

USO DE SORBITOL PARA POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO DE ACTIVINA RECOMBINANTE EM *KOMAGATAELLA PHAFFII*

Ana Beatriz Ribeiro Silva¹, Stephany Gonçalves dos Santos^{1 e 2} e Ivan Carlos dos Santos^{1 e 2}

¹Laboratório de Biomoléculas e Biofármacos, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São João del-Rei

²Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), Universidade Federal de São João del-Rei

anabearibeiros@aluno.ufsj.edu.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: A tecnologia de proteínas recombinantes é aplicada em diversas áreas, e oferece produção consistente, alta pureza e personalização, com vantagens significativas sobre fontes naturais. **OBJETIVO:** Este estudo tem como objetivo avaliar o impacto da suplementação de sorbitol na produtividade da proteína activina A. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi utilizada uma cepa recombinante de *Komagataella phaffii* para expressar a proteína activina A sob o controle do promotor AOX1. As células foram pré-cultivadas em meio YPD e transferidas para meio BSM. Durante a fase de indução, sorbitol (25; 50; 75 e 100 g/L) foi adicionado entre induções com metanol. A presença da activina A foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração por prata. Além disso, a proteína foi quantificada utilizando o método de Bradford. **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram que o sorbitol aumentou a expressão da proteína Activina A em até 44%. **CONCLUSÃO:** O sorbitol emerge como um candidato promissor para aprimorar a expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*.

Palavras-chave: Proteínas Recombinantes; Sorbitol; Activina A; *Komagataella phaffii*.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia é crucial para avanços em medicina, terapia gênica e diagnósticos, com as proteínas recombinantes (PR) desempenhando papel central. A produção de PR pode ser feita em larga escala com qualidade e eficácia consistentes, além de facilitar a purificação, reduzindo impurezas e efeitos colaterais, quando comparados a purificações a partir de fontes naturais (Tripathi e Shrivastava, 2019; Jefferis, 2021; Pollet *et al.*, 2021; Garcia Garcia *et al.*, 2023).

Microorganismos como a levedura *Komagataella phaffii* são frequentemente usados como hospedeiros por seu crescimento rápido e alto rendimento de proteínas (Gündüz Ergün *et al.*, 2019; Huertas e Michán, 2019). O promotor AOX1 da *K. phaffii*, ativado por metanol, é essencial para a expressão de PR. complexas (Yang *et al.*, 2018; Türkanoğlu Özçelik *et al.*, 2019). Entretanto, o uso de metanol pode apresentar desafios, tornando a otimização das condições de cultivo fundamental (Heistingner *et al.*, 2020; Bustos *et al.*, 2022). Uma estratégia promissora é o uso de co-substratos como o sorbitol, que não reprime o promotor AOX1 e reduz o consumo de oxigênio e a produção de calor, mantendo ou aumentando a produtividade proteica (Azadi *et al.*, 2017, 2018; Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022, 2023). Isso ocorre porque o sorbitol, sendo um poliol, é metabolizado mais lentamente e gera menos calor durante a combustão do que o metanol (Chen *et al.*, 2018).

No entanto, cada PR apresenta desafios específicos em relação à expressão, tornando crucial o desenvolvimento de estratégias personalizadas de bioprocessamento (Contesini *et al.*, 2020; Gordeeva *et al.*, 2022; Besleaga *et al.*, 2023).

Neste contexto, este estudo concentrou-se em avaliar a expressão da activina A (actA), membro da família TGF- β (Fator de crescimento transformante beta), que desencadeia uma série de eventos biológicos fundamentais, incluindo regulação do ciclo celular, diferenciação celular e regeneração tecidual (Bloise *et al.*, 2019). Foram investigados os efeitos de diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 g/L) de sorbitol sobre a produção da actA, escolhida por suas diversas funções biológicas e aplicações terapêuticas.

