



OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *KOMAGATAELLA PHAFFII* POR MEIO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO

STEPHANY GONÇALVES DOS SANTOS; LETICIA GARCIA CARDOSO; ANA BEATRIZ RIBEIRO SILVA; GABRIEL NOGUEIRA SOARES; IVAN CARLOS DOS SANTOS

RESUMO

A biotecnologia é essencial para o avanço da medicina, terapia gênica e diagnósticos, e a produção de proteínas recombinantes desempenha um papel crucial nesse contexto. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de activina A, proteína com importantes aplicações terapêuticas, em *Komagataella phaffii*, focando nos efeitos da suplementação com o antioxidante ácido ascórbico, utilizado para mitigar a toxicidade do metanol, usado como indutor na expressão de proteínas recombinantes. Foi utilizada uma cepa recombinante de *K. 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 o meio foi suplementado com diferentes concentrações de ácido ascórbico (0, 5, 10, 15 e 20 mM) 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 por dosagem utilizando o método de Bradford. Os resultados mostraram uma melhora significativa na produção de activina A nos grupos suplementados com ácido ascórbico, com destaque para as concentrações de 10 e 15 mM, que apresentaram maior rendimento. A concentração de 10 mM de ácido ascórbico foi considerada a melhor opção para maximizar a produção de activina A em *K. phaffii*. Conclui-se que a suplementação com ácido ascórbico é uma estratégia eficaz para otimizar a produção de proteínas recombinantes, contribuindo para o desenvolvimento de terapias biotecnológicas mais eficientes e acessíveis.

Palavras-chave: Biotecnologia; Activina A; Expressão heteróloga; Antioxidante; Engenharia Genética.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma área vital para o avanço da medicina, terapia gênica, diagnósticos e diversas outras. Nesse contexto, a produção de proteínas recombinantes desempenha um papel crucial, impulsionando inovações em vários setores da indústria (Tripathi e Shrivastava, 2019; Garcia *et al.*, 2023). As proteínas recombinantes são sintetizadas por meio de técnicas de engenharia genética, que envolvem a inserção de genes de interesse em sistemas de expressão heterólogos, ou seja, organismos diferentes daqueles em que essas proteínas são naturalmente produzidas (Puetz e Wurm, 2019; Hadar *et al.*, 2022). Uma das principais vantagens dessa abordagem é a possibilidade de produção em larga escala, de forma consistente, garantindo qualidade e eficácia. Além disso, essas proteínas são mais facilmente purificadas, o que reduz a presença de impurezas e efeitos colaterais, comparado a medicamentos derivados de fontes naturais (Jefferis, 2021; Pollet *et al.*, 2021).

Para a produção de proteínas recombinantes, é comum o uso de microrganismos como células hospedeiras, e as leveduras, especialmente a *Komagataella phaffii* (anteriormente

conhecida como *Pichia pastoris*), se destacam nesse cenário. Elas oferecem crescimento rápido, facilidade de cultivo e alto rendimento na produção de proteínas (Gündüz Ergün *et al.*, 2019; Huertas e Michán, 2019). A *K. phaffii* tornou-se um hospedeiro ideal para expressão heteróloga devido a três características: capacidade de crescer até altas densidades (> 150 g/L), habilidade de secretar proteínas totalmente dobradas e funcionais, e um promotor AOX1 (álcool oxidase I) que é fortemente reprimido na presença de glicose, glicerol ou etanol e totalmente induzido por metanol (Yamada *et al.*, 1995; Wollborn *et al.*, 2022). O promotor AOX1 da *K. phaffii*, ativado pelo metanol, é essencial para a expressão heteróloga de proteínas recombinantes, permitindo a produção em larga escala de proteínas complexas (Yang *et al.*, 2018; Türkanoglu Özçelik *et al.*, 2019).

