

THAÍS DE SOUSA BARROS

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA PRODUÇÃO EM ESCALA DA  
ENZIMA L- ASPARAGINASE POR *Escherichia coli* BL21 (DE3) AspB

BRASÍLIA, 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

THAÍS DE SOUSA BARROS

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA PRODUÇÃO EM ESCALA DA  
ENZIMA L- ASPARAGINASE POR *Escherichia coli* BL21 (DE3) AspB

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília.

Orientadora: Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Coorientadora: Nádia Skorupa Parachin

BRASÍLIA

2020

THAÍS DE SOUSA BARROS

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA PRODUÇÃO EM ESCALA DA  
ENZIMA L- ASPARAGINASE POR *Escherichia coli* BL21 (DE3) AspB

Dissertação apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília.

Aprovado em 11 de agosto de 2020

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

---

Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha  
Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB)

---

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso  
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho a minha família, especialmente aos meus pais, Gersioneton e Diana, e aos meus irmãos, Jean e Christyan pelo amor, compreensão e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que me guiou até este momento.

À minha família, que é a minha base. Em especial aos meus pais Gersioneton e Diana que me apoiaram e acreditaram em mim em cada momento dessa caminhada. Aos meus irmãos Jean e Christyan pela amizade e compreensão. Sem vocês essa caminhada seria muito mais turbulenta e cansativa. Obrigado pelo apoio, orações e paciência.

À minha orientadora Pérola Magalhães, por ter aberto as portas do Laboratório de Produtos Naturais durante a minha graduação e novamente na pós-graduação sempre serei grata pela sua confiança e orientação durante todo este processo.

À minha coorientadora Nádia Parachin pelo apoio e suporte essencial para a conclusão deste trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Produtos Naturais, Diegue, Lucas, Marcela, Paula, Renata, Samuel e Victor, por me acolherem e pelos ensinamentos. Em especial a Kellen pela amizade e apoio.

As técnicas do laboratório, Júlia e Patrícia, que tiveram toda disposição para me ajudar e cuidar da segurança do laboratório.

Aos alunos da Universidade Católica de Brasília, Nadiele e Lucas pela assistência oferecida durante a fase de estudo nos biorreatores.

Aos meus amigos Andressa, Gislane, Nayra e Nélio, sou grata pela nossa amizade e crescimento conjunto, nós iniciamos a graduação juntos e agora estamos juntos na pós-graduação, torço pelo sucesso de vocês.

À Dra. Gisele Monteiro do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e pelo Dr. Adalberto Pessoa do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Farmacêutica da Universidade de São Paulo por cederem a cepa utilizada neste trabalho.

Aos meus amigos que tiveram que lidar com minha ausência em alguns momentos devido ao empenho exigido durante todo esse processo, sou grata pela compreensão de vocês em cada momento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos membros da banca por aceitarem o convite. Sou grata a atenção e contribuição neste trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho, sou extremamente grata.

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”*

*(Benjamin Disraeli)*

## RESUMO

A enzima L-asparaginase (L-ASNase) catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônio. Devido ao seu mecanismo de ação, esta enzima é utilizada no tratamento da leucemia linfocítica aguda, pois quando a L-ASNase é administrada no plasma sanguíneo causa o esgotamento do aminoácido resultando na apoptose seletiva das células cancerígenas. A enzima L-asparaginase não é produzida no Brasil, devido ao desabastecimento ocorrido em 2013 no mercado brasileiro desta enzima viu-se a necessidade de uma produção nacional da L-ASNase. Buscando alternativas viáveis de produção desta enzima, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de processos para a produção em escala da enzima L-ASNase pela bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) AspB. Para a quantificação da enzima L-ASNase foram comparados os métodos de Nessler e o método de  $\beta$ -hidroxamato aspártico (AHA), sendo escolhido o AHA devido sua baixa interferência com a amônia livre. Foram testados três meios de cultivo, o meio definido, o meio semi-definido e o meio complexo. O meio definido foi o que obteve menor custo de produção e a maior atividade de L-ASNase. Para a fase de produção da enzima, dois indutores foram comparados, a lactose e seu análogo IPTG. Das concentrações testadas para os indutores as que obtiveram a maior atividade da enzima foi de  $10 \text{ g L}^{-1}$  para a lactose e  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  para o IPTG. O momento da curva de crescimento que obteve a maior atividade da L-ASNase para o início da indução foi no meio da fase exponencial. A atividade da L-ASNase foi acompanhada durante o intervalo de 10-24h, nos tempos 18 e 20h não houve diferença estatísticas entre os indutores. A lactose foi escolhida como indutor para a continuidade dos experimentos devido a semelhança entre as atividades da L-ASNase com ambos os indutores, baixa toxicidade e baixo custo. Nos estudos em biorreator, foram feitos cultivos em batelada e batelada alimentada tendo como objetivo a alta densidade celular para depois iniciar a indução do cultivo. Os cultivos de batelada alimentada o peso seco final foi de  $69,90 \text{ g L}^{-1}$ . A produção da enzima L-ASNase em batelada alimentada induzida com  $30 \text{ g L}^{-1}$  a que apresentou a melhor produção da enzima com  $43.954,79 \text{ U L}^{-1}$ . A produção da enzima L-ASNase foi realizada com sucesso em agitador orbital e biorreator, trazendo avanços para a produção de uma enzima L-ASNase nacional que seja viável economicamente.

**Palavras-chave:** L-asparaginase; *Escherichia coli*; IPTG; Lactose; biorreator.

## ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase (L-ASNase) catalyzes the hydrolysis of the amino acid asparagine in aspartic acid and ammonium, due to its mechanism of action this enzyme is used in the treatment of acute lymphocytic leukemia, because when L-ASNase is administered in the blood plasma it causes the depletion of the amino acid resulting in the selective apoptosis of cancer cells. There are commercial L-ASNases, but none produced in Brazil, due to the shortage in 2013 in the Brazilian market of this enzyme, there was a need for a national production of L-ASNase. Searching for viable alternatives for the production of this enzyme, the objective the development of processes for the scale production of the L-ASNase enzyme by *Escherichia coli* BL21 (DE3) AspB. For the quantification of the enzyme L-ASNase, the methods of Nessler and the method of  $\beta$ -hydroxamate aspartic (AHA) were compared due to its low interference with free ammonia. Three culture media were tested, the defined medium, the semi-defined medium and the complex medium. The defined medium the lowest production cost and the highest L-ASNase activity. Two inducers were compared, lactose and its IPTG analogue. Of the concentrations tested for inducers, those that obtained the highest enzyme activity were 10 g L<sup>-1</sup> for lactose and 0.45 mmol L<sup>-1</sup> for IPTG. The time of the growth curve that obtained the highest L-ASNase activity for the beginning of the induction was in the middle of the exponential phase. The activity of L-ASNase was monitored during the interval of 10-24h, at times 18 and 20h there was no statistical difference between the inducers. Lactose was chosen as an inducer for the continuity of the experiments due to the similarity between the activities of L-ASNase with both inducers, low toxicity and low cost. In the bioreactor studies, batch and fed batch cultures were carried out with the objective of high cell density and then start the culture induction. The fed batch cultures were carried out, the final dry weight was 69.90 g L<sup>-1</sup>. The enzyme L-ASNase in batch fed induced with 30 g L<sup>-1</sup> presented the best enzyme production with 43,954.79 U L<sup>-1</sup>. The production of the enzyme L-ASNase was successfully carried out in a shaker and bioreactor. , bringing advances to the production of a national L-ASNase enzyme that is economically viable.

**Keywords:** L-asparaginase; *Escherichia coli*; IPTG; Lactose; bioreactor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Mecanismo simplificado da ação da L-ASNase. Fonte: Adaptado de Badoei-Dalfard (2016)(19).....	5
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de ação do repressor lac. Fonte: Imagem retirada e adaptado de Matthaei (2004) (48).....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema das escalas de trabalho de processos fermentativos. Fonte: Imagem adaptada de Schmidell (2001) (54). ....	13
<b>Figura 4.</b> Esquema de uma fermentação em batelada alimentada. Fonte: Imagem retirada e modificada Krause (2016) (56). ....	17
<b>Figura 5.</b> Gráfico de calibração da bomba para alimentação. Onde foi feita a correlação entre a porcentagem de ativação da bomba e o volume da alimentação bombeada para dentro do biorreator. ....	26
<b>Figura 6.</b> A L-ASNase hidrolisa a asparagina em ácido aspártico e amônia. ....	27
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de reação da quantificação da atividade da enzima L-ASNase pelo método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato. ....	28
<b>Figura 8.</b> Curva padrão do $\beta$ -hidroxamato aspártico. ....	30
<b>Figura 9.</b> Reações do ensaio do método Nessler. O ensaio do método de Nessler é dividido em duas etapas, na primeira etapa ocorre a hidrólise catalisada pela enzima L-ASNase do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia e na segunda etapa, onde o reagente colorimétrico Nessler interage com a amônia proveniente da primeira etapa do ensaio. ....	32
<b>Figura 10.</b> Curva padrão do ensaio de proteína pelo Kit de Ensaio de Proteína BCA. ....	35
<b>Figura 11.</b> Correlação do peso seco (X) da biomassa celular e a densidade óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ), lida em equipamento Biomate 3S Thermo Scientific. ....	41
<b>Figura 12.</b> Comparação da quantificação da atividade da enzima L-ASNase pelo método de Nessler e pelo método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato (AHA). Os resultados das atividades de L-ASNase( $U\ mL^{-1}$ ) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (*, $p \leq 0,05$ ). ....	43
<b>Figura 13.</b> Comparação entre a quantificação da atividade da enzima L-ASNase em suspensão celular e da enzima extraída. Os resultados das atividades de L-ASNase	

(U g <sub>cell</sub> <sup>-1</sup> ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. ....	45
<b>Figura 14.</b> “A” Curva de crescimento da <i>E. coli</i> AspB em meio definido, semi-definido e complexo representado por média e desvio padrão. A linha roxa representa o meio complexo, a linha azul representa o meio semi-definido e a linha vermelha representa o meio definido. “B” Comparação da atividade de L-ASNase em <i>E. coli</i> AspB cultivadas nos meios definido, semi-definido e complexo. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g <sub>cell</sub> <sup>-1</sup> ) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (*,p ≤ 0,05).....	46
<b>Figura 15.</b> Curva logarítmica de crescimento da <i>E. coli</i> AspB nos meios definido, semi-definido e complexo.....	47
<b>Figura 16.</b> Otimização da concentração de glicose. A linha roxa representa o cultivo com 5 g L <sup>-1</sup> de glicose, a linha azul representa o cultivo com 10 g L <sup>-1</sup> de glicose e a linha verde o cultivo com 20 g L <sup>-1</sup> de glicose.....	51
<b>Figura 17.</b> “A” Indução da <i>E. coli</i> AspB com diferentes concentrações de IPTG. Foram comparadas três concentrações de IPTG (0,1 mmol L <sup>-1</sup> , 0,45 mmol L <sup>-1</sup> e 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ). Os resultados das atividades de L-ASNase (U g <sub>cell</sub> <sup>-1</sup> ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por <i>Kruskal-Wallis</i> com pós-teste de Dunn's (*p ≤ 0,05). “B” Indução da <i>E. coli</i> AspB com diferentes concentrações de lactose. Foram comparadas três concentrações de lactose (10 g L <sup>-1</sup> , 14 g L <sup>-1</sup> e 18 g L <sup>-1</sup> ). Os resultados das atividades de L-ASNase (U g <sub>cell</sub> <sup>-1</sup> ) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (*p ≤ 0,05). ....	53
<b>Figura 18.</b> Custo dos indutores para necessário para induzir um litro de meio com 10 g de lactose e 0,45 mmol de IPTG. Lactose e IPTG foram cotados da mesma empresa, sendo o mesmo fabricante dos produtos.....	54
<b>Figura 19.</b> O cultivo de <i>E. coli</i> AspB foi induzido com IPTG ou lactose em diferentes momentos da curva de crescimento, sendo 3 horas o início da fase exponencial, 5 horas o meio da fase exponencial, 7 horas o fim da fase exponencial e 9 horas na fase estacionária. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g <sub>cell</sub> <sup>-1</sup> ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparados por <i>Kruskal-Wallis</i> com pós-teste de Dunn's (*p ≤ 0,05).....	56

<b>Figura 20.</b> Acompanhamento da atividade da enzima L-ASNase após a indução com IPTG e lactose durante o intervalo de 10-24h. Os resultados das atividades de L-ASNase ( $U\ g_{cell}^{-1}$ ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (* $p \leq 0,05$ ). .....	57
<b>Figura 21.</b> Comparação do acompanhamento da atividade da enzima L-ASNase após a indução com IPTG e lactose durante o intervalo de 10-24h. Os resultados das atividades de L-ASNase ( $U\ g_{cell}^{-1}$ ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparados por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.....	58
<b>Figura 22.</b> Cultivo em batelada da <i>E. coli</i> AspB em biorreator. A linha azul representa o crescimento da biomassa ( $g\ L^{-1}$ ), a linha rosa representa o consumo da glicose ( $g\ L^{-1}$ ) e a linha verde representa a produção de acetato ( $g\ L^{-1}$ ). .....	59
<b>Figura 23.</b> Avaliação do $\mu_{set}$ 0,20 e 0,30 durante alimentação exponencial no peso seco ( $g\ L^{-1}$ ). Na figura a linha verde está representado a curva de crescimento como $\mu_{set}$ 0,20 e a linha azul está representado a curva de crescimento como $\mu_{set}$ 0,30....	61
<b>Figura 24.</b> Indução em biorreatores com três concentrações de lactose $10\ g\ L^{-1}$ , $20\ g\ L^{-1}$ e $30\ g\ L^{-1}$ . Na figura "A" está representado as três curvas de crescimento em peso seco ( $g\ L^{-1}$ ) e na figura "B" está representado a atividade de L-ASNase induzida por cada concentração de lactose. A cor azul está representando o cultivo induzido com $10\ g\ L^{-1}$ de lactose, a cor vermelha está representando o cultivo induzido com $20\ g\ L^{-1}$ de lactose e a cor verde está representando o cultivo induzido com $30\ g\ L^{-1}$ de lactose. Os resultados das atividades de L-ASNase ( $U\ g_{cell}^{-1}$ ) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (* $p \leq 0,05$ ).....	63
<b>Figura 25.</b> Representação do crescimento da biomassa, o consumo de glicose e produção de acetato em cultivos com diferentes concentrações de lactose. A linha azul representa a biomassa ( $g\ L^{-1}$ ), a linha rosa o consumo da glicose ( $g\ L^{-1}$ ), a linha verde a produção de acetato ( $g\ L^{-1}$ ) e a seta representa o momento da indução com lactose. ....	64
<b>Figura 26.</b> Comparação entre os cultivos realizados em agitador orbital e biorreator. ....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Propriedades bioquímicas da enzima L-ASNase em diferentes fontes microbianas. Tabela retirada de Kumar e Sobha (2012) (37).....	7
<b>Tabela 2-</b> Características dos diferentes sistemas hospedeiros de expressão. Tabela adaptada de Nagesh e Shrivastava (2019)(39).....	9
<b>Tabela 3-</b> Artigos em que o gene da L-ASNase de <i>E. coli</i> no sistema de expressão <i>E. coli</i> .....	13
<b>Tabela 4-</b> Cultivos de alta densidade celular utilizando <i>Escherichia coli</i> com concentração celular acima de 100 g L <sup>-1</sup> de massa seca.....	18
<b>Tabela 5-</b> Composição dos meios de cultivo definido, semi-definido e complexo.....	21
<b>Tabela 6-</b> Composição da solução de elementos traços .....	22
<b>Tabela 7-</b> Composição da solução de sulfato de magnésio.....	23
<b>Tabela 8-</b> Composição da solução de tiamina .....	23
<b>Tabela 9-</b> Composição da solução de ampicilina .....	23
<b>Tabela 10-</b> Composição da solução de sais .....	24
<b>Tabela 11-</b> Formulação final do meio definido a partir das soluções estoques.....	24
<b>Tabela 12-</b> Composição da solução de alimentação .....	27
<b>Tabela 13-</b> Preparo das soluções padrão para o método de $\beta$ -hidroxamato aspártico .....	30
<b>Tabela 14-</b> Primeira etapa da curva padrão do método de Nessler .....	33
<b>Tabela 15-</b> Segunda etapa da curva padrão do método de Nessler .....	33
<b>Tabela 16-</b> Primeira etapa do ensaio do método de Nessler .....	34
<b>Tabela 17-</b> Segunda etapa do ensaio do método de Nessler .....	34
<b>Tabela 18-</b> Ensaio de glicose enzimática líquida .....	36
<b>Tabela 19-</b> Pontos da curva padrão da glicose, lactose e acetato (g L <sup>-1</sup> ) .....	37
<b>Tabela 20-</b> Trabalhos publicados com sistema de expressão <i>Escherichia coli</i> para a produção da enzima L-ASNase (*= Atividade específica; $\Delta$ = Extrato bruto; O= Enzima purificada; ITC= Calorimetria de titulação isotérmica; AHA= Ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato) .....	44
<b>Tabela 21-</b> Peso seco final (X), velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e fator de conversão do substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ) dos meios definido, semi-definido e complexo .....	48

<b>Tabela 22-</b> Custo por grama de cada componente presente nos meios definido, semi-definido e complexo (*sigma; **dinâmica) .....	48
<b>Tabela 23-</b> Custo por grama dos indutores.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, SIMBOLOS

<b>AHA</b>	Ácido L-aspirtil- $\beta$ -hidroxamato
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ASPS</b>	Asparagina sintetase
<b>cAMP</b>	AMP cíclico
<b>CAP</b>	Proteína Ativadora de Catabólitos do inglês <i>catabolite activador protein</i>
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de alta performance
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DO<sub>600nm</sub></b>	Densidade óptica a 600 nm
<b><i>E. coli</i> AspB</b>	<i>Escherichia coli</i> com vetor para a produção da enzima L-asparaginase
<b>GOD</b>	Glucose oxidase
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
<b>ITC</b>	Calorimetria de titulação isotérmica
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LLA</b>	Leucemia Linfocítica Aguda
<b>L-ASNase</b>	L-asparaginase
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>OD</b>	Oxigênio dissolvido

<b>POD</b>	Peroxidase
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>Qsp</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico do inglês ribonucleic acid
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>Tris</b>	Tris (Hidroximetil) Aminometano
<b>UI</b>	Unidade Internacional
<b>UFC</b>	Unidade de formação de colônias
<b>X</b>	peso seco
$\mu_x$	Velocidade específica de crescimento
$\mu_{set}$	Taxa de crescimento específica desejada
$Y_{x/s}$	Fator de conversão do substrato em célula

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1.	<i>Leucemia</i> .....	2
1.1.2.	<i>L-asparaginase</i> .....	3
1.1.3.	<i>Produção de proteínas recombinantes</i> .....	8
1.1.4.	<i>Escalonamento de bioprocessos</i> .....	13
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1.	MICROORGANISMO .....	20
3.2.	PREPARO DO ESTOQUE DE CÉLULAS DA <i>E. COLI</i> ASPB.....	20
3.3.	MEIOS DE CULTIVO AVALIADOS .....	21
3.4.	PREPARO DO MEIO DEFINIDO.....	22
3.4.1.	<i>Solução de elementos traço</i> .....	22
3.4.2.	<i>Solução de glicose</i> .....	22
3.4.3.	<i>Solução de sulfato de magnésio</i> .....	22
3.4.4.	<i>Solução de tiamina</i> .....	23
3.4.5.	<i>Solução de ampicilina</i> .....	23
3.4.6.	<i>Solução de sais</i> .....	23
3.4.7.	<i>Formulação final do meio definido</i> .....	24
3.5.	PREPARO DO INÓCULO .....	24
3.6.	BIORREATOR .....	25
3.6.1.	<i>Alimentação exponencial</i> .....	25
3.7.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
3.7.1.	<i>Método do ácido L-aspartil-β-hidroamato (AHA)</i> .....	27
3.7.2.	<i>Método de Nessler</i> .....	31
3.8.	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA.....	35
3.9.	QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE .....	36
3.9.1.	<i>Sistema enzimático de glicose enzimática líquida</i> .....	36
3.9.2.	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i> .....	37
3.10.	MEDIDAS DE CRESCIMENTO.....	38
3.10.1.	<i>Determinação do peso seco</i> .....	38

3.10.2.	<i>Densidade óptica 600 nm</i> .....	38
3.10.3.	<i>Curva de crescimento</i> .....	38
3.10.4.	<i>Curva peso seco x DO<sub>600nm</sub></i> .....	39
3.11.	MÉTODO DE ROMPIMENTO CELULAR .....	39
3.12.	INDUTORES.....	39
3.13.	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA ( $\mu_x$ ) .....	40
3.14.	FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULA ( $Y_{x/s}$ ) .....	40
3.15.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
4.1.	DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DE <i>E. COLI</i> ASPB E A CORRELAÇÃO COM A DENSIDADE ÓPTICA A 600 NM.....	41
4.2.	ATIVIDADE DE L-ASNASE .....	42
4.2.1.	<i>Método para quantificação da atividade da enzima L-ASNase</i> .....	42
4.2.2.	<i>Quantificação da atividade de atividade da L-ASNase em suspensão celular x enzima extraída.</i> .....	45
4.3.	DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA CULTIVO DA <i>E. COLI</i> ASPB ...	46
4.3.1.	<i>Curva de crescimento</i> .....	46
4.3.2.	<i>Análise de custo dos meios</i> .....	48
4.4.	OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE .....	50
4.5.	OTIMIZAÇÃO DA INDUÇÃO EM AGITADOR ORBITAL .....	51
4.5.1.	<i>Concentração do indutor</i> .....	51
4.5.2.	<i>Custo do indutor</i> .....	54
4.5.3.	<i>Tempo para o início da indução</i> .....	55
4.5.4.	<i>Tempo após a indução</i> .....	56
4.6.	CULTIVO EM BIORREATOR.....	59
4.6.1.	<i>Batelada</i> .....	59
4.6.2.	<i>Batelada alimentada</i> .....	60
4.6.3.	<i>Produção da enzima L-ASNase em biorreator</i> .....	62
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>68</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é uma doença maligna que se caracteriza pela multiplicação descontrolada de blastos (1). A proliferação destas células imaturas pode resultar em meningite leucêmica, anemia, insuficiência hepática e renal e por fim pode levar o paciente a óbito (2). A incidência dessa neoplasia é maior em crianças chegando a representar 76% dos casos de leucemias em pacientes menores de 15 anos (3). Desde 1961, o medicamento a base da enzima L-ASNase juntamente com os medicamentos danorubicina, vincristina e prednisolona vem sendo utilizada no tratamento de LLA. Esse protocolo terapêutico tem proporcionado a sobrevivência de 80% dos pacientes pediátricos e de até 50% dos pacientes adultos (4,5).

Neste tratamento, a L-ASNase é responsável por catalisar a hidrólise da asparagina em ácido aspártico e amônio. O aminoácido asparagina é utilizado nos ciclos metabólicos das células. A célula cancerígena não tem a capacidade ou possui capacidade reduzida de produção deste aminoácido sendo dependente da asparagina que está presente no plasma sanguíneo. No tratamento da LLA, a L-ASNase é administrada por via intramuscular ou intravenosa, hidrolisando toda a asparagina presente no plasma sanguíneo levando a células cancerígenas a apoptose (6,7).

As L-ASNase liberadas para uso clínico são provenientes dos procariotos, *Escherichia coli* e *Erwinia Chrysanthemi* (atualmente conhecida como *Dickeya dadantii*). As formulações de *E. coli*, nativa e a peguilada, vêm sendo utilizadas como primeira linha de tratamento e a enzima de *E. Chrysanthemi* (também chamada de *Dickeya dadantii*) é utilizada como segunda linha de tratamento a pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade a enzima proveniente de *E. coli* (8–10). Atualmente não temos uma produção nacional deste medicamento sendo necessária a sua importação. Diante de um histórico de risco de desabastecimento deste medicamento no Brasil e de sua necessidade para o tratamento dos pacientes leucêmicos (11), vê-se a necessidade de se buscar

alternativas de produção nacional da enzima L-ASNase de maneira viável economicamente.