METODOLOGIA

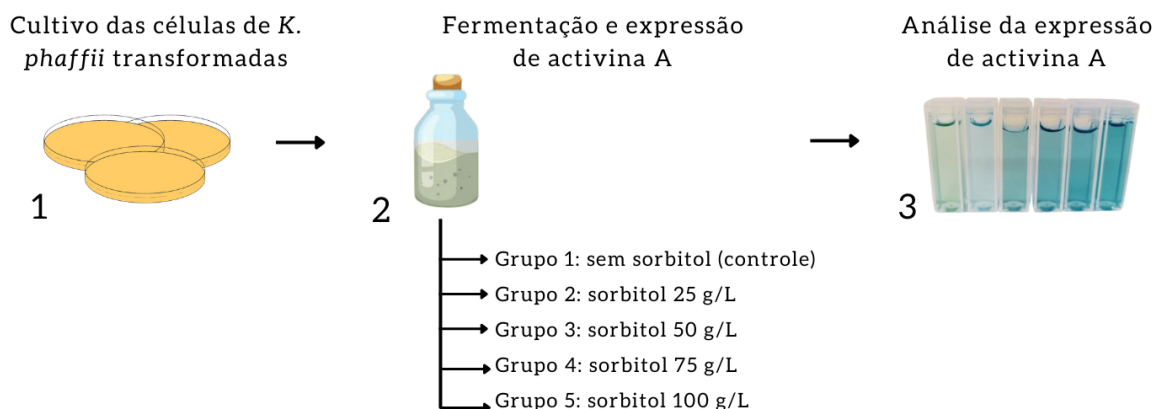


Figura 1- Procedimentos do experimento. Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

Cultivo das células de *K. phaffii* transformadas: O procedimento de cultivo e fermentação segue o protocolo “EasySelect™Pichia Expression Kit” com modificações (Figura 1). Os clones (cAct) capazes de expressar a proteína, de propriedade da Proteobras Desenvolvimento Biotecnológico Ltda., foram fornecidos em parceria pela empresa. O meio sólido YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2% e ágar 3%) esterilizado em autoclave foi vertido em placas de Petri (20 mL). Após solidificado o meio, este foi estriado com 20 µL do cAct por placa, essas foram incubadas em estufa a 30°C por 48 horas.

Fermentação e expressão da actA: O meio líquido BSM (basal salts medium) foi esterilizado em autoclave e, após o resfriamento, foi realizada a transferência dos cAct do YPD para BSM (5 placas para 300 mL), suplementado com de solução de minerais traços (PTM1, 4,35 mL/L). Os cAct foram cultivados sob agitação a 250xg e 30°C por 48 horas. Após isso foi iniciada a indução a cada 12 horas com adição de metanol (0,5%) e PTM1 (12 mL por litro de metanol), bem como sorbitol, 0; 25; 50; 75 e 100 g/L, para os grupos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, uma vez ao dia entre as induções. Todo o processo da adição de soluções foi realizado em capela de fluxo laminar com materiais esterilizados com álcool 70% e luz ultravioleta (20 minutos). Ao final do processo, o fermentado foi submetido à centrifugação por 20 minutos à 4.000xg para separação das células e, ao final do ciclo, retirou-se o sobrenadante, que foi transferido para filtros de ultracentrifugação (Amicon®) de 3 kDa, para concentração e diálise com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0.

Análises: O material foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 12,5%, para identificação da actA por comparação de seu fator de migração com os de proteínas padrão de massas conhecidas. A quantificação do conteúdo proteico foi realizada pelo método de Bradford, baseado na ligação do corante coomassie brilliant blue (G-250), à proteína, e na comparação desta ligação com uma curva padrão gerada pela reação de quantidades conhecidas da proteína padrão, albumina sérica bovina (Bradford, 1976). O experimento foi realizado em duplicata, a fim de se obter valores médios de maior precisão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de Sorbitol na co-alimentação com metanol em *K. Phaffii* apresenta ação positiva na expressão de ActA. Neste a estratégia desenvolvida focou na otimização da expressão da act

A. Foi feita a adição de sorbitol nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 (g/L) e observado o aumento substancial da expressão da ActA, em (aproximadamente) 21; 25; 34 e 44%, respectivamente (figura 2).

