UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* expressa
em *Pichia pastoris***

Omar Santiago Pillaca Pullo

Tese para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* expressa
em *Pichia pastoris***

Omar Santiago Pillaca Pullo

Tese para obtenção do Título de MESTRE

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

SÃO PAULO

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P641p	<p>Pillaca Pullo, Omar Santiago</p> <p>Produção de L-asparaginase (ASP3) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i> / Omar Santiago Pillaca Pullo. -- São Paulo, 2016. 135p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.</p> <p>Orientador: Vitolo, Michele Co-orientador: Pessoa Junior, Adalberto</p> <p>1. Biotecnologia farmacêutica 2. Leveduras 3. Reatores bioquímicos 4. Leucemia I. T. II. Vitolo, Michele, orientador. III. Pessoa Junior, Adalberto, co-orientador.</p> <p>615.1 CDD</p>
-------	--

OMAR SANTIAGO PILLACA PULLO

**Produção de L-asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* expressa
em *Pichia pastoris***

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

*“Equipado com seus cinco sentidos,
o homem explora o universo ao seu redor,
e chama a essa aventura de ciência”*

Edwin Hubble

DEDICATÓRIA

*Dedico à minha mãe, Marcelina,
ao meu pai, Eulogio.*

AGRADECIMENTOS

“La frase: ‘La persona se hizo sola’ no existe, carece de veracidad. Todos estamos hechos por otras miles de personas. Cada ser que hizo algo bueno por nosotros, o nos dijo algunas palabras de aliento o aprobación, influyó en nuestra personalidad y nuestros hechos. Es por eso que se vuelven parte de cualquier éxito nuestro”.

George Matthew Adams

Agradezco a mis padres: Marcelina e Eulogio; mis mejores maestros, por enseñarme las cosas más importantes de la vida, aquellas que no se enseñan en ninguna universidad; por las cosas que pudieron darme y por las que tuvieron que negarme; por enseñarme a nunca olvidar mis raíces, porque solo quien recuerda de donde viene sabe a donde va; por enseñarme el valor de la humildad, eso que habla más de ti que cualquier título universitario y porque eso me ha permitido conocer personas importantes en mi vida. A mi madre, quien sufrió mucho con mi partida y quien seguramente será la primera en recibirme con los brazos abiertos, a ella le digo: “Vuelvo a casa”;

A mis Hermanas: Delia, Sandra e Jessica; porque solo estando lejos de ellas pude comprender cuanto las necesitaba en mi vida y aprendí a valorar los momentos con ellas, y porque aquí pude descubrir cuanto se parecen nuestras personalidades; gracias por apoyarme cuando más las necesite y porque aún siguen a mi lado;

A Maritsa; por acompañarme en este camino que ha parecido más largo de lo que fue, por ser mi amiga y compañera, por darme los abrazos que necesitaba, por regañarme cuando hice las cosas mal, por felicitarme cuando las hice bien, por no soltarme la mano aun cuando tuvo motivos para hacerlo; gracias por ser parte de mi vida y por llenarla del modo en que lo haces;

A mi tío Grimaldo; por ser como mi segundo padre, por sentirse tan orgulloso de mí como yo de él, por ser la persona que suele dar todo sin esperar nada a cambio, ojala algún día llegue a ser un tío como tu lo eres;

A Brianna Danae; por ser esa personita capaz de llenar mi vida con su sonrisa, por ser quien me motiva a ser un buen tío y sobretodo un buen padrino;

A Karin; por esas tardes con café y por las largas conversaciones sobre la vida, por sus discusiones, por sus consejos, por sus bromas, por los apodos, por las risas, por ser una de las pocas personas que pudo entenderme, por guardarme los secretos y por acompañarme en las locuras, por su increíble amistad que espero conservar durante muchos años más;

A Fernando; al amigo que se volvió como mi hermano, por esas largas conversaciones que aún solemos tener, por la complicidad tácita e inquebrantable que tenemos, por ser mi amigo por más de ocho años y por ser una de las personas que me ayudo a llegar a Brasil;

A mis grandes amigos Nathaly, Ruby y Arturo; porque aun cuando estuvieron a cientos de kilómetros de distancia siguieron presentes en mi vida;

A mis amigos y colegas (a los que partieron y a los que quedan): Karin, Ignácio, Brian, Luciana, Nicole, David, Mindy, Perla, Valker, Juan, Iván, Johanna, César, Daniel; por las reuniones y viajes espectaculares, porque espero que el tiempo y el destino nos vuelvan a reunir, en algún lugar de este mundo tan grande y pequeño a la vez, espero sentarme a la mesa con ustedes nuevamente y disfrutar nuestro reencuentro como otras tantas veces;

A mis orientadores, Prof. Michele Vitolo y Prof. Adalberto Pessoa-Jr; por todo el apoyo brindado, por corregirme cuando estaba equivocado, por darme los consejos adecuados y porque me dieron la oportunidad de crecer profesionalmente;

A la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por el Financiamiento al proyecto temático, Proceso (2013/08617-7);

A CAPES por mi bolsa de maestría.

Muchas gracias !

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
 1.- INTRODUÇÃO	 21
 2.- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 24
2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda	24
2.2. L-Asparaginase (ASNase)	26
2.3. <i>Pichia pastoris</i>	29
2.3.1. Características gerais e vantagens	30
2.3.2. Leveduras metilotróficas e álcool oxidase (AOX)	34
2.4. Proteínas periplasmáticas	38
2.5. Cinética do processo fermentativo	40
2.5.1. Curva de crescimento microbiano	41
2.5.2. Tempo de geração (tg) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$)	42
2.5.3. Fator de conversão ($Y_{X/S}$)	43
2.6. Cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator	45
2.6.1. Agitação e aeração em biorreatores	46
2.6.1.1. Coeficiente Volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)	47
2.7. Rompimento de células de <i>Pichia pastoris</i>	48
 3. OBJETIVOS	 50
3.1. Objetivo geral	50
3.2. Objetivos específicos	50
 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 52
4.1. Métodos e protocolos gerais	52
4.1.1. Micro-organismo e plasmídeo	52
4.1.2. Manutenção e reativação (pré- inóculo) da <i>P. pastoris</i>	52
4.1.3. Determinação da curva de crescimento do pré-inóculo	53
4.1.4. Quantificação de biomassa seca	53
4.1.5. Quantificação da concentração de glicerol	54
4.1.6. Construção de curva padrão de densidade ótica e massa celular seca	54
4.2. Estudos de crescimento em agitador orbital	55
4.2.1. Avaliação do crescimento de <i>P. pastoris</i> em diferentes concentrações de glicerol .	55
4.2.2. Avaliação da produção de biomassa final em diferentes concentrações de glicerol	55
4.2.3. Velocidades específicas de crescimento (μ_x)	55
4.2.4. Tempo de geração (t_g)	56
4.2.5. Fator de conversão ($Y_{X/S}$)	56
4.3. Determinação da localização da ASNase	57
4.3.1. Avaliação preliminar da indução de <i>P. pastoris</i> em diferentes temperaturas e	
concentrações de metanol	57
4.3.2. Avaliação da localização periplasmática da ASNase	57
4.3.2.1. Preparação da suspensão de células vivas de <i>P. pastoris</i>	58

4.3.2.2. Quantificação da atividade no espaço periplasmático	58
4.3.2.3. Avaliação do método de quantificação da atividade periplasmática em diferentes volumes de suspensão celular	58
4.3.3. Avaliação da localização extracelular da ASNase	59
4.3.3.1. ASNase avaliada por eletroforese em gel (SDS – PAGE)	59
4.3.4. Avaliação da localização intracelular da ASNase	59
4.3.4.1. Construção da curva de rompimento das células de <i>P. pastoris</i> com pérolas de vidro	60
4.3.4.1.1. Acondicionamento das pérolas de vidro e preparo do banho de gelo	60
4.3.4.1.2. Preparação dos sistemas de rompimento	60
4.3.4.1.3. Controle da temperatura	60
4.3.4.2. Cultivo de <i>P. pastoris</i>	61
4.3.4.3. Contagem de células intactas de <i>P. pastoris</i>	61
4.3.4.4. Quantificação das proteínas totais	63
4.3.4.5. Quantificação da atividade ASNase do meio intracelular	63
4.4. Estudos de indução da ASNase em agitador orbital	64
4.4.1. Avaliação da indução de <i>P. pastoris</i> em concentrações elevadas de metanol	64
4.4.2. Planejamento fatorial na fase de indução das condições de expressão de ASNase ...	64
4.4.3. Avaliação da expressão de ASNase em diferentes valores de pH	65
4.4.4. Avaliação da expressão de ASNase com suplementação de aminoácidos e casaminoácidos	65
4.4.5. Avaliação da influência do tempo de crescimento na expressão de ASNase	66
4.4.6. Avaliação da influência da concentração inicial de glicerol da fase de crescimento na expressão de ASNase	66
4.5. Estudos de produção de ASNase em biorreator	67
4.6. Avaliação estatística (Teste F) dos métodos de quantificação	67
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 69
5.1. Quantificação da concentração de glicerol	69
5.2. Quantificação da atividade no espaço periplasmático	71
5.3. Determinação da curva de crescimento do pré-inóculo	71
5.4. Construção da curva de correlação de densidade ótica e massa celular seca	73
5.5. Estudos de crescimento em agitador orbital	74
5.5.1. Avaliação do crescimento de <i>P. pastoris</i> em diferentes concentrações de glicerol	74
5.5.2. Avaliação da produção de biomassa final em diferentes concentrações de glicerol	78
5.5.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos $\mu_{\max}$, t_g e $Y_{x/s}$ nos ensaios de crescimento de <i>P. pastoris</i> em frascos Erlenmeyer	81
5.6. Determinação da localização da ASNase	83
5.6.1. Avaliação preliminar da indução de <i>P. pastoris</i> em diferentes temperaturas e concentrações de metanol	83
5.6.2. Avaliação da localização periplasmática da ASNase	87
5.6.2.1. Avaliação do método de quantificação da atividade periplasmática em diferentes volumes de suspensão celular	87
5.6.3. Avaliação da localização extracelular da ASNase	88
5.6.3.1. ASNase avaliada por eletroforese em Gel (SDS – PAGE)	88
5.6.4. Avaliação da localização intracelular da ASNase	89
5.6.4.1. Construção da curva de rompimento das células de <i>P. pastoris</i> com pérolas de vidro...	89
5.7. Estudos de indução da ASNase em agitador orbital	93
5.7.1. Avaliação da indução de <i>P. pastoris</i> em concentrações elevadas de metanol	93
5.7.2. Planejamento fatorial fracionado das condições de indução da ASNase	99