A combinação da produção de proteínas recombinantes e dos processos de cultivo em larga escala vem tornando possível que proteínas com baixa produtividade sejam obtidas em quantidades que seriam dificilmente ou até impossíveis a partir de fontes naturais (12). A utilização da *E. coli* como hospedeiro possui vantagens por apresentar uma genética e fisiologia bem elucidadas, rápido crescimento, baixo custo de meio de cultura e permitir altos níveis de expressão de proteínas viabilizando assim a produção em industrial desta enzima. (13,14).

Este estudo propôs-se o desenvolvimento de um processo para a produção em escala de até 3L da enzima L-ASNase por *Escherichia coli* BL21(DE3) AspB.

## 1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1. Leucemia

Leucemia é uma doença maligna que é caracterizada pela proliferação descontrolada dos leucócitos (glóbulos brancos), podendo envolver a medula óssea, os leucócitos circulantes e órgãos, como baço e linfonodos (1,2). Os leucócitos se desenvolvem a partir de células-tronco da medula óssea. Ocasionalmente, uma célula imatura sofre mutação genética, que pode resultar na interferência no controle normal da divisão celular, tendo como consequência a multiplicação descontrolada ou resistente à morte celular natural levando dessa maneira a leucemia (2). Podemos dividir a leucemia em 12 tipos, sendo os mais frequentes: leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, leucemia Linfocítica aguda e leucemia Linfocítica crônica (1).

#### 1.1.1.1. Leucemia Linfocítica Aguda

A LLA afeta as células linfóides que se multiplicam de forma incontrolável produzindo um excesso de linfócitos imaturos (blastos), os quais impede que a medula óssea funcione normalmente (1). As células leucêmicas entram na corrente sanguínea e são levadas para o fígado, o baço, os linfonodos, o cérebro e os testículos, onde podem continuar a crescer e se multiplicar. O acúmulo destas

células pode causar meningite leucêmica, anemia, insuficiência hepática e renal, entre outras complicações (2).

Esse quadro leucêmico pode ocorrer em pessoas de todas as faixas etárias, porém existem dois picos de frequência, o primeiro acontece em pacientes na idade de 2 a 6 anos e o segundo pico acontece em pacientes acima dos 60 anos. A maior incidência de diagnósticos acontece em pacientes com idade inferior a 15 anos, correspondendo a 76% dos casos de leucemias diagnosticadas nessa faixa etária. A LLA em adultos representa 20% das leucemias agudas, sendo mais comuns em homens e caucasianos (3).

Os pacientes podem apresentar febre, fadiga, hemorragia, dores ósseas e articulares, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia entre outros sintomas. Esses sintomas são reflexos da insuficiência da medula óssea, da infiltração extra medular e da agudização da doença (3).

Para o tratamento de LLA, desde 1961, é utilizada a enzima L-ASNase combinada com daunorubicina, vincristina e prednisolona e tem se mostrado eficazes durante todo o tratamento da doença. Atualmente a taxa de sobrevivência é de 80% em pacientes pediátricos e em pacientes adultos fica entre 38% a 50% o que é considerada uma taxa baixa de sobrevivência (4).

### **1.1.2. L-asparaginase**

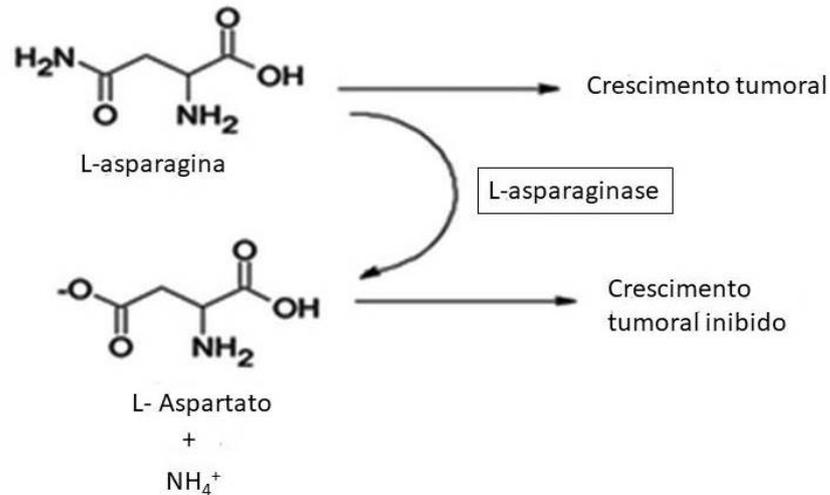
A L-asparagina amino-hidrolase (L-asparaginase, EC 3.5.1.1) catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônio (15). Esta enzima foi descoberta em 1904 por Lang em tecidos bovinos (16) e foi ratificada por Furth e Friedmann (1910) que confirmaram sua presença em órgãos de cavalo e porco (17). Clementi (1922) demonstrou sua atividade em cobaias (18), mas sua atividade antitumoral só foi descoberta em 1952 por Kidd (19,20). Mashburn e Wriston (1964) constataram que a L-ASNase apresentava atividade inibitória em tumores de ratos (21). Broome (1965) elucidou o mecanismo de dependência nutricional das células malignas da L-asparagina do plasma (22).

A estrutura cristalográfica da enzima L-ASNase nativa de *E. coli* foi determinada por Swain e colaboradores (1993), sendo um homotetrâmero, onde

cada monômero é formado por 330 aminoácidos (23). Os monômeros são capazes de se associar fortemente, formando dímeros íntimos que são mantidos principalmente forças de van der Waals e interações eletrostáticas, os dois dímeros são ligados por ligações semelhantes, sendo ativa apenas na conformação tetramérica (7,23). Os sítios ativos desta enzima está localizada entre as subunidades nos dímeros íntimos, cada dímero apresenta dois sítios ativos (23). Por seu mecanismo essa enzima tem sido usada amplamente na indústria alimentícia e farmacêuticas.

A enzima L-ASNase vem sendo aplicada no tratamento de diferentes tipos de neoplasias como Leucemia Linfóide Aguda e linfoma de Hodgkin (15). L-ASNase faz parte do protocolo de tratamento da LLA em crianças (5). A infusão de L-ASNase, tem como objetivo o rápido esgotamento da asparagina plasmática, seguido pelo efluxo de asparagina intracelular privando as células da asparagina circulante no plasma. O esgotamento da asparagina plasmática é importante nessa fase do tratamento, pois as células saudáveis possuem a enzima asparagina sintetase, que converte aspartato e glutamina em asparagina e glutamato, essa asparagina será usada para os ciclos metabólicos das células. No entanto, uma grande parte das células cancerígenas não possuem ou possuem baixa expressão da enzima asparagina sintetase sendo dependente da asparagina plasmática, resultando na apoptose das células cancerígenas por falta de nutrientes essenciais para essas células (24).

A Figura 1 mostra o mecanismo de ação da L-ASNase que é a hidrólise da asparagina em ácido aspártico e amônia. As células cancerígenas são incapazes de sintetizar ou produzem em baixa quantidade a asparagina, na falta deste aminoácido acontece o bloqueio de ciclos metabólicos da célula, levando de maneira seletiva a apoptose das células cancerígenas (6,7).



**Figura 1.** Mecanismo simplificado da ação da L-ASNase. Fonte: Adaptado de Badoei-Dalfard (2016)(19).

A L-ASNase é produzida amplamente por vários organismos, mas na prática clínica são aplicadas no tratamento humano as enzimas derivadas de *Escherichia coli* e de *Erwinia chrysanthemi* (9). Duas formulações são derivadas da *E. coli*, nativa e peguilada, e são a primeira linha de tratamento para pacientes com LLA (10). As L-ASNase nativa, possuem nomes comerciais como: Elspar<sup>®</sup>, Kidrolase<sup>®</sup>, Crasnitin<sup>®</sup>, Leunase<sup>®</sup>, Asparaginase Medac<sup>®</sup>, Leuginase<sup>®</sup>, Spectrila<sup>®</sup> e a versão da L-ASNase peguilada é a L-ASNase com propilenoglicol que aumenta a meia vida da enzima, sendo seu nome comercial Oncaspar<sup>®</sup>. A L-ASNase de *E. chrysanthemi* foi nomeada de Erwinase<sup>®</sup> e é utilizada como tratamento de segunda escolha, sendo preferencialmente administrado em pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade L-ASNase de *E.coli* (8–10).

O regime de tratamento envolve injeções com uma grande quantidade de proteínas por via intravenosa ou intramuscular. A dosagem utilizada para L-ASNase de *E. coli* nativa é de 5.000 UI/m<sup>2</sup> de superfície corporal (9), em contrapartida a dosagem da L-ASNase de *E. chrysanthemi* é de 25.000 UI/m<sup>2</sup> (25) sendo ambas administradas três vezes por semana (9). Essa diferença de dosagem de 5 vezes entre as duas L-ASNases se deve ao tempo reduzido de meia-vida da enzima de *E. chrysanthemi*, que é 15 horas, comparado a enzima de *E. coli*, que é de 24 a 30 horas. Uma solução encontrada para esse curto tempo de meia vida foi a peguilação

da enzima de *E. coli*, que resultou na diminuição da dose para 2.500 UI/m<sup>2</sup>(7) e uma duração de meia vida de 7 dias aproximadamente (9).

Entretanto, a terapia com L-ASNase tem o potencial para desencadear a resposta imune produzindo anticorpos anti-asparaginase que são frequentemente associados a reações de hipersensibilidade, como anafilaxia, anormalidade da coagulação, trombose, disfunção hepática, pancreatite, hiperglicemia e disfunção cerebral. Os efeitos adversos podem também ser assintomáticos podendo provocar a inativação rápida da L-ASNase resultando em uma diminuição da sua ação (26–29).

Uma alternativa seria a utilização de enzimas de origem eucariótica. Neste sentido, um estudo publicado por Belén e colaboradores (2020), apresentou avaliação *in silico* comparando nove enzimas L-ASNase de origem fúngica e uma enzima L-ASNase proveniente da *E. coli*. O estudo avaliou as possíveis respostas imunológicas através da frequência dos epítopos de célula T alergênicas na estrutura de cada enzima e o grau de imunogenicidade. Ao realizar a análise das frequências relativas dos epítopos de célula T alergênicas verificou que *Penicillium digitatum* e do *Aspergillus terreus* apresentavam a mais alta densidade epitópica. O grau de imunogenicidade não apresentou diferença significativa entre as nove L-ASNase fúngicas, mas o grau de imunogenicidade das enzimas fúngicas foi equivalente ou maior do que o relatado para a bacteriana, como foi o caso da L-ASNase de *Penicillium digitatum*. Esses resultados contradizem o esperado de que as L-ASNase de eucariotos seriam mais seguras do que a de procariotos (30).

Na indústria alimentícia, a L-ASNase é usada para reduzir a formação de acrilamida. A acrilamida é formada no processo de cozimento e frituras de alimentos ricos em amido através da reação de Maillard (19). Esta reação ocorre quando o alimento é aquecido e o grupo carbonila interage com o grupo amino dos aminoácidos ou proteínas, sendo responsável pela cor e pelo aspecto característico do cozimento (31). A redução da produção de acrilamida é relevante, pois é uma neurotoxina que é classificada como potencial cancerígena para humanos (15). A cadeia amina que está presente na estrutura da acrilamida é proveniente do aminoácido asparagina que está presente naturalmente na matéria prima inicial,

sendo assim possível reduzir em mais de 99% a acrilamida produzida utilizando L-ASNase antes de fritar ou assar os alimentos (32).

Na Tabela 1 estão presentes as propriedades bioquímicas da enzima L-ASNase nas diferentes fontes microbianas. O pH ótimo e a temperatura ótima são as condições em que a enzima é mais ativa e varia de acordo com cada enzima (33). A constante de Michaelis ( $K_M$ ) representa a afinidade da enzima com o substrato para aquelas enzimas que obedecem a equação de Michaelis-Menten, quanto menor o  $K_M$  maior é a afinidade da enzima pelo substrato (34). O ponto isoelétrico (pI) é o valor de pH onde a carga total da proteína é igual a zero (35). A atividade específica é a atividade da enzima dividida pelo peso total das proteínas (36).

**Tabela 1-** Propriedades bioquímicas da enzima L-ASNase em diferentes fontes microbianas. Tabela retirada de Kumar e Sobha (2012) (37)

Fonte microbiana	pH ótimo	Temperatura ótima	$K_M$ (M)	pI	Atividade específica ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Peso molecular (kDa)*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	37	$0.147 \times 10^{-3}$	-	-	160
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	9	37	$1.45 \times 10^{-4}$	6.38	732.3	34
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8-9	-	$4.1 \times 10^{-4}$	4.5	-	70
<i>Azotobacter vinelandii</i>	8.6	48	$1.1 \times 10^{-4}$	-	2.47	84
<i>E.coli</i>	7-8	37	$1.25 \times 10^{-5}$	4.9	-	141
<i>Serratia marcescens</i>	6.8	-	$1.0 \times 10^{-4}$	5.2	255	171-180
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	8.6	-	$2.2 \times 10^{-3}$	6.8	-	230
<i>Erwinia aroideae</i>	7.5	-	$3 \times 10^{-3}$	6.8	256	155
<i>Erwinia carotovora</i>	8	50	$1.8 \times 10^{-5}$	-	-	125-145
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ASNase I	8.5	$7.4 \times 10^{-3}$	-	-	400
	ASNase II	6.8	$3.5 \times 10^{-4}$	-	-	800
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7	40	$2.5 \times 10^{-3}$	-	-	80
<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	7.4	37	$1 \times 10^{-3}$	5.5	-	216
<i>Mycobacterium phlei</i>	8.8-9.2	-	$0.7 \times 10^{-3}$	-	-	126
<i>Bacillus coagulans</i>	8.5-9.5	55	$4.7 \times 10^{-3}$	-	10.9	85
<i>Fusarium tricinctum</i>	7.5-8.7	-	$5.2 \times 10^{-4}$	5.18	-	161-170
<i>Vibrio succinogenes</i>	7.3	-	$4.78 \times 10^{-5}$	8.74	202	146
<i>Proteus Vulgaris</i>	7-8	57	$2.6 \times 10^{-5}$	5.08	300	-

\* O peso molecular teórico é a soma de todos os pesos moleculares dos aminoácidos presentes na proteína.

No histórico da L-ASNase como medicamento no Brasil, até 2013 o Ministério da Saúde realizava a compra da Elspar<sup>®</sup> fabricada pelo laboratório Bagó<sup>®</sup>, que obtinha o registro sanitário na ANVISA. A Bagó<sup>®</sup>, em dezembro de 2012, anuncia a descontinuação da fabricação por insustentabilidade mercadológica. Em janeiro de 2013 ocorre um desabastecimento do medicamento nos hospitais brasileiros culminando em uma compra emergencial em março de 2013 da Asparaginase Medac<sup>®</sup>, mesmo o medicamento não tendo registro na ANVISA, seguida de uma nova compra emergencial em 2014. Somente em 2017, um novo medicamento obteve aprovação do registro pela ANVISA. Em 2017, o registro da enzima peguilada Oncaspar<sup>®</sup> foi aprovado. Diante deste quadro, viu-se a necessidade de estudar a produção dessa enzima visando apoiar a produção nacional.

### **1.1.3. Produção de proteínas recombinantes**

Proteínas nativas e recombinantes vêm sendo utilizadas na indústria farmacêutica desde 1922 quando Banting e Best produziram a primeira proteína farmacêutica, a insulina. Em 1927, a penicilina foi descoberta, porém sua produção foi iniciada apenas no início da década 1940 (38).

A produção de enzimas industriais teve sua notória evolução nos anos de 1980 a 1990, quando se iniciou a utilização de enzimas microbianas. Anteriormente eram utilizados como fonte de enzimas os animais e as plantas, no entanto estas enzimas tinham uma baixa disponibilidade e preços elevados levando a sua baixa utilização. Quando as enzimas microbianas começaram a serem utilizadas, os cultivos eram mais simples e mais rápidos do que as enzimas de animais e os organismos eram facilmente manipulados geneticamente, mostrando-se uma alternativa economicamente favorável (38).

Após alguns anos, a tecnologia do DNA recombinante veio para trazer grandes avanços na produção de enzimas, pois enzimas que eram de organismos difíceis de serem cultivados ou manipulados passaram a ser produzidas por organismos geneticamente modificados, como a insulina humana, albumina, hormônio do crescimento humano, vacinas, anti-inflamatórios entre outros (39,40). Esta tecnologia possibilitou o aumento da estabilidade, atividade enzimática, especificidade da enzima e o aumento da produção enzimática. Atualmente, a

engenharia proteica resultou na produção de enzimas com qualidade superior as enzimas nativas devido a mudanças únicas na sequência dos aminoácidos resultaram em mudança de pH ótimo, termoestabilidade, inibição de *feedback*, especificidade ao substrato (38).

Para ser possível fazer a expressão de uma proteína recombinante, a escolha do sistema de expressão e do vetor de clonagem são de grande importância, sendo discutido nos tópicos abaixo:

#### 1.1.3.1. Sistema de expressão

Existe uma ampla variedade de sistemas de expressão para a produção de proteínas. As proteínas podem ser expressas em culturas celulares de bactérias, leveduras, fungos, mamíferos, plantas, insetos, animais transgênicos e *in vitro*. Para se escolher um sistema de expressão é importante levar em consideração a quantidade de proteínas produzidas, funcionalidade, velocidade de produção e o rendimento (38). As características dos diferentes sistemas hospedeiros de expressão estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Características dos diferentes sistemas hospedeiros de expressão. Tabela adaptada de Nagesh e Shrivastava (2019)(39)

<b>Sistema de expressão</b>	<b>Características</b>
<b>Células de mamífero</b>	Boa dobragem de proteínas, padrão de glicosilação humanizada, boa secreção, taxa de crescimento lenta, livre de pirogênio, alto custo de produção total, longo tempo de produção, propagação difícil, rendimento médio para alto do produto, alta qualidade do produto, capacidade de expansão muito baixa, alto custo de purificação, alto risco de contaminação (vírus, príons, DNA oncogênico).
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Baixo custo geral, baixo tempo de produção, facilidade de cultivo, fácil propagação, produção de proteínas não-glicosiladas, alta taxa de crescimento, baixa capacidade de secreção das proteínas, risco médio de contaminação (endotoxinas), facilidade de modificação do genoma, modificações no genoma, rendimento médio do produto, baixa qualidade do produto, alta capacidade de aumento de escala, alto custo de purificação, livre de vírus.

Sistema de expressão	Características
<b>Leveduras</b>	Custo total médio, boa dobra de proteínas, produção de proteínas glicosiladas, tempo médio de produção, propagação fácil, taxa de crescimento rápido, alto rendimento do produto, qualidade média do produto, facilidade de modificação do genoma, boa capacidade de secreção das proteínas, livre de pirogênio, facilidade de cultivo, alta capacidade de aumento de escala, baixo risco de contaminação, custo médio de purificação.
<b>Células de insetos</b>	Boa dobragem de proteínas, baixa taxa de crescimento, alto rendimento do produto, custo geral médio, propagação viável, difícil de cultivar, tempo médio de produção, produção de proteínas glicosiladas, boa capacidade da secreção de proteínas, custo médio de purificação, risco muito baixo de contaminação, alta capacidade de aumento de escala, produto médio qualidade.
<b>Planta transgênica</b>	Boa dobragem de proteínas, produção de proteínas glicosiladas, custo geral muito baixo, tempo médio de produção, capacidade de aumento de escala muito alta, fácil propagação, alto rendimento do produto, alta qualidade do produto, baixo risco de contaminação, alto custo de purificação.
<b>Animais transgênicos</b>	Alto custo total, alto tempo de produção, baixa capacidade de aumento de escala, propagação viável, alto rendimento do produto, alta qualidade do produto, risco muito alto de contaminação (vírus, príons, DNA oncogênico), alto custo de purificação.

A escolha do hospedeiro será de acordo com a propriedade da proteína de interesse. O sistema de expressão escolhido neste trabalho foi a *Escherichia coli* que será discutido abaixo:

#### 1.1.3.1.1. *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, sendo um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas não glicosiladas. Isso se deve diversas vantagens com relação à expressão de proteínas, dentre essas vantagens destacasse que é o hospedeiro melhor caracterizado geneticamente e fisiologicamente, tem um rápido crescimento, os meios de cultura podem ser feitos facilmente e com baixo custo e permitindo altos níveis de expressão de proteínas

(13,14). Existem algumas limitações para expressão em *E. coli* como as características estruturais a serem expressas, como a glicosilada, estabilidade e eficiência translacional do mRNA, dobramento das proteínas, ação de proteases da célula do hospedeiro e possibilidade dos códons da proteína de interesse serem tóxicas para o hospedeiro (41).

A *E. coli* foi utilizado como sistema de expressão de diversos medicamentos que estão no mercado. A insulina humana foi o primeiro medicamento aprovado nos Estados Unidos da América em 1982. A aprovação do hormônio do crescimento bovino em 1994 estabeleceu um novo padrão para a fabricação pela sua relação custo-benefício. Além dos medicamentos citados acima, podemos encontrar outros medicamentos presentes no mercado como interferon  $\alpha$ 2b, interferon  $\alpha$ 2a, filgrastim, interferon  $\beta$ -1b, ranibizumabe, hormônio paratireóide humano, hormônio da paratireoide entre outros (42).

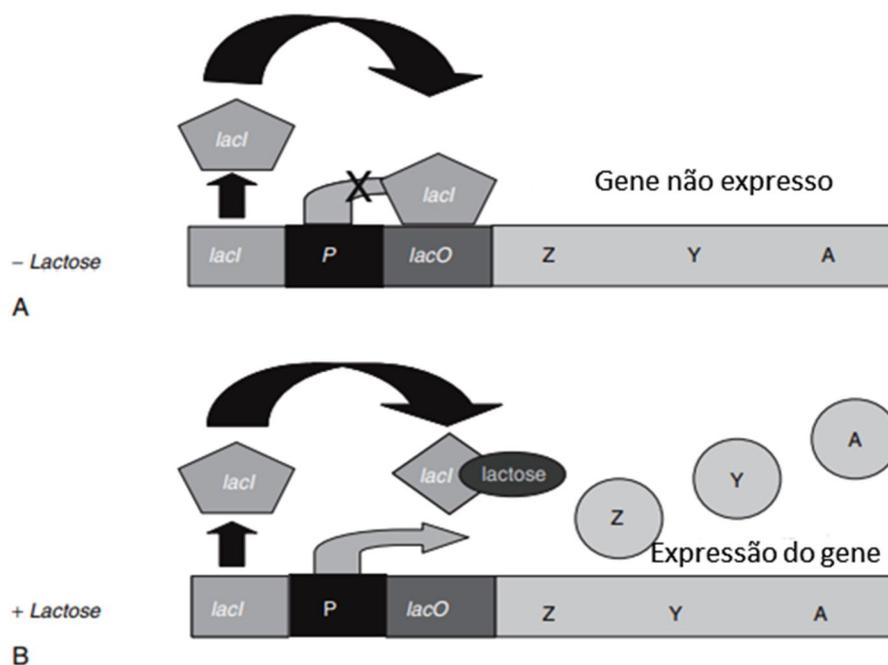
Neste trabalho foi utilizado a bactéria *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) esta é uma células competente deficiente de algumas proteases e produz pouco acetato e é adequada para a expressão de genes não tóxicos (43). As proteases deficientes nessa cepa é a OmpT e a Lon, a OmpT faz parte de uma família de proteases de membrana externa as ompTinas, que são responsáveis pela virulência das bactérias gram-negativas patogênicas (44). A protease Lon faz parte da superfamília de proteases ATNases associadas a diversas atividades celulares sendo responsável pela degradação seletiva de proteínas mutantes e anormais (45).

#### 1.1.3.2. Vetor de expressão pET

Encontra-se uma grande variedade de vetores de expressão para *E. coli*, onde diferem em sua capacidade de solubilidade, purificação, sequências de clivagem de proteases e na regulação de níveis de expressão (46). Um dos vetores de expressão mais utilizados é o pET que tem como promotor o T7, este promotor é capaz de induzir uma grande quantidade de mRNA resultando em uma grande quantidade de proteínas (47).

O vetor de expressão utilizado no presente trabalho foi o vetor pET-15b, que apresenta em sua composição o promotor T7 e o operador lacO. O promotor T7 é a

região onde a RNA polimerase se liga para fazer a transcrição. Como demonstrado na Figura 2, operador *lacO* apresenta um mecanismo de repressão, em que a proteína codificada pelo gene *lacI*, chamada de repressor *lac*, se liga ao operador *lacO* e a inibe a transcrição das proteínas, pois não permite que a RNA polimerase se ligue ao operador. Na presença de lactose ou do seu análogo IPTG, essa se liga a proteína *lacI* mudando a conformação e liberando *lacO* para ocorre a transcrição (48).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do repressor *lac*. Fonte: Imagem retirada e adaptado de Matthaei (2004) (48).