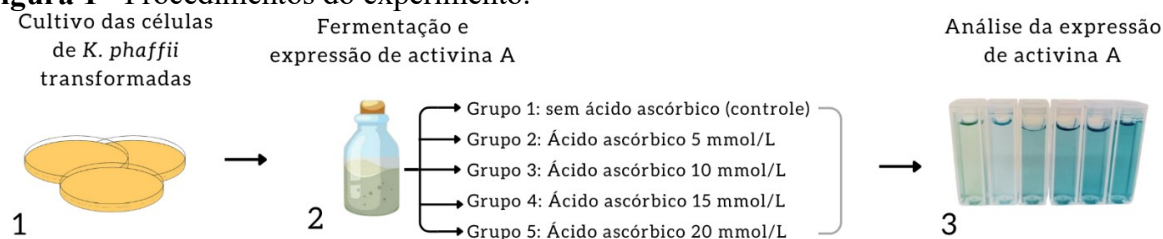
No entanto, a produção de proteínas recombinantes em células hospedeiras, incluindo a levedura *K. phaffii*, enfrenta limitações como a regulação inadequada da expressão gênica, instabilidade das proteínas e baixo rendimento de produção. A otimização das condições de cultivo, incluindo a suplementação do meio, é crucial para superar esses desafios (Türkanoglu Özçelik *et al.*, 2019; Bustos *et al.*, 2022; Brabander *et al.*, 2023). No caso da *K. phaffii*, um dos desafios mais frequentes é o uso de metanol. Este é uma importante fonte de carbono e um indutor da expressão gênica na maioria das estratégias de fermentação de *K. phaffii*, sendo usado tanto para o crescimento da biomassa quanto para a indução da produção de proteína pelo promotor AOX1 (García-Ortega *et al.*, 2019; Türkanoglu Özçelik *et al.*, 2019).

A toxicidade associada à oxidação do metanol pela enzima álcool oxidase (AOX) pode ser mitigada pelo uso de antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C), que ajuda a preservar a viabilidade celular e a qualidade das proteínas produzidas (Liu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2021). No entanto, cada proteína recombinante 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 se concentrou na proteína recombinante activina A, 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), sendo, por esses fatores, importante alvo no desenvolvimento de terapias e diagnóstico. Foram investigados os efeitos de diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 mM) de ácido ascórbico sobre a produção da activina A recombinante, escolhida por suas diversas funções biológicas e aplicações terapêuticas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

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 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 clone por placa, sendo essas, em seguida, incubadas em estufa a 30°C por 48 horas.

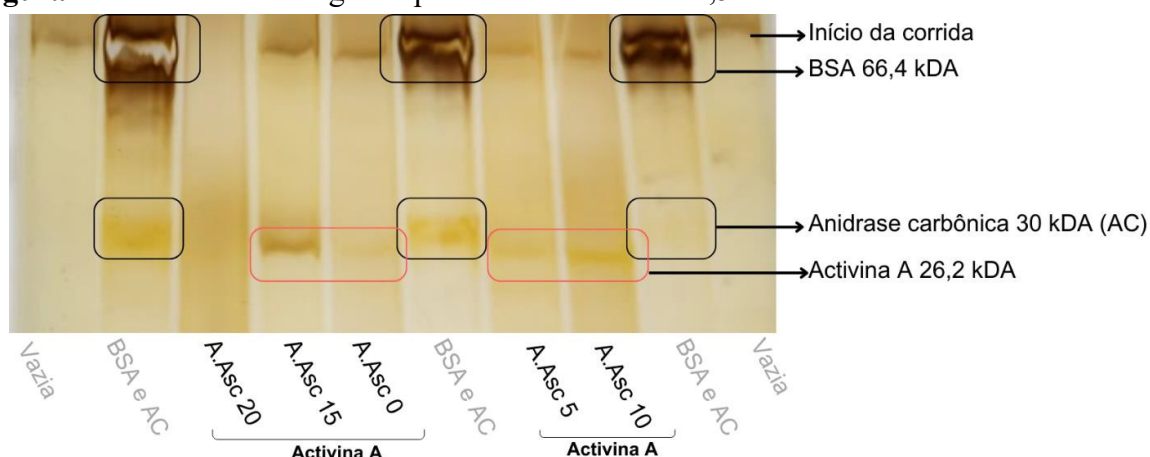
Fermentação e expressão da activina A: O meio líquido BSM (basal salts medium) foi esterilizado em autoclave e, após o resfriamento, foi realizada a transferência das leveduras do meio sólido YPD para BSM (5 placas para 300 mL), suplementado com solução de minerais traços (PTM1 4,35 mL/L). As leveduras foram cultivadas 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 ácido ascórbico, 0; 5; 10; 15 e 20 mM, 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 10 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 activina A 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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram uma melhora significativa na produção de activina A em todos os grupos suplementados com ácido ascórbico, quando comparados ao grupo controle (sem suplementação). Os grupos com 10 e 15 mM de ácido ascórbico (Grupo 3 e 4) apresentaram o melhor desempenho. A análise quantitativa da proteína, utilizando o método de Bradford, e a confirmação por SDS-PAGE (Figura 2), mostraram uma clara correlação entre a concentração de ácido ascórbico e a produção de activina A.