5.7.3. Avaliação da expressão de ASNase em diferentes valores de pH	103
5.7.4. Avaliação da expressão de ASNase com suplementação de aminoácidos e casaminoácidos	105
5.7.5. Avaliação da influência do tempo de crescimento na expressão de ASNase	108
5.7.6. Avaliação da influência da concentração de glicerol da fase de crescimento na expressão de ASNase	110
5.8. Estudos de produção de ASNase em biorreator	112
5.9. Avaliação estatística (Teste F) dos métodos de quantificação	119
6. CONCLUSÕES	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Microfotografia das células blásticas da medula óssea (A) Células saudáveis, variações na aparência celular são características de normalidade. (B) Células de paciente com LLA, blastos leucêmicos são caracterizados por sua aparência invariável.	24
Figura 2.	Incidência de LLA de acordo com a idade dos pacientes.	25
Figura 3.	Reação catalisada pela ASNase.	26
Figura 4.	Mecanismo de reação “ping pong” catalisada pela ASNase.	27
Figura 5.	Células de <i>P. pastoris</i> ao microscópio após tincão de Gram.	29
Figura 6.	Número de artigos publicados usando o sistema de expressão de <i>Pichia pastoris</i> entre os anos 1984 - 2015. Base de dados PUBMED.	30
Figura 7.	Integração de vetores de expressão dentro do genoma de <i>P. pastoris</i> . (a) Entrecruzamento Simples dentro do locus <i>his4</i> . (b) Integração do fragmento do vetor por substituição do gene <i>AOX1</i> .	32
Figura 8.	Diferença nos padrões de glicosilação das leveduras <i>P. pastoris</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	34
Figura 9.	Via de metabolismo de metanol em <i>P. pastoris</i> .	36
Figura 10.	Microfotografia de célula de <i>P. pastoris</i> crescendo em diferentes fontes de carbono.	37
Figura 11.	(a) Componentes da estrutura celular da levedura. (b) Componentes do espaço periplasmático da levedura.	40
Figura 12.	Perfis típicos de variação das concentrações dos componentes S, X, P (substrato, levedura, produto) em relação ao tempo.	41
Figura 13.	Fases da curva de crescimento do micro-organismo.	42
Figura 14.	Relação linear entre o crescimento de <i>E. coli</i> e a concentração de substrato limitante, manitol.	44
Figura 15.	Esquema do ciclo de rompimento da biomassa úmida de <i>P. pastoris</i> com pérolas de vidro.	61
Figura 16.	Esquema da Câmara de Neubauer apresentando as zonas de contagem de leveduras.	62
Figura 17.	Fundamento bioquímico das reações na determinação de glicerol através do <i>Kit Triglicéridos Liquiform Labtest</i> ®.	69
Figura 18.	Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada água pelo <i>Kit Triglicéridos Liquiform Labtest</i> ® em espectrofotômetro.	69

Figura 19.	Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada em meio BMGY novo pelo <i>Kit Triglicéridos Liquiform Labtest</i> ®.	70
Figura 20.	Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada em meio BMGY fermentado pelo <i>Kit Triglicéridos Liquiform Labtest</i> ®.	70
Figura 21.	Reação de hidroxilaminólise da L-asparagina.	72
Figura 22.	Curva de crescimento do pré-inóculo de <i>P. pastoris</i> em meio BMGY com 10,0 g.L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 36 horas.	72
Figura 23.	Curva de correlação de DO e massa celular seca de <i>P. pastoris</i> crescida em meio BMGY com 10,0 g.L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 8 horas.	73
Figura 24.	Curva de correlação de DO e massa celular seca de <i>P. pastoris</i> crescida em meio BMGY com 10,0 g.L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 8 horas e em meio BMMY 2% de metanol a 20°C, 250 rpm durante 72 horas.	74
Figura 25.	Crescimento de <i>P. pastoris</i> em função do tempo em diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	75
Figura 26.	Curva de Ln (X) de <i>P. pastoris</i> em função do tempo em diferentes concentrações de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	77
Figura 27.	Consumo de glicerol por <i>P. pastoris</i> em função do tempo em diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	77
Figura 28.	Curva de variação do pH em função do tempo do cultivo de <i>P. pastoris</i> em diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	78
Figura 29.	Concentração de biomassa de <i>P. pastoris</i> em função de diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	79
Figura 30.	Concentração de biomassa de <i>P. pastoris</i> obtidas experimental e teoricamente em função de diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.	80
Figura 31.	Concentração de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH 6.0) a 10 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25%, 0,5% e 1,0% em função do tempo e em agitador orbital.	84
Figura 32.	Concentração de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH 6.0) a 20 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25%, 0,5% e 1,0% em função do tempo e em agitador orbital.	84
Figura 33.	Concentração de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH 6.0) a 30 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25%, 0,5% e 1,0% em função do tempo e em agitador orbital.	85

Figura 34.	Concentração de biomassa seca de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH 6.0) a 10 °C, 20 °C e 30 °C, concentrações de metanol de 0,25%, 0,5% e 1,0% após 120 horas de cultivo em agitador orbital a 250 rpm.	85
Figura 35.	Atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY durante indução a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 0,25%, 0,5% e 1,0%.	86
Figura 36.	Curva padra de correlação de Atividade periplasmática de ASNase e biomassa seca de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3,0% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g.L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 8 horas.	88
Figura 37.	Eletroforese SDS-PAGE dos meios de cultivo de <i>Pichia pastoris</i> em diferentes temperaturas de indução em meio BMMY a 250 rpm e 1,0% de metanol durante 120 horas.	89
Figura 38.	Controle de temperatura durante o rompimento das células de <i>P. pastoris</i> . Temperatura dos sistemas depois da etapa de resfriamento e Temperatura dos sistemas depois da etapa de agitação.	91
Figura 39.	Curva de rompimento de células de <i>P. pastoris</i> . Cada ciclo consta de 30 segundos de agitação a 3000 rpm e 60 segundos de resfriamento em banho de gelo a -10°C.	92
Figura 40.	Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol e variação do pH do cultivo de <i>P. pastoris</i> em meio BMGY 10 g.L ⁻¹ de glicerol, a 30°C e 250 rpm.	93
Figura 41.	Crescimento de <i>P. pastoris</i> em meio BMGY-BMMY (pH não ajustado) a 30°C-20°C, 250 rpm e concentrações de metanol de 1%, 2% e 3%.	94
Figura 42.	Atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH não ajustado) durante indução com metanol a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 1%, 2% e 3%.	95
Figura 43.	Crescimento de <i>P. pastoris</i> em meio BMGY-BMMY (pH 6,0) a 30°C-20°C, 250 rpm e concentrações de metanol de 1%, 2% e 3%.	96
Figura 44.	Atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> em meio BMMY (pH não ajustado) durante indução com metanol a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 1%, 2% e 3%.	96
Figura 45.	Atividade volumétrica da ASNase de <i>P. pastoris</i> produzida em meio BMMY (pH 6.0) a 20°C, 250 rpm em diferentes concentrações de metanol durante 144 horas de cultivo.	97
Figura 46.	Diagrama de Pareto na análise da concentração de biomassa seca (g.L ⁻¹), considerando o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios.	100
Figura 47.	Diagrama de Pareto na análise da Atividade Periplasmática (U.g ⁻¹), considerando o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios.	100