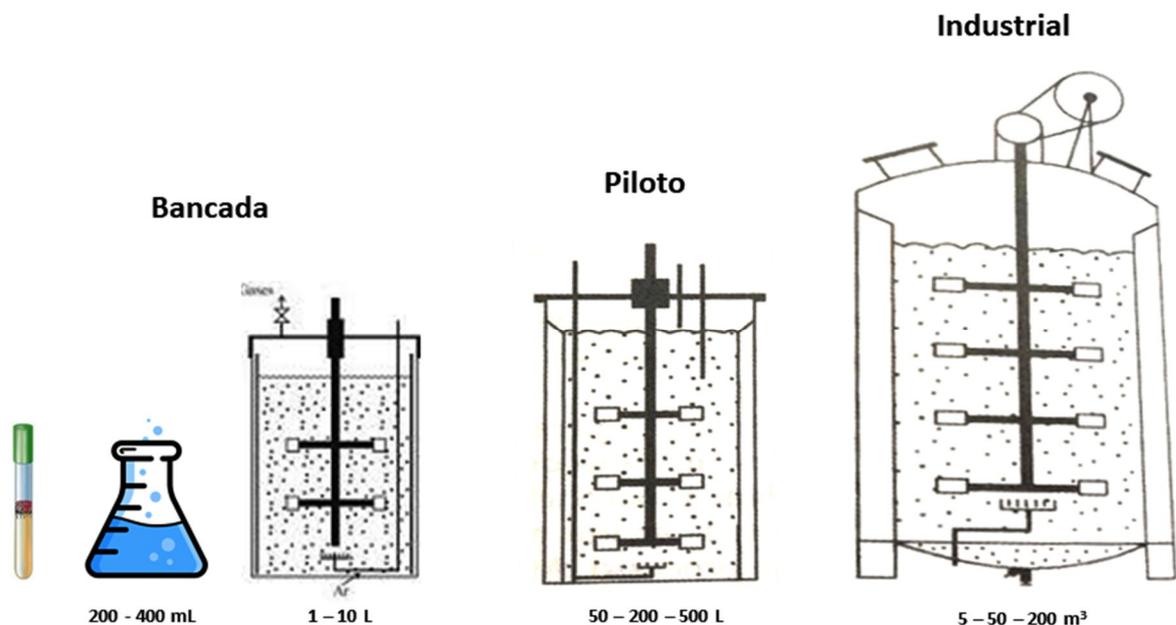
A expressão do gene da enzima L-ASNase de *E. coli* no sistema de expressão *E. coli* já foram explorados em alguns trabalhos como demonstrado na Tabela 3, mas em nenhum destes artigos houve o escalonamento do processo ou a busca pelo cultivo de alta densidade celular.

**Tabela 3-** Artigos em que o gene da L-ASNase de *E. coli* no sistema de expressão *E. coli*

Sistema de expressão	Vetor	Meio de cultura	Indutor	Referência
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-15b	Meio LB	IPTG	(49)
<i>E. coli</i> BL21 star (DE3)	pET-26b	Meio definido	IPTG	(50)
<i>E. coli</i> JM109	pKA	Meio LB	-	(51)
<i>E. coli</i> JM105, JM109, DH5 $\alpha$ e TG1	pBV220 e pUC19	Meio LB	Temperatura	(52)
<i>E. coli</i> cepas JM105, BL21 e CU1783.	pKP2, pQWE1 e pTWE1	Meio LB	IPTG	(53)

#### 1.1.4. Escalonamento de bioprocessos

No processo de desenvolvimento de produção de um produto, é necessário encontrar condições adequadas que permita produtividade e rendimento de proteínas economicamente viável (47,54). Como demonstrado na Figura 3, processos fermentativos são divididos em três escalas: a de bancada, a piloto e a industrial (54).



**Figura 3.** Esquema das escalas de trabalho de processos fermentativos. Fonte: Imagem adaptada de Schmidell (2001) (54).

A escala de bancada é a que apresenta a maior flexibilidade e menor custo. Nesta escala será definido microrganismo, o meio de cultura, temperatura, pH e velocidade de consumo do oxigênio do processo. Fazem parte dessa escala os cultivos feitos em agitador orbital (*shaker*) e biorreatores até 10 litros de capacidade. Após se definir esses parâmetros pode-se ampliar a escala para um reator piloto, neste momento as variáveis estudadas na escala de bancada serão mantidas. Na escala piloto será fixado um critério de ampliação de escala, sendo uma grandeza que tem que ser fixa em todas as escalas. E na escala industrial visará operar o biorreator de maneira similar a escala piloto visando a produção em alta escala (54). Neste trabalho a escala de trabalho foi a de bancada, pois foi feito um processo de triagem em agitador orbital seguido por biorreator de até 3 litros de capacidade.

#### 1.1.4.1. Processos fermentativos em biorreatores

Os biorreatores são reatores onde ocorrem reações químicas catalisadas por enzimas ou células vivas. Essas células vivas podem ser microbianas, animais ou vegetais. O processo fermentativo pode ser classificado em: descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado e contínuo (54). Sendo assim o processo descontínuo ou batelada, onde um meio de cultura asséptico é inoculado com o microrganismo de interesse, no decorrer do processo só é adicionado oxigênio, antiespumante, ácido e/ou base para controle do pH (55). No processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator e não é retirado do produto antes do final do processo. No processo semicontínuo, ocorre primeiramente uma batelada simples onde no final retira-se uma parte do meio de cultura fermentado e um novo meio de cultura é adicionado aproveitando o mosto. E por fim, a fermentação contínua é caracterizada pela alimentação constante e uma vazão constante, sendo assim o volume sempre é constante (54). Neste trabalho foi utilizada a batelada alimentada para se obter uma maior quantidade de biomassa.

##### 1.1.4.1.1. Batelada alimentada

As fermentações em batelada alimentada iniciam-se com uma batelada simples e após o término da fonte de carbono é iniciada a alimentação da

fermentação. Existem algumas finalidades para a alimentação do cultivo durante a fermentação algumas delas estão descritas abaixo:

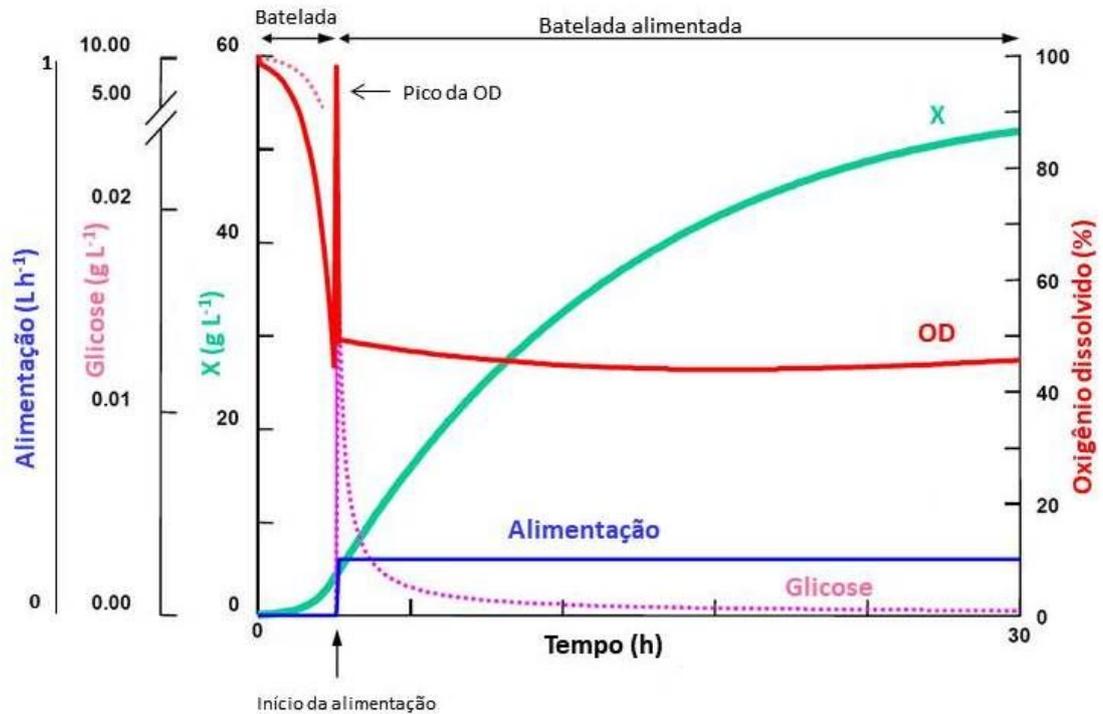
- Minimizar os efeitos do controle do metabolismo celular, os microrganismos dispõem de mecanismos regulatórios para que não haja uma superprodução de produtos e síntese de enzimas desnecessária, o processo de batelada alimentada pode ser útil para contornar alguns desses mecanismos (54,55);
- Prevenir a inibição por substrato ou precursores, pois qualquer fonte de nutriente pode se tornar inibitória por sua concentração, do microrganismo ou condição do cultivo (55);
- Minimizar a formação de produtos de metabolismo tóxicos, esse ponto é crítico quando o objetivo é chegar em altas densidades celulares(54);
- Superar problemas de estabilidade como contaminação, mutação e instabilidade do plasmídeo (54).
- Quando se deseja estudar a cinética dos processos fermentativos é possível controlar a velocidade da alimentação deixando o substrato em baixas concentrações por longo período de tempo o que ajuda na estimativa dos cálculos cinéticos (54).

Foram desenvolvidos métodos a fim de conseguir suprir a demanda de nutrientes, especialmente da fonte de carbono. Para isso foram desenvolvidos três métodos de alimentação: taxa constante, taxa gradual e taxa exponencial. A alimentação de taxa constante é o método mais simples de alimentação, pois é definido uma taxa fixa de alimentação e essa taxa será constante durante todo o cultivo. A desvantagem desse método é que chegará em determinado momento da fermentação que a quantidade de nutrientes não será suficiente para concentração celular, diminuindo assim a velocidade de crescimento específica continuamente (12). Alimentação com taxa gradual é o método em que o nutriente limitante do cultivo é alimentado exponencialmente para acompanhar o crescimento das células, levando a um crescimento exponencial durante todo o cultivo. Alimentação com taxa exponencial foi desenvolvida a fim de controlar a velocidade de crescimento específico através da velocidade da alimentação. Uma vantagem deste tipo de

alimentação é manter abaixo do valor crítico de formação de acetato. Em fermentações de *E. coli* é desejável manter a baixa concentração de acetato pois em altas concentrações o acetato irá inibir o crescimento e a produção de proteínas recombinantes. Sendo mantida a velocidade de crescimento específica ( $\mu$ ) entre 0,1 a 0,3 h<sup>-1</sup> (12).

Para iniciar a alimentação no momento adequado foram desenvolvidos mecanismos de *feedback* direto e indireto. Os métodos de *feedback* indiretos fazem correlações entre parâmetros físicos e a alimentação do cultivo como os métodos de DO-stat, pH-stat, taxa de evolução de dióxido de carbono e a concentração celular. O método de DO-stat baseia-se no momento em que a oxigênio dissolvido tem aumento acentuado sendo indicativo que o substrato está esgotado. O método de pH-stat tem como embasamento que no momento que a principal fonte de carbono se esgota há um aumento no pH do cultivo, decorrente dos íons de amônio secretados pelas células. O método de evolução de dióxido de carbono é outro indicador, pois no momento de crescimento as células liberam CO<sub>2</sub> sendo o consumo da fonte de carbono proporcional a liberação de CO<sub>2</sub>. O método de concentração celular onde a alimentação é determinada de acordo com a concentração celular. A concentração celular pode ser determinada por turbidimetria. Como método de *feedback* direto é a quantificação da fonte de carbono principal (12).

A Figura 4 exemplifica uma batelada alimentada, onde no primeiro momento acontece uma batelada simples e após o término da glicose ocorre um pico do oxigênio dissolvido (OD). A alimentação é feita em uma taxa constante, resultando no aumento da peso seco (X) (56).



**Figura 4.** Esquema de uma fermentação em batelada alimentada. Fonte: Imagem retirada e modificada Krause (2016) (56).

Buscando maximizar a produtividade volumétrica, foi desenvolvido os cultivos de alta densidade celular que tem como vantagem a possibilidade de volumes reduzidos em reatores, água residual reduzida, maior facilidade de separação celular e melhor rendimento do produto (57,58). Para alcançar alta densidade celular é necessário uma alimentação contínua dos substratos para a produção de produtos intracelulares e extracelulares (59). Na Tabela 4 estão trabalhos onde foi alcançada a alta densidade celular em *E. coli* com suas respectivas massa seca, o meio de cultivo, o indutor, a estratégia para a alimentação, o mecanismo de *feedback* para início da alimentação e volume do biorreator utilizado.

**Tabela 4-** Cultivos de alta densidade celular utilizando *Escherichia coli* com concentração celular acima de 100 g L<sup>-1</sup> de massa seca

Microorganismo	Massa seca (g/L)	Meio de cultivo	Indutor	Estratégia da Alimentação	Mecanismo de <i>feedback</i>	Volume do biorreator (L)	Referência
<i>E. coli</i> BL21 (DE3-)	119	Complexo	Lactose		Método direto	5	(60)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	100/120	Complexo/ Definido	Lactose	Exponencial	-	5	(61)
<i>E. coli</i>	110	Definido	-	Exponencial	Método direto	50	(62)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	103,4	Definido	IPTG	Exponencial	pH-stat	-	(63)
<i>E. coli</i> K12	101	Definido	-	Exponencial	pH-stat	2,5	(64)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	100	Definido	IPTG	Exponencial	pH-stat	2	(65)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	183	Complexo	IPTG	-	pH-stat	5	(66)
<i>E. coli</i> JM105	110	Definido	Arabinose	Exponencial	-	3	(67)
<i>E. coli</i> K12 RV308	145	Definido	IPTG	Exponencial	Método direto	10	(68)
<i>E. coli</i> TG1	148	Definido	-	Exponencial	DO-stat	5	(69)
<i>E. coli</i> TG1	110	Definido	-	Exponencial	DO-stat	72	(57)

O cultivo de alta densidade celular já foi utilizado para a produção de peptídeos (60), proteínas e enzimas como a penicilina G acilase (61), ciclodextrina glicosiltransferase (63), interferon  $\gamma$  (65) entre outros. Neste trabalho foi feita batelada alimentada com alimentação com taxa exponencial utilizando como *feedback* a DO-star visando utilizar a estratégia do cultivo de alta densidade celular para aumentar o rendimento da enzima L-ASNase e reduzir os custos de produção para torna possível a produção nacional desta enzima.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver processos para produção em escala até 3L da enzima L-ASNase por *Escherichia coli* BL21(DE3) AspB.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que o objetivo geral fosse alcançado foi necessário estabelecer os objetivos específicos descritos abaixo:

- Comparar e definir o método de quantificação da atividade da enzima L-ASNase;
- Definir o meio de cultura a ser utilizado nos cultivos;
- Definir o indutor utilizado, IPTG ou lactose;
- Avaliar o custo dos meios de cultivos e dos indutores;
- Definir parâmetros para cultivo em biorreatores;
- Alcançar cultivos de alta densidade celular;
- Produzir da enzima L-ASNase em biorreator de 3 litros.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MICRORGANISMO

Os experimentos neste trabalho foram realizados utilizando L-ASNase de *Escherichia coli* (GenBank KY305877) expressa no hospedeiro *E. coli* BL21 (DE3) tendo como vetor de expressão o pET-15b, que contém uma sequência de sinal de exportação para o espaço periplasmático e gene de resistência à ampicilina como marcador seletivo. Essa cepa foi denominada no presente trabalho como *E. coli* AspB. A cepa modificada foi cedida pela professora Dra. Gisele Monteiro do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e pelo professor Dr. Adalberto Pessoa do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Farmacêutica da Universidade de São Paulo.

#### 3.2. PREPARO DO ESTOQUE DE CÉLULAS DA *E. coli* AspB

Para o preparo do estoque padronizado, uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio LB (triptona ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) e NaCl ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ), suplementado com ampicilina ( $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em um Erlenmeyer de 250 mL e incubados em agitador orbital (incubador shaker series Innova 44<sup>®</sup>) á  $37^\circ\text{C}$  e 180 rpm. A cada duas horas foi retirado assepticamente uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de amostra. Essa alíquota foi centrifugada a 10.000 g, 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ , descartado o sobrenadante e o precipitado ressuspense em 1 mL de NaCl 0,85%. Em seguida foi realizada a leitura da densidade óptica a 600nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) dessa suspensão. Foi considerado o valor de diluição da amostra (1:2). Quando a densidade estava entre 1,5 e 2,0 o cultivo foi interrompido. Uma alíquota de 40 mL do cultivo foi transferido para um tubo tipo cônico estéril de 50 mL e centrifugado a 10.000g, 10 minutos,  $4^\circ\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi suspenso com 40 mL de meio de criopreservação, que continha 34 mL de meio LB estéril e 6 mL de glicerol estéril (85% meio LB e 15% glicerol). Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram estocadas em criotubo estéril. Os criotubos foram armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.3. MEIOS DE CULTIVO AVALIADOS

Foram preparados três meios de cultivo para *E. coli* AspB diferentes: meio definido (57), meio semi-definido (70) e o meio complexo (71). A composição destes meios está descrita Tabela 5:

**Tabela 5-** Composição dos meios de cultivo definido, semi-definido e complexo

Meio definido		Meio semi-definido		Meio complexo	
Glicose	5,0 g L <sup>-1</sup>	Glicose	5,0 g L <sup>-1</sup>	Glicose	5,0 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,3 g L <sup>-1</sup>	Extrato de levedura	1,0 g L <sup>-1</sup>	Extrato de levedura	5,0 g L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,0 g L <sup>-1</sup>	Triptona	10,0 g L <sup>-1</sup>
Ácido cítrico	1,7 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,0 g L <sup>-1</sup>	NaCl	10,0 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g L <sup>-1</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0 g L <sup>-1</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,342 g L <sup>-1</sup>
Citrato de Ferro III	60,0 mg L <sup>-1</sup>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	4,6 g L <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,742 g L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15,0 mg L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,0 g L <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g L <sup>-1</sup>
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	8,0 mg L <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	81,0 mg L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50,0 mg L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0 mg L <sup>-1</sup>	ZnCl <sub>2</sub>	3,9 mg L <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5 mg L <sup>-1</sup>	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	6,0 mg L <sup>-1</sup>	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1 mg L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,5 mg L <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	73,8 mg L <sup>-1</sup>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	25,0 mg L <sup>-1</sup>
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,5 mg L <sup>-1</sup>	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,81 mg L <sup>-1</sup>	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4,0 mg L <sup>-1</sup>
EDTA·Na <sub>2</sub>	8,4 mg L <sup>-1</sup>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 mg L <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 mg L <sup>-1</sup>
Tiamina·HCl	4,5 mg L <sup>-1</sup>	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O	4,8 mg L <sup>-1</sup>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,8 mg L <sup>-1</sup>
		MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20,4 mg L <sup>-1</sup>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20,0 mg L <sup>-1</sup>
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6,0 mg L <sup>-1</sup>	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1 mg L <sup>-1</sup>

O custo de cada meio de cultivo foi analisado realizando busca de preço em 3 empresas nacionais, entre os dias 02 a 08 de maio de 2018.

### 3.4. PREPARO DO MEIO DEFINIDO

Para formulação do meio defino foram preparadas soluções individuais como descrito abaixo:

#### 3.4.1. Solução de elementos traço

Foram preparados 500 mL da solução de elementos traços, para isso cada reagente foi pesado separadamente como descrito na Tabela 6:

**Tabela 6-** Composição da solução de elementos traços

Componente	Massa (g)	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
<b>Citrato de Ferro III</b>	3,00	6,0
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	0,75	1,5
<b>Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	0,40	0,8
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,15	0,3
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,125	0,25
<b>CoCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,125	0,24
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,075	0,15
<b>EDTA.Na<sub>2</sub></b>	0,45	0,84

Os componentes do meio foram solubilizados individualmente e após a solubilização completa os sais foram misturados em balão volumétrico o volume completado com água ultrapura para 500 mL. A solução foi esterilizada com filtração esterilizante em membrana de 0,22 µm e armazenada a temperatura ambiente e abrigo da luz por até 12 meses.

#### 3.4.2. Solução de glicose

A solução de glicose foi preparada em três diferentes concentrações foram elas 5 g L<sup>-1</sup>, 10 g L<sup>-1</sup> e 27,5 g L<sup>-1</sup>. O volume final da solução foi de 80 mL e a solução foi autoclavada para posteriormente ser adicionado ao meio.

#### 3.4.3. Solução de sulfato de magnésio

Foram preparados 20 mL da solução de sulfato de magnésio, na concentração de 60 g L<sup>-1</sup>, e posteriormente essa solução foi autoclave para uso (Tabela 7).

**Tabela 7-** Composição da solução de sulfato de magnésio

Componente	Massa (g)	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	1,2	60

**3.4.4. Solução de tiamina**

Foram preparados 25 mL de solução de tiamina na concentração de 4,5 mg L<sup>-1</sup>.  
 1. Descrito na **Tabela 8**.

**Tabela 8-** Composição da solução de tiamina

Componente	Massa (mg)	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Tiamina.HCl</b>	112,5	4,5

A solução foi esterilizada com filtração esterilizante através de membrana de 0,22 µm. Foram feitas alíquotas da solução em microtubos estéreis e armazenados a -20°C.

**3.4.5. Solução de ampicilina**

Foram preparadas 25 mL de solução de ampicilina na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 9).

**Tabela 9-** Composição da solução de ampicilina

Componente	Massa (mg)	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
<b>Ampicilina</b>	2500	100

A solução foi esterilizada com filtração esterilizante através membrana de 0,22 µm. Foram feitas alíquotas da solução em micro tubos estéreis e armazenados a -20°C.

**3.4.6. Solução de sais**

Foram preparados 900 mL da solução de sais em pH 6,8. Foram pesados separadamente os seguintes componentes:

**Tabela 10-** Composição da solução de sais

Componente	Massa (g)	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	13,3	14,78
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	4,0	4,44
<b>Ácido cítrico</b>	1,7	1,89

Os componentes foram solubilizados em 800 mL de água destilada. Após a solubilização completa foi adicionado 10 mL da solução de elementos traço e o pH ajustado para 6,8 com NaOH 5,0 M. O volume foi completado para 900 mL com água destilada e por fim esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

#### 3.4.7. Formulação final do meio definido

A formulação final do meio de cultivo foi preparada dentro de um frasco Schott® estéril, onde foram adicionadas as soluções estoque de acordo com a composição na .

Tabela 11.

**Tabela 11-** Formulação final do meio definido a partir das soluções estoques

Componente	Volume (mL)
<b>Solução de sais</b>	900
<b>Solução de glicose</b>	80
<b>Solução de sulfato de magnésio</b>	20

As soluções estoques foram transferidas para o frasco Schott®, misturadas e armazenadas a temperatura ambiente e abrigo da luz por até um mês.

Após fracionar o meio para realização do cultivo foram adicionados 1000 µL da solução estoque de timina e 1000 µL da solução estoque da ampicilina para cada 1,0 L de meio definido.

### 3.5. PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL (relação volume de meio: volume do frasco = 1:10) de meio e 250 µL do estoque de

células descrito no item 3.2 e incubado no agitador orbital a 37°C e 180 rpm por até 16 horas.

### 3.6. BIORREATOR

Os cultivos em biorreator foram realizados em equipamento New Brunswick BioFlo®/CelliGen® 115 (Eppendorf®). Para os cultivos em batelada foi utilizado o biorreator com capacidade 1,3 L e para as bateladas alimentadas o biorreator com capacidade de 3 L. Os biorreatores foram equipados com termômetro, o *sparger* (responsável pela entrada dos gases), tubo de coleta, condensador, sensor de oxigênio dissolvido, eletrodos de pH, entrada para base, alimentação e indutor. A temperatura foi mantida constante com o auxílio da jaqueta de água e a homogeneidade da fermentação com o sistema de agitação.

