356	2,0966
15	1	2	1,34	100	4×10^{-5}	0,5	1	6	0,4191	2,1890

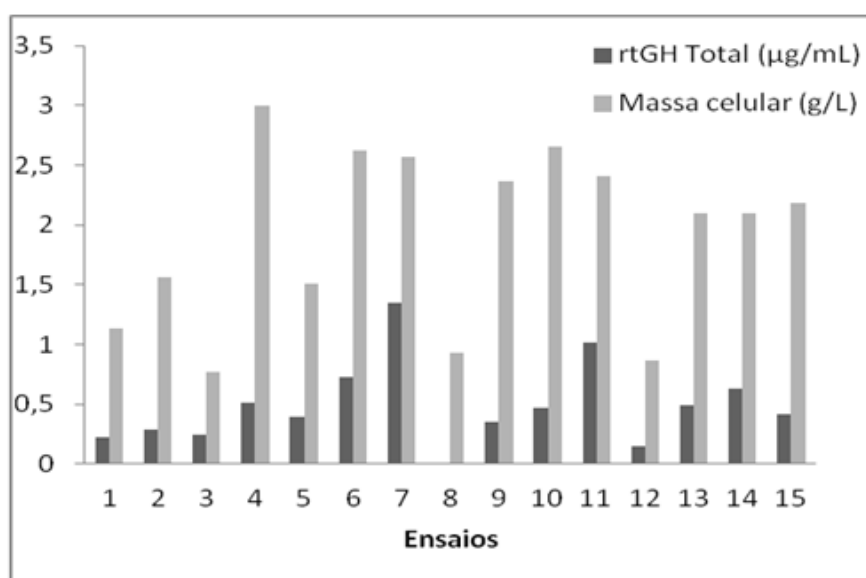


Figura 6: Gráfico de barra dos valores obtidos das variáveis respostas rtGH e biomassa do delineamento Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios e 3 repetições do ponto central após 72 horas de cultivo.

A partir dos resultados representados na Tabela 3 e na Figura 4 é possível observar ao que se refere a produção do rtGH que os ensaios 7 e 11 apresentaram maiores níveis da proteína expressa, com 1,3516 e 1,0125 μg/mL de rtGH respectivamente, essa maior produção é devido a altas concentrações de metanol,

peptona e a densidade do inoculo. Os ensaios que possuíram os menores níveis de produção foram os ensaios 8 e 12, sendo que no ensaio 8 não foi possível detectar a presença de rtGH nos sobrenadantes da cultura. Em relação ao ensaio 12 a produção de rtGH em µg/mL foi de 0,1473, esta menor produção é devida a baixas concentrações de metanol e peptona, visto que, o metanol é um componente essencial quando se deseja produzir altas concentrações da proteína recombinante.

A concentração máxima de metanol testada no presente trabalho foi de 0,9%, semelhante ao obtido por Jin, Meng e Xia (2011), revelando que a adição de metanol a 1% aumentou a atividade de sua enzima rapidamente, produzindo quantidades mais elevadas do que a 0,5%, que é a concentração padrão utilizada. Os resultados de Vellanki, Potumarthi e Mangamoori (2009) enfatizaram que a concentração da fonte de carbono é requisito essencial para a produção em larga escala de estreptoquinase por *P. pastoris*, também observado por Ma et al. (2014), os quais consideram o metanol como significativos na produção de colágeno recombinante, sendo que todos os autores citados acima utilizaram o delineamento de Plackett-Burman para otimização de suas respectivas proteínas recombinantes em *P. pastoris*, confirmando os resultados obtidos.

Com relação a biomassa, os ensaios que possuíram os melhores resultados foram as condições 4, 6 e 10 com 2,9986, 2,6202 e 2,6598 em g/L respectivamente, os quais tem em comum o alto nível de extrato de levedura e metanol. Os ensaios 3, 8 e 12 apresentaram os menores níveis de biomassa, com concentrações baixas de extrato de levedura e metanol.

Diante disto, os resultados evidenciam que o metanol é essencial tanto para a produção de rtGH quanto para o crescimento de massa celular e o extrato de levedura sendo importante para altos níveis de biomassa.