Figura 48.	Superfície de resposta na análise da concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) frente à interação Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)/MeOH(%) no planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios.	101
Figura 49.	Superfície de resposta na análise da atividade periplasmática (U.g^{-1}) frente à interação MeOH (%) / Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios.	102
Figura 50.	Superfície de resposta na análise da atividade periplasmática (U.g^{-1}) frente à interação Tempo de indução (h)/Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios.	102
Figura 51.	Biomassa seca e atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY em diferentes valores de pH a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.	104
Figura 52.	Atividade volumétrica de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY em diferentes valores de pH a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.	105
Figura 53.	Biomassa seca e atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) com diferentes suplementos de aminoácidos e casaminoácidos a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.	106
Figura 54.	Atividade volumétrica de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) com diferentes suplementos de aminoácidos e casaminoácidos a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.	107
Figura 55.	Biomassa seca e Atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após diferentes tempo de crescimento em meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol.	108
Figura 56.	Atividade volumétrica de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após diferentes tempo de crescimento em meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol.	109
Figura 57.	Biomassa seca e Atividade periplasmática de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em diferentes concentrações iniciais de glicerol em meio BMGY.	111
Figura 58.	Atividade volumétrica de ASNase de <i>P. pastoris</i> induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C , 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em diferentes concentrações iniciais de glicerol em meio BMGY.	112

Figura 59.	Comportamento de <i>P. pastoris</i> em biorreator <i>New Brunswick Bioflo</i> [®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm.	113
Figura 60.	Comportamento de <i>P. pastoris</i> em biorreator <i>New Brunswick Bioflo</i> [®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 40,0 g L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm.	114
Figura 61.	Comportamento de <i>P. pastoris</i> em biorreator <i>New Brunswick Bioflo</i> [®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução.	115
Figura 62.	Comportamento de <i>P. pastoris</i> em biorreator <i>New Brunswick Bioflo</i> [®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 40,0 g L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Nomes e características genéticas das cepas comerciais de <i>P. pastoris</i> .	33
Tabela 2.	Componentes do meio YPD* (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose medium</i>).	52
Tabela 3.	Componentes do meio BMY* (<i>buffered complex médium</i>).	53
Tabela 4.	Fatores e níveis do desenho estatístico fracionado $3^{k-1}+2$.	65
Tabela 5.	Parâmetros da cinética de crescimento de <i>P. pastoris</i> em meio BMGY pH 6,0 a 30°C e 250 rpm em função da concentração de glicerol. A velocidade específica máxima (μ_{max}), tempo de geração (t_g) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$).	82
Tabela 6.	Parâmetros da cinética de crescimento e produção de ASNase do cultivo de <i>P. pastoris</i> em biorreator <i>New Brunswick Bioflo</i> ® 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 e 40,0 g L ⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução.	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AOX	Álcool oxidase
ARN	Ácido Ribonucleico
ASNase	L-asparaginase
AT	Azul de tripano
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex medium</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex medium</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
Da	Daltons
DO	Densidade ótica
EC	Enzyme commission
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FAD	Flavina adenina dinucleótideo
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HIS4	Histidinol desidrogenase
k_La	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio
k_M	Constante de Michaelis-Menten
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
Mut⁻	Sem crescimento em metanol
Mut⁺	Crescimento em metanol
Mut^s	Crescimento lento em metanol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótideo reduzido
OD	Oxigênio dissolvido
OTR	<i>Oxygen transference rate</i>
OUR	<i>Oxygen uptake rate</i>
Pep4	Enzima vacúolo peptidase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
rpm	Rotações por minuto
SCP	<i>Single cell protein</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TP	Tampão de lise
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
U	Unidade internacionais de atividade enzimática
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

RESUMO

PILLACA-PULLO, O. S. **Produção de L-Asparaginase (ASP3) de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris***. 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A enzima L-asparaginase (ASNase) usada como biofármaco no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é de origem bacteriana, o que provoca reações imunológicas nos paciente e a ASNase usada no Brasil é importada o que dificulta seu uso por razões de abastecimento e de preço. Por outra parte, dentro dos sistemas de expressão de proteínas recombinantes usados pela biotecnologia, destaca-se a *Pichia pastoris*, levedura metilotrófica de fácil manipulação, crescimento rápido, alta capacidade de expressão e capaz de realizar modificações pós-traducionais. Neste projeto, o gene de ASNase II de *Saccharomyces cerevisiae* foi expressa em *P. pastoris* (Mut^s), tendo sido analisada a localização da enzima nos meios extracelular, intracelular e espaço periplasmático. Além disso, foram avaliadas diversas condições de crescimento e indução da ASNase em agitador orbital e finalmente foi feito o cultivo em biorreator de 3L operado em batelada. Segundo o análise da expressão, a enzima foi localizada no espaço periplasmático. O crescimento de *P. pastoris* em diferentes concentrações de glicerol (10,0 - 50,0 g.L⁻¹) mostraram parâmetros cinéticos similares ($\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$; $t_g = 2,0 \text{ h}$) e o maior fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s} = 0,9 \text{ g g}^{-1}$) foi obtido com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol. A expressão de ASNase somente ocorreu a 20 °C e melhora com concentrações de metanol acima de 1,0% (v/v), obtendo-se a maior produção da enzima a 3% de metanol durante 48 horas, o que foi corroborado pelo planejamento fatorial fraccionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. Também se observou que o pH de indução, a suplementação com aminoácidos ou casaminoácidos e concentração de glicerol durante a fase de crescimento apresentaram pouca ou nenhuma influência na expressão. Entretanto, as células induzidas imediatamente após o glicerol ter sido consumido melhoraram a produção de ASNase. No cultivo em biorreator, a fase de crescimento foi feita com 10,0 e 40,0 g.L⁻¹ de glicerol, e a fase de indução com pulsos de 3,0% (v/v) de metanol durante 120 horas. A maior atividade volumétrica (710,2 U.L⁻¹) de ASNase foi obtida na batelada com 40,0 g.L⁻¹ de glicerol e a atividade periplasmática foi constante durante o tempo de cultivo o que significa que o controle do pH afeta positivamente na expressão de ASNase.

Palavras Chave: L-asparaginase, *Pichia pastoris*, leucemia linfoblástica aguda.

ABSTRACT

PILLACA-PULLO, O. S. **Production of L-Asparaginase (ASP3) from *Saccharomyces cerevisiae* expressed in *Pichia pastoris***. 2016. 135 p. Thesis (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The bacterial L-asparaginase (ASNase) is used as biopharmaceutical in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and non-Hodgkin lymphoma and because his origin causes immune reactions in patients. The ASNase used in Brazil is imported which hinders its use due to supply availability and price. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, is a microorganism easy to handle and with fast growth and high capacity of expression of recombinant proteins and that is able to carry out post-translational modifications. In this work, *Saccharomyces cerevisiae* ASNase II gene was expressed in *Pichia pastoris* (Muts) and was analyzed its localization in extra and intracellular medium and periplasmic space. Also, different conditions of growth and induction were evaluated in shaker, that culminated in a cultivation carried out in 3L bioreactor operated in batch. According the expression analysis, the enzyme was localized in periplasmic space; *Pichia pastoris* growth in different concentrations of glycerol (10 - 50 g.L⁻¹) show similar kinetic parameters ($\mu_{\text{máx}} = 0.35 \text{ h}^{-1}$; $t_g = 2.0 \text{ h}$), with the higher substrate to biomass yield ($Y_{x/s} = 0.9 \text{ g.g}^{-1}$) obtained with 10 g.L⁻¹ of glycerol. The ASNase expression only occurred at 20°C and improves with methanol concentrations above 1.0% (v/v) to yield the highest production ASNase 3.0% methanol for 48 hours, which was corroborated by factorial fractionated design ($3n-k+2$), $n = 3$ and $k = 1$. Also was observed that the pH of induction, supplementation with amino acids or casaminoacids and glycerol concentration during the growth phase had little or null influence on the expression. However the induction immediately after glycerol depletion improved the ASNase production. In bioreactor, were used 10 and 40 g.L⁻¹ of glycerol in the growth phase and in the induction phase were used methanol pulses of 3.0% (v/v) during 120 hours. The major volumetric activity (710,2 U.L⁻¹) of ASNase occurred in batch cultivation with 40 g.L⁻¹ of glycerol and periplasmic activity was almost constant during the process which means that the control of pH affects positively the ASNase expression.

Keywords: L-asparaginase, *Pichia pastoris*, acute lymphoblastic leukemia.

