

ENSIO PILOTO NA PRODUÇÃO DA BACTÉRIA GÊNIO *Leptospira* pi a
 inter de COLETOREATOR DE BA CA D

PEREIRA Maria a B; OLIVEIRA Th¹; OLIVEIRA R² ar íci a
 Di a² DELLAGOSTIN, O dr¹; HARTEW GONDA ia á Da w an

¹ Laboratório de Biotecnologia Molecular - UFPE
² Laboratório de Biotecnologia de Alimentos - UFPA
 Campus Diversitário - Caixa Postal 90.384
mbutsclin@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Leptose, causada por bactéria gênero *Leptospira* é uma zoonose de importância global que é transmitida através de água contaminada com fezes de animais (BRAGA, 2004), podendo estar associada a desastres naturais (DESAI, S. et al., 2005). Sendo um problema de saúde pública, a leptose no setor agropecuario, ou de vacinas, é justificada para populações de risco. Atualmente, a leptose é focada no desenvolvimento de vacinas recombinantes de proteínas de membrana externa (OWEN, ZETTEL, 2005). O grupo de proteínas de membrana LipL32.

A proteína LipL32 tem sido alvo de estudos (BRAGA, 2001; BRAGA, C. et al., 2005; d., 2007). Com o objetivo de subunidade recombinante em *Escherichia coli*, quelexi, a purificação de spores foi realizada por filtração e levadura. Foi aplicada a HARTEW, GONDA et al., 2010). A unidade de destilação é receve e an tag es, to c e s s i m e n t o e m m e s d e c u l t u a r e l a t i v a m e n t e s i m p l e s a p a r t i r d e p r o d u ç ã o p a r a e s t a i n d u s t r i a s, b e m c o m o a p r e e n t a d e t r a n s p o r t e m e m a r (DALY, R.; HEARN, M.T., 2006). Além da simplicidade de secreção e purificação (CHEN, G. P. et al. resente m e n t o, ã o e x p r e s s a o n a l i t e r a t u r a d a p r o d u ç ã o d e L e p t o s p i r a s e m b a n c a d a. A s s i m e s t e t r a b a l h o d e m o n s t r a n e s t a i s c a d e, n o d a p r o d u ç ã o d e u m a n t í L e p t o s p i r a s e t o r s

2 METODOLOGIA

A dimensão dos parâmetros é normalizada em relação a bancada (Bioflo 110 - New Brunswick, 14L, convolumentil L. O inóculo foi cultivado e mantido em 200 rpm) utilizado em 200 mL. O meio de cultivo é o meio BMGY (10g de levedura em 100 mL de água) e o pH é ajustado para 7.0. A fermentação é realizada em 7 L de BMGY. Com a temperatura da fermentação fixada em 30°C, a velocidade de agitação é de 200 rpm. A aeração é feita por um sistema de 204 (Sigmata) e o tempo de fermentação é de 24 horas.

seu controle livre durante o período de 1 vmd e α. Durante o período de 2 fixo em 3% (agitação com 1 vmd e α). Ali mentação do meta no lp ão da proteína r e c o r e a l i z a d a d e m o d o c o n t r o l a d o d e 5% de me t i n c i a d a a p o s o e s t a t a l d e g l i c e r o l n o m e i o d e A c e t a d e a m e t e a r z a d a a o l o g o p r o c e s s o , q u e d e e s s a s f o r a m a l i a d a c o n t a g e n d e c é l u l a r v i á v e i s e m m Y E D á q u a n d o i n c u b a d a s a 28°C p o r 2 4

O sobrenadante foi submetido a filtração por membranas de 0,2 e 0,22 μm (Milipore) e a concentração da proteína foi realizada por espectrofotometria (Liobrás) em amostras de purificação/controle. A quantificação da proteína foi realizada em uma curva padrão com a expressão de E. coli.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução do cultivo de *P. pastoris* expressando a proteína LipL32 foi realizada a 17 horas e a expressão de LipL32 foi detectada a partir de 24 horas de cultivo. A primeira amostra foi coletada a 48 horas de cultivo e se detectou a secreção de Oculi com o ser induzido a partir de 24 horas de presença da proteína. A partir de então (3 e 9 horas de cultivo) o período de expressão foi