Os parâmetros definidos para a fermentação foram: temperatura a 37°C, pH a 6,8, não foi necessário a adição de ácido, apenas de base (NH<sub>4</sub>OH 3 M). O oxigênio dissolvido de 40%, quando o percentual de oxigênio ficava a baixo de 40% a cascata de agitação era ativada que variava de 200 a 900 rpm e 2 vvm de ar comprimido/oxigênio. Para os cultivos realizados em biorreator de 1,3 L de capacidade utilizado 500 mL de meio de cultura e para os cultivos com biorreator de 3 L de capacidade contendo 800 mL de meio de cultura.

#### 3.6.1. Alimentação exponencial

Para a realização da alimentação exponencial, foi necessário obedecer ao modelo matemático derivado do balanço de massas supondo rendimento celular constante e crescimento em exponencial (12). A equação está descrita na Equação 1:

**Equação 1.** Determinação da taxa de fluxo da alimentação para o método de alimentação exponencial:

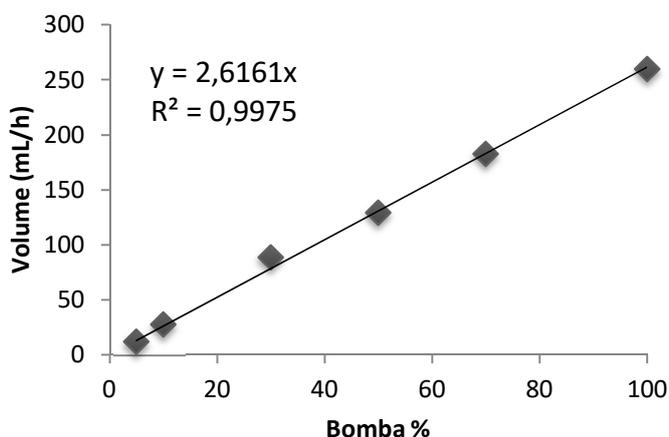
$$F = \left( \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \right) X(t_0) V(t_0) \exp[\mu(\text{set}) (t - t_0)]$$

Onde, F é taxa de fluxo da alimentação (L h<sup>-1</sup>),  $\mu$  é a taxa de crescimento específica real e  $\mu(\text{set})$  taxa de crescimento específica desejada,  $Y_{x/s}$  é coeficiente biomassa/substrato (g g<sup>-1</sup>), m é o coeficiente de manutenção específico (g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), X

( $t_0$ ) é a concentração de biomassa no início da alimentação ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $V$  volume do cultivo no início da alimentação (L) e  $t-t_0$  é o tempo de alimentação decorrido.

### 3.6.1.1. Calibração da bomba

Para conhecer o volume da alimentação que seria bombeado para o biorreator foi necessário fazer a calibração da bomba. Com o sistema de alimentação, que envolve a bomba, a garrafa e as mangueiras por onde é bombeada a solução de alimentação, foi feita a calibração. Com o auxílio de uma proveta, a bomba foi ativada por um minuto em diferentes porcentagens (5, 10, 30, 50, 70 e 100%) e em triplicata. O volume que foi bombeado em um minuto foi multiplicado por 60, para saber o volume bombeado em 1 hora e plotado no gráfico. A inclinação da reta foi utilizada no cálculo do fluxo de alimentação. Como demonstrado na Figura 5.



**Figura 5.** Gráfico de calibração da bomba para alimentação. Onde foi feita a correlação entre a porcentagem de ativação da bomba e o volume da alimentação bombeada para dentro do biorreator.

### 3.6.1.2. Solução de alimentação

No cultivo de batelada alimentada, após o consumo da glicose do meio, foi adicionada a solução de alimentação de acordo com o fluxo descrito no item 3.6.1. Os componentes foram solubilizados em água destilada e esterilizados por calor úmido. A composição da solução de alimentação (72) está descrito na Tabela 12:

**Tabela 12-** Composição da solução de alimentação

Componente	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
<b>Glicose</b>	600
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	20
<b>EDTA</b>	0,813
<b>Citrato de Ferro (III)</b>	0,04
<b>CoCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,004
<b>MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	0,0235
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,0023
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,0047
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0,004
<b>Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	0,016

### 3.7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

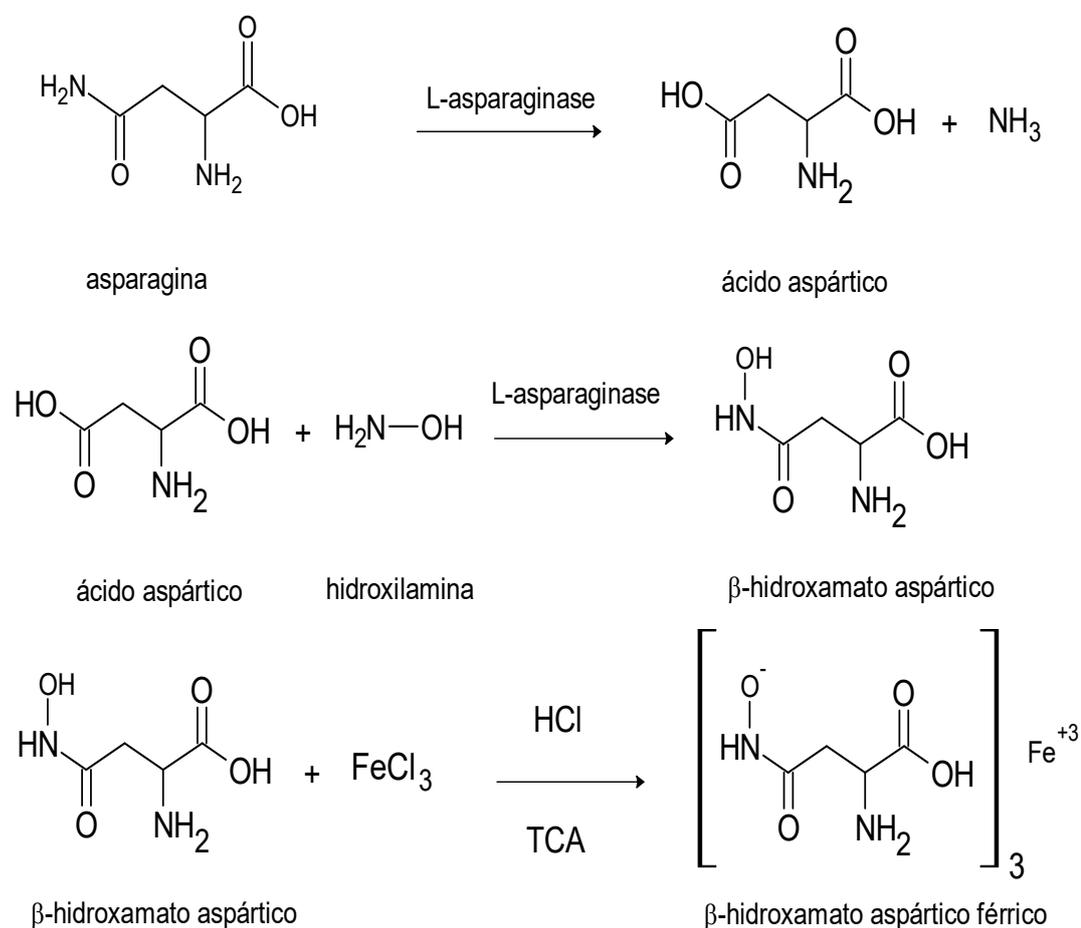
A atividade da enzima L-ASNase foi determinada por duas metodologias, método do ácido L-aspartil-β-hidroxamato (AHA) (73) e método de Nessler (74). A asparagina é hidrolisada pela L-ASNase em ácido aspártico e amônia como demonstrado na Figura 6, o método AHA utiliza o ácido aspártico para quantificar a atividade da L-ASNase (73). Alternativamente o método de Nessler utiliza a amônia livre no meio para quantificar a atividade da L-ASNase (74).

**Figura 6.** A L-ASNase hidrolisa a asparagina em ácido aspártico e amônia.

#### 3.7.1. Método do ácido L-aspartil-β-hidroxamato (AHA)

Como já citado, um dos produtos da reação de hidrólise da asparagina pela L-ASNase é o ácido aspártico. O ácido aspártico quando em contato com a hidroxilamina, na presença da L-ASNase, forma β-hidroxamato aspártico e essa reação é parada com ácido tricloroacético (TCA), HCl e cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>). O

cloreto férrico irá se complexar com o β-hidroxamato aspártico sendo o reagente colorimétrico da reação que será lida no espectrofotômetro a 500 nm, como demonstrado na Figura 7 (73).



**Figura 7.** Mecanismo de reação da quantificação da atividade da enzima L-ASNase pelo método do ácido L-aspartil-β-hidroxamato.

Preparo das soluções:

### 3.7.1.1. Tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>

O Tris foi pesado 6,057 g e solubilizado em 1 litro de água destilada, o pH foi ajustado para 8,6 com HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. O tampão foi armazenado em geladeira até o uso.

### 3.7.1.2. Solução de asparagina 0,1 mol L<sup>-1</sup>

Foi pesado 0,132 g de asparagina e solubilizado em 9 mL de água destilada e o volume foi ajustado com o auxílio de balão volumétrico qsp 10 mL. A preparação da asparagina foi extemporânea em todos os ensaios.

### 3.7.1.3. Solução de hidroxilamina 1 mol L<sup>-1</sup>

#### 3.7.1.3.1. Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina 2,0 mol L<sup>-1</sup>

O cloridrato de hidroxilamina foi pesado 1,39 g e solubilizado em 10 mL de água ultra purificada. A solução foi armazenada a 5°C.

#### 3.7.1.3.2. Solução estoque de hidróxido de sódio 2 mol L<sup>-1</sup>

Foram pesados 8 g de NaOH e solubilizados em 100 mL de água ultra pura. Essa solução foi armazenada em temperatura ambiente.

As duas soluções foram misturadas momentos antes do ensaio nas proporções 1:1.

### 3.7.1.4. Solução de cloreto férrico/TCA/HCl

#### 3.7.1.4.1. Solução de cloreto férrico

O cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) foi pesado 1,648 g e solubilizado em 10 mL de água destilada.

#### 3.7.1.4.2. Solução de TCA e HCl

Em um balão volumétrico de 10 mL foram adicionados 700 µL de HCl e 2 mL de TCA 6,1 M, o volume do balão foi completado com água destilada qsp 10 mL.

As soluções de cloreto férrico e TCA/HCl foram misturadas e foram armazenados em frasco âmbar e a solução foi mantida a 5°C.

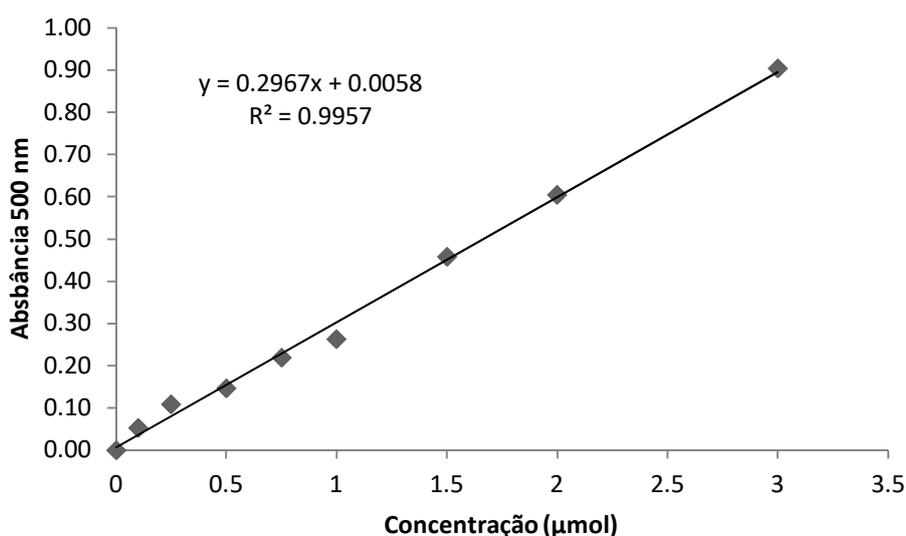
### 3.7.1.5. Construção da curva padrão de β-hidroxâmato aspártico

Para fazer a curva padrão foi usado um padrão de β-hidroxâmato aspártico da marca Sigma-Aldrich®. Foi pesado 7,4 mg do padrão e solubilizado em 9 mL de água ultra pura e com auxílio de um balão volumétrico o volume completado de 10 mL, a concentração da solução mãe é de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>. A curva foi construída como descrito na Tabela 13:

**Tabela 13-** Preparo das soluções padrão para o método de  $\beta$ -hidroxamato aspártico

Solução padrão	Moles ( $\mu\text{mol}$ )	$\beta$ -hidroxamato aspártico $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ( $\mu\text{L}$ )	Tampão Tris-HCl pH 8,6 ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
<b>Branco</b>	0,0	0	2,000	0,50
<b>Padrão 1</b>	0,1	20	1,980	0,50
<b>Padrão 2</b>	0,25	50	1,950	0,50
<b>Padrão 3</b>	0,50	100	1,900	0,50
<b>Padrão 4</b>	0,75	150	1,850	0,50
<b>Padrão 5</b>	1,0	200	1,800	0,50
<b>Padrão 6</b>	1,5	300	1,700	0,50
<b>Padrão 7</b>	2,0	400	1,600	0,50
<b>Padrão 8</b>	3,0	600	1,400	0,50

Os padrões foram feitos em triplicata e após adicionar solução de cloreto férrico/TCA/HCl, as amostras foram lidas no espectrômetro a 500 nm. Os resultados foram plotados resultando a curva apresentada na Figura 8.

**Figura 8.** Curva padrão do  $\beta$ -hidroxamato aspártico versus a absorbância a 500nm.

### 3.7.1.6. Procedimento de quantificação de L-ASNase pelo método de AHA

Os ensaios foram realizados em tubo cônico de 5 mL e em triplicata. Cada ensaio foi composto por 200  $\mu\text{L}$  de L-asparagina 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , 200  $\mu\text{L}$  de hidroxilamina, 1,5 mL de tampão tris-HCl 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L}$  de amostra. O branco da amostra foi composto por 1,9 mL de tampão tris-HCl 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{L}$  de amostra. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Decorrido os 30 minutos, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  da solução  $\text{FeCl}_3/\text{TCA}/\text{HCl}$ . As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos e 4°C e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm.

### 3.7.1.7. Cálculo da atividade da enzima L-ASNase em $\text{U g}_{\text{cell}}^{-1}$ pelo método AHA.

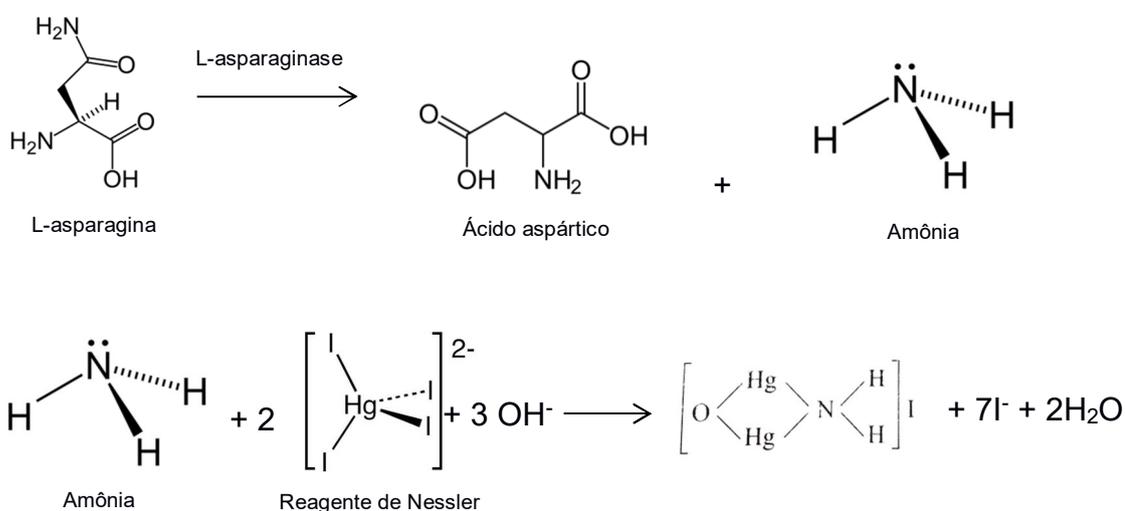
Para a quantificação da atividade de L-ASNase, a biomassa foi suspensa em solução NaCl 0,85% para uma concentração final de 0,05 g  $\text{mL}^{-1}$  (célula úmida) e o volume adicionado da suspensão ao ensaio foi de 100  $\mu\text{L}$ . A Equação 2 demonstra o cálculo da atividade da enzima L-ASNase.

**Equação 2.** Cálculo da atividade da enzima L-ASNase em  $\text{U g}_{\text{cell}}^{-1}$  pelo método AHA.

$$\frac{U}{g} \text{ de ASNase} = \left[ \frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{peso da amostra})(\text{tempo da reação})} \right]$$

### 3.7.2. Método de Nessler

O método de Nessler foi executado em duas etapas, como demonstrado na Figura 9, a primeira com a presença do substrato asparagina e da L-ASNase, em condições favoráveis para reação enzimática. A segunda etapa com os produtos da primeira etapa e na presença do reagente de Nessler. O reagente de Nessler é uma solução alcalina de tetraiodomercurato(II) de potássio que complexou com a amônia livre produzida na primeira etapa do ensaio, formando uma coloração amarelo-acastanhado que foi lida no espectrofotômetro a 436 nm (74).



**Figura 9.** Reações do ensaio do método Nessler. O ensaio do método de Nessler é dividido em duas etapas, na primeira etapa ocorre a hidrólise catalisada pela enzima L-ASNase do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia e na segunda etapa, onde o reagente colorimétrico Nessler interage com a amônia proveniente da primeira etapa do ensaio.

As soluções utilizadas no ensaio estão listadas a baixo:

#### 3.7.2.1. Tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>

O Tris foi pesado 6,057 g e solubilizado em 1 L de água destilada, o pH foi ajustado para 8,6 com HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. O tampão foi armazenado em geladeira até o uso.

#### 3.7.2.2. Solução de asparagina 189 mmol L<sup>-1</sup>

A asparagina foi pesada 0,249 g e solubilizado em 9 mL de água ultra pura, com o auxílio de um balão volumétrico o volume foi completo para 10 mL. A asparagina era preparada momentos antes do início do ensaio.

#### 3.7.2.3. Solução de TCA 1,5 mmol L<sup>-1</sup>

O TCA foi pesado 12,255 g e solubilizado em 50 mL de água destilada. O TCA foi armazenado em geladeira até o uso.

### 3.7.2.4. Reagente de Nessler

O reagente de Nessler é uma solução de tetraiodomercurato(II) de potássio que foi adquirido pronto para o uso da marca Merck®.

### 3.7.2.5. Construção da curva padrão de sulfato de amônio

A solução mãe de sulfato de amônio em uma concentração de 6 mmol L<sup>-1</sup> que equivale a 12 mmol L<sup>-1</sup> de amônia livre foi preparada. Para isso foram pesados 79,28 mg e solubilizado em 100 mL de água ultra pura.

A primeira etapa do ensaio foi feito em tubos e foi preparado como descrito na Tabela 14:

**Tabela 14-** Primeira etapa da curva padrão do método de Nessler

Solução padrão	Moles $\mu\text{mol}$	Solução 12 mmol L <sup>-1</sup> de amônio ( $\mu\text{L}$ )	Água ultra pura (mL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mmol L <sup>-1</sup> ) (mL)
<b>Branco</b>	0,0	0,0	1,100	1,00
<b>Padrão 1</b>	0,11	100	1,000	1,00
<b>Padrão 2</b>	0,16	150	0,950	1,00
<b>Padrão 3</b>	0,27	250	0,850	1,00
<b>Padrão 4</b>	0,55	500	0,600	1,00
<b>Padrão 5</b>	1,1	1000	0,100	1,00

Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionada 0,1 mL a solução de parada TCA 1,5 mol L<sup>-1</sup>.

Os tubos foram centrifugados 10000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante utilizado para segunda etapa.

Em novos tubos de ensaio foram adicionados as soluções como descrito na Tabela 15:

**Tabela 15-** Segunda etapa da curva padrão do método de Nessler

Solução padrão	Moles $\mu\text{mol}$	Volume do sobrenadante da 1° etapa ( $\mu\text{L}$ )	Água ultra pura (mL)	Reagente de Nessler (mL)
<b>Branco</b>	0,0	200	4,3	0,5
<b>Padrão 1</b>	0,11	200	4,3	0,5
<b>Padrão 2</b>	0,16	200	4,3	0,5
<b>Padrão 3</b>	0,27	200	4,3	0,5
<b>Padrão 4</b>	0,55	200	4,3	0,5
<b>Padrão 5</b>	1,1	200	4,3	0,5

Após agitação por inversão, a coloração formada foi lida depois de 1 minuto em espectrofotometro a 436 nm.

### 3.7.2.6. Procedimento de quantificação de L-ASNase pelo método de Nessler

A primeira etapa do ensaio foi realizado em tubos cônicos de 5 mL. Em cada tubo foi preparado como descrito na Tabela 16:

**Tabela 16-** Primeira etapa do ensaio do método de Nessler

Solução padrão	Volume da amostra ( $\mu\text{L}$ )	Água ultra pura (mL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mmol L <sup>-1</sup> ) (mL)	Asparagina (mL)
<b>Branco da amostra</b>	100	0,900	1,00	0,1
<b>Amostra</b>	100	0,900	1,00	0,1

Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionada 0,1 mL da solução de parada TCA 1,5 mol L<sup>-1</sup>.

Os tubos foram centrifugados 10000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante utilizado para segunda etapa. Em novos tubos de ensaio foram adicionados as soluções como descrito na Tabela 17:

**Tabela 17-** Segunda etapa do ensaio do método de Nessler

Solução padrão	Volume do sobrenadante da 1° etapa ( $\mu\text{L}$ )	Água ultra pura (mL)	Reagente de Nessler (mL)
<b>Branco da amostra</b>	200	4,3	0,5
<b>Amostra</b>	200	4,3	0,5

Após agitação por inversão, a reação foi lida depois de 1 minuto em espectrofotometro a 436 nm.

### 3.7.2.7. Cálculo da atividade da enzima L-ASNase em U mL<sup>-1</sup> pelo método de Nessler

A atividade da enzima L-ASNase foi mesurada em suspensão celular ou após o processo de extração da enzima com o sonicador. A concentração da suspensão celular foi de 0,05 g mL<sup>-1</sup>. A descrição do cálculo da atividade da enzima L-ASNase pelo método de Nessler está descrito na Equação 3.

**Equação 3.** Cálculo da atividade da enzima L-ASNase em U mL<sup>-1</sup> pelo método de Nessler

$$\frac{U}{mL} = \frac{(\mu\text{mol de amônio da amostra}) \times (\text{volume da etapa 1})}{(\text{volume da etapa 1 para etapa 2}) \times (\text{tempo de reação etapa 1}) \times (\text{volume da amostra})}$$

### 3.8. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Para quantificação de proteína foi utilizado o Kit de Ensaio de Proteína BCA da Thermo Scientific Pierce que se baseia-se na reação de Biureto que é a redução de Cu<sup>2+</sup> para Cu<sup>1+</sup> em condições básicas.

O reagente colorimétrico é o ácido bicinconínico que é específico para Cu<sup>1+</sup>. Duas moléculas de ácido bicinconínico reagem com um íon de cobre Cu<sup>1+</sup>, assim sendo proporcionalmente a coloração produzida pelo reagente e a concentração das proteínas. A coloração produzida é a purpura que foi lida no espectrofotômetro a 562 nm (75).

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, onde 25 µL da amostra ou do padrão foram pipetados em triplicata e 200 µL do reagente foram adicionados. A placa foi inserida no leitor de microplaca onde ocorreram 30 segundos de shaker, 30 minutos de incubação a 37°C e leitura a 562 nm. A quantidade de proteína foi estimada através de uma curva padrão feita com padrão de albumina composta por nove pontos (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL). Resultando na curva demonstrada na Figura 10.