1. INTRODUÇÃO

Leucemia é um tipo de neoplasia que afeta as células progenitoras hematopoéticas da medula óssea encarregadas de dar origem aos eritrócitos (transporte de oxigênio), leucócitos e plaquetas do sangue. Estas células têm a função de transportar oxigênio, defender o organismo contra lesões de infecção e formação de coágulos de sangue, respectivamente (TESTÓN, 2011). A maior parte dos casos de leucemias requer dois eventos: predisposição genética (geralmente desconhecida) e uma causa precipitante (fatores ambientais, como a exposição a pesticidas, metais pesados, drogas, etc.) (MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ, 2010). Segundo o progenitor hematopoiético afetado e o tempo de doença, há quatro tipos de classificação: leucemia linfoblástica aguda (LLA); leucemia mielóide aguda; leucemia linfoblástica crônica; leucemia mielóide crônica (TESTÓN, 2011). A forma aguda é caracterizada pelo aumento rápido de células imaturas do sangue, incapacitando à medula óssea de produzir células sanguíneas saudáveis. No entanto, a forma crônica envolve aumento excessivo de células maduras anormais, levando meses ou até anos para progredir (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). A LLA é a mais comum (80% do total), seguida da leucemia mielóide aguda (~15%) (MINISTERIO DE SALUD DE CHILE, 2010). No Brasil, no ano 2016, estima-se atingir 10070 casos novos de leucemia o que corresponde a um risco estimado de 9,74 casos novos a cada 100 mil pessoas (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

ASNase é uma enzima utilizada como agente quimioterapêutico no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e linfoma não Hodgkin (FERRARA et al., 2006; MULLER; BOOS, 1998). CLEMENTI (1922) observou alta concentração de ASNase no soro de cobaia e KIDD (1953) foi o primeiro em observar a atividade antineoplásica. Estudos posteriores demonstraram que a atividade terapêutica não foi eficiente em outros tipos de câncer, e que não se apresentava no soro de outros animais como cavalo e coelho (SHRIVASTAVA et al., 2016). A prática terapêutica comum é a injeção intravenosa da enzima livre (MITCHELL et al., 1994). Como as células leucêmicas precisam grandes quantidades de L-asparagina disponível para manter seu crescimento maligno (ALI et al., 2016), uma vez injetada na corrente sanguínea a enzima ASNase depleta as reservas de L-asparagina do plasma deixando as células tumorais sem o aminoácido. As células normais não

são afetadas pela ASNase porque a asparagina necessária para a síntese proteica é produzida no citoplasma pela ação da enzima asparagina sintetase (LOUREIRO, 2010). Dita enzima encontra-se silenciada geneticamente nas células tumorais razão pela qual são forçadas a obter o aminoácido da corrente sanguínea (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). O desbloqueio do gene que codifica asparagina sintetase é suficiente para as células tumorais tornarem-se resistentes ao tratamento com ASNase (ASLANIAN; KILBERG, 2001; RICHARDS; KILBERG, 2006).

Embora, a viabilidade do cultivo de *E. coli* em larga escala tenha possibilitado a produção de ASNase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007) e esta seja muito utilizada; as ASNases de origem bacteriana estão associadas com efeitos secundários como anafilaxia, dor, edema de Quincke, urticaria, eritema, rash e prurito (PANOSYAN et al., 2004) o que se complica quando é administrada sem a terapia imunossupressora adequada. Estes problemas requerem o desenvolvimento de ASNase de fontes alternativas (SHRIVASTAVA et al., 2012) como a utilização de ASNase de origem eucariótica (leveduras e fungos filamentosos) que podem apresentar reações alérgicas de menor intensidade, devido às propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e estão ausentes nos seres procarióticos (SARQUIS et al., 2004).

Assim, *Pichia pastoris* é uma levedura usada como sistema para expressão de proteínas recombinantes porque combina as vantagens de ser facilmente manipulada, com crescimento rápido, com capacidade de gerar modificações proteicas pós-traducionais semelhantes às células de mamíferos (processos proteolíticos, dobramento, formação de pontes dissulfeto, glicosilações e processamento de sequência sinal) assim como de excreção das proteínas recombinantes (FELBER; PICHLER; RUTH, 2014). Não apresenta compostos pirogênicos nem agentes oncogênicos e virais e proporciona altos níveis de expressão, pois possui forte agente indutor, o metanol (ANDRADE et al., 2000; CALIK et al., 2010a; CREGG et al., 2000; KATO et al., 2013; SHI et al., 2003). Outra razão para o uso como sistema de expressão é a capacidade para crescer em diferentes fontes de carbono, incluindo metanol, em meio quimicamente definido (MACAULEY-PATRICK et al., 2005), além que a capacidade para crescer em metanol serve para expressar as proteínas e atingir culturas de elevada densidade celular (CREGG et al., 2000).

Estas características são importantes desde que a biotecnologia esteja envolvida em aproximadamente 40% dos produtos do mercado farmacêutico mundial (SPADIUT et al., 2014). No entanto, a produção de proteínas recombinantes é um mercado de bilhões de dólares que compreende produtos biofarmacêuticos e enzimas industriais. A venda global de proteínas biofarmacêuticas atingiu US\$ 87 bilhões no ano 2008 (WEINACKER et al., 2013), uns US\$ 120 bilhões no ano 2012 (BUTLER; MENESES-ACOSTA, 2012), uns US\$ 170 bilhões no ano 2014 (SPADIUT et al., 2014) e como o crescimento anual esperado está entre 7 e 15% (VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013), para o ano 2016 espera-se cifra próxima a US\$ 200 bilhões. Por sua parte, diversos produtos farmacêuticos e enzimas produzidas por *P. pastoris* já estão no mercado ou em fase de teste, incluindo albumina sérica humana, antígeno da hepatite B, fator de crescimento epidermal (EGF) e a enzima fitase (CEREGHINO; CREGG, 2000), sendo que o primeiro produto biofarmacêutico produzido em *P. pastoris* (*Kalbitor by Dyax Corp., a Kallikrein inhibitor*[®]) foi aprovado pela FDA no ano 2013 (VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013). No entanto, outras proteínas estão sendo produzidas e estudadas para o tratamento de doenças como a diabetes, câncer, HPV (*Human papillomavirus*) e aterosclerose; atingindo em alguns casos, melhor funcionalidade e rendimento com menor custo do que outros sistemas de expressão (WEINACKER et al., 2013).

Neste contexto, o presente trabalho é parte do projeto temático “Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco antileucêmico” o que esta financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e tem como proposta principal o desenvolvimento de um biofarmaco produzido nacionalmente com melhores aspectos de biodisponibilidade, estabilidade, toxicidade e alergenicidade com respeito às formulações bacterianas. Assim, neste trabalho é feito o desenvolvimento de um bioprocesso que resulte na produção recombinante da enzima ASNase de *S. cerevisiae* usando o sistema de expressão *P. pastoris* com a finalidade de fornecer nova alternativa de produção para o biofármaco ASNase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A LLA é o câncer das células precursoras (linfoblastos) que afeta a medula óssea e/ou sangue periférico (RAFAEL et al., 2011) (Figura 1). Os sintomas mais comuns são: dor óssea; síndrome de anemia (palidez, taquicardia, astenia, fadiga); trombocitopenia (petéquias, hemorragias); neutropenia (infecções) e organomegalia (hepatoesplenomegalia) (RAFAEL et al., 2011). De acordo com as características físicas e o nível de desenvolvimento das células leucêmicas, a LLA é classificada em dois subtipos: leucemia linfoblástica de células B e leucemia linfoblástica de células T. Esta classificação permite melhor orientação sobre o tratamento mais adequado para o paciente (LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2014).

Figura 1. Microfotografia das células blásticas da medula óssea (a) Células saudáveis, variações na aparência celular são características de normalidade. (b) Células de paciente com LLA, blastos leucêmicos são caracterizados por sua aparência invariável. (*Leukemia and Lymphoma Society*, 2014).

LLA é principalmente uma doença pediátrica, tem pico de incidência máxima entre os 2 e 5 anos de idade (LOZANO, 2002; ORTEGA et al., 2008) o que corresponde a 25,0% de todos os cânceres em crianças nessa faixa etária (CABRAL et al., 2012). Estima-se incidência mundial aproximada de 10-50 casos por milhão de pessoas por ano (INSTITUTO DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS, 2013), sendo nos EUA a incidência de LLA, em média,

32 casos por milhão de pessoas (MINISTERIO DE SALUD DE CHILE, 2010). No Brasil, a cidade de Fortaleza apresenta quase o dobro da taxa de São Paulo (28 e 15,9 por milhão, respectivamente) e o triplo quando comparado a Recife (9,2 por milhão). Em Ribeirão Preto, a incidência estimada através de dados hospitalares é de 25,5 casos por milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (HOSPITAL DE CANCER DE BARRETOS, 2016). Esta doença também é mais comum em homens que em mulheres, assim como em caucasianos do que em afro-americanos (FAUCI et al., 1998). Em relação às áreas geográficas, há evidências de aumento da incidência de LLA na população de norte e oeste da Europa, Norte de África e Oceania (ORTEGA et al., 2008).

Figura 2. Incidência de LLA de acordo com a idade dos pacientes. [Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Statistical Research and Applications Branch, atualizado em abril de 2013].

Por outra parte, a LLA evoluiu de doença mal definida e intratável na metade do século passado para doença que está entre as mais entendidas e as mais curáveis no início deste século (PEDROSA; LINS, 2002). A taxa de cura de crianças com LLA atingiu cerca de 80% em muitos países desenvolvidos (GAO et al., 2013). Esse sucesso foi obtido não só pelo melhor conhecimento da doença e a introdução de novas drogas com protocolos terapêuticos adequados, senão principalmente ao melhor tratamento de suporte (PEDROSA; LINS, 2002).

