

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES A PARTIR DE CULTIVOS DE *Pichia pastoris* EM FERMENTADOR DE BANCADA

Rômulo Previato da Silva (PIBITI/CNPq/Universidade Estadual de Londrina (UEL), romulo.previato@uel.br),

Doumit Camilios Neto (camiliosneto@uel.br)

Universidade Estadual de Londrina (UEL) /Departamento de Bioquímica e Biotecnologia

Ciências Biológicas, bioquímica, bioquímica de microrganismos

Palavras-Chave: Proteína recombinante, expressão heteróloga, *Pichia pastoris*, fermentador de bancada, SARS-CoV-2

Introdução

O SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19 e da pandemia que afetou o mundo todo, apresenta alta transmissibilidade e letalidade. Assim, a busca por vacinas capazes de combater uma maior dispersão desse vírus é de suma importância. Uma das formas de alcançar este objetivo é por produção heteróloga dos antígenos, como a proteína S, responsável pela entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira. Dessa maneira, seria possível produzir a proteína S recombinante em fermentadores de bancada, a fim de otimizar as condições de produção desse imunobiológico em escala laboratorial e, posteriormente, estabelecer as condições adequadas para a operação de uma microfábrica experimental. Por conseguinte, isso permitiria uma melhora da produção de vacinas nacionais.

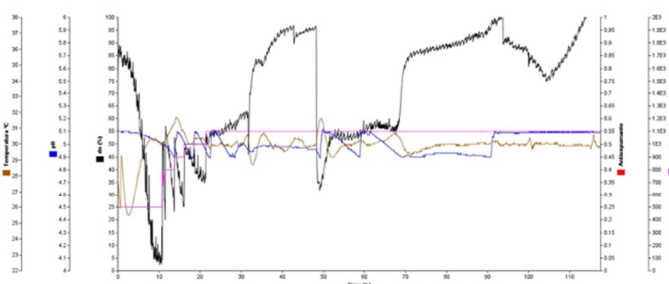
Problema

Normalmente a expressão de proteínas recombinantes ocorrem em bactérias, principalmente *Escherichia coli*, porém nesses microrganismos modificações pós-traducionais, como glicosilação de aminoácidos, não são realizadas. Em contrapartida esse processo ocorre em leveduras e outras células eucarióticas, como as humanas, porém o cultivo de células humanas é muito dispendioso. Ao ponto que a utilização de leveduras resulta em uma redução do custo do processo em 10,2 vezes. Logo, é de suma importância estabelecer as condições de cultivo adequadas para expressão de proteínas recombinantes em leveduras.

Solução e Benefícios

Durante o cultivo notou-se a importância da agitação para manter os níveis de oxigênio dissolvido (OD) adequados ao crescimento da levedura. Deste modo, foi utilizado o biorreator Applikon EZControl e uma agitação de 1000-1100 rpm para manter o OD acima de 20%. O consumo completo da fonte de carbono ocorreu em torno de 50h e resultou em um crescimento celular de 90 g/L. Depois procedeu-se para alimentação com glicerol e o consumo total ocorreu em 95h com um rendimento de 129,1 g/L. Em seguida adicionou-se metanol, isso resultou em uma queda abrupta de OD na fase de adaptação e por volta de 105h a OD ultrapassou 100%. Logo, o cultivo foi interrompido neste momento por não estar mais favorável à sobrevivência das células.

Figura 1. Gráfico do processo de fermentação da *Pichia pastoris*



Ao final do cultivo, foi constatado um rendimento de 29,9 mg/L de extrato bruto de proteína extracelular. A avaliação qualitativa foi realizada por meio de eletroforese, a qual indicou a presença do domínio RBD da proteína S1 do vírus SARS-CoV-2. Ensaios de purificação estão em andamento, mas a presença de antiespumante está dificultando as etapas *downstream*.

Considerações Finais

O estudo em nível de bancada possibilitou estabelecer que o ponto crítico para o cultivo da *Pichia pastoris* é o nível de oxigênio dissolvido, sendo necessário um aumento da agitação para mantê-lo adequado. Após estabelecidas as condições adequadas foi possível expressar a proteína recombinante. As dificuldades atuais residem em manter o OD adequada em escalas maiores e na purificação da proteína recombinante.

Estágio de Desenvolvimento da Tecnologia

Nível 4 – Otimização, pois ocorreu a validação do conceito em ambiente laboratorial.

Agradecimentos

CNPq (PIBITI), CAPES, Fundação Araucária e NAPI-Vacinas pelo suporte financeiro. Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos (Coordenadores UFPR); Dra. Kamila B. Baldin Wessel e Dra. Maritza Araújo Todo Bom (Colaboradores UFPR)

Contato Institucional

Universidade Estadual de Londrina
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
camiliosneto@uel.br – (43) 99973-8950