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12,5%.



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

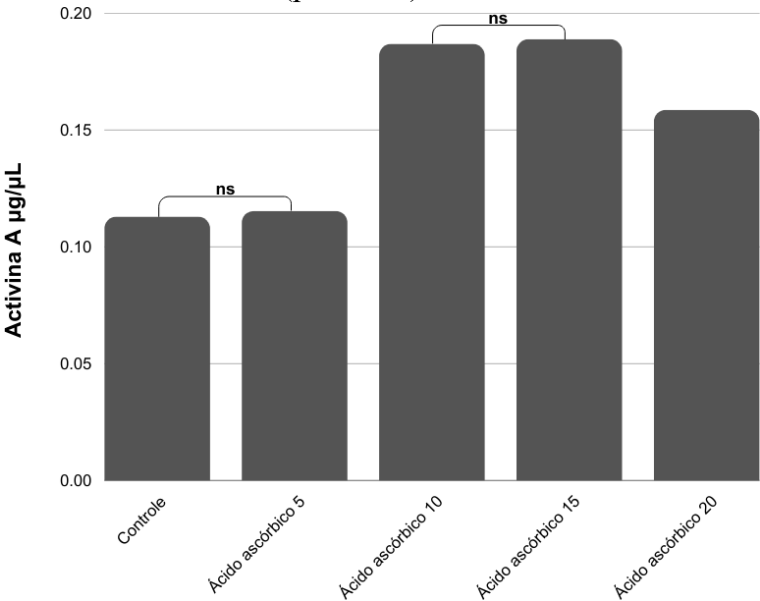
A análise por SDS-PAGE (Figura 2) confirmou a presença de activina A em todos os grupos, com uma banda nítida correspondente ao peso molecular esperado da proteína (~26 kDa). A intensidade das bandas foi maior no grupo 4, seguido do 3, corroborando os dados quantitativos de Bradford para cada grupo (Tabela 1).

Tabela 1 – Activina A produzida nos diferentes grupos, concentrações em ug/uL obtidas pelo método de Bradford (1976).

Ácido (mM)	ascórbicoina A produzida (µg/µL)
0	0,1130
5	0,1154
10	0,1869
15	0,1889
20	0,1587

Esses resultados indicam que a suplementação com ácido ascórbico promove um aumento na produção de activina A, com a concentração de 15 mM (grupo 4) resultando na maior produção. Entretanto, por não apresentar diferença estatisticamente significativa (Figura 3), a suplementação com a concentração de 10 mM (grupo 3) se mostra a melhor opção, pela melhora equivalente à do grupo 4, com uso de menos ácido ascórbico.

Figura 3 - Produção de activina A com a suplementação de diferentes concentrações de ácido ascórbico (Controle (0); 5; 10; 15 e 20 mM) durante o período de indução. Os grupos que receberam 10 e 15 mM não apresentaram diferença estatisticamente significativa, assim como o grupo que recebeu 5mM e o controle ($p<0,05\%$).



Fonte: Elaborado pelos autores (2024).

A suplementação com ácido ascórbico mostrou-se eficaz na melhora da produção de activina A em *K. phaffii*. O ácido ascórbico, atuando como antioxidante ajudou a mitigar os efeitos tóxicos do metanol, preservando a viabilidade celular e a qualidade da proteína produzida (Liu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2021). O grupo com 10 mM de ácido ascórbico destacou-se como o mais eficiente, sugerindo que essa concentração é ideal para maximizar a produção de activina A. A diminuição na produção observada no grupo com 20 mM pode ser atribuída a um possível efeito inibitório em altas concentrações de ácido ascórbico, o que já foi observado em outros sistemas biológicos (Contesini *et al.*, 2020).

Para fins de comparação, é importante notar que estudos prévios revelaram diferenças marcantes nos efeitos do ácido ascórbico. Em um estudo conduzido por Azadi e equipe (2018), focado na produção de hormônio de crescimento humano recombinante em *K. phaffii*,

observou-se um aumento na expressão de proteínas de 16%, 40% e 49% com concentrações de ácido ascórbico de 5, 10 e 20 mM, respectivamente. Outro estudo realizado pela equipe de Xiao (2006), investigando a produção de hirudina, mostrou que a suplementação de 10 mM de ácido ascórbico resultou em um aumento de 29,73% na expressão de proteínas em comparação com o grupo controle, um resultado comparável aos obtidos neste estudo. Embora o estudo de Xiao tenha focado na viabilidade celular, a melhoria na expressão proteica destaca o potencial do ácido ascórbico como um fator benéfico em diferentes contextos de expressão proteica.