No entanto, no Brasil (entre 2000 e 2005), a sobrevida relativa em cinco anos de leucemia infantil foi de 70% (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Os protocolos de tratamento geralmente incluem: a) terapia de indução, incluindo combinações de drogas entre as quais estão principalmente: vincristina, prednisona, ciclofosfamida, doxorrubicina, e ASNase; b) terapia de consolidação: citarabina e metotrexato; c) terapia de manutenção: 6-mercaptopurina, vincristina, metotrexato e prednisona e d) profilaxia do SNC (LAMANNA et al., 2013).

2.2. L-Asparaginase (ASNase)

ASNase [EC 3.5.1.1] catalisa a hidrólise da L-asparagina a ácido L-aspártico e amônia (DUNLOP; ROON, 1975; FISHER; WRAY, 2002; WARANGKAR; KHOBRADE, 2010). Mais especificamente, está envolvida na hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido, por esta razão também é denominada L-asparagina amino hidrolase (LOUREIRO, 2010).

Figura 3. Reação catalisada pela ASNase. (Modificado de NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

A transformação pela ASNase envolve mecanismo tipo “*ping pong*” no qual o grupo nucleofílico da enzima ataca o substrato asparagina formando um intermediário tetraédrico que subsequentemente se decompõe para formar um intermediário acil-enzima, seguido pela eliminação de amônia. Um segundo nucleófilo (comumente água), ataca este intermediário, transformando-o em ácido aspártico e enzima livre regenerada (EHRMAN; CEDAR; JAMES, 1971; RÖHM; VAN ETEN, 1986).

Figura 4. Mecanismo de reação “ping pong” catalisada pela ASNase (Modificado de SHRIVASTAVA et al., 2016).

O tratamento de LLA com ASNase esgota as reservas de L-asparagina causando inanição seletiva das células tumorais susceptíveis provocando inibição da maturação do precursor de ARN do ribossomo e transcrição do ARNr provocando redução da síntese de asparaginil ARNt, o que limita a síntese de peptídeos (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2015). A depleção de L-asparagina também provoca retardamento da biossíntese dos nucleotídeos e prolonga a fase S do ciclo celular (ELLEM; FABRIZIO; JACKSON, 1970) e bloqueia as células cancerosas na fase G1 do ciclo celular, antes da degradação de ADN (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2015). Por outra parte, os íons de amônia ingressam no citoplasma por difusão e modificam o pH, que leva à ativação do sinal de transdução associado à rota de fosforilação de substratos e apoptose (UENO et al., 1997).

Porém, a terapia com ASNase é associada com efeitos colaterais como leucopenia, crises neurológicas, anafilaxia, alterações da coagulação, pancreatites, etc. Outra limitação é que o sistema imune do paciente pode reagir contra o medicamento por diferentes formas, incluindo depressão do gene de asparagina sintetase, produção de anticorpos específicos contra a enzima, inativação de caspase 3 ou PARP [poli(ADP-ribose)polimerase] e produção de glutamina em grandes quantidades pelos adipócitos (ALI et al., 2016).

Fatores importantes para o uso da enzima inclui alta afinidade pelo substrato asparagina (baixo valor de k_M), ausência de efeitos colaterais, ausência de complicações imunogênicas e baixo *clearance* da enzima no plasma (prolongada vida média) com o fim de minimizar a frequência necessária de administração (NAGARETHINAM et al., 2012; PARMENTIER et al., 2015). Também foi sinalada a importância de evitar a atividade glutaminase. Porém, PARMENTIER et al., (2015) mostraram evidência que a atividade

glutaminase de ASNase é essencial para a toxicidade em células leucêmicas. Por exemplo, ASNase de fontes bacterianas contem até 10% de atividade glutaminase (ALI et al., 2016). Baseados na sequência, estrutura e homologia funcional existem três grandes famílias de ASNase: i) bacterianas, também chamadas de tipo I e tipo II, ii) tipo planta, também chamada tipo III e iii) semelhantes a ASNase de *Rhizobium elti* (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). A ASNase bacteriana tipo I é citoplasmática e a tipo II é periplasmática, e em *Escherichia coli* estas possuem os mesmos motivos de aminoácidos conservados, mas diferem na sua estrutura quaternária (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2015). As ASNases produzidas por certas leveduras têm sequências de aminoácidos muito semelhantes à família bacteriana do tipo II (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta dois tipos de ASNase (semelhante à *E. coli*): 1) ASNase I, enzima constitutiva intracelular codificada pelo gene ASP1; 2) ASNase II, enzima periplasmática, codificada pelo gene ASP3 e dependente da fonte de nitrogênio (DUNLOP; ROON, 1975). A ASNase II de *S. cerevisiae* tem sido expressa em *Pichia pastoris* e a massa molecular estimada da enzima foi 136 kDa, ponto isoelétrico 4,5, temperatura ótima 46 °C e pH 7,2 (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016).

Por outra parte, a busca de novas fontes potenciais de ASNase é fato importante já que aumenta a disponibilidade do biofármaco para a população e permite contar com um sistema de contenção frente a sucessos inesperados de desabastecimento. Em 2013, o Laboratório Bagó suspendeu a produção de Elspar[®] (ASNase de *Escherichia coli*) comercializado no Brasil (FOLHA SP, 2013a) desestabilizando o sistema de saúde brasileiro e levando o estado a investir na pesquisa e desenvolvimento necessário para atingir a produção nacional de tecnologias biofarmacêuticas a fim de evitar a dependência de importação do medicamento. Assim, a produção de ASNase será feita pelo Instituto Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) em parceria com laboratórios internacionais NT Pharma (China) e United Biotec (EUA) (FOLHA SP, 2013b). Portanto, termina sendo imprescindível continuar a pesquisa em ASNase e em outros tipos de biofármaco, com o fim de evitar a dependência de importação de este tipo de medicamentos no país. Assim é necessário investir em todas as áreas do conhecimento (bioprocessos, biologia molecular, nanotecnologia, etc) relacionadas com o desenvolvimento de estes produtos biotecnológicos.

2.3. *Pichia pastoris*

Pichia é um gênero que pertence à família *Saccharomycetaceae*, ordem *Saccharomycetales*, classe *Saccharomycetes*, filo *Ascomycota* e reino *Fungi* (POUTOU et al., 2005a) e é um organismo anaeróbio facultativo.

Figura 5. Células de *P. pastoris* ao microscópio após tinção de Gram.

P. pastoris é uma levedura utilizada desde 1984 como sistema para expressão de proteínas recombinantes, possuem entre 50-75% de probabilidade de expressão (HIGGINS; CREGG, 1998) e capacidade intrínseca para expressar genes sem necessidade de otimização (CEREGHINO; CREGG, 2000). É um hospedeiro eficiente e de baixo custo utilizado para produzir elevados níveis de proteínas heterólogas (LIN-CEREGHINO et al., 2006). Por esta razão é cada vez mais utilizado no campo da biotecnologia acadêmica e industrial (COS et al., 2005) sendo o segundo sistema mais utilizado para a expressão heteróloga após a bactéria *Escherichia coli* (SØRENSEN, 2010), atualmente ao redor de 550 proteínas heterólogas foram produzidas com sucesso usando *P. pastoris* (LIN-CEREGHINO et al., 2006). O sucesso do sistema na expressão e produção de proteínas heterologas pode ser observado com o incremento anual do número de publicações científicas (Figura 6).

Figura 6. Número de artigos publicados usando o sistema de expressão de *Pichia pastoris* entre os anos 1984 - 2015. Base de dados PUBMED.

A história da levedura *P. pastoris* inicia com a produção de SCP (*Single Cell Protein*) pela *Phillips Petroleum* quem foi responsável de definir os meios e protocolos adequados para o cultivo da levedura em metanol (*Phillips Petroleum Company Licesing*, 1986). Na década de 1990, o Instituto Salk de Biotecnologia / Industriais Associates, Inc. (*Sebia, La Jolla, CA, EUA*), realizou estudos de tipo biológico em *P. pastoris*, e avaliou a possibilidade de desenvolvê-la como sistema de expressão de proteínas heterólogas. Os pesquisadores de Sebia isolaram genes e promotores eficazes para a expressão de proteínas heterólogas, construíram vectores, linhagens e protocolos para manipulação genética da levedura. Em 1993, *Phillips Petroleum* cedeu a patente da *P. pastoris* como sistema de expressão de proteínas heterólogas à *Research Corporation Technologies*, RCT (Tucson, AZ) e outorgou a licença à empresa *Invitrogen Corporation* para comercializar com os componentes do sistema (CEREGHINO; CREGG, 2000).

2.3.1. Características gerais e vantagens

Este micro-organismo eucarioto tem crescimento rápido (tempo de geração entre 2-3 horas), com capacidade de gerar modificações proteicas pós-traducionais semelhantes às células de mamíferos (processos proteolíticos, dobramento, formação de pontes dissulfeto, glicosilações e processamento de sequência sinal) assim como de excreção das proteínas

recombinantes (COS et al., 2005). É um micro-organismo facilmente adaptável à fermentação em larga escala, atingindo os níveis de expressão que não são frequentemente obtidos com outros tipos de células (CREGG et al., 1993).