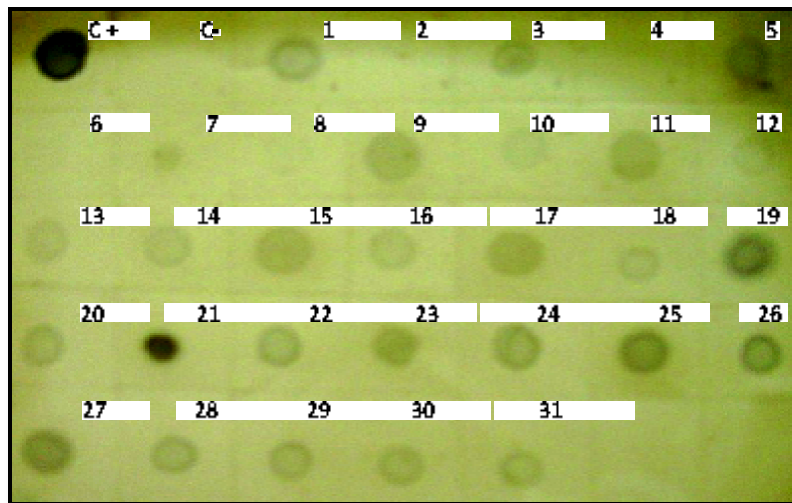


Figura 1: Detecção da expressão de LipL32 ao longo do cultivo. C+, LipL32 expressa e purificada em E. coli; C-, sobrenadante de *P. pastoris* não induzido a 17h de cultivo; 1-5, sobrenadante de 3 e 9h de cultivo; 6-10, 48h de cultivo; 11-15, 72h de cultivo; 16-20, 86h de cultivo; 21-25, 146h de cultivo; 26-31, 27, 28, 29, 30 e 31: amostras após o processo de

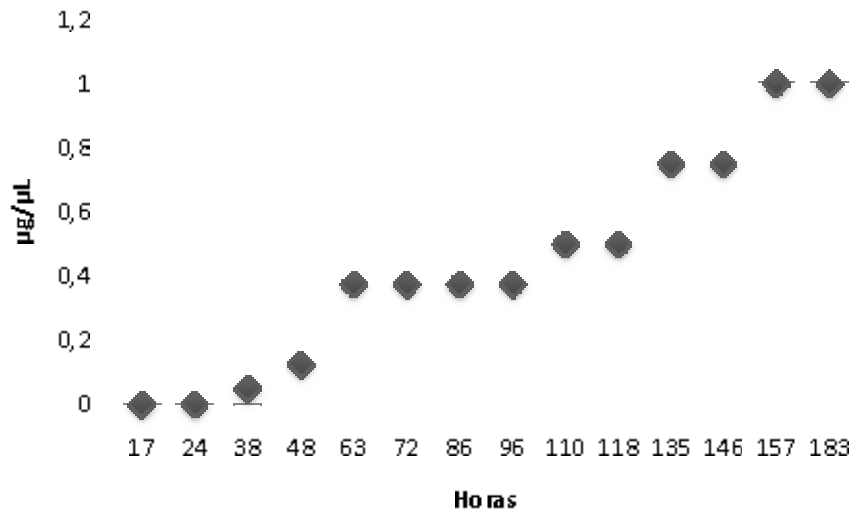


Figura 2 Expressão da proteína recombinante (sobrenadante) em função do tempo de cultivo (horas) em meio de cultura contendo glicose e glicerol.

Após o período de indução, o sobrenadante do cultivo contendo a proteína recombinante foi coletado e filtrado (centrifugação e filtração). Não houve perda de proteína após este processo. Mesmo com esta perda, o rendimento de proteína final do processo foi de 375 mg/L.

A figura 3 mostra a viabilidade de cultura de *P. pastoris* expressando a proteína recombinante em L2. As curvas de crescimento mantiveram um aumento constante durante o cultivo. A partir da contagem, manteve-se em crescimento até o final da operação. Os fatores que levaram ao não crescimento não são pressupostos, que seja devido à diminuição de nutrientes disponíveis no cultivo ou excesso de metanol, que pode ser tóxico para as células. Um a é reduzir a quantidade de metanol presente no meio e fazer experimentos.