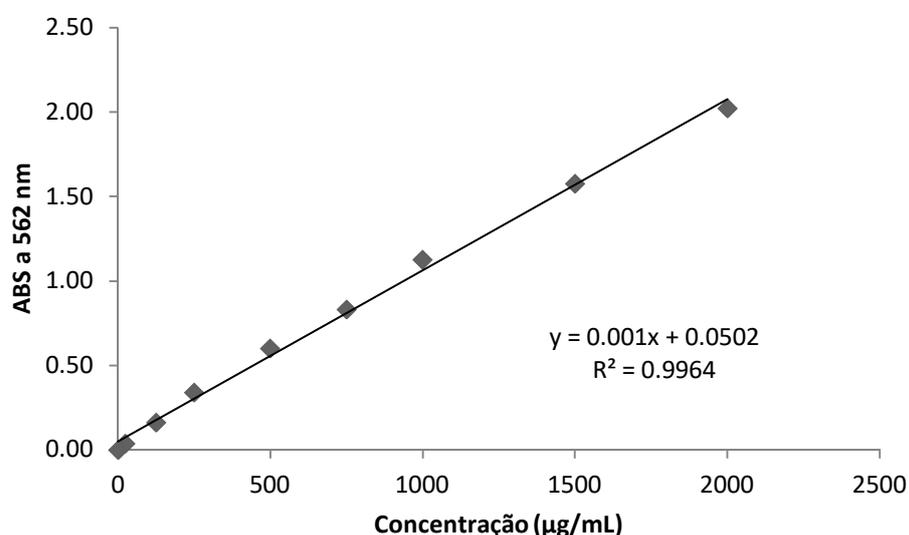


Figura 10. Curva padrão do ensaio de proteína pelo Kit de Ensaio de Proteína BCA.

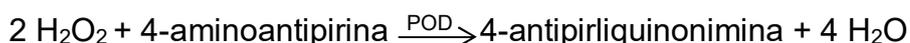
Nos casos que a absorbância foi maior do que a plotada na curva foi realizada a diluição da amostra e nova leitura.

### 3.9. QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE

#### 3.9.1. Sistema enzimático de glicose enzimática líquida

A quantificação de glicose para os experimentos em Erlenmeyer foram realizadas pelo sistema enzimático de glicose enzimática líquida (Doles), onde o princípio é composto de duas reações utilizando as enzimas Glucose oxidase (GOD) e o peroxidase (POD), como descrito na Equação 4:

**Equação 4.** Sistema enzimático de glicose enzimática líquida.



O produto formado, 4-antipirliquinonimina, que tem uma coloração avermelhada, onde a sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose da amostra (76).

O kit é composto pela solução padrão de glicose e o reagente colorimétrico. Em tubo cônico de 2 mL foram preparados os ensaios com os seguintes componentes descritos na Tabela 18:

**Tabela 18-** Ensaio de glicose enzimática líquida

Componentes	Branco	Teste	Padrão
<b>Reagente colorimétrico</b>	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Padrão</b>	-	-	10 µL
<b>Amostras</b>	-	µL	-

Os tubos foram agitados e incubados por 5 minutos a 37°C. E a leitura foi realizada em espectrofotômetro em 510nm. A cor final é estável por 20 minutos. O branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro e a concentração da glicose foi calculada como está descrito na Equação 5:

**Equação 5.** Quantificação da glicose pelo sistema enzimático de glicose enzimática líquida:

$$Glicose \left( \frac{mg}{dL} \right) = \frac{Absorbância \ teste}{absorbância \ padrão} \times 100$$

### 3.9.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação da glicose, acetato e lactose para os experimentos em biorreator foram realizadas utilizando o cromatógrafo Prominence UFLC (Shimadzu®) equipado com bomba de alta precisão, auto-injetor ultra-rápido e dois detectores SPD-20A (Shimadzu®) e RI(Shimadzu®). O SPD-21A é um detector ultravioleta que detecta na faixa de absorvância 190 a 700 nm foi utilizado para a detecção do acetato. O RID-10A é um detector de índice de refração que foi utilizado para detectar a glicose e a lactose. A coluna de exclusão iônica utilizada foi a Shim-Pack SCR-101H (7,9 mm x 30 cm, Shimadzu). A análise ocorreu durante 30 minutos a 60°C e a vazão da fase móvel igual a 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A fase móvel constituiu em uma solução de ácido sulfúrico a 5 mmol L<sup>-1</sup> em modo isocrático e volume de injeção de 20 uL. As amostras retiradas do biorreator foram diluídas (1:4) e filtradas em filtro de PVDF de 0,22 µm e 13 mm de diâmetro.

Para a quantificação dos substratos (glicose e lactose) e do produto (acetato), foi feito curva padrão com 6 pontos, a cada corrida foi feita uma nova curva padrão, como descrito na Tabela 19:

**Tabela 19-** Pontos da curva padrão da glicose, lactose e acetato (g L<sup>-1</sup>)

Níveis	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Lactose (g L <sup>-1</sup> )	Acetato(g L <sup>-1</sup> )
<b>P1</b>	1,562	0,312	0,092
<b>P2</b>	3,125	0,625	0,187
<b>P3</b>	6,25	1,25	0,375
<b>P4</b>	12,5	2,5	0,75
<b>P5</b>	25	5	1,5
<b>P6</b>	50	10	3

### 3.10. MEDIDAS DE CRESCIMENTO

#### 3.10.1. Determinação do peso seco

A medida do peso seco constitui o processo básico de medida de massa microbiana presente na amostra, podendo ser utilizado para padronização de outros métodos (77). Para determinação de peso seco foram utilizados tubos cônicos de 50 mL que foram lavados com água destilada e secos na estufa a 70 °C por 24 horas. Após resfriados a temperatura ambiente, pesados em balança analítica e anotados o peso dos tubos, que foi denominado como a “massa A”. Uma alíquota de 50 mL do cultivo foi transferida para o tubo previamente pesado, e centrifugado por 10 minutos a 1000 g, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi lavado com 5 mL de água destilado e novamente centrifugado e desprezado o sobrenadante. Os tubos foram colocados para secar em estufa a 70°C até peso constate, que foi denominado como a “massa B”. Para determinar a massa celular, calculou-se a diferença entre a massa “A” e “B”, como demonstrado na Equação 6.

**Equação 6.** Determinação do peso seco:

$$X (g L^{-1}) = \frac{(m_b - m_a)}{AI} \cdot 1000$$

Onde,  $m_a$  é Peso inicial do tubo cônico vazio (g),  $m_b$  é Peso final do tubo cônico + biomassa seca (g) e  $AI$  é volume da alíquota inicial (mL).

#### 3.10.2. Densidade óptica 600 nm

A densidade óptica 600nm ( $DO_{600nm}$ ) é a medida da turvação de uma suspensão microbiana. Essa turbidez está relacionada à massa de microrganismo presente na amostra e sua medida a absorvância foi medida no espectrofotômetro a 600 nm (78). Soluções com absorvâncias acima de 0,4 foram diluídas com água destilada.

#### 3.10.3. Curva de crescimento

A curva de crescimento dos microrganismos utilizando os três meios citados no item 3.3 foram construídas. No início do cultivo foi inoculado uma  $DO_{600nm}$  de 0,1

em cada Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio em agitador orbital a 37°C e 250 rpm, a cada duas horas foi retirado assepticamente uma alíquota de 0,5 mL e medido a  $DO_{600nm}$  afim de acompanhar o crescimento. O volume total retirado do cultivo foi menor que 10% do volume inicial.

#### 3.10.4. Curva peso seco x $DO_{600nm}$

Com o cultivo de meio definido, após 24 horas a 37°C e 200 rpm as células foram recolhidas por centrifugação a 4000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas com 10 mL de solução de NaCl 0,85%. Essa suspensão foi utilizada para fazer diluições na faixa de 0,1 até 1,6, em triplicada, em balões volumétricos de 50 mL. A  $DO_{600nm}$  foi verificada de acordo com o item 3.10.2. O peso seco foi realizado de acordo com a determinação de massa seca descrito no item 3.10.1. Os resultados foram correlacionados e obteve-se a equação da reta  $y = 1,7242x + 0,0745$  com o  $R^2 = 0,9902$  em agitador orbital. Uma nova equação da reta foi feita para os experimentos em biorreator, com 32 pontos que variam a  $DO_{600nm}$  entre 28 e 158, resultando na equação  $y = 2,2081x + 7,7349$  com o  $R^2 = 0,9806$  correlacionando a densidade óptica a 600 nm e o peso seco ( $g L^{-1}$ ).

#### 3.11. MÉTODO DE ROMPIMENTO CELULAR

As células microbianas em suspensão ( $0,05 g mL^{-1}$  de NaCl 0,85%) foram submetidas a ruptura por ultrassom (Vibra-Cell®). A suspensão foi colocada em tubos cônicos de 50 mL e em banho de gelo para evitar a desnaturação de proteínas. As células foram sonicadas por 7 minutos, sendo 30 segundos de pulso e 45 segundos de sem pulso e amplitude de 30%. Após a sonicação, a suspensão foi centrifugada a 4000 g por 15 minutos (79). O sobrenadante foi analisado quanto a atividade da enzima L-ASNase.

#### 3.12. INDUTORES

Foram utilizados dois indutores neste trabalho, a lactose e o análogo isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A solução estoque de lactose foi preparada na concentração de  $200 g L^{-1}$  em água destilada e esterilizada por calor úmido. A solução estoque de IPTG foi preparada na concentração de  $1,0 mol L^{-1}$  em água destilada e esterilizada por filtração em membrana de  $0,22 \mu m$ .

### 3.13. VELOCIDADE DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA ( $\mu_x$ )

A  $\mu_x$  foi calculada na fase exponencial de crescimento, em que a velocidade específica de crescimento é constante e máxima ( $\mu_x = \mu_m$ )(54). A equação utilizada para calcular o  $\mu_x$  está descrita na **Equação 7**

**Equação 7.** Cálculo do  $\mu_x$ :

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x \cdot (t - t_0)$$

Onde X é concentração celular final no meio ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $X_0$  é concentração celular inicial no meio ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $(t-t_0)$  é o intervalo de tempo (h).

### 3.14. FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULA ( $Y_{x/s}$ )

Para o cálculo do fator de conversão de biomassa em produto foi considerado o crescimento celular (X) e o consumo do substrato (S), que foram relacionados pela **Equação 8**(54)

**Equação 8.** Cálculo do  $Y_{x/s}$ :

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Onde X é concentração celular final no meio ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $X_0$  é concentração celular inicial no meio ( $\text{g L}^{-1}$ ), S é Concentração do substrato final do meio ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $S_0$  é Concentração do substrato inicial do meio ( $\text{g L}^{-1}$ ).

### 3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism® Version 6.01. A distribuição de dados foi avaliada quanto a normalidade da distribuição. Para os dados que apresentaram distribuição normal foi aplicado teste paramétrico de análise de variância (ANOVA)-Dunnet, e os dados foram representados por média e desvio padrão. Os dados que apresentaram distribuição não normal foram aplicados teste não paramétrico Kruskal-Wallis, e os dados representados por mediana e intervalos interquartis. A diferença significativa foi considerada para os valores de  $p \leq 0,05$ .

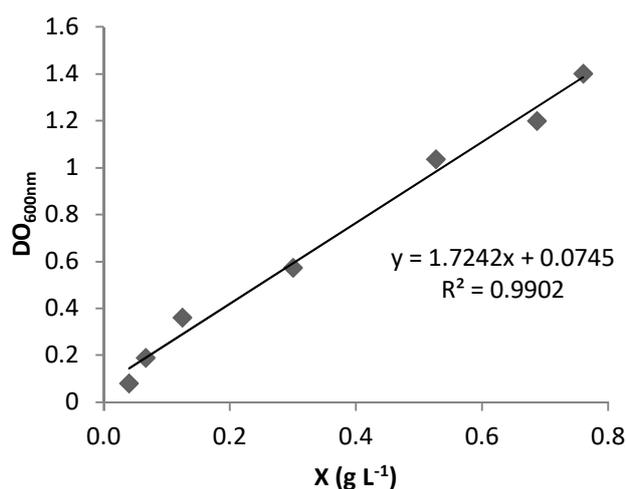
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver processos para produção em escala de até 3L da enzima L-ASNase por *E. coli* AspB, com a finalidade de contribuir para uma possível produção nacional desta enzima. Para isso, busca-se definir o meio de cultivo, indutor e parâmetros para a produção da enzima L-ASNase em agitador orbital e em biorreator.

##### 4.1. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DE *E. coli* AspB E A CORRELAÇÃO COM A DENSIDADE ÓPTICA A 600 nm.

Com os dados obtidos através da avaliação do peso seco da *E. coli* AspB, foi possível correlacionar peso seco com a  $DO_{600nm}$ .

Como pode ser observado na Figura 11, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,9902 demonstrando que a equação explica a correlação da densidade óptica e do peso seco. Sendo a correlação  $DO_{600nm}$  x peso seco de 0,54, esse valor significa que no momento em que a  $DO_{600nm}$  igual a 1 equivale a 0,54 g L<sup>-1</sup>. Esse resultado corrobora com o encontrado por Baig e colaboradores (2008), que encontrou a correlação de 0,50 para *E. coli* MG1655 (80).



**Figura 11.** Correlação do peso seco (X) da biomassa celular e a densidade óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ), lida em equipamento Biomate 3S Thermo Scientific.

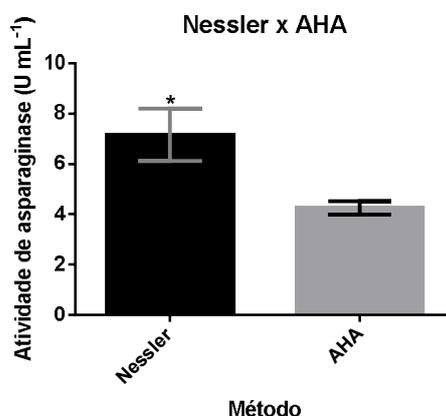
## 4.2. ATIVIDADE DE L-ASNase

### 4.2.1. Método para quantificação da atividade da enzima L-ASNase.

Existem diversos métodos para a quantificação da atividade da L-ASNase, incluindo cromatografia líquida de alta performance (CLAE), ensaios de eletroforese, e determinação por ensaios colorimétricos como o reagente de Nessler e método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato e o indofenol (81).

Foram testados dois métodos colorimétricos, o método de Nessler e o método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato (AHA). Ambos os métodos são métodos indiretos, pois não quantificam a enzima L-ASNase, mas os produtos da reação enzimática.

Na Figura 12, pode ser visto que o método de Nessler quantificou atividade de L-ASNase com média de  $7,15 \pm 1,5 \text{ U mL}^{-1}$  e o método AHA apresentou uma atividade de L-ASNase média de  $4,26 \pm 0,4 \text{ U mL}^{-1}$ . Esses valores corroboram com o encontrado por Magri e colaboradores (2018), onde ao comparar os resultados encontrados pelo método de Nessler e AHA, foi possível concluir que o método de Nessler superestima em 17% a atividade de L-ASNase e enquanto o método AHA subestima em 67% a atividade de L-ASNase, quando comparado a quantificação da enzima realizada em CLAE (81).



**Figura 12.** Comparação da quantificação da atividade da enzima L-ASNase pelo método de Nessler e pelo método do ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxamato (AHA). Os resultados das atividades de L-ASNase (U mL<sup>-1</sup>) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (\*,  $p \leq 0,05$ ).

Em uma revisão publicada por Freitas e colaboradores (2019), discutiu-se como a amônia proveniente do meio de cultura ou do processo fermentativo interferia na quantificação da atividade de L-ASNase pelo método de Nessler, pois algumas publicações utilizavam o extrato bruto para as quantificações da atividade enzimática, quantificando não somente a amônia proveniente da reação da L-ASNase, mas a amônia livre total presente no meio de cultivo após o processo de fermentação. A utilização do método de Nessler é indicada para enzimas purificadas, onde não estariam presentes interferentes. Para quantificação em extrato bruto seria recomendável utilizar outro método de quantificação da atividade enzimática de L-ASNase que apresentasse menos interferentes (82). O método AHA apresenta uma baixa interferência com amônia (81,82). Sabendo que a enzima produzida neste trabalho não foi purificada foi utilizado o método de AHA na continuidade deste trabalho, reduzindo assim o viés da interferência da amônia na metodologia.

Na Tabela 20 estão os trabalhos publicados sobre a produção da enzima L-ASNase de forma recombinante e com o sistema de expressão *E. coli*. Dentre as informações apresentadas na tabela estão a origem do gene da enzima L-ASNase,

o método de quantificação da enzima, o valor da atividade encontrada e qual o indutor utilizado no cultivo.

**Tabela 20-** Trabalhos publicados com sistema de expressão *Escherichia coli* para a produção da enzima L-ASNase (\*= Atividade específica; Δ= Extrato bruto; O= Enzima purificada; ITC= Calorimetria de titulação isotérmica; AHA= Ácido L-aspirtil-β-hidroxiâmato)

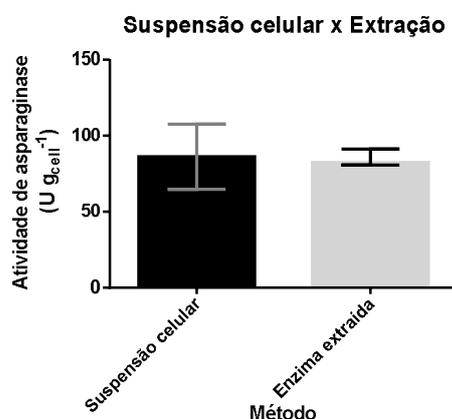
Origem do gene	Método de quantificação	Atividade da L-ASNase	Indutor	Referência
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Nessler	38,88 UI mL <sup>-1</sup> Δ	IPTG	(83)
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Nessler	165 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(84)
<i>Acinetobacter soli</i>	Nessler	400 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(85)
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	Nessler	767 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(86)
<i>Cobetia amphilecti</i>	Nessler	778 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(87)
<i>Lactobacillus casei</i>	Nessler	0,419 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(88)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nessler	225,6 UI g <sub>cells</sub> <sup>-1</sup> Δ	IPTG	(89)
<i>Bacillus sp</i>	Nessler	-	IPTG	(90)
<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	Nessler	20,13 U L <sup>-1</sup> Δ	IPTG	(91)
<i>Vibrio cholerae</i>	nessler	2120 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(92)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nessler	26 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(93)
<i>Aspergillus terreus</i>	Nessler	42,46 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(94)
<i>Halomonas elongata</i>	Nessler	1510 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(95)
<i>Escherichia coli</i>	Nessler	-	IPTG	(49)
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Nessler	35,2 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(96)
<i>Synechococcus elongatus</i>	Nessler	45 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(97)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nessler	110,1 UI mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(98)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nessler	196,2 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(99)
<i>Erwinia carotovora</i>	Nessler	12,5 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(100)
<i>Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens</i>	Nessler	687,1 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(101)
<i>Escherichia coli</i>	Nessler	40,8 U mL <sup>-1</sup> * Δ	IPTG	(50)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AHA	0,95 UI mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(102)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Nessler	210 U mg <sup>-1</sup> * O	Lactose	(103)
<i>Escherichia coli</i>	Nessler	190 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(104)
<i>Staphylococcus sp</i>	Nessler	113,06 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(105)
<i>Erwinia carotovora</i>	Nessler	0,72 UI mg <sup>-1</sup> * Δ	IPTG	(106)
<i>Erwinia carotovora</i>	ITC	9,6 kcal mol <sup>-1</sup> O	IPTG	(107)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Nessler	-	Arabinose	(108)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Nessler	62,7 U mg <sup>-1</sup> * O	Arabinose	(109)
<i>Withania somnifera L.</i>	Nessler	55 UI mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(110)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Nessler	62,7 UI mg <sup>-1</sup> * O	Arabinose	(111)
<i>Flammulina velutipes</i>	HPLC	16 U mL <sup>-1</sup> Δ	IPTG	(112)
<i>Glycine max</i>	Nessler	-	IPTG	(113)
<i>Escherichia coli</i>	Nessler	130 U mL <sup>-1</sup> Δ	-	(51)
<i>Erwinia carotovora</i>	Nessler	0,72 U mg <sup>-1</sup> * Δ	IPTG	(114)
<i>Erwinia carotovora</i>	Nessler	630 UI mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(115)
<i>E. coli AS1.357</i>	SDS	228 U mL <sup>-1</sup> Δ	Temperatura	(52)

Continua

Origem do gene	Método de quantificação	Atividade da L-ASNase	Indutor	Referência
<i>Escherichia coli</i>	AHA	91 U mg <sup>-1</sup> * O	IPTG	(53)
<i>Escherichia coli</i>	AHA	1,08 U mg <sup>-1</sup> * Δ	Lactose	Este trabalho

#### 4.2.2. Quantificação da atividade de atividade da L-ASNase em suspensão celular x enzima extraída.

Como demonstrado na Figura 13, a quantificação em suspensão celular resultou uma atividade mediana de 86,32 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup> e na enzima extraída atividade mediana de 82,74 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>. A amplitude dos resultados foi maior na suspensão, sendo justificado pela maior dificuldade de manter a homogeneidade da suspensão em comparação a enzima extraída. Os resultados foram semelhantes ao encontrado por Barati e colaboradores (2016), que concluíram que a suspensão celular é um método alternativo ao sonificador por apresentarem resultados semelhantes (116).



**Figura 13.** Comparação entre a quantificação da atividade da enzima L-ASNase em suspensão celular e da enzima extraída. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

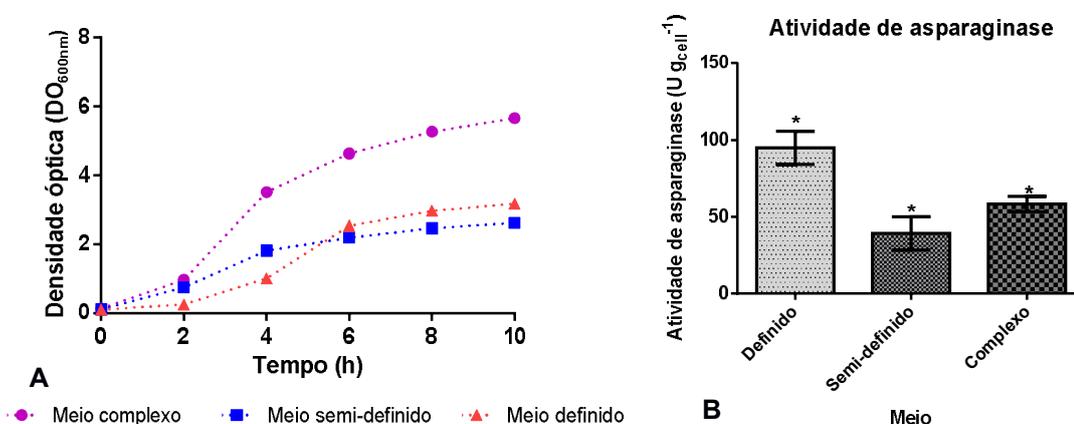
A hipótese é que o substrato consiga penetrar no interior das células bacterianas e a L-ASNase hidrolise o substrato. Os produtos da reação, ácido aspártico e amônia, retornem para o meio da reação onde são quantificados (116). A utilização da suspensão celular pode ser útil no momento de triagem, com o intuito de reduzir o tempo e o custo necessário para análise dos resultados.

### 4.3. DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA CULTIVO DA *E. coli* AspB

Foram testados três meios de cultivo o definido, semi-definido e um meio complexo. Para cada um deles foram calculadas as seguintes variáveis características dos processos fermentativos: conversão de substrato em células, peso seco final e a velocidade específica dos processos.

#### 4.3.1. Curva de crescimento

Foram construídas curvas de crescimento da *E. coli* AspB com os diferentes meios avaliados como demonstrado Figura 14 “A”. Os resultados foram expressos por média e desvio padrão, sendo o desvio padrão muito pequeno, não sendo possível observar a barra do desvio padrão no gráfico. Para essas curvas a fonte de carbono em comum, a glicose, foi fixada em 5 g L<sup>-1</sup>. Na Figura 14 “B” está representada a atividade da L-ASNase nos meios de cultivo avaliados. O meio definido apresentou atividade de 94,77 ± 10 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>, seguido pelo meio complexo com atividade 58,18 ± 5 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>, o meio semi-definido 39,27 ± 10 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>.