O resultado a seguir vem confirmar os resultados obtidos desta primeira etapa. Assim, um resultado positivo de um fator sobre a resposta (produção de biomassa ou produtividade de rtGH) indica que um aumento nos valores desse fator é acompanhado por um aumento da resposta, assim se um resultado for negativo acarretará na diminuição sobre a resposta.

Com os resultados obtidos foi realizada a análise estatística (Figura 5 e 6), evidenciando os fatores que são significativos ou negativos na produção do rtGH e biomassa. Dentre os oito fatores, o metanol, peptona e inoculo possuem efeitos

significativos sobre a resposta, ou seja, quanto maior é o aumento dessas concentrações durante o cultivo, maior será a produção do rtGH. A biotina que é fonte de vitamina também foi incluída como fator significativo, porém, esta possui efeito negativo, isto é, quando há um aumento na concentração de biotina, menor é a produção de rtGH.

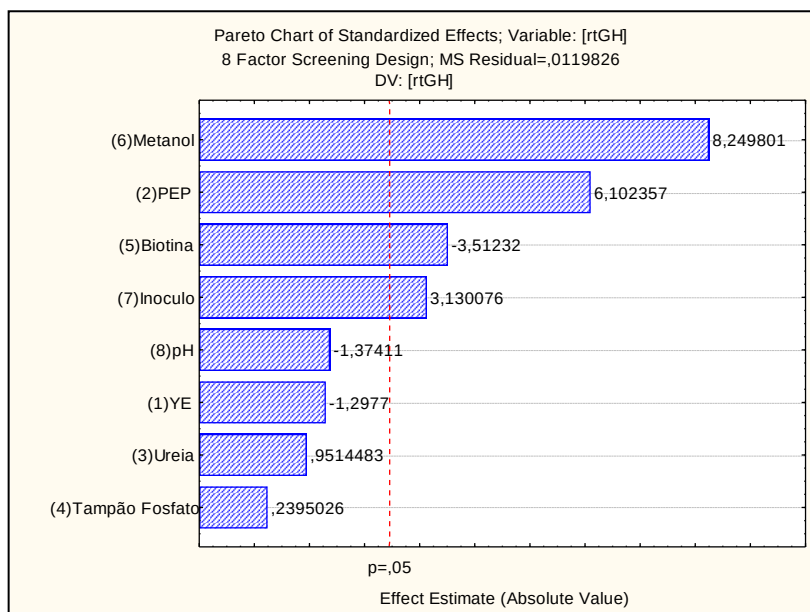


Figura 7: Diagrama de pareto dos oito fatores e seus efeitos negativos ou positivos perante a produção e biomassa do hormônio de crescimento recombinante de tabaqui em *Pichia pastoris*, clone 32 Mut⁺.

Na figura 5 o metanol é indicado como o fator mais significativo, ou seja, apresenta um resultado positivo sobre a resposta, pois, sabe-se que a falta de metanol pode causar declínios na atividade metabólica celular, pois a falta de fontes de carbono não manteria os requisitos para o metabolismo celular. Portanto, as concentrações de metanol durante a fase de indução afetam diretamente a produção de proteína e o crescimento das células. Durante a fase de indução o controle da concentração do metanol é geralmente considerado como um dos fatores cruciais para o sucesso da produção de proteína heteróloga por *P. Pastoris* (Gao e Shi, 2013).

Na figura 6, a seguir são representados quais fatores são significativos para a biomassa e seus efeitos. O metanol, o extrato de levedura e o tampão fosfato são os componentes essenciais para maior biomassa, evidenciado nos resultados

discutidos acima e no gráfico de pareto, sendo que esses três componentes são significativos e com efeitos positivos para o crescimento de massa celular.