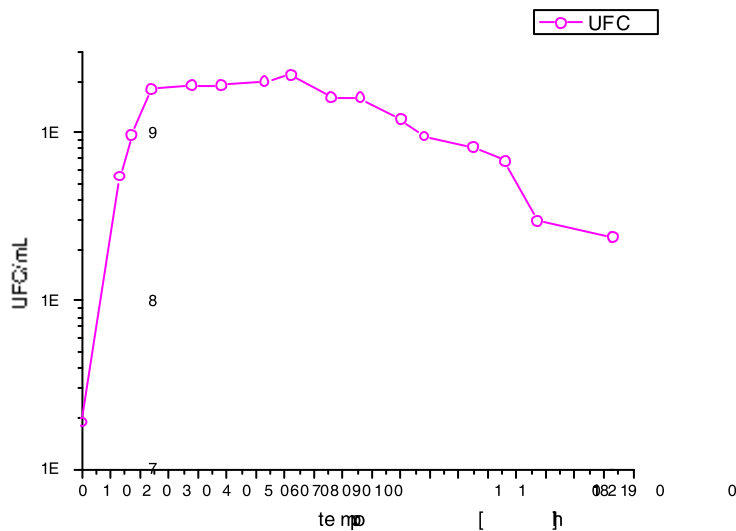


Figura 3 Unidades Formadoras (UFC) de *P. pastoris* no cultivo.

4 CONCLUSÕES

Fô possível expressar a proteína *L. interrogans* baseada em plasmídeos bioretos de *A. baumannii* detectada em amostras de urina (uam de ro sobre ad an e d ca (será de), neste caso com em dme No entanto, roves par âne t d necess tamser avaliada com o intuito expressão, com o pr ex de a quantidade de metano l ra i du ão zeçada de otr os me ôsr culti va A proteí na Lp32 p od zi d serã utilizada em en ai so imunoproteção emhamster e en ês t es d i

5 REFERÊNCIAS

BHARADWAJ R Leptospirosis - a zoonotic disease. *Indian J. Med Res*, 12:13-38, 2004.

BRANGER C, CHATRENET B, GAUVERT A, AUBERT JM, and ANDRIEUX F. Protection of *Leptospira interrogans* against infection with the gene encoding the outer membrane protein OmpA. *Vaccine* 2005; 23: 4062-4069.

BRANGER C, SONRIER C, CHATRENET B, KLUWEN-GOETZ N, JAUSSANT A, ANDRIEUX F, and EL QADHI M. Hemolysin-like proteins in *Leptospira interrogans* by a dog bite. *Vaccine* 2006; 24: 681-686.

CERGHINO P, CERGHINO JL, and LGHIC C. Production of recombinant proteins in fermenter culture of *Bacillus pasteurii*. *Curr. Opin. Biotechnol* 2001; 12: 332-337.

DALY RM, HARRIS M. Epidemiology of leptospirosis in the United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 154-167.

DESAI S, VANTU, LIERZ M, ESPEL W, ZÄCZERWISKI M, SADKOWSKA-TOYS M, ADICOV A, MEBETZ BRA B, NOCKER K, and JANSEN R. Resurgence of febrile leptospirosis among seasonal migrants in Germany in 2007. *Clin. Infect. Dis* 2009; 48: 691-697.

HARTWIG DD, OLIVEIRA TL, SEIXAS FK, and HARTBEINCP M. High incidence of leptospirosis in vaccinated calves. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 76: 9-13.

SEIXAS FK, DA SILVA EF, HARTWIG DD, MARILIM FAGUNDES M, DOSSARG, and DELLACOSTIN OA. Role of immunization against leptospirosis in the Lp32a *Leptospira interrogans* protection studies for vaccination. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 76: 88-95.

WANGZ, JIN L, and WEFZIN A. Leptospirosis. *Microb. Cell* 2007; 16: 39-47.