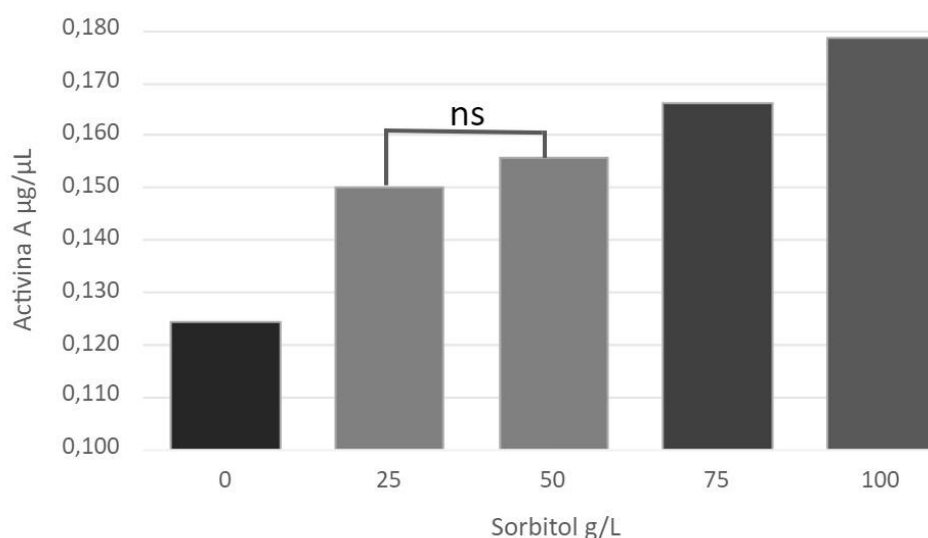


Figura 2- Produção de activina A (µg/µL) com a suplementação de diferentes concentrações de sorbitol (0-controle; 25; 50; 75 e 100 g/L) durante o período de indução. Os grupos que receberam 25 e 50 g/L não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05\%$). Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

A concentração com maior expressão em relação ao controle foi a de 100 g/L (44%), mas o 25 g/L teve custo-benefício notável, visto que gerou aumento de 21%, enquanto o de 100 g/L, que utiliza 4 vezes mais sorbitol, proporcionou pouco mais que o dobro disso.

A melhora do processo com a utilização do sorbitol revela que os problemas envolvendo a oxidação do metanol podem ser atenuados, potencializando a produção de actA recombinante. No entanto, apesar de seguir a tendência de otimização da produção, a melhora obtida pode diferir das descobertas em outros estudos, assim como a concentração ótima de sorbitol.

Alguns estudos anteriores, como o de Azadi e colaboradores (2017), demonstraram resultados mais significativos na produção de PR com 60 g/L de sorbitol, atingindo aumento de 99,4%. Já o estudo da equipe de Chen (2017) alcançou aumento de 80,9% na produção do precursor de insulina suína utilizando 50 g/L de sorbitol. Na estratégia de alimentação mista relatada por Celik e colaboradores (2009), utilizando 50 g/L de sorbitol, houve aumento de 62,5% na produção de rhGH (hormônio de crescimento humano recombinante) com alimentação constante de sorbitol/metanol na fase de indução. Outros estudos já alcançaram taxas melhores utilizando concentrações mais baixas, como o de Li colaboradores (2013) que

alcançou aumento de 101% na produção de β -galactosidase derivada de metagenoma utilizando 20 g/L de sorbitol.

Essa variação se dá por diversos fatores, como variações de clones, linhagens e características da proteína de interesse (Contesini *et al.*, 2020; Gordeeva *et al.*, 2022; Offei *et al.*, 2022). Bem como as estratégias de co-alimentação, incluindo o momento da adição de sorbitol, também podem afetar significativamente os resultados (García Ortega *et al.*, 2019; Brabander *et al.*, 2023). Essa variação de estratégias ocorre, em parte, pois a descrição detalhada sobre a alimentação de sorbitol na fermentação é escassa na literatura.

Além disso, o equipamento de cultivo desempenha papel crucial. Biorreatores e frascos oferecem diferentes níveis de controle sobre as condições do ambiente, o que pode afetar a resposta ao sorbitol. Biorreatores fornecem ambiente mais controlado, enquanto os experimentos em frascos podem ser mais sensíveis às variações nas condições ambientais. A maior parte da literatura disponível é voltada ao uso de biorreatores, entre os estudos citados anteriormente, por exemplo, apenas o de Li e colaboradores (2013) detalha a co-alimentação na fermentação em frascos. Compreender essas variações e adequar o experimento a elas é essencial para maximizar a produtividade do sistema de expressão de proteína e garantir a qualidade do produto final.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de sorbitol mostra-se uma estratégia eficaz na produção de actA recombinante, sendo a otimização das condições de cultivo com sorbitol uma abordagem promissora. Para a produção de actA todas as concentrações de sorbitol utilizadas (25; 50; 75 e 100 g/L) melhoram a produção em comparação com o controle, sendo que a concentração com maior otimização da produção foi a de 100 g/L, em 44%.

Os dados obtidos destacam a importância de realizar experimentos de otimização para garantir a maximização da produtividade, tornando estudos relacionados a actA mais viáveis.