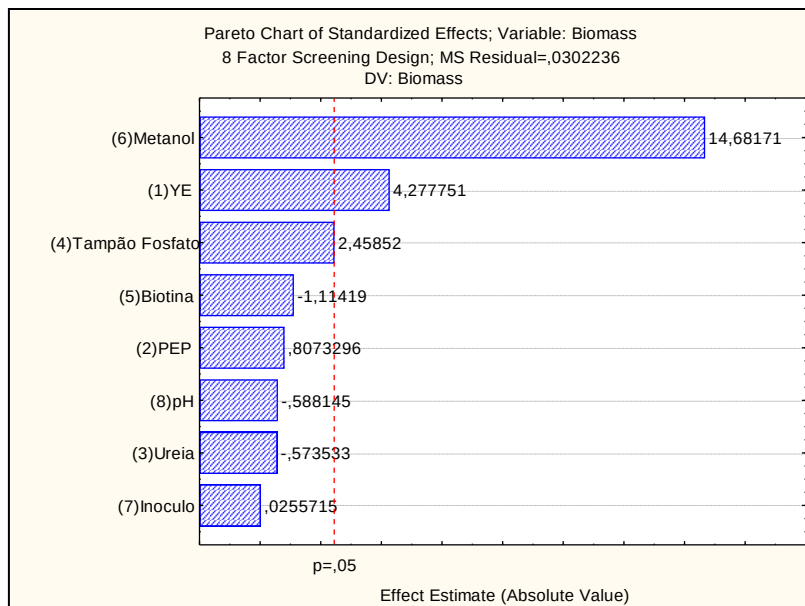


Figura 8: Gráfico de Pareto obtido do delineamento baseado no método Plackett & Burman, com oito fatores, tendo como variável resposta a produção de biomassa. PEP: peptona, YE: extrato de levedura.

5.7. Indução nas condições otimizadas

Diante do extenso trabalho para otimizar por meio do delineamento de Plackett e Burman e o prazo para a entrega do referido trabalho, não foi possível a realização da indução nas condições otimizadas nesse período, no entanto, nos comprometemos na execução dessa ultima etapa no mês de agosto para alcançar os objetivos desse projeto e a apresentação adequada de todas etapas/objetivos no congresso de iniciação científica.

6. Conclusão

Esse trabalho de otimização do hormônio de crescimento recombinante de tambaqui em sistema eucarioto em *Pichia pastoris* foi bem sucedido, pois as

análises estatísticas revelaram ser uma ferramenta de grande utilidade no desenvolvimento de bioprocessos biotecnológicos.

Com esta metodologia foi possível comparar o nível de produção e rendimento do rtGH em *P. pastoris*, com a mudança nas concentrações dos parâmetros físico-químicos, permitindo a interação entre os fatores, diferente das técnicas tradicionais de otimização dos bioprocessos.

Com esses resultados foi possível comprovar que o metanol e a peptona são os fatores de maior importância para a produção do rtGH na levedura, ou seja, as concentrações de 0,9% de metanol e 3% de peptona mostraram melhores resultados do que as concentrações recomendadas pelo manual de expressão gênica de 0,5% e 2% respectivamente, e a concentração de 1,5% de extrato de levedura apresenta melhores resultados quanto ao crescimento de massa celular, diferente do recomendado que é de 1%.

A partir desses resultados será possível a produção do rtGH em grande escala, diminuindo o custo de produção, pois quando aumenta a concentração de metanol, peptona e extrato de levedura no meio de cultivo, maior será a produção do rtGH e biomassa.