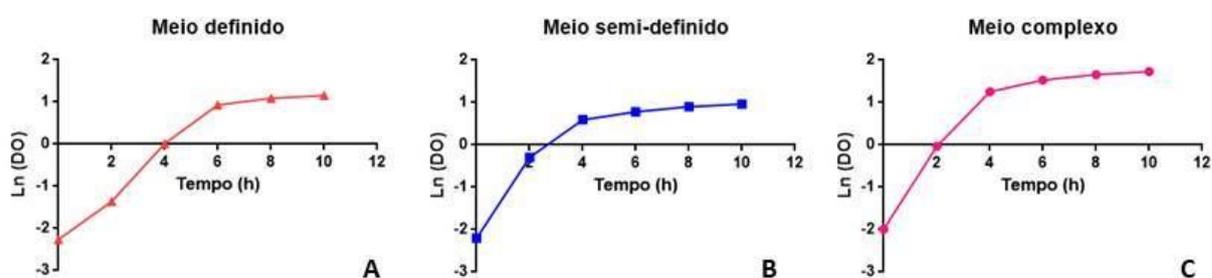


**Figura 14.** “A” Curva de crescimento da *E. coli* AspB em meio definido, semi-definido e complexo representado por média e desvio padrão. A linha roxa representa o meio complexo, a linha azul representa o meio semi-definido e a linha vermelha representa o meio definido. “B” Comparação da atividade de L-ASNase em *E. coli* AspB cultivadas nos meios definido, semi-definido e complexo. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (\*, p ≤ 0,05).

O meio complexo foi o que apresentou a maior quantidade de biomassa final com  $3,24 \text{ g L}^{-1}$ , seguido pelo meio definido com  $1,80 \text{ g L}^{-1}$  e o meio semi-definido com  $1,48 \text{ g L}^{-1}$ , como já citado na Figura 14. O  $\mu_x$  variou de  $0,547$  a  $0,812 \text{ h}^{-1}$ , sendo o que apresentou o menor  $\mu_x$  o meio definido, seguido pelo meio semi-definido e complexo. Na Tabela 21 apresenta-se os dados calculados a partir da curva de crescimento.

A fase log ou exponencial dos três meios teve a duração de quatro horas, seguida da fase estacionária que foi alcançada mais tardiamente pelo meio definido, como demonstrado na Figura 15.

A elevada concentração celular do meio complexo pode ser explicada devido ao fato que além da glicose, o meio complexo apresenta mais duas fontes de carbono, o extrato de levedura e a triptona ocasionando assim o maior crescimento celular.



**Figura 15.** Curva logarítmica de crescimento da *E. coli* AspB nos meios definido, semi-definido e complexo.

O maior valor de  $Y_{x/s}$  foi obtido com o cultivo em meio complexo, seguido do meio semi-definido e do meio definido. Para o cálculo do  $Y_{x/s}$  foi considerado apenas a glicose como substrato, o meio complexo apresenta mais duas fontes de carbono, o extrato de levedura e a triptona e o meio semi-definido apresenta o extrato de levedura sendo explicado o maior valor de  $Y_{x/s}$  do meio complexo.

**Tabela 21-** Peso seco final (X), velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e fator de conversão do substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ) dos meios definido, semi-definido e complexo

Meio	X (g L <sup>-1</sup> )	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g g <sup>-1</sup> )
Definido	1,80	0,547	0,306
Semi-definido	1,48	0,699	0,397
Complexo	3,24	0,812	0,628

Em trabalho publicado por Ponce (1999), foi demonstrado a relação linear entre a produção de acetato e a  $\mu_x$ , nos permitindo inferir que o meio complexo é o maior produtor de acetato (117). O acetato é um dos produtos do metabolismo da fermentação da *E. coli*, sendo ele produzido pela oxidação do piruvato via acetil-CoA. O acetato que tem sua produção durante a fase exponencial, onde a glicose não é limitante será consumido após a exaustão da glicose (118). Em altas concentrações de glicose, os níveis intracelulares de cAMP são baixos e não a expressão do acetil-CoA sintetase. Sem a expressão do acetil-CoA sintetase não ocorre o consumo do acetato para a produção de acetil-CoA (119). O excesso de acetato inibe o crescimento celular e a produção de proteínas, não sendo desejável em cultivos em que se pretende o alcance de altas densidade celulares (120).

#### 4.3.2. Análise de custo dos meios

Foi realizada uma análise de custo de cada meio, o intuito era saber qual seria o custo para se produzir um litro de cada meio. Os preços médios obtidos estão listados na Tabela 22.

**Tabela 22-** Custo por grama de cada componente presente nos meios definido, semi-definido e complexo (\*sigma; \*\*dinâmica)

Componente	Preço (R\$)	Preço por grama (R\$)
Acetato de zinco ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ )**	30,00	0,06
Ácido bórico ( $H_3BO_3$ )*	153,00	0,31
Ácido cítrico*	157,00	1,57
Ampicilina*	261,00	52,20
Citrato de ferro III ( $C_6H_5FeO_7$ )**	653,00	1,31
Cloreto de cálcio ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )*	301,00	0,60

Continua

Componente	Preço (R\$)	Preço por grama (R\$)
<b>Cloreto de cobalto II (CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)**</b>	45,00	0,45
<b>Cloreto de cobre II (CuCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O)*</b>	149,00	0,46
<b>Cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O)*</b>	199,00	1,99
<b>Cloreto de sódio (NaCl)*</b>	223,00	0,89
<b>Cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>)**</b>	15,00	0,03
<b>Cloridrato de tiamina*</b>	228,00	22,80
<b>EDTA*</b>	194,00	1,94
<b>Extrato de levedura*</b>	638,00	1,28
<b>Fosfato de amônio dibásico (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>*</b>	206,00	2,06
<b>Fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)*</b>	224,00	2,24
<b>Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)*</b>	153,00	1,53
<b>Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)*</b>	213,00	2,13
<b>Glicose**</b>	17,00	0,03
<b>Molibdato de sódio (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O)*</b>	288,00	2,88
<b>Sulfato de alumínio (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.16H<sub>2</sub>O)*</b>	218,00	2,18
<b>Sulfato de cobre II (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O)*</b>	171,00	1,71
<b>Sulfato de ferro II (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)*</b>	231,00	0,92
<b>Sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)*</b>	598,00	5,98
<b>Sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O)**</b>	22,00	0,02
<b>Sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>).6H<sub>2</sub>O*</b>	70,00	0,70
<b>Sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O)*</b>	170,00	1,70
<b>Triptona*</b>	329,00	1,32

Após calcular o valor por grama de cada componente foi estimado quanto custaria para preparo de 1 litro de cada meio de acordo com a composição descrita no item 3.3. O custo foi obtido em Reais (R\$). O meio que seria mais oneroso é o meio semi-definido (R\$ 77,08), seguido do meio complexo (R\$ 64,80), sendo que o menos oneroso o meio definido (R\$ 44,06). O custo do meio de cultivo deve ser levado em consideração no momento da escolha do meio de cultura, pois o intuito do trabalho seria o aumento de escala, em um biorreator com 1 L de meio a diferença do custo entre o meio definido e o meio complexo é de R\$20,74.

Para ser viável um processo fermentativo, o meio de cultivo tem que ser o mais barato possível, sem menosprezar fatores como a produtividade e o rendimento (77). A escolha feita em cada etapa do processo fermentativo vai impactar em toda cadeia de produção, por exemplo se aumentássemos a escala das fermentações para a escala piloto onde seria necessário 125 L de meio de cultivo, a diferença de custo entre o meio definido e o meio complexo que é de R\$20,74 por

litro de meio de cultivo iria para R\$2.592,50 encarecendo todo o processo de produção e assim o produto final.

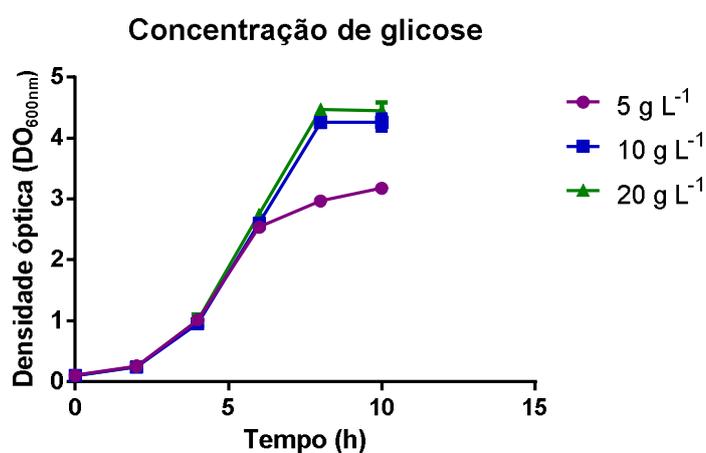
Ao final da análise dos meios de cultura foi possível concluir que apesar do meio definido não ser o que mais induziu o crescimento celular, foi o meio que induziu a maior atividade de L-ASNase em contra partida ao menor custo de produção. Como o objetivo deste trabalho é o aumento da escala para biorreatores, outro importante fator que influenciou na escolha do meio para darmos continuidade ao trabalho, foi a própria composição dos meios testados. No meio complexo estão presentes o extrato de levedura e a triptona e no meio semi-definido está presente o extrato de levedura, esses componentes não tem uma fórmula fixa, variando entre os lotes do produto a concentração de um ou outro componente o que pode ocasionar alterações na produção da enzima de interesse (121). Outro fator relevante, é que a triptona e o extrato de levedura quando presentes em biorreatores ocasionam um maior volume de espuma no meio, sendo necessária a adição mais frequente de antiespumante durante o cultivo e é sabido que o antiespumante em grande quantidade é tóxico para algumas células (122). Neste contexto o meio escolhido para prosseguir o trabalho foi o meio definido.

#### 4.4. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

Para a comparação dos meios a glicose foi fixada em  $5 \text{ g L}^{-1}$ , após a decisão de prosseguir com o meio definido foi otimizado a concentração de glicose para que fosse alcançada a maior biomassa em agitador orbital com o meio definido. Foram avaliadas 3 concentrações de glicose, adicionadas ao meio definido,  $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $10 \text{ g L}^{-1}$  e  $20 \text{ g L}^{-1}$

Na Figura 16 estão presentes três curvas de crescimento com concentrações diferentes de glicose, sendo as concentrações  $5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $10 \text{ g L}^{-1}$  e  $20 \text{ g L}^{-1}$ . O cultivo de  $5 \text{ g L}^{-1}$  foi o que apresentou menor  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  igual a 3,16. Os cultivos com as duas maiores concentrações de glicose não tiveram diferença entre as suas curvas de crescimento, chegando a mesma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  final igual a 4,20, que equivale a biomassa de  $2,50 \text{ g L}^{-1}$ . No cultivo com  $20 \text{ g L}^{-1}$ , o esperado era que resultasse em uma maior biomassa final, mas este não foi o resultado alcançado. Alguns fatores podem ter influenciado neste resultado, como a limitação de oxigênio, pois em cultivo em

agitador orbital não há o acréscimo de oxigênio. Outro fator relevante é a produção de produtos inibitórios, como o acetato que em altas concentrações de glicose pode haver uma maior produção de acetato levando a inibição do crescimento celular. E uma terceira hipótese é o esgotamento de nutrientes essenciais, como uma fonte de nitrogênio (54). Assim, no restante dos ensaios em agitador orbital foi utilizado o meio definido com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose.



**Figura 16.** Otimização da concentração de glicose. A linha roxa representa o cultivo com  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, a linha azul representa o cultivo com  $10 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e a linha verde o cultivo com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose.

#### 4.5. OTIMIZAÇÃO DA INDUÇÃO EM AGITADOR ORBITAL

Para o estudo de indução foram utilizados dois indutores a lactose e o seu análogo o IPTG. Para isso foi testado a melhor concentração, o tempo ideal para induzir e o tempo ideal para finalizar o cultivo.

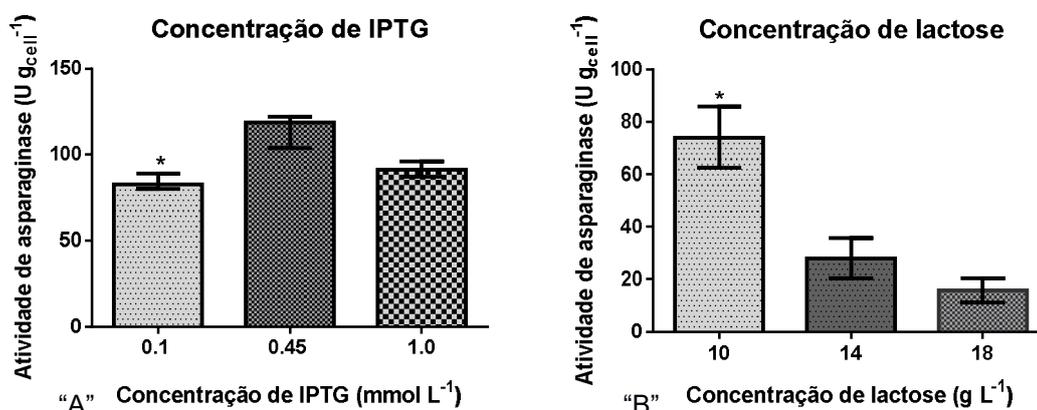
##### 4.5.1. Concentração do indutor

Para cada indutor foram testadas três concentrações. As concentrações do IPTG testadas foram  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e a lactose foram  $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $14 \text{ g L}^{-1}$  e  $18 \text{ g L}^{-1}$ . As concentrações de IPTG testadas foram escolhidas com base em artigos onde as concentrações se encontravam no intervalo entre  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (123–126). A mesma conduta foi adotada para a lactose, foram encontrados artigos com as mais variadas concentrações de lactose sendo utilizado entre  $10 \text{ g L}^{-1}$  a  $18 \text{ g L}^{-1}$  (60,127,128). Para a avaliação da indução os cultivos foram

realizados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio definido. Os cultivos foram inoculados com a  $DO_{600nm}$  0,1 e após 5 horas foram induzidos e após 24 horas da indução o cultivo foi interrompido e a atividade da enzima L-ASNase foi quantificada.

Na Figura 17 “A”, das três concentrações testadas a que menos induziu a produção da enzima L-ASNase foi a concentração de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  com uma atividade mediana de  $82,74 \text{ U g}_{cell}^{-1}$ . As concentrações de  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  induziram a atividades estatisticamente iguais. Sendo assim escolhida a concentração  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  para a continuidade dos experimentos.

Como demonstrado na Figura 17 “B”, a concentração de lactose que induziu melhor a produção da enzima L-ASNase foi a de  $10 \text{ g L}^{-1}$  com atividade média de L-ASNase de  $74,15 \pm 21 \text{ U g}_{cell}^{-1}$ , seguido da concentração de  $14 \text{ g L}^{-1}$  com  $28,02 \pm 12 \text{ U g}_{cell}^{-1}$  e a que apresentou a menor indução da enzima de interesse foi a de  $18 \text{ g L}^{-1}$  com  $15,73 \pm 6 \text{ U g}_{cell}^{-1}$ . Essa redução da atividade da L-ASNase em maiores concentrações da lactose pode ter ocorrido pela supressão da produção da enzima em altas concentrações da lactose.



**Figura 17.** “A” Indução da *E. coli* AspB com diferentes concentrações de IPTG. Foram comparadas três concentrações de IPTG (0,1 mmol L<sup>-1</sup>, 0,45 mmol L<sup>-1</sup> e 1,0 mmol L<sup>-1</sup>). Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por *Kruskal-Wallis* com pós-teste de Dunn’s (\*p ≤ 0,05). “B” Indução da *E. coli* AspB com diferentes concentrações de lactose. Foram comparadas três concentrações de lactose (10 g L<sup>-1</sup>, 14 g L<sup>-1</sup> e 18 g L<sup>-1</sup>). Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (\*p ≤ 0,05).

Outros trabalhos apresentaram essa mesma concentração de IPTG para a indução. Em trabalho publicado por Chua e colaboradores (2018) foi realizada a indução com IPTG 0,4 mmol L<sup>-1</sup> para a produção proteína estreptavidina em *E. coli* BL21 com o vetor de expressão pET21a (126). Em outro trabalho Saha e colaboradores (2018) utilizou a indução com IPTG 0,5 mmol L<sup>-1</sup> para a produção de protease com o vetor de expressão pET41a (125).

Em trabalho publicado por Tian (2011), o resultado foi semelhante ao encontrado no presente trabalho, onde em concentrações superiores a 10 g L<sup>-1</sup> houve a supressão da proteína alvo (128). Diante dos resultados apresentados a concentração de 10 g L<sup>-1</sup> foi a escolhida para a continuidade dos experimentos.

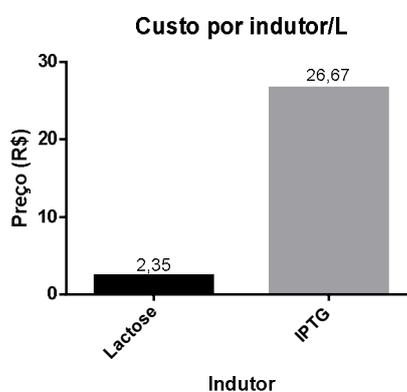
#### 4.5.2. Custo do indutor

Após definir qual a concentração necessária para a indução de um litro de meio foi necessário determinar a viabilidade de custo para cada meio, como demonstrado na Tabela 23.

**Tabela 23-** Custo por grama dos indutores

Componente	Preço (R\$)	Preço por grama (R\$)
<b>Lactose</b>	469,00	0,2345
<b>IPTG</b>	249,00	249,00

Considerando que os dois indutores utilizados possuíam a mesma procedência e mesma marca, o valor para induzir um litro de meio com 10 g de lactose foi calculado em R\$ 2,35 e para induzir com 0,45 mmol de IPTG é de R\$26,67, demonstrado na Figura 18.



**Figura 18.** Custo dos indutores para necessário para induzir um litro de meio com 10 g de lactose e 0,45 mmol de IPTG. Lactose e IPTG foram cotados da mesma empresa, sendo o mesmo fabricante dos produtos.

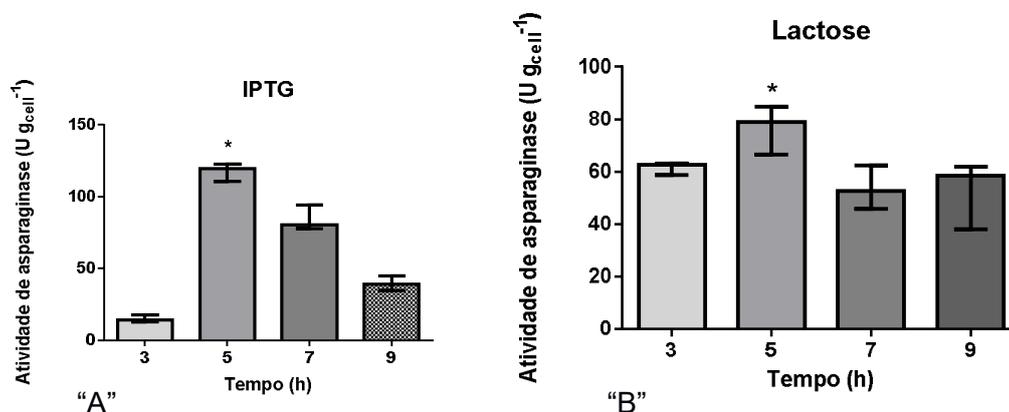
Quando se comparou os dois indutores foi possível concluir que é necessária uma quantidade noventa e três vezes maior de lactose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) para a indução de um litro de meio em comparação ao IPTG ( $0,11 \text{ g L}^{-1}$ ) para se chegar a atividades de L-ASNase semelhantes. Essa diferença de concentração se deve ao fato de a lactose ser consumida como fonte de carbono sendo necessária uma concentração maior para ele conseguir desempenhar a função de indutor. Quando foi realizada a

comparação de custo, apesar de se utilizar uma quantidade muito maior de lactose o seu custo é onze vezes menor que o do IPTG. Como já explicitado na escolha do meio de cultura, a intensão do trabalho seria o aumento de escala do processo sendo importante a avaliação dos custos de cada etapa.

#### **4.5.3. Tempo para o início da indução**

Os cultivos foram induzidos em momentos diferentes da curva de crescimento, sendo a inicial  $DO_{600nm}$  0,1. A concentração utilizada para a indução foi de  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  para o IPTG e  $10 \text{ g L}^{-1}$  para a lactose. Os cultivos foram induzidos em quatro momentos, o primeiro momento foi 3 horas após o início do cultivo, quando começava a fase exponencial, para a cepa utilizada neste trabalho, com a  $DO_{600nm}$  entre 0,4 a 0,6. O segundo momento foi após 5 horas do início do cultivo, onde marcava-se o meio da fase exponencial, com a  $DO_{600nm}$  entre 1,5 a 2,5 e terceiro momento foi após 7 horas do início do cultivo, sendo considerado o final da fase exponencial, com a  $DO_{600nm}$  entre 3,8 a 4,0 e por último o cultivo celular foi induzido já na fase estacionária em 9 horas de cultivo e  $DO_{600nm}$  entre 4,15 a 4,6. O cultivo foi interrompido após 24 horas da indução e a atividade de L-ASNase foi quantificada.

Na Figura 19, podemos observar que o momento que foi possível quantificar a maior atividade da enzima L-ASNase foi no meio da fase exponencial após 5 horas do início do cultivo, o IPTG induziu a uma atividade de L-ASNase de  $119,66 \text{ U g}_{cell}^{-1}$ , a lactose induziu uma produção de L-ASNase de  $78,98 \text{ U g}_{cell}^{-1}$ . Sendo utilizado o meio da fase exponencial (5 horas) para a indução nos demais experimentos.



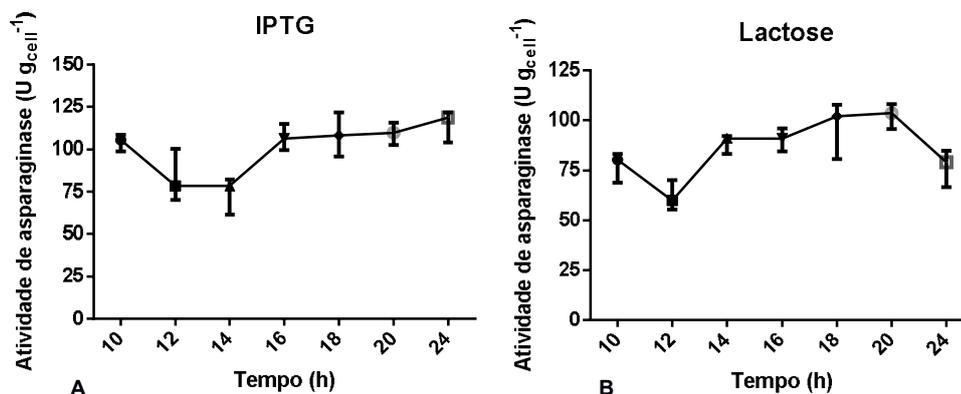
**Figura 19.** O cultivo de *E. coli* AspB foi induzido com IPTG ou lactose em diferentes momentos da curva de crescimento, sendo 3 horas o início da fase exponencial, 5 horas o meio da fase exponencial, 7 horas o fim da fase exponencial e 9 horas na fase estacionária. Os resultados das atividades de L-ASNase ( $\text{U g}_{\text{cell}}^{-1}$ ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparados por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's ( $*p \leq 0,05$ ).

Em estudos anteriores, o tempo escolhido para a indução foi quando a DO estava entre 0,4 e 0,8 (50,84,96,100,101). No entanto, o IPTG é tóxico para as células, quando adicionado no início do cultivo, há uma perda na concentração final de biomassa (128).

#### 4.5.4. Tempo após a indução

Um ponto importante na indução é quanto tempo é necessário para que ocorra a indução do cultivo. Para isso os cultivos tiveram a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  inicial igual a 0,1 e foi feito a indução dos cultivos quando a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  estava entre 1,5 a 2,5, com  $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$  para o IPTG ou  $10 \text{ g L}^{-1}$  para a lactose. A atividade da L-ASNase foi acompanhada das 10 horas até as 24 horas após a indução.

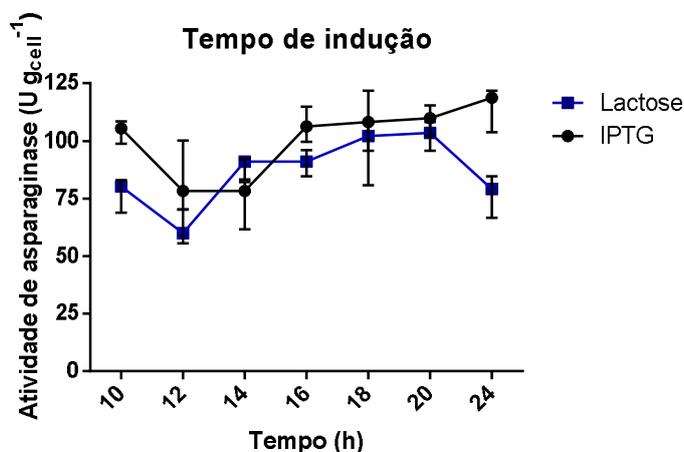
Na Figura 20 A, está representada a curva com as atividades de L-ASNase após a indução com IPTG, do tempo 16h a 24h foi formado um platô onde as atividades de L-ASNase não apresentaram diferença estatísticas entre elas, com média de atividades de  $109 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$ . Na Figura 20 B, está a curva com o indutor lactose onde as melhores atividades de L-ASNase foram encontradas entre os pontos de 18h e 20h, sem diferença estatística entre elas, com média das atividades de  $99 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$ .