Outros fatores que permitiram firmar a levedura *P. pastoris* como um dos sistemas clássicos de expressão de proteínas heterólogas, mais adequada até que o *Saccharomyces cerevisiae*. As características são (CEREGRINO et al., 2002):

- A *P. pastoris* é um micro-organismo fácil de manipular e cultivar. As técnicas de manipulação genética são similares às utilizadas em *S. cerevisiae*;
- Por ser um micro-organismo haploide qualquer modificação genética é manifestada fenotipicamente em gerações posteriores;
- É uma levedura com metabolismo principalmente respiratório, o que facilita o crescimento até atingir altas densidades celulares, comparada com leveduras fermentadoras;
- São obtidos elevados níveis de expressão de proteínas heterólogas intra e extracelulares com uso de meios simples e de baixo custo;
- Não secretar proteínas nativas ao meio extracelular, facilitando os processos de recuperação e purificação (*Downstream*);
- Não produz fenômenos de hiperglicosilação das proteínas, o que a diferencia de *S. cerevisiae*, diminuindo com isto as respostas imunogênicas dos organismos onde serão usados.

Em referência à manipulação genética, segundo HIGGINS; CREGG, (1998), os vetores lineares geram transformantes estáveis de *P. pastoris* por meio da recombinação homologa entre as sequências compartilhadas pelo vetor e o genoma do hospedeiro. Todos os vetores carregam pelo menos um segmento de ADN de *P. pastoris* (fragmentos do promotor do AOX1 ou GAP) com um sítio de restrição que pode ser clivado e usado para dirigir o vetor para se-integrar dentro do genoma do hospedeiro mediante entrecruzamento simples (Figura 7a). Os vetores contêm o gene HIS4 de *P. pastoris* que pode ser dirigido para ser integrado dentro do locus genômico his4. Por outro lado, os vetores com sequências 3'AOX1 podem ser integradas dentro do genoma de *P. pastoris* por entrecruzamento simples em qualquer loci AOX1 ou HIS4 mediante substituição do gene (Inserção Ω) em AOX1 (Figura 7b). Esse

último evento surge do entrecruzamento tanto nas regiões do promotor AOX1 e 3'AOX1 do vetor e genoma, e resulta na deleção da região que codifica o AOX1 (substituição do gene). Os transformantes resultantes do evento de substituição do AOX1 são fenotipicamente His⁺ e Mut^s.

Figura 7. Integração de vetores de expressão dentro do genoma de *P. pastoris*. (a) Entrecruzamento Simples dentro do locus *his4*. (b) Integração do fragmento do vetor por substituição do gene AOX1 (HIGGINS; CREGG, 1998).

Devido ao aumento do interesse na aplicação, novas ferramentas genéticas para *P. pastoris* têm sido desenvolvidas e, portanto, a disponibilidade de novas cepas têm intensificado a necessidade de projeto sistemático de processos de cultivo e de produção com esta levedura (LOOSER et al., 2014). Existem cepas comerciais dos diferentes fenótipos da levedura. Todas as cepas comerciais de *P. pastoris* derivam da NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*, Peoria, IL). As linhagens mais amplamente utilizadas para a expressão de proteínas heterólogas são as cepas GS115, KM71 e X-33 (HIGGINS; CREGG, 1998).

Tabela 1. Nomes e características genéticas das cepas comerciais de *P. pastoris*.

<i>Cepa</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Referência</i>
GS 115	his4	Mut ⁺ His ⁻	Higgins; Cregg
X-33	Wt (GS115 revertida*)	Mut ⁺ His ⁺	Higgins; Cregg
KM71	aox1 Δ ::SARG4 his4 arg4	Mut ^s His ⁻	Higgins; Cregg
KM71H	aox1 Δ ::SARG4 arg4	Mut ^s His ⁺	TermoFisher®
KM7121	aox1 Δ ::SARG4 aox2 Δ ::Phis4 his4 arg4	Mut ⁻ His ⁻	Higgins; Cregg
MC100-3	aox1 Δ ::SARG4 aox2 Δ ::Phis4	Mut ⁻ His ⁻	Higgins; Cregg
SMD 1168	pep4 Δ his4	Mut ⁺ His ⁻ Protease ⁻	Higgins; Cregg
SMD 1168H	pep4	Mut ⁺ His ⁺ Protease ⁻	TermoFisher®
SMD 1165	prb1 his4	Mut ⁺ His ⁻ Protease ⁻	Higgins; Cregg
SMD 1163	pep4 prb1 his4	Mut ⁺ His ⁻ Protease ⁻	Higgins; Cregg

*A cepa X-33 deriva da GS115 na que se recuperou a funcionalidade do gene HIS4 pela transformação com o vetor pPIC9K.

No que se refere aos processos de glicosilação, *P. pastoris* assim como outras leveduras e fungos adiciona O-oligossacarídeos nos grupos hidroxila de serina e treonina das proteínas secretadas. As cadeias glicosiladas somente são compostas de resíduos de manose, diferente das células eucarióticas que possuem composição de açúcar mais variada (CEREHINO; CREGG, 2000; HÉLÈNE et al., 2001). Porém, a glicosilação faz as proteínas recombinantes mais parecidas com as humanas, pelo menos em tamanho, quando comparadas com aquelas obtidas por outro sistema de expressão como é o caso de *S. cerevisiae*.

Figura 8. Diferença nos padrões de glicosilação das leveduras *P. pastoris* e *S. cerevisiae* (Adaptação de *New England Biolabs*® INC, 2015).

O comprimento máximo das cadeias de oligossacarídeo adicionadas por *P. pastoris* não excede os trinta resíduos de manose, ao contrário de *S. cerevisiae* que tende a hiperglicosilar as proteínas, adiciona entre 50 e 150 resíduos de açúcar (Figura 8) (CEREGHINO; CREGG, 2000). Além disso, *P. pastoris* não contém a enzima responsável pela formação de resíduos α -1,3-manose, principal causa da natureza antigênica de glicoproteínas expressas em *S. cerevisiae* e que impedem a sua utilização para fins terapêuticos (CREGG et al., 1993).

2.3.2. Leveduras metilotróficas e álcool oxidase (AOX)

OGATA; NISHIKAWA; OHSUGI, (1969) descobriram a capacidade de certas leveduras de utilizar o metanol como fonte de carbono e energia. As leveduras metilotróficas descritas pertencem a quatro gêneros: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* e *Torulopsis* (FABER et al., 1995; TANI, 1978).

Segundo SERRANO (2001), o metabolismo em leveduras metilotróficas é muito diferente do metabolismo das bactérias metilotróficas principalmente por que: i) As leveduras tem álcool oxidases, em vez de metanol desidrogenases, ii) parte do metabolismo do metanol é compartimentalizado dentro do peroxissomo, iii) As leveduras geram energia via oxidação do NADH enquanto as bactérias o fazem por acoplamento com a cadeia de transporte de elétrons. Ademais, as leveduras metilotróficas possuem características mais favoráveis que as bactérias metilotróficas para aplicação à tecnologia SCP (*Single Cell Protein*), como: células de tamanhos maiores que facilitam sua recuperação; baixo teor de ácidos nucleicos; alto conteúdo de vitaminas; lipídios; hidratos de carbono e aminoácidos essenciais tais como a

lisina, triptofano ou metionina. Além disso, possuem capacidade de crescer em pH (3-5), o que dificulta a contaminação.

Como foi mencionada anteriormente a enzima Álcool oxidase (AOX), é responsável pelo metabolismo do metanol nas leveduras metilotróficas. Esta enzima AOX possui tamanho molecular aproximado de 600 kDa, e está composta por oito subunidades agrupadas em dois tetrameros (VAN DIJKEN; OTTO; HARDER, 1976). Cada subunidade contém uma ligação não covalente com o cofator FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) (CREGG; MADDEN, 1988), pelo qual a ativação do AOX requer aumento na síntese de FAD⁺ (POUTOU et al., 2005a). A AOX possui baixa afinidade por seus substratos (metanol e oxigênio) fato que é compensado com o aumento na velocidade de síntese da enzima (CREGG; MADDEN, 1989). A concentração da enzima pode atingir até 30% da proteína solúvel total da célula (CREGG et al., 1993; VEENHUIS et al., 1983).

A completa oxidação do metanol em CO₂ e H₂O inclui tanto vias de assimilação (biossínteses de material celular) como vias de não assimilação (geração de energia) (SERRANO, 2001). A capacidade de oxidar metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio é conferida pela enzima álcool oxidase (AOX) que pode ser codificada pelos genes da álcool oxidase 1 e 2 (AOX1 e AOX2). Estes genes são regulados e induzidos pela presença do metanol no meio de cultivo. Ao redor de 85% da atividade de AOX é regulada pelo gene AOX1, enquanto que o gene AOX 2 regula os restantes 15% (ELLIS et al., 1985). Os genes AOX1 e AOX2 são regulados de modo semelhante, o produto de cada gene é a mesma enzima e se localiza dentro do peroxissomo pelo qual a presença de dois genes parece não ter sido adequadamente justificada (CREGG; MADDEN, 1989).