7. Referências

- ACOSTA, J.; ESTRADA, M. P.; CARPIO, Y.; RUIZ, O.; MORALES, R.; MARTÍNEZ, E.; VALDÉS, J.; BORROTO, C.; BESADA, V.; SÁNCHEZ, A.; HERRERA, F. 2009. **Tilapia somatotropin polypeptides: potent enhancers of fish growth and innate immunity.** *Biotecnología Aplicada*, Vol.26, nº.3.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. 1998. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia.** Volume 4 de Estudos do Mamirauá. Sociedade Civil Mamirauá. 186p.
- BATRA, J.; BERI, D.; MISHRA, S. 2014. **Response Surface Methodology Based Optimization of β -Glucosidase Production from *Pichia pastoris*.** *Applied Biochem Biotechnol*, 172:380–393.
- BJÖRNSSON, B. T.; JOHANSSON, V.; BENEDET, S.; EINARSDOTTIR, I. E.; HILDAHL, J.; AGUSTSSON, T.; JÖNSSON, E. 2002. **Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action.** *Fish Physiology and Biochemistry*, 27: p.227–242.
- CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. 2000. **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.** *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66p.
- CINTRA, L. C. 2010. **Clonagem e expressão do gene da tioredoxina1 de *Paracoccidioides brasiliensis* em *Pichia pastoris*.** Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- COSTA, L.R.F.; BARTHEM, R.B.; BITTENCOURT, M.M. 2001. **A pesca do tambaqui, *Colossoma macropomum*, com enfoque na área do Médio Solimões, Amazonas, Brasil.** *Acta Amazonica*, 31(3): 449-468p.
- CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. 2009. **Expression in the yeast *Pichia pastoris*.** *Methods in Enzymology*, Vol. 463, 169-188p.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2015. **Plantas medicinais melhoram saúde dos peixes em piscicultura.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/6658495/plantas-medicinais-melhoram-saude-dos-peixes-em-piscicultura>>. Acesso em: 30/12/2015
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fábio Reyno. 2012. **Embrapa inicia o primeiro sequenciamento do genoma de peixes brasileiros.** Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/janeiro/3a-semana/embrapa-inicia-o-primeiro-sequenciamento-do-genoma-de-peixes-brasileiros/>. Acessado em: 20 dezembro de 2015.
- EMBRAPA. I. M. K. P; MORO, G. V.; NAKANDAKARE, I. B. 2014. **Incorporação de aditivos na ração de peixes.** Palmas – Tocantins.

FERNANDES, F. R. R. 2005. **Piscicultura: sustentabilidade e preservação das Espécies tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Matrinxã (*Brycon cephalus*).** Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina – Universidade de São Paulo.

FICKERS, P. 2014. ***Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production.** Current Research in Microbiology and Biotechnology. Vol. 2, No. 3: 354-363.

FRANÇA, R. C. 2011. **Avaliação do Potencial Probiótico da Levedura *Pichia pastoris*.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas- Pelotas.

GAO, M.; SHI, Z. 2013. **Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*.** Chinese Journal of Chemical Engineering, 21(2) 216—226.

IBAMA. **Começa amanhã o defeso do Tambaqui.** 2009. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/>>. Acesso em: 22 de Dez. 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de Dados Agregados – Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA: Produção da Aquicultura por tipo de produto,** 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=3940&z=t&o=21>>. Acesso em: 27 de Abr. 2016.

INVITROGEN. 2010. **For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*.** ISAAC, V.J.; RUFFINO, M.L. 2000. **Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992-1993,** 225-280p. In: IBAMA. Recursos pesqueiros do médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira, (Coleção Meio Ambiente. Serie Estudos Pesca, 22). Brasília.

I

ZEL, A.C.U; MELO, L.A.S. 2004. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em tanques escavados no Estado do Amazonas.** Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 32.

JACOMETO, C.B.; BARRERO, N.M.L.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; GOMES, P.C.; POVH, J.A.; JUNIOR, D.P.S.; VARGAS, L.; RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P. 2010. **Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil.** Pesq. Agropec. Bras., Brasília, Vol. 45, n. 5, 481-487p.

JIA, Y.; JI, X.; WANG, Q.; WANG, L.; LI, N.; DU, Q.; CHANG, Z. 2014. ***Pichia pastoris* Expressing Recombinant *Misgurnus anguillicaudatus* Growth Hormone Promotes the Growth of *M. anguillicaudatus* Larvae.** Pakistan J. Zool., Vol. 46(4), p. 975-981.

JIN, X.; MENG, N.; XIA, L. M. 2011. **Expression of an Endo- β -1,4-glucanase Gene from *Orpinomyces* PC-2 in *Pichia pastoris*.** International Journal of Molecular Sciences, 12, 3366-3380.