**Figura 20.** Acompanhamento da atividade da enzima L-ASNase após a indução com IPTG e lactose durante o intervalo de 10-24h. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparado por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's (\*p ≤ 0,05).

Nos trabalhos citados na Tabela 20, foram utilizados três indutores nos cultivos, sendo eles o IPTG, a arabinose e a lactose. A lactose e o IPTG induzem o *operon lac* (48) e a arabinose induz o *operon arabinose* (129). O IPTG foi o indutor utilizado com maior frequência e a lactose foi utilizada em apenas dois trabalhos, sendo grande parte destes experimentos realizados em agitador orbital. Na Tabela 4, está mostrando que a maior parte dos cultivos continuam sendo induzidos com IPTG, mas existe um aumento na frequência da utilização da lactose como indutor em cultivos de alta densidade celular, sendo estes cultivos realizados em biorreatores. Essa tendência de substituição da IPTG para a lactose em escalas maiores demonstram que custo e a toxicidade do indutor torna-se mais relevante no aumento da escala, pois esses fatores impactam no sucesso do cultivo de alta densidade celular e viabilidade econômica do processo (127,128).

Como demonstrado na Figura 21, as curvas com ambos os indutores apresentaram comportamento semelhante, tendo atividade sem diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) nos pontos de 18 e 20h.



**Figura 21.** Comparação do acompanhamento da atividade da enzima L-ASNase após a indução com IPTG e lactose durante o intervalo de 10-24h. Os resultados das atividades de L-ASNase ( $U\ g_{cell}^{-1}$ ) foram expressos como mediana e intervalo interquartil comparados por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Em trabalhos feitos anteriormente foi realizada a comparação entre os indutores lactose e IPTG. Tian e colaboradores (2011) realizaram a comparação da indução com IPTG e lactose, a concentração de IPTG utilizada não foi descrita, mas foi comparada com concentrações de lactose que variaram entre 2 a  $50\ g\ L^{-1}$ , sendo a concentração de  $10\ g\ L^{-1}$  a que apresentou a maior atividade do fator de crescimento de queratinócito humano recombinante-2 (128). Em outro trabalho publicado por Bashir e colaboradores (2016), foi realizada novamente a comparação de IPTG versus a lactose, foram utilizadas três concentrações de IPTG  $1\ mmol\ L^{-1}$ ,  $1,5\ mmol\ L^{-1}$  e  $2,5\ mmol\ L^{-1}$  e as concentrações de lactose foram 2 a  $16\ g\ L^{-1}$ . Sendo concluído que a concentração de  $14\ g\ L^{-1}$  de lactose apresentou a mesma indução da concentração  $1,5\ mmol\ L^{-1}$  de IPTG (127).

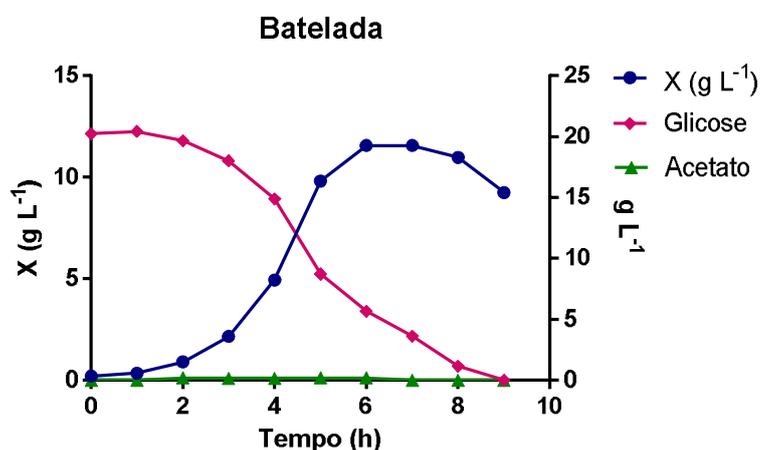
A utilização da lactose como indutor apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as vantagens para sua utilização está sua origem natural, ter um custo menor, ser menos tóxica e a baixa velocidade de indução sendo um benefício para a produção de proteínas mais solúveis (127,128). E como desvantagem da lactose será sua utilização como fonte de carbono durante a fermentação, o que torna o processo mais difícil de ser controlado (128). Por esses motivos detalhados o indutor escolhido para dar continuidade ao trabalho foi a lactose.

#### 4.6. CULTIVO EM BIORREATOR

Após os estudos em agitador orbital, foram iniciados os estudos com biorreatores de 1,3 L e 3 L. O meio utilizado foi o meio definido com a glicose inicial foi de  $27,5 \text{ g L}^{-1}$  (57).

##### 4.6.1. Batelada

Como demonstrado na Figura 22, a biomassa máxima alcançada no cultivo foi de  $11 \text{ g L}^{-1}$ , o cultivo foi interrompido quando a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  começou a decair. A glicose foi completamente consumida e a quantidade máxima de acetato produzida foi de  $0,20 \text{ g L}^{-1}$ . Foi calculado o  $\mu_x$  de  $0,79 \text{ h}^{-1}$  e o  $Y_{x/s}$  foi de  $0,45 \text{ g g}^{-1}$ .



**Figura 22.** Cultivo em batelada da *E. coli* AspB em biorreator. A linha azul representa o crescimento da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), a linha rosa representa o consumo da glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a linha verde representa a produção de acetato ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Em trabalho publicado por Kim e colaboradores (2019), onde utilizaram *E. coli* BL 21 para a produção de peptídeo na fase de batelada foi calculado o  $\mu_x$  de 0,74 e a concentração de acetato ficou abaixo de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  (60). Este resultando é semelhante ao encontrado no presente trabalho.

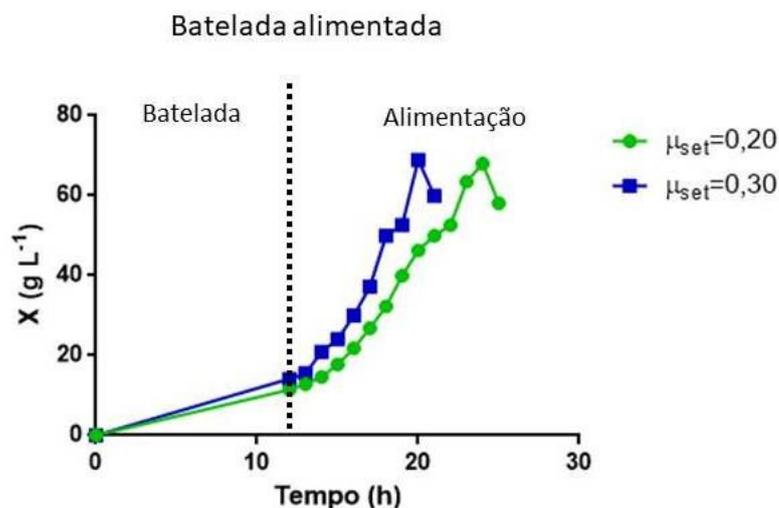
No artigo de Riesenber e colaboradores(1991), que foi a referência para o meio definido utilizado neste trabalho, na fase de batelada a biomassa alcançada foi de  $12 \text{ g L}^{-1}$ , resultado semelhante com o encontrado de  $11 \text{ g L}^{-1}$ . A produção de acetato no artigo foi de  $1 \text{ g L}^{-1}$  sendo maior do que a encontrada no presente trabalho de  $0,20 \text{ g L}^{-1}$  (57).

#### 4.6.2. Batelada alimentada

Após se conhecer a cinética do cultivo em batelada foi iniciada a alimentação. O cultivo foi inoculado com a  $DO_{600nm}$  0,01, após 12 horas a glicose foi totalmente consumida e ocorreu o pico da OD (DO-stat). Neste momento foi iniciada a alimentação. O método de escolha foi a alimentação exponencial para que fosse controlada a produção do produto acetato durante a alimentação.

Lee SY (1996), descreveu que  $\mu_{set}$  ideal seria entre 0,1 e 0,3, para que a produção de acetato durante a alimentação não inibisse o crescimento celular (12). Levando em consideração esses valores foram avaliados dois  $\mu_{set}$ , 0,20 e 0,30. O peso seco máximo alcançado no presente trabalho foi de  $69 \text{ g L}^{-1}$ , sendo alcançados pelos dois  $\mu_{set}$  avaliados, os cultivos foram interrompidos quando houve o decaimento da biomassa.

Na Figura 23, está demonstrado o crescimento da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante a alimentação. Os pontos da batelada não foram coletados, pois já tinham sido bem descritos nos experimentos anteriores. Após o pico da OD, foi iniciada a alimentação e foram coletados pontos a cada hora. Chegou-se ao mesmo peso seco máximo nos dois  $\mu_{set}$ , mas em tempo diferentes, quando o  $\mu_{set}$  usado foi de 0,30 alcançou a biomassa máxima de  $69 \text{ g L}^{-1}$ , foi obtida com 8 horas de alimentação e quando o  $\mu_{set}$  usado foi de 0,20 alcançou a biomassa máxima foi obtida com 12 horas de alimentação. A produção máxima de acetato do  $\mu_{set}$  0,20 foi de  $1,60 \text{ g L}^{-1}$  e o  $\mu_{set}$  0,30 foi de 2,37. O oxigênio foi um fator limitante nos dois cultivos, foi adicionado uma mistura de 2 vvm ar comprimido e oxigênio puro. A proporção dessa mistura foi sendo ajustada de acordo com a necessidade da fermentação.



**Figura 23.** Avaliação do  $\mu_{set}$  0,20 e 0,30 durante alimentação exponencial no peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ). Na figura a linha verde está representado a curva de crescimento como  $\mu_{set}$  0,20 e a linha azul está representado a curva de crescimento como  $\mu_{set}$  0,30.

Na Tabela 4 estão listados trabalhos cujo o objetivo era alcançar o cultivo de alta densidade celular, e os valores de biomassa seca final foram superiores a  $100 \text{ g L}^{-1}$ . Para alcançar o cultivo de alta densidade celular a maior parte dos trabalhos apresentados na tabela utilizou o meio definido e a estratégia de alimentação foi a exponencial que foram semelhantemente utilizadas no presente trabalho. Três trabalhos citados conseguiram alcançaram valores de biomassa superiores a  $100 \text{ g L}^{-1}$  com biorreatores com capacidade igual ou inferior a 3 L (64,65,67). Neste trabalho, sugere-se que não foi possível alcançar maiores concentrações celulares devido à limitação de oxigênio, pois foi adicionado o máximo de oxigênio permitido pelo equipamento utilizado e ao final do cultivo houve a carência de oxigênio, sendo possível contornar essa carência do oxigênio com o aumento da capacidade do biorreator e reduzindo proporcionalmente o volume inicial do cultivo e aumentando a entrada do oxigênio, desta maneira será sugere-se ser possível aumentar a disponibilidade de oxigênio fazendo que o cultivo alcance maiores concentrações de biomassa.

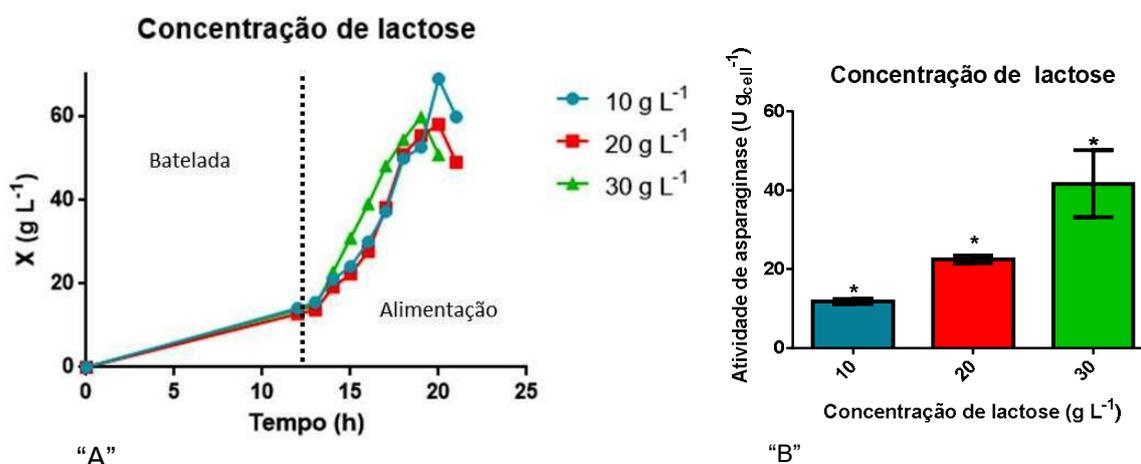
Há poucos artigos em que ocorre o escalonamento da produção da enzima L-ASNase recombinante tendo como sistema de expressão *Escherichia coli*. Dentre esses estudos, utilizaram biorreator com capacidade de 2 litros e a  $\text{DO}_{600\text{nm}}$

alcançada foi 6 em cultivo em batelada (83). Em outro trabalho, alcançou 30 g L<sup>-1</sup> de peso seco utilizando biorreator com capacidade de 2 litros (107). E o trabalho em que mais se aproximou o valor da biomassa alcançada neste trabalho, alcançou 53,3 g L<sup>-1</sup> de peso seco (130). O presente trabalho alcançou o 69 g L<sup>-1</sup> (DO<sub>600nm</sub> 158).

#### **4.6.3. Produção da enzima L-ASNase em biorreator**

A indução da enzima L-ASNase foi realizada com três concentrações de lactose 10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup>. O cultivo foi induzido com lactose no momento em chegou em alcançou 50 g L<sup>-1</sup> de peso seco e foi interrompido quando iniciou o decaimento do peso seco. O aumento da concentração da lactose como indutor em biorreator foi necessária, pois no momento em que houve a indução do cultivo com 10 g L<sup>-1</sup> de lactose a concentração celular estava mais alta do que a alcançada nos experimentos em agitador orbital não sendo a concentração de lactose o suficiente para a indução do meio devido à alta concentração celular no momento da indução.

Na Figura 24 “A”, está a comparação das três curvas de crescimento de cultivos que foram induzidos com diferentes concentrações de lactose e na Figura 24 “B” a atividade de L-ASNase referente a cada indução em U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>. O cultivo que foi induzido com 10 g L<sup>-1</sup> de lactose foi o que apresentou maior concentração celular (69 g L<sup>-1</sup>), mas foi o que apresentou a menor atividade de L-ASNase (11,79 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>). O cultivo que foi induzido com 20 g L<sup>-1</sup> a maior concentração celular alcançada foi de 58 g L<sup>-1</sup>, mas houve um aumento no valor de atividade de L-ASNase (22,56 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>). E o cultivo que foi induzido com 30 g L<sup>-1</sup> de lactose teve sua concentração celular máxima 59 g L<sup>-1</sup> e a maior atividade de L-ASNase (41,68 U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>).

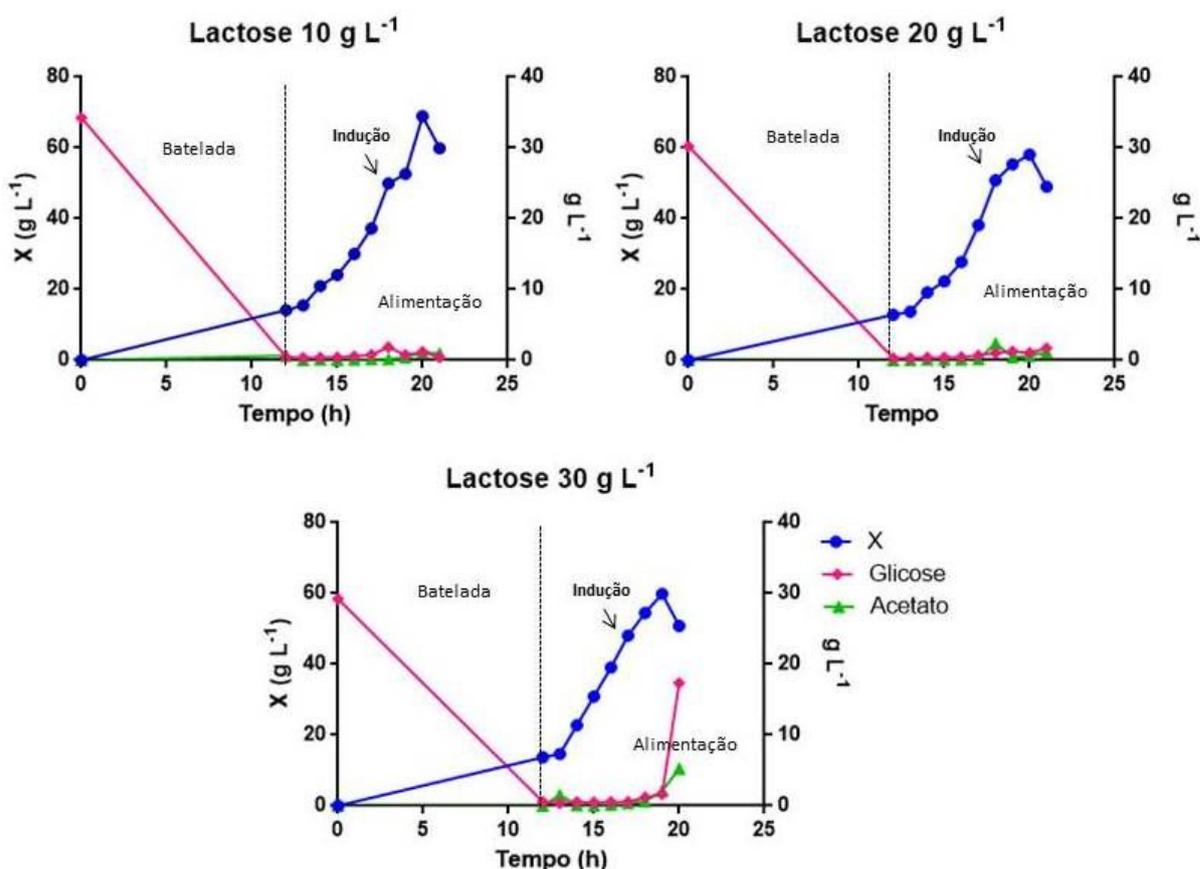


**Figura 24.** Indução em biorreatores com três concentrações de lactose 10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup> e 30 g L<sup>-1</sup>. Na figura “A” está representado as três curvas de crescimento em peso seco (g L<sup>-1</sup>) e na figura “B” está representado a atividade de L-ASNase induzida por cada concentração de lactose. A cor azul está representando o cultivo induzido com 10 g L<sup>-1</sup> de lactose, a cor vermelha está representando o cultivo induzido com 20 g L<sup>-1</sup> de lactose e a cor verde está representando o cultivo induzido com 30 g L<sup>-1</sup> de lactose. Os resultados das atividades de L-ASNase (U g<sub>cell</sub><sup>-1</sup>) foram expressos por média e desvio padrão e comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnet (\*p ≤ 0,05).

A menor concentração celular nos cultivos de 20 e 30 g L<sup>-1</sup> de lactose pode ser atribuído a baixa solubilidade da lactose. A lactose tem solubilidade de 216 g L<sup>-1</sup> sendo assim necessário um volume cada vez maior para se chegar à concentração desejada de lactose no cultivo, esse volume alto resulta na diluição da cultura. Vélez e colaboradores (2014) utilizaram pulsos de 400 mL de lactose (200 g L<sup>-1</sup>) para induzir o cultivo para a produção de Penicilina G acilase, para contornar a baixa solubilidade da lactose (61).

Na Figura 25, está representada a biomassa produzida durante a alimentação e os dados obtidos através da análise em CLAE. O cultivo induzido com 30 g L<sup>-1</sup> de lactose foi o que a maior produção de acetato (5,25 g L<sup>-1</sup>), seguido por 20 g L<sup>-1</sup> (1,10 g L<sup>-1</sup>) e por último 10 g L<sup>-1</sup> (0,96 g L<sup>-1</sup>). Este resultado, indica que em todas as concentrações a quantidade de oxigênio está limitando a fermentação, pois o acúmulo de acetato é inversamente proporcional aos níveis de oxigênio, isso se deve a menor atividade do ciclo TCA e dos níveis alterados de transcrição de genes

associado ao metabolismo da glicose e acetato (131). O único cultivo que foi interrompido sem o consumo completo da glicose foi o de  $30 \text{ g L}^{-1}$ . Este resultado poderia ser explicado pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, aumentando assim a concentração de glicose no meio de cultura, sendo que o excesso da glicose é responsável pela aumento da produção de acetato e a alta concentração de acetato causa a redução da velocidade de crescimento (120,132).



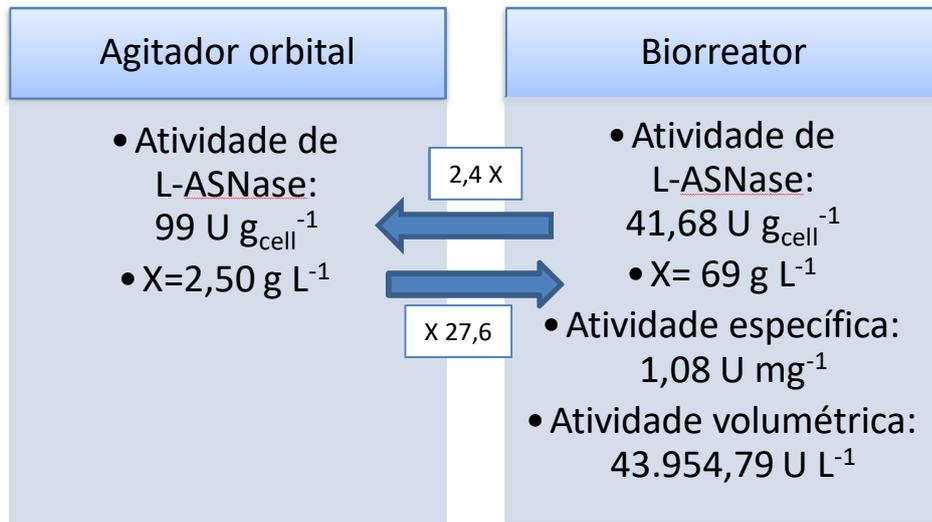
**Figura 25.** Representação do crescimento da biomassa, o consumo de glicose e produção de acetato em cultivos com diferentes concentrações de lactose. A linha azul representa a biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ), a linha rosa o consumo da glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), a linha verde a produção de acetato ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a seta representa o momento da indução com lactose.

Na Tabela 20, onde o sistema de expressão utilizado em todos os trabalhos foi a *E. coli*, dois trabalhos que expressaram seu resultados em atividade específica no extrato bruto, ambos os estudos utilizaram gene da L-ASNase de *Erwinia carotovora*, e alcançaram a atividade específica de  $0,72 \text{ U mg}^{-1}$  (106,114), sendo

estes resultados inferiores ao encontrado no presente trabalho que foi de  $1,08 \text{ U mg}^{-1}$ . Em trabalho publicado por Lopes e colaboradores (2019), utilizando o gene da L-ASNase de *Saccharomyces cerevisiae* a atividade encontrada foi de  $225,6 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$ , essa atividade é superior ao que encontrado no presente trabalho  $41,68 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$  (89). Em outro trabalho publicado por Chohan e colaboradores (2018), utilizando o gene da L-ASNase de *Pyrobaculum calidifontis* a atividade volumétrica encontrada de  $20,13 \text{ U L}^{-1}$  sendo inferior ao encontrado no presente trabalho de  $43.954,79 \text{ U L}^{-1}$  (91).

Em trabalho publicado por Khushoo e colaboradores (2005), buscou-se a produção de enzima L-ASNase extracelular no sistema de expressão *E. coli* BLR (DE3), os cultivos foram realizados com meio complexo em biorreator de 2 litros de capacidade e induzido com  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de IPTG. A atividade volumétrica de  $850.000 \text{ U L}^{-1}$  da enzima L-ASNase no meio extracelular (130). A atividade enzimática encontrada foi superior ao encontrado no presente trabalho, porém, o método de quantificação da atividade da enzima L-ASNase foi o método de Nessler, a escolha do método de quantificação traz dúvidas sobre a real atividade da enzima, uma vez que a enzima está no meio extracelular e o meio de cultivo após o processo de fermentativo interfere na metodologia (82).