Outros gêneros de levedura metilotrófica, como *H. polymorpha* ou *C. boidinii*, tem um único gene que codifica a enzima álcool oxidase, ou seja, a existência de dois genes parece não ser uma ocorrência muito comum. No entanto, as condições fisiológicas ou ambientais em que a disponibilidade de dois genes de AOX resulte vantajosa para a célula pode não ter sido ainda reproduzida em laboratório (SERRANO, 2001). A semelhança entre os genes AOX1 e AOX2 é tão grande que a sequência de nucleotídeos possui homologia de 92%, a proteína gerada por cada gene tem homologia de 95% em termos de composição de aminoácidos e 97%, em termos de atividade específica (KOUTZ et al., 1989).

O metabolismo do metanol pela *P. pastoris* começa no peroxissomo (Figura 9). Juntamente com a catalase a AOX difunde dentro da matriz do peroxissomo para degradar o peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água (CERECHINO; CREGG, 2000). O formaldeído formado pode seguir duas vias alternativas, a via de dissimilação que é fonte de energia para as células que crescem em metanol e o formaldeído restante é assimilado para formar constituintes celulares em uma via cíclica. Segundo a rota de assimilação, o formaldeído entra na via cíclica através da reação de condensação com a xilulose 5-monofosfato (Xu5P) catalisada pela di-hidroxiacetona sintetase (DAS, 2.2.1.3). Esta reação forma dihidroxiacetona (DHA) e uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato (GAP) a cada três ciclos, que serão metabolizados posteriormente no citosol. Através de uma série de rearranjos, Xu5P é subsequentemente regenerado para entrar na via cíclica. Através da via de dissimilação, uma parte do formaldeído gerado espontaneamente reage com a glutathione para formar S-hidroximetilglutathione que em seguida é oxidado para dióxido de carbono, com a ajuda de glutathione (GSH) e duas desidrogenases dependentes de NAD^+ (formaldeído desidrogenase - FLD, EC 1.2.1.1 e formato desidrogenase - FDH 1.2.1.2). O NADH_2 produzido é utilizado para a produção de energia (HARTNER; GLIEDER, 2006).

Figura 9. Via de metabolismo de metanol em *P. pastoris*. 1, Alcool oxidase; 2, Catalase; 3, Formaldeído desidrogenase; 4, Formato desidrogenase, 5, di-hidroxiacetona sintetase; 6, di-hidroxiacetona kinase; 7, Fructosa 1,6-bisfosfato aldolase; 8, Fructosa 1,6-bisfosfatase (Modificado de SERRANO, 2001).

A capacidade de adaptação da *P. pastoris* ao metabolismo do metanol é tão elevada que segundo VEENHUIS et al (1983) os peroxissomos podem ocupar até 90% do volume celular, quando crescem em presença de metanol. Porém em outras fontes de carbono como glicose ou glicerol os peroxissomos não são observados. Este fato é observado na Figura 8, em que se observa que a célula da levedura apresenta modificações em função da fonte de carbono presente no meio de cultivo. A Figura 10a corresponde a uma microfotografia do interior da célula de *P. pastoris* quando cresce em glicerol, o que significa sem presença de peroxissomos. Na Figura 10b, a presença dos peroxissomas é evidente. Quando as células crescidas em metanol passam a um meio com glicose ou quando há limitação de íons NH_4^+ , se observa autofagia dos peroxissomos por processos de proteólises (ROSE; HARRISON, 1989; SAKAI et al., 1998; YUAN; STROMHAUG; DUNN, 1999).

Figura 10. Microfotografia de uma célula de *P. pastoris* crescendo em diferentes fontes de carbono (a) glicerol (b) metanol. (Adaptação de COS et al., 2005).

O metanol age como indutor para a produção de proteína recombinante e como fonte de carbono e energia. Assim, as etapas de indução e produção da proteína heteróloga estão interligadas com a utilização do substrato e crescimento da biomassa. Por essa razão, o sistema de expressão de *P. pastoris* é diferenciado de *E. coli*, no qual os promotores podem ser induzidos por agente independente, não metabolizável. Por conseguinte, os processos de produção de *P. pastoris* são mais complexos de controlar (LOOSER et al., 2014). As quantidades de metanol que entram na via oxidativa e a via de assimilação são controladas pela concentração do AOX ativa e as concentrações de substratos e produtos. A inativação de

AOX ocorre quando a concentração de metanol é aumentada. Neste caso, a oxidação excede o uso de formaldeído provocando a acumulação e inativação da enzima por causa da dissociação do FAD^+ . A célula eventualmente morre (POUTOU et al., 2005b).

Existem três fenótipos de estirpes recombinantes de *P. pastoris*, que dizem respeito à capacidade de utilizar metanol: 1) o tipo selvagem, que utiliza mais metanol (Mut^+), em que tanto a AOX1 quanto a AOX2 estão intactas; 2) a utilização lenta de metanol (Mut^s), resultante da supressão do gene AOX1 e; e 3) a utilização de menos metanol (Mut^-), em que ambos genes, AOX1 e AOX2, são interrompidos (FERRARA et al., 2006). As variantes como meio de cultivo, pH, temperatura, agitação, etc. para a produção de proteínas nessa levedura podem variar de acordo com a linhagem a ser utilizada ou de acordo com a proteína heteróloga a ser expressa. Pode-se dizer que não há protocolos fixos que garantam produção ideal, mas algumas orientações, resultantes das pesquisas realizadas, possibilitaram melhora importante na produtividade (COS et al., 2006).

O metabolismo do metanol pela linhagem Mut^s é três vezes mais lento do que Mut^+ . As velocidades específicas de crescimento em metanol são de $0,05\ h^{-1}$ para Mut^s e $0,14\ h^{-1}$ para Mut^+ (BRIERLEY et al., 1990; CREGG, MADDEN, 1988). A linhagem Mut^s apresenta algumas vantagens como: i) é menos sensível que a linhagem Mut^+ ao metanol residual no meio de fermentação e, portanto o processo de aumento de escala pode ser mais fácil (STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998) e mais tolerante a possíveis efeitos tóxicos (SERRANO, 2001). ii) o fato de não sintetizar grandes quantidades de AOX pode ser vantajoso para a expressão heteróloga de certas proteínas, porque a síntese de AOX e a proteína heteróloga dependem do mesmo substrato indutor (SREEKRISHNA et al., 1989) e iii) responde mais favoravelmente a estratégias de alimentação mistas, tipo combinação dos substratos glicerol-metanol, o que aumenta a taxa específica de consumo de metanol e, em alguns casos, a produtividade final do sistema (D'ANJOU; DAUGULIS, 2001).

2.4. Proteínas periplasmáticas

O periplasma é o espaço entre a superfície externa da membrana plasmática e a superfície interior da parede celular. Este é um espaço descontínuo pela presença interrompida de invaginações na membrana plasmática e irregularidades na superfície interna da parede

celular. Esta estrutura não é considerada uma organela típica; porém, é importante por conter enzimas específicas da levedura (BOULTON; QUAIN, 2001). Além disso, a concentração de proteínas no periplasma é elevada, de fato, possivelmente maior do que o necessário para fins puramente catalíticos (ARNOLD, 1991).

A liberação de moléculas intracelulares é determinada pela funcionalidade da membrana do plasma e a porosidade da parede da célula de levedura (ZHAO; FLEET, 2003). Por essa razão, algumas enzimas sintetizadas intracelularmente e que, em seguida, são transportadas para o espaço periplasmático, terminam sendo retidas devido à porosidade limitada da parede da célula (SCHERRER; LOUDEN; GERHARDT, 1974). Assim, ARNOLD (1991) define as enzimas periplásmicas como aquelas que podem ter suas atividades determinadas em células intactas sem ruptura da membrana plasmática.

A levedura *P. pastoris* tem níveis de expressão que atingem até 80% de proteínas totais secretadas (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012) e até 30% de proteínas totais da célula (LI et al., 2008; SHI et al., 2003) e geralmente são outras leveduras como *S. cerevisiae* quem tende a reter as proteínas no espaço periplasmático mesmo com peptídeos de baixa massa molecular (HARTNER; GLIEDER, 2006). No entanto, leveduras não convencionais (incluindo *P. pastoris* e *H. polymorpha*) secretam as proteínas ainda com massa molecular elevada (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991). Porém, existem alguns casos onde as proteínas produzidas por *P. pastoris* não conseguem ser secretadas e são localizadas no espaço periplasmático como levanosucrase (LUBINEAU et al., 1998) e fructosiltransferase humana (TRUJILLO et al., 2001) ou como exo- β -frutosidase (BfrA) de *Thermotoga marítima* segregada tanto para o espaço periplasmático como no meio extracelular de *P. pastoris* (MARTÍNEZ et al., 2014a; MENÉNDEZ et al., 2013). No entanto, FERRARA et al (2006) relataram a expressão da ASNase II de *S. cerevisiae* dentro do espaço periplasmático e explicou que a não secreção da proteína poderia ser por causa da interação da parede celular com algum domínio não identificado da enzima.