As variações nos resultados entre os estudos podem ser atribuídas a várias variáveis experimentais discutidas anteriormente, incluindo a linhagem específica de *K. phaffii* utilizada, as características da proteína estudada, a metodologia experimental e as condições de cultivo. Em resumo, os achados deste estudo indicam que a adição de ácido ascórbico nas concentrações de 10 e 15 mM resultou em melhorias significativas na expressão de proteínas recombinantes em *K. phaffii*. A comparação com estudos anteriores, como o de Xiao (2006), reforça o potencial do ácido ascórbico como uma estratégia valiosa para otimizar a expressão de proteínas recombinantes em sistemas que utilizam *K. phaffii* como hospedeiro.

Os resultados reforçam a viabilidade de *K. phaffii* como um sistema hospedeiro eficaz para a produção de proteínas recombinantes, especialmente quando suplementado adequadamente. A capacidade de crescer em altas densidades e secretar proteínas funcionais faz dessa levedura uma escolha promissora para aplicações industriais (Yamada *et al.*, 1995; Wollborn *et al.*, 2022).

A suplementação com ácido ascórbico melhorou significativamente a produção de activina A em *K. phaffii*, com a concentração de 10 mM sendo a mais eficaz. Estes achados destacam a importância de otimizar as condições de cultivo e suplementação para maximizar a produção de proteínas recombinantes, contribuindo para avanços na biotecnologia e suas aplicações terapêuticas. A comparação com estudos anteriores, como o de Xiao (2006), reforça o potencial do ácido ascórbico como uma estratégia valiosa para aprimorar a expressão de proteínas recombinantes em sistemas baseados em *K. phaffii*.

4 CONCLUSÃO

A suplementação de ácido ascórbico tem ação positiva na expressão de proteínas recombinantes em *Komagataella phaffii*. Concentrações de 10, 15 e 20 mM demonstraram melhorias significativas na expressão da activina A. Os resultados reforçam o potencial do ácido ascórbico como estratégia eficaz para otimizar bioprocessos em sistemas baseados em *K. phaffii*. A pesquisa sugere novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias biotecnológicas mais eficientes, destacando a importância contínua da investigação nesse campo.

REFERÊNCIAS

- AZADI, S.; SADJADY, S.; MORTAZAVI, S.; NAGHDI, N.; MAHBOUBI, A.; SOLAIMANIAN, R. Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 3, p. 222–238, 1 jun. 2018.
- 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.

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, 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.

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.

HADAR, D.; STRUGACH, D. S.; AMIRAM, M. Conjugates of Recombinant Protein-Based Polymers: Combining Precision with Chemical Diversity. **Advanced NanoBiomed Research**, v. 2, n. 6, p. 2100142, jun. 2022.

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.

LIN, N. X.; HE, R. Z.; XU, Y.; YU, X. W. Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2021.

LIU, W. C.; INWOOD, S.; GONG, T.; SHARMA, A.; YU, L. Y.; ZHU, P. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 258–271, 17 fev. 2019.

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.

PUETZ, J.; WURM, F. M. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. **Processes**, v. 7, n. 8, p. 476, 24 jul. 2019.

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.

WOLLBORN, D.; MUNKLER, L. P.; HORSTMANN, R.; GERMER, A.; BLANK, L. M.; BÜCHS, J. Predicting high recombinant protein producer strains of Pichia pastoris MutS using the oxygen transfer rate as an indicator of metabolic burden. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2 jul. 2022.

XIAO, A.; ZHOU, X.; ZHOU, L.; ZHANG, Y. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in Pichia pastoris fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 837–844, 9 out. 2006.

YAMADA, Y.; MATSUDA, M.; MAEDA, K.; MIKATA, K. The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of Komagataella Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439–444, 1 jan. 1995.

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.

YANG, Q.; DIAO, J.; LEGRAND, N. N. G.; SERWAH, B. N. A.; ZHU, M.; PANG, B.; ZHANG, H. The protein expression profile and transcriptome characterization of Pichia caribbica induced by ascorbic acid under the oxidative stress. **Biological Control**, v. 142, p. 104164, 1 mar. 2020.