KOUTINAS, M.; KIPARISSIDES, A.; PISTIKOPOULOS, E. N.; MANTALARIS, A. 2012. **Bioprocess systems engineering: transferring traditional process engineering principles to industrial biotechnology**. Computational and Structural Biotechnology Journal, Vol. No: 3, Issue:4.

KUBITIZA, F. 2004. **Tambaqui, pacu e híbridos**. Panorama da Aquicultura, Vol. 14, nº 82, março/abril.

MA, X. X.; FAN, D. D.; ZHU, C. H.; SHANG, Z. F.; MI, Y. 2014. **Optimization of fermentation medium for collagen production of recombinant *Pichia pastoris* during induction phase**. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 6(7):1802-1809.

MARIN-SANGUINO, A.; VOIT, E. O.; GONZALEZ-ALCON, C.; TORRES, N. V. 2007. **Optimization of biotechnological systems through geometric programming**. Theoretical Biology and Medical Modelling, 4:38.

MATA-GÓMEZ, L. C.; MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. 2014. **Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview**. Microbial Cell Factories, 13:12.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. 2001. **Criação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) em Viveiros de Argila/Barragens no Estado do Amazonas**. Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 18.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura do ano de 2011**. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf. Acessado em: 23 março de 2016.

PING, Y.; YUAN, Y.; YUN-PING, T. 2011. **Medium optimization for endochitinase production by recombinant *Pichia pastoris* ZJGSU02 using response surface methodology**. African Journal of Biotechnology, Vol. 10(1), pp. 75-84, 3.

SADALLA-PINTO, E. A. 2012. **Clonagem e expressão do cDNA codificador do Hormônio de crescimento de tambaqui (*Colossoma macropomum*) na levedura *Pichia pastoris***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. 2. Ed. New York, 1659p.

SEBRAE. **Criação Comercial de Peixes em Viveiros ou Açudes**, 2001. Disponível em: <<http://www.dce.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

SOUZA, A. R. B. 2009. **Análise do transcriptoma de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma***

***macropomum*) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris*.** Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA.

SUFRAMA. 2003. **Potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica: piscicultura.**

TERRAZAS, W. D. M. 2012. **Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris*.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista – UNESP.

VELLANKI, R. N.; POTUMARTHI, R.; DODDAPANENI, K. K.; ANUBROLU, N.; MANGAMOORI, L. N. 2013. **Constitutive Optimized Production of Streptokinase in *Saccharomyces cerevisiae* Utilizing Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Promoter of *Pichia pastoris*.** BioMed Research International, Article ID 268249, 10p.

VELLANKI, R. N.; POTUMARTHI, R.; MANGAMOORI, L. N. 2009. **Constitutive Expression and Optimization of Nutrients for Streptokinase Production by *Pichia pastoris* Using Statistical Methods.** Applied Biochem Biotechnol, 158:25–40.

WALLIS, M. 1992. **The expanding growth hormone/prolactin family.** *J. Mol. Endo.*, 9:185-188.

WOYNAROVICH, E. 1986. **Tambaqui e pirapitinga: propagação artificial e criação de alevinos.** CODEVASF, Brasília. 68p.

YOUSEFIAN, M.; SHIRZAD, E. 2011. **The review of the effect of growth hormone on immune system, metabolism and osmoregulation of fish.** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(5):467-475.

YU, Y.; ZHOU, X.; WU, S.; WEI, T.; YU, L. 2014. **High-yield production of the human lysozyme by *Pichia pastoris* SMD1168 using response surface methodology and high-cell-density fermentation.** Electronic Journal of Biotechnology, 17: 311–316.

8. Cronograma

Meta/Atividades	Período											
	2015					2016						
	Agos.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abril	Maió	Jun.	Jul.
Revisão/Pesquisa bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Realizar planejamento fatorial para otimização em sistema de frascos agitados.	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
Realizar a indução do rtGH em frascos agitados nas condições otimizadas.					AR	AR	AR	AR	AR			
Análise do produto expresso em gel SDS-PAGE	R	R	R	R	R	R	R	R	R			
Análise do produto expresso por Western Blotting				R	R							
Elaboração do Resumo e Relatório Final										R	R	
Preparo da Apresentação Final para Congresso												R