REFERÊNCIAS

- AZADI, S.; MAHBOUBI, A.; NAGHDI, N.; SOLAIMANIAN, R.; MORTAZAVI, S. A. Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 16, n. 4, p. 1555, 1 set. 2017.
- BESLEAGA, M.; VIGNOLLE, G. A.; KOPP, J.; SPADIUT, O.; MACH, R. L.; MACH-AIGNER, A. R.; ZIMMERMANN, C. Evaluation of reference genes for transcript analyses in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 1 dez. 2023.
- BLOISE, E.; CIARMELA, P.; CRUZ, C. DELA; LUISI, S.; PETRAGLIA, F.; REIS, F. M. Activin A in Mammalian Physiology. **Physiological reviews**, v. 99, n. 1, p. 739–780, 1 jan. 2019.
- BRABANDER, P.; UITTERHAEGEN, E.; DELMULLE, T.; WINTER, K. DE; SOETAERT, W. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review. **Biotechnology Advances**, v. 64, p. 108121, 1 maio 2023.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BUSTOS, C.; QUEZADA, J.; VEAS, R.; ALTAMIRANO, C.; BRAUN-GALLEANI, S.; FICKERS, P.; BERRIOS, J. Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. **Metabolites**, v. 12, n. 4, p. 346, 14 abr. 2022.
- ÇELİK, E.; ÇALIK, P.; OLIVER, S. G. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co substrate sorbitol. **Yeast**, v. 26, n. 9, p. 473–484, 1 set. 2009.
- CHEN, L.; MOHSIN, A.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; LIU, Y.; GUO, M. Enhanced Protein Production by Sorbitol Co-feeding with Methanol in Recombinant *Pichia pastoris* Strains. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 767–773, 2017.

CONTESINI, F. J.; DAVANÇO, M. G.; BORIN, G. P.; VANEGAS, K. G.; CIRINO, J. P. G.; MELO, R. R. DE; MORTENSEN, U. H.; HILDÉN, K.; CAMPOS, D. R.; CARVALHO, P. DE O. Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1032, 9 set. 2020.

GARCIA GARCIA, C.; PATKAR, S. S.; WANG, B.; ABOUOMAR, R.; KIICK, K. L. Recombinant protein-based injectable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 193, p. 114673, 1 fev. 2023.

GARCÍA-ORTEGA, X.; CÁMARA, E.; FERRER, P.; ALBIOL, J.; MONTESINOS-SEGUÍ, J. L.; VALERO, F. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? **New Biotechnology**, v. 53, p. 24–34, 25 nov. 2019.

GORDEEVA, T. L.; BORSCHEVSKAYA, L. N.; FEDAY, T. D.; TKACHENKO, A. A.; SINEOKY, S. P. The Expression Potential of Novel *Komagataella* Strains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 916–922, 1 dez. 2022.

GÜNDÜZ ERGÜN, B.; HÜCCETOĞULLARI, D.; ÖZTÜRK, S.; ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Established and upcoming yeast expression systems. **Methods in Molecular Biology**, v. 1923, p. 1–74, 2019.

HEISTINGER, L.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Microbe profile: *Komagataella phaffii*: A methanol devouring biotech yeast formerly known as *pichia pastoris*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 166, n. 7, p. 614–616, 28 jul. 2020.

HUERTAS, M. J.; MICHÁN, C. Paving the way for the production of secretory proteins by yeast cell factories. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1095–1096, 1 nov. 2019.

JEFFERIS, R. Recombinant Proteins and Monoclonal Antibodies. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 175, p. 281–318, 2021

LI, C.-J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.-P.; WANG, A.; MAO, R.-Q.; LI, G. Medium optimization for the production of a metagenome-derived β -galactosidase by *Pichia pastoris* using response surface methodology. **African Journal of Microbiology**, v. 7, n. 13, p. 1077–1085, 2013.

LIU, B.; CONG, W.; ZHAO, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, J. An inducible *Komagataella phaffii* system for protein expression using sorbitol dehydrogenase promoter. **Biotechnology Letters**, p. 1–11, 19 abr. 2023a.

OFFEI, B.; BRAUN-GALLEANI, S.; VENKATESH, A.; CASEY, W. T.; O'CONNOR, K. E.; BYRNE, K. P.; WOLFE, K. H. Identification of genetic variants of the industrial yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) that contribute to increased yields of secreted heterologous proteins. **PLOS Biology**, v. 20, n. 12, p. e3001877, 1 dez. 2022.

POLLET, J.; CHEN, W. H.; STRYCH, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 71–82, 1 mar. 2021.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 420, 20 dez. 2019.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; YILMAZ, S.; INAN, M. *Pichia pastoris* promoters. **Methods in Molecular Biology**, v. 1923, p. 97–112, 2019.

WANG, B.; NESBETH, D.; KESHAVARZ-MOORE, E. Sorbitol/methanol mixed induction reduces process impurities and improves centrifugal dewatering in *Pichia pastoris* culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 130, p. 109366, 1 nov. 2019.

YANG, J.; CAI, H.; LIU, J.; ZENG, M.; CHEN, J.; CHENG, Q.; ZHANG, L. Controlling AOX1 promoter strength in *Pichia pastoris* by manipulating poly (dA:dT) tracts. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1401, 1 dez. 2018.