Na Figura 26, está explicitada as diferenças entre os cultivos em agitador orbital e biorreator. A concentração de máxima de lactose utilizada foi de  $30 \text{ g L}^{-1}$ , não induzindo o cultivo na mesma proporção obtida em experimentos em agitador orbital. A atividade da L-ASNase máxima alcançada em agitador orbital foi de  $99 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$  comparado ao  $41,68 \text{ U g}_{\text{cell}}^{-1}$  alcançada em biorreator. A atividade específica do extrato bruto foi de  $1,08 \text{ U mg}^{-1}$ , sendo atividade volumétrica máxima alcançada de  $43.954,79 \text{ U L}^{-1}$  em biorreator. A concentração celular alcançada em biorreator foi 27 vezes mais alta do que em agitador orbital.



**Figura 26.** Comparação entre os cultivos realizados em agitador orbital e biorreator.

Para a continuidade dos estudos de indução seria necessário que a concentração de lactose fosse aumentada até alcançar o mesmo nível de indução do agitador orbital. O aumento da concentração de lactose dentro do biorreator traz a limitação do volume, pois como a lactose possui baixa solubilidade, é necessário adicionar um volume cada vez maior da solução de lactose, causando a diluição da cultura, podendo tornar inviável o seu escalonamento na indústria, sendo necessária a busca de estratégias para melhorar a indução com a lactose, como a lactose ser adicionada em pulsos (61) e a redução da temperatura do cultivo durante a indução para a produção das enzimas seja mais lenta, mas de forma constante (133).

## **5. CONCLUSÃO**

A produção da enzima L-ASNase foi realizada em agitador orbital e biorreator de 3L, utilizando como meio de cultivo o meio definido e como indutor a lactose. Após o processo de escalonamento de agitador orbital para biorreator a concentração celular aumentou significativamente, resultando no aumento da produtividade volumétrica da enzima de interesse. Apesar de ter sido realizada a produção da L-ASNase em biorreator, é necessário o aprofundamento dos estudos de indução, para se obter uma maior produtividade da enzima L-ASNase.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Leucemia. [cited 2017 Jun 18]. Available from: <http://www2.inca.gov.br>
2. Emadi A, Law JY. MSD Manuals [Internet]. Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). 2020 [cited 2020 Jul 15]. Available from: <https://www.msdmanuals.com>
3. Lassaletta Atienza A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatr Integr.* 2016;20(6):380–9.
4. Quintanilla-Flores DL, Flores-Caballero MÁ, Rodríguez-Gutiérrez R, Tamez-Pérez HE, González-González JG. Acute Pancreatitis and Diabetic Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Case Rep Oncol Med* [Internet]. 2014;2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970348/>
5. Ministério da Saúde. Portaria n° 312, de 27 de março de 2013. 2013;
6. Amena S., Vishalakshi N., Prabhakar M., Dayanand A. LK. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces Gulbargensis*. *Brazilian J Microbiol.* 2010;41:173–8.
7. Lopes AM, Oliveira-Nascimento L de, Artur Ribeiro CATJ, Breyer CA, Oliveira MA de, Monteiro G, et al. Therapeutic l-asparaginase : upstream , downstream and beyond Therapeutic l-asparaginase : upstream ,. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2015; Available from: <http://www.tandfonline.com/loi/ibty20%0ATherapeutic>
8. Woods D, Winchester K, Towerman A, Gettinger K, Carey C, Timmermann K, et al. From the Children ' s Oncology Group : Evidence-Based Recommendations for PEG-Asparaginase Nurse Monitoring , Hypersensitivity Reaction Management , and Patient / Family Education. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2017;

9. Silva TAC e, Costa IM, Biasoto HP, Lima GM, Silva CM, Pessoa A, et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. *Blood Rev* [Internet]. 2020;107417. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2019.107417>
10. Lima GM, Effer B, Biasoto HP, Feijoli V, Pessoa A, Palmisano G, et al. Glycosylation of L-asparaginase from *E.coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. *Biochem Eng J* [Internet]. 2020;156(January). Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X20300310?dgcid=rss\\_sd\\_all&utm\\_source=researcher\\_app&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=RESR\\_MRKT\\_Researcher\\_inbound](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X20300310?dgcid=rss_sd_all&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound)
11. Anvisa. Nota – Autorização para importação da L-Asparaginase. 2017;9–10.
12. Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Elsevier Sci. 1996;98–105.
13. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Vol. 10, Current Opinion in Biotechnology. 1999. p. 411–21.
14. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5(APR):1–17.
15. Cachumba JJM, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Santos JC Dos, Silva SS Da. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian J Microbiol J Microbiol*. 2016;47s:77–85.
16. LANG S. Über desamidierung im Tierkörper. *Beitr Chem Physiol Pathol*. 1904;5:321–345.
17. Furth O, Friedmann M. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. *Biochemistry*. 1910;26:435–440.
18. Clementi A. La desamidation enzymatique de l'asparagine chez les differentes

- especies animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme. Arch Intern Physiol. 1922;19:369–398.
19. Badoei-Dalfard A. L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. Mol Biol Rescarch Commun [Internet]. 2016;5:1–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5019328/>
  20. Sobin LH, Kidd JG. A Metabolic Difference Between Two Lines of Lymphoma 6C3HED Cells in Relation to Asparagine. Proc Soc Exp Biol Med. 1965;119(2):325–7.
  21. Mashburn LT, Wriston JC. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys. 1964;105:450–452.
  22. Broome JD. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. J Natl Cancer Inst. 1965;35(6):967–974.
  23. Swain AL, Jaskolski M, Housset D, Rao JKM, Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(4):1474–8.
  24. Lomelino CL, Andring JT, McKenna R, Kilberg MS. Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease. J Biol Chem. 2017;292(49):19952–8.
  25. Gossai N, Richards M, Boman L, Messinger Y, Gernbacher S, Perkins J, et al. Symptomatic Hyperammonemia with *Erwinia chrysanthemi* -derived Asparaginase in Pediatric Leukemia Patients. J Pediatr Hematol Oncol. 2018;40(4):312–5.
  26. Mahajan R V., Saran S, Kameswaran K, Kumar V, Saxena RK. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. Bioresour Technol [Internet]. 2012;125:11–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>

27. Doriya K, Kumar DS. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech*. 2016;6(2):1–10.
28. Vidya J, Sajitha S, Ushasree MV, Sindhu R, Binod P, Madhavan A, et al. Genetic and metabolic engineering approaches for the production and delivery of L-asparaginases: an overview. *Bioresour Technol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.057>
29. Lopez-santillan M, Iparraguirre L, Martin-guerrero I, Gutierrez-camino A. Review of pharmacogenetics studies of L-asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia points to variants in the GRIA1 gene. *Drug Metab Pers Ther*. 2017;32(1):1–9.
30. Belén LH, Beltrán JF, Carlota L, Rangel DO, Gisele Y, Pessoa A, et al. Immunogenicity assessment of fungal L - asparaginases : an in silico approach. *SN Appl Sci* [Internet]. 2020;(2020). Available from: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2021-z>
31. Liu P, Lu X, Li N, Zheng Z, Qiao X. Characterization, variables, and antioxidant activity of the Maillard reaction in a fructose-histidine model system. *Molecules*. 2019;24(1).
32. Zyzak D V., Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem*. 2003;51(16):4782–7.
33. Thapa S, Li H, OHair J, Bhatti S, Chen FC, Nasr K Al, et al. Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2019;61(8):579–601. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>
34. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. In: *Biochemistry*. 5th ed. New York; 2002.
35. Bhatia S, Dahiya R. Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science [Internet]. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical*

- Sciences. Elsevier Inc.; 2015. 121-156 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00004-2>
36. Szczesna K. Proteomics & metabolomics from technology networks [Internet]. Why Does the Molecular Weight of My Protein Differ From the Theoretically Expected Weight? 2019 [cited 2019 Apr 9]. Available from: <https://www.technologynetworks.com/proteomics/articles/why-does-the-molecular-weight-of-my-protein-differ-from-the-theoretically-expected-weight-322079>
  37. Santhosh Kumar D, Sobha K. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. *Abr* [Internet]. 2012;3(December):2012. Available from: <http://www.soeagra.com/abr/abr.htm>
  38. Demain AL, Vaishnav P. Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2009;3(3):297–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
  39. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(December).
  40. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2018;36(12):1136–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4305>
  41. Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2009;18(5):936–48.
  42. Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, Saini KS, et al. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J Microbiol Biotechnol*. 2015;25(7):953–62.
  43. Thermoscientific. BL21 ( DE3 ) Competent Cells. Vol. 21. p. 6–7.
  44. Vandeputte-Rutten L, Kramer RA, Kroon J, Dekker N, Egmond MR, Gros P.

- Crystal structure of the outer membrane protease Ompt from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001;20(18):5033–9.
45. Liao JH, Lin YC, Hsu J, Lee AYL, Chen TA, Hsu CH, et al. Binding and cleavage of *E. coli* HU $\beta$  by the *E. coli* Lon protease. *Biophys J* [Internet]. 2010;98(1):129–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.052>
  46. Cabrita LD, Dai W, Bottomley SP. A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnol.* 2006;6(Lic):1–8.
  47. Hunt I. From gene to protein: A review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expr Purif.* 2005;40(1):1–22.
  48. Matthaei KI. Caveats of Gene-Targeted and Transgenic Mice [Internet]. Vol. 1, Handbook of Stem Cells. Elsevier Inc.; 2004. 589-598 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-436643-5.50068-7>
  49. Zhang Y, Li D, Li Y. Expression and purification of L-asparaginase from *Escherichia coli* and the inhibitory effects of cyclic dipeptides. *Nat Prod Res* [Internet]. 2017;31(18):2099–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1277350>
  50. Kim SK, Min WK, Park YC, Seo JH. Application of repeated aspartate tags to improving extracellular production of *Escherichia coli* L-asparaginase isozyme II. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2015;79–80:49–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.017>
  51. Jianhua C, Yujun W, Ruibo J, Min W, Wutong W. Probing the antigenicity of *E. coli* L-asparaginase by mutational analysis. *Mol Biotechnol.* 2006;33(1):57–65.
  52. WANG Y, QIAN S, MENG G, ZHANG S. Cloning and Expression of L-Asparaginase Gene in *Escherichia coli*. 2001;95:93–101.
  53. Harms E, Wehner A, Jennings MP, Pugh KJ, Beacham IR, Rohm KH. Construction of expression systems for *Escherichia coli* asparaginase II and

- two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. *Protein Expr Purif.* 1991;2(2–3):144–50.
54. Schimidell W, Lima U de A, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia industrial-vol.2.* 1° Edição. Editora Edgard Blucher LTDA; 2001.
  55. Clarke KG. Microbial kinetics during batch, continuous and fed-batch processes. *Bioprocess Engineering.* 2013. 97-146 p.
  56. Krause M, Neubauer A, Neubauer P. The fed-batch principle for the molecular biology lab: Controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2016;15(1):1–13.
  57. Riesenber D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz DJ, Sanders EA, et al. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. *J Biotechnol.* 1991;20:17–28.
  58. Ramadhan SH, Matsui T, Nakano K, Minami H. High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* strain HKT554 and its application for optically active sulfoxide production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(5):1903–7.
  59. Lee YL, Chang HN. High Cell Density Culture of a Recombinant *Escherichia coli* Producing Penicillin Acylase in a Membrane Cell Recycle Fermentor. 1990;
  60. Kim YS, Karisa N, Jeon WY, Lee H, Kim Y, Ahn J. High-level production of N-terminal pro-brain natriuretic peptide , as a calibrant of heart failure diagnosis , in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(12):4779–88.
  61. Vélez AM, da Silva AJ, Luperni Horta AC, Sargo CR, Campani G, Gonçalves Silva G, et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. *BMC Biotechnol.* 2014;14.
  62. Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, et al. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. 2007;132:167–79.

63. Kim S, Kweon D, Lee D, Park Y, Seo J. Coexpression of folding accessory proteins for production of active cyclodextrin glycosyltransferase of *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*. 2005;41:426–32.
64. Soo B, Seung KÆ, Lee C. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. 2004;147–50.
65. Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Maghsoudi N, Mohammadian-Mosaabadi J, Mohammadi MR, Bahrami A, et al. Process development for production of recombinant human interferon- $\gamma$  expressed in *Escherichia coli*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004;31(2):63–9.
66. Hu SY, Wu JL, Huang JH. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. J Biotechnol. 2004;107(2):161–71.
67. Delisa MP, Li J, Rao G, Weigand WA, Bentley WE. Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. Biotechnol Bioeng. 1999;65(1):54–64.
68. Horn U, Strittmatter W, Krebber A, Knüpfer U, Kujau M, Wenderoth R, et al. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. Appl Microbiol Biotechnol. 1996;46(5–6):524–32.
69. Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. 1995;39:59–65.
70. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005;41(1):207–34.
71. Santos JCF. Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de L-asparaginase II. Universidade de São Paulo; 2017.
72. SHILOACH J, RINAS U. Bacterial Cultivation for Production of Proteins and

- Other Biological Products. In: *Bacterial Cultivation for Protein Production*. American Society for Microbiology Press; 2010. p. 132–44.
73. Drainas C, Kinghorn JR, Pateman JA. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*. 1977;98(2):493–501.
  74. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro organisms. *J Gen Microbiol*. 1973;76(1):85–99.
  75. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85.
  76. Thomas JA, Schlender KK, Lerner J. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal Biochem*. 1968;25(C):486–99.
  77. Schmidell W, Lima U de A, Aquarone E, Borzani W. *Biotechnologia Industrial*. 2001.
  78. Schmidell W, Lima U de A, Aquarone E, Borzani W. *Biotechnologia industrial-vol.1. 1º Edição*. Editora Edgard Blucher LTDA; 2001.
  79. Flores-Santos JC, Vitolo M, Costa-Silva TA, Pessoa-Jr A, Freire RKB. Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. *Prep Biochem Biotechnol* [Internet]. 2018;48(8):707–17. Available from: <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487850>
  80. Baig F, Fernando LP, Salazar MA, Powell RR, F.Brucec T, Harcum SW. Dynamic Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Inclusion Body Formation. *Bone* [Internet]. 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
  81. Magri A, Soler MF, Lopes AM, Cilli EM, Barber PS, Pessoa A, et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric

- methods versus high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(27):6985–90.
82. de Freitas MM, Souza PM, Cruvinel K, Barros T, Santos SN, Long PF, et al. Interferences that impact measuring optimal L-asparaginase activity and consequent errors interpreting these data. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(13):5161–6.
83. Mihooliya KN, Nandal J, Kumari A, Nanda S, Verma H, Sahoo DK. Studies on efficient production of a novel L-asparaginase by a newly isolated *Pseudomonas resinovorans* IGS-131 and its heterologous expression in *Escherichia coli*. *3 Biotech* [Internet]. 2020;10(4):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2135-4>
84. Maqsood B, Basit A, Khurshid M, Bashir Q. Characterization of a thermostable, allosteric L-asparaginase from *Anoxybacillus flavithermus*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;152:584–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.246>
85. Jiao L, Chi H, Lu Z, Zhang C, Chia SR, Show PL, et al. Characterization of a novel type I L-asparaginase from *Acinetobacter soli* and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2020;xxx(xxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.01.007>
86. Chohan SM, Sajed M, Naeem S un, Rashid N. Heterologous gene expression and characterization of TK2246, a highly active and thermostable plant type L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;147:131–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.012>
87. Farahat MG, Amr D, Galal A. Molecular cloning, structural modeling and characterization of a novel glutaminase-free L-asparaginase from *Cobetia amphilecti* AMI6. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;143:685–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.258>
88. Aishwarya SS, Selvarajan E, Iyappan S, Rajnish KN. Recombinant L-

- Asparaginase II from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and Its Anticancer Activity. Indian J Microbiol [Internet]. 2019;59(3):313–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00806-0>
89. Lopes W, Santos BAF dos, Sampaio ALF, Gregório Alves Fontão AP, Nascimento HJ, Jurgilas PB, et al. Expression, purification, and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif [Internet]. 2019;159(July 2018):21–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.02.012>
90. Safary A, Moniri R, Hamzeh-Mivehroud M, Dastmalchi S. Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. BioImpacts [Internet]. 2019;9(1):15–23. Available from: <https://doi.org/10.15171/bi.2019.03>
91. Chohan SM, Rashid N, Sajed M, Imanaka T. Pcal\_0970: an extremely thermostable l-asparaginase from *Pyrobaculum calidifontis* with no detectable glutaminase activity. Folia Microbiol (Praha). 2018;
92. Radha R, Arumugam N, Gummadi SN. Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization. Int J Biol Macromol [Internet]. 2018;111:129–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.165>
93. Sindhu R, Manonmani HK. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. Protein Expr Purif [Internet]. 2018;143:83–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.009>
94. Farag A, Ataya F, Ali H, Hussein A, Saeed H, El-Sharkawy A, et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* l-asparaginase in *Escherichia coli* [Internet]. Vol. 106, International Journal of Biological Macromolecules. Elsevier B.V.; 2017. 1041-1051 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.110>
95. Ghasemi A, Asad S, Kabiri M, Dabirmanesh B. Cloning and characterization of

- Halomonas elongata* L-asparaginase, a promising chemotherapeutic agent. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(19):7227–38.
96. Shi R, Liu Y, Mu Q, Jiang Z, Yang S. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;96:93–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.115>
97. Kebeish R, El-Sayed A, Fahmy H, Abdel-Ghany A. Molecular cloning, biochemical characterization, and antitumor properties of a novel L-asparaginase from *Synechococcus elongatus* PCC6803. *Biochem.* 2016;81(10):1173–81.
98. Santos; JHPM, Costa; IM, Molino; JVD, Leite; MSM, Pimenta; M V., Coutinho; JAP, et al. Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. *Biotechnol Prog.* 2016;33(2):416–24.
99. Costa IM, Schultz L, De Araujo Bianchi Pedra B, Leite MSM, Farsky SHP, De Oliveira MA, et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36239>
100. Labrou NE, Muharram MM. Biochemical characterization and immobilization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in a microplate for high-throughput biosensing of L-asparagine. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2016;92:86–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.06.013>
101. Lee SJ, Lee Y, Park GH, Umasuthan N, Heo SJ, de Zoysa M, et al. A newly identified glutaminase-free L-Asparaginase (L-ASPG86) from the marine bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;26(6):1115–23.
102. Kishore V, Nishita KP, Manonmani HK. Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large

- scale production in *E. coli* BL21. 3 Biotech [Internet]. 2015;5(6):975–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-015-0300-y>
103. Pokrovskaya M V., Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, Veselovsky A V., Grishin D V., Abakumova OY, et al. Identification of Functional Regions in the *Rhodospirillum rubrum* L-Asparaginase by Site-Directed Mutagenesis. Mol Biotechnol. 2015;57(3):251–64.
  104. Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. Front Microbiol. 2014;5(SEP):1–11.
  105. Han S, Jung J, Park W. Biochemical Characterization of L-Asparaginase in NaCl-Tolerant *Staphylococcus sp.* OJ82 Isolated from Fermented Seafood. J Microbiol Biotechnol. 2014;24(8):1096–104.
  106. Pourhossein M, Korbekandi H. Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. Adv Biomed Res [Internet]. 2014;3:82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761390>
  107. Roth G, Nunes JES, Rosado LA, Bizarro C V., Volpato G, Nunes CP, et al. Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase ii production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. Brazilian J Chem Eng. 2013;30(2):245–56.
  108. Pokrovskii VS, Pokrovskaya M V., Aleksandrova SS, Anrianov RM, Zhdanov DD, Osmel'yanyuk NM, et al. *Physicochemical properties* and antiproliferative activity of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. Appl Biochem Microbiol. 2013;49(1):18–22.
  109. Sidoruk K V., Pokrovsky VS, Borisova AA, Omeljanuk NM, Aleksandrova SS, Pokrovskaya M V., et al. Creation of a producer, optimization of expression, and purification of recombinant *Yersinia Pseudotuberculosis* L-asparaginase. Bull Exp Biol Med. 2011;152(2):219–23.
  110. Oza VP, Parmar PP, Patel DH, Subramanian RB. Cloning, expression and

- characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. 3 Biotech [Internet]. 2011;1(1):21–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-011-0003-y>
111. Pokrovskaya M V., Aleksandrova SS, Pokrovsky VS, Omeljanjuk NM, Borisova AA, Anisimova NY, et al. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. Protein Expr Purif [Internet]. 2012;82(1):150–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2011.12.005>
  112. Eisele N, Linke D, Bitzer K, Na'amnieh S, Nimtz M, Berger RG. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. Bioresour Technol [Internet]. 2011;102(3):3316–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.098>
  113. Cho CW, Lee HJ, Chung E, Kim KM, Heo JE, Kim JI, et al. Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. Mol Cells. 2007;23(3):280–6.
  114. Kotzia GA, Labrou NE. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. J Biotechnol. 2005;119(4):309–23.
  115. Krasotkina J, Borisova AA, Gervaziev YV, Sokolov NN. One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biotechnol Appl Biochem. 2004;39(2):215.
  116. Barati M, Tabarzad M, Safarpour H, Ghanbariasad A, Ghaderi O. Validation of a simple and rapid method for assessment of intracellular bacterial asparaginase. Iran J Pharm Sci. 2016;12(2):33–42.
  117. Ponce E. Effect of growth rate reduction and genetic modifications on acetate accumulation and biomass yields in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng. 1999;87(6):775–80.
  118. Bernal V, Castaño-Cerezo S, Cánovas M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. Appl Microbiol

- Biotechnol [Internet]. 2016;100(21):8985–9001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7832-x>
119. Renilla S, Bernal V, Fuhrer T, Castaño-Cerezo S, Pastor JM, Iborra JL, et al. Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: Interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(5):2109–24.
  120. Luli GW, Strohl WR. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(4):1004–11.
  121. Müller J, Beckers M, Mußmann N, Bongaerts J, Büchs J. Elucidation of auxotrophic deficiencies of *Bacillus pumilus* DSM 18097 to develop a defined minimal medium. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2018;17(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0956-1>
  122. Routledge SJ. Beyond de-foaming: productivity the effects of antifoams on bioprocess. *Comput Struct Biotechnol* [Internet]. 2012;3(4):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210014>
  123. Duan X, Zhang X, Shen Z, Su E, Zhao L, Pei J. Efficient production of aggregation prone 4- $\alpha$ -glucanotransferase by combined use of molecular chaperones and chemical chaperones in *Escherichia coli*.pdf. *J Biotechnol*. 2019;
  124. Babbal, Adivitiya, Mohanty S, Khasa YP. Bioprocess optimization for the overproduction of catalytic domain of ubiquitin-like protease 1 (Ulp1) from *S. cerevisiae* in *E. coli* fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2019;120(October 2018):98–109. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.10.008>
  125. Saha A, Acharya BN, Priya R, Tripathi NK, Shrivastava A, Rao MK, et al. Development of nsP2 protease based cell free high throughput screening assay for evaluation of inhibitors against emerging *Chikungunya* virus. *Sci Rep*.

- 2018;8(1):1–13.
126. Chua LH, Tan SC, Liew MWO. Process intensification of core streptavidin production through high-cell-density cultivation of recombinant *E. coli* and a temperature-based refolding method. *J Biotechnol* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.04.012>
  127. Bashir H, Ahmed N, Khan MA, Zafar AU, Tahir S, Khan MI, et al. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. *Biotechnol Appl Biochem*. 2016;63(5):708–14.
  128. Tian H, Tang L, Wang Y, Wang X, Guan L, Zhang J, et al. Lactose induction increases production of recombinant keratinocyte growth factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther*. 2011;17(2):123–9.
  129. Greenblatt J, Schleif R. Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon in vitro. *Nat new Biol*. 1971;230:19–23.
  130. Khushoo A, Pal Y, Mukherjee KJ. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(2):189–97.
  131. Phue JN, Shiloach J. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metab Eng*. 2005;7(5–6):353–63.
  132. Lim HK, Lee SU, Chung S II, Jung KH, Seo JH. Induction of the T7 promoter using lactose for production of recombinant plasminogen kringle 1-3 in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*. 2004;14(2):225–30.
  133. de Groot NS, Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett*. 2006;580(27):6471–6.