Figura 11. (a) Componentes da estrutura celular da levedura. **(b)** Componentes do espaço periplasmático da levedura (Modificado de HORST FELDMANN, 2012).

2.5. Cinética do processo fermentativo

O estudo cinético do processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de cultivo. Entende-se como componentes, o micro-organismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura. Segundo NASCIMENTO et al (2009) e HISS (2001) é recomendado realizar o acompanhamento dos componentes de acordo com os seguintes critérios. Como substrato, composto que limita a reação, chamado de “S”; como produto, o de interesse econômico, chamado de “P” e finalmente a concentração do micro-organismo, chamado de “X”. Assim aplicado a nosso caso seria do seguinte modo: S = glicerol, P = ASNase e X = *Pichia pastoris*.

Quando as conclusões sobre o cultivo de micro-organismo forem baseadas unicamente em dois valores dos componentes X, S ou P (finais e iniciais), não se pode afirmar que o estudo cinético do processo tenha sido realizado adequadamente. É importante o conhecimento dos valores intermediários, que permitam definir os perfis das curvas ou a forma matemática destas para uma análise adequada do fenômeno sob o ponto de vista cinético. Assim, tais perfis representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação. Além desse aspecto, cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, por intermédio de variáveis como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão, obtidos também a partir das curvas de ajuste $X = X(t)$, $P = P(t)$ e $S = S(t)$ (HISS, 2001).

Figura 12. Perfis típicos de variação das concentrações dos componentes S , X , P (substrato, levedura, produto) em relação ao tempo (HISS, 2001).

2.5.1. Curva de crescimento microbiano

O crescimento de levedura em meio de cultura favorável depois de sua inoculação segue comportamento característico representado pelos valores de concentração celular, pode ser dividido em fases (Figura 11) (GRETSCHMANN, 2009; HISS, 2001):

Fase 1: latência, Também conhecida como fase “lag”. Esta fase segue imediatamente à inoculação do micro-organismo no meio. É um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias para metabolizar os componentes do meio. Durante esta fase não há reprodução celular $X = X_o = \text{constante}$. A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inóculo (valor de X_o), com idade do micro-organismo (tempo de pré-inóculo) e com o seu estado fisiológico;

Fase 2: transição. Inicia a reprodução microbiana propriamente dita, a velocidade de crescimento e a velocidade de reprodução aumentam gradualmente;

Fase 3: logarítmica ou exponencial. Nesta fase o valor da velocidade específica de crescimento é constante e máxima ($\mu = \mu_{\text{máx}}$);

Fase 4: linear de crescimento, com velocidade de reprodução constante. Pode ocorrer sem previa existência da fase logarítmica como no caso dos micro-organismos filamentosos;

Fase 5: desaceleração, causado pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultura e ao acúmulo de inibidores. A velocidade de crescimento diminui até se anular;

Fase 6: estacionária, os nutrientes são muito escassos e os produtos tóxicos se tornam mais abundantes. Nesta etapa o número de células que se divide é o mesmo que o número de células que morrem, então não há crescimento líquido da população. Por outro lado ocorrem mudanças na estrutura bioquímicas da célula;

Fase 7: declínio ou lise. Nesta fase a velocidade de morte supera a velocidade de produção de novas células e então a quantidade de células diminui. A autólise com rompimento celular ocorre pela ação das enzimas intracelulares.

Figura 13. Fases da curva de crescimento do micro-organismo (a) Ordenadas lineares; (b) Ordenadas semilogarítmicas (HISS, 2001).

2.5.2. Tempo de geração (t_g) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$)

O tempo de geração (t_g) é o tempo necessário para dobrar a população de micro-organismos. Segundo STANIER et al (1989) o t_g é definido como o tempo requerido para que todas as células aumentem por um fator de 2. Este parâmetro varia entre os diferentes micro-organismos (MADIGAN et al, 1999). Para certas bactérias o tempo de geração é

relativamente curto, sendo que a *E. coli* apresenta valor de 20 minutos na temperatura de 37 °C. O valor mínimo do tempo de geração para as leveduras está compreendido entre 1,5 e 2,0 horas (HISS, 2001).

A velocidade específica de crescimento (μ_x) é definida como a mudança no número de células ou biomassa por unidade de tempo (MADIGAN et al, 1999). Quando um micro-organismo está na fase de crescimento exponencial, o μ_x atinge seu valor máximo e constante ($\mu_x = \mu_{m\acute{a}x}$) (HISS, 2001). Este parâmetro ($\mu_{m\acute{a}x}$) é definido como a inclinação da curva de crescimento logarítmico na fase de crescimento exponencial (ALARCÓN, 2008). Nessa fase exponencial assume-se que a velocidade de crescimento (dX/dt) é diretamente proporcional à concentração X (Equação 1).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot X \quad (\text{Equação 1})$$

Ou

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t - t_i) \quad (\text{Equação 2})$$

Na fase exponencial $\mu_{m\acute{a}x}$ está relacionado com o t_g , o qual já foi definido como o intervalo de tempo necessário para duplicar a população de micro-organismos. Então:

$$\ln \frac{2X_0}{X_0} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t_g) \quad (\text{Equação 3})$$

Ou

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln 2}{t_g} \quad (\text{Equação 4})$$

2.5.3. Fator de conversão ($Y_{x/s}$)

Os micro-organismos, principalmente os quimio-organotróficos, requerem um composto orgânico como fonte de carbono e energia, um receptor de hidrogênio, íons

inorgânicos e dióxido de carbono. Qualquer um dos requisitos nutricionais essenciais de um organismo por definição é um potencial fator limitante. No caso dos micro-organismos capazes de crescer em meios definidos simples, a composição do meio é facilmente ajustada de modo que as concentrações de todos os nutrientes essenciais fiquem em grande quantidade com exceção de um, que então se torna o único fator limitante (MONOD, 1949).

Figura 14. Relação linear entre o crescimento de *E. coli* e a concentração de substrato limitante, manitol (Modificado de MONOD, 1949).

Assim, se verificou que a relação entre a biomassa celular (X) e a concentração inicial do nutriente (S) é linear gerando a seguinte equação:

$$X = K \cdot S \quad (\text{Equação 5})$$

Assim, a constante “ K ”, melhor representado como o fator de conversão ($Y_{X/S}$) é definido como a relação entre a quantidade de nutriente limitante utilizado na formação de uma unidade de quantidade de biomassa e é independente da concentração do nutriente. Também implica que o crescimento é interrompido apenas quando o substrato limitante é completamente esgotado. Em outras palavras, que não existe concentração limite abaixo da qual o crescimento é impossível (MONOD, 1942).

2.6. Cultivo de *P. pastoris* em biorreator

Segundo CORDOBA et al (2003) os processos de produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* podem ser conduzidos de dois modos: em frascos *Erlenmeyer* ou em biorreatores. O primeiro modo emprega geralmente meios mínimos ou definidos e é levado a cabo em duas fases: 1) A fase de crescimento, a qual consiste em produzir a maior quantidade de biomassa com uso de fontes de carbono como glicose ou glicerol, com temperatura controlada e agitação; 2) A fase de indução, esta corresponde à produção da proteína heteróloga pela indução do promotor AOX. O segundo processo com uso de biorreator pode ser conduzido de forma descontínua, descontínua alimentada ou contínua.

A produtividade de *P. pastoris* em agitador orbital é tipicamente baixa e melhora bastante em cultivos em biorreator. A utilização de biorreatores é preferível, uma vez que todos os parâmetros podem ser monitorizados e controlados simultaneamente (CEREGHINO et al., 2002). No biorreator, o ambiente reacional controlado, permite obter altas concentrações do micro-organismo de interesse (ZHOU et al., 2014)4). Acrescenta-se, também, que a transcrição controlada pelo promotor AOX1 é estimulada em células de *P. pastoris* pela adição paulatina de metanol, procedimento permitido pelo design do biorreator (ALMUZARA et al., 2002; CROWLEY et al., 2000; WAGNER et al., 1997). Segundo VIADER et al (2011) o uso de biorreatores operados em condições otimizadas de cultivo pode aumentar a produção de proteína recombinante entre 30 a 300 vezes e as melhores condições para produzir uma proteína recombinante, no padrão de expressão de *P. pastoris*, em biorreator são: temperatura 30°C, pH da fase de indução próximo do valor do meio ambiente no qual a enzima tem ação, inferior a 7,0 e a concentração de oxigênio dissolvido maior que 20%.

Em geral, os cultivos em biorreator têm as seguintes fases: uma primeira fase de crescimento em glicerol ou glicose em sistema descontínuo. Aqui interessa alcançar rapidamente uma alta concentração celular e máxima produção de biomassa; do mesmo modo, são mantidas as condições de cultura não limitadas por oxigênio, porque *P. pastoris*, nestas condições, pode acumular etanol ou acetato no meio de crescimento, metabólitos que resultam em fortes repressores da AOX (CHIRUVOLU; CREGG; MEAGHER, 1997; MEHMET; MEAGHER, 2001; ZHANG et al., 2000). Depois de esgotado todo o glicerol ou glicose tem início a segunda fase, na qual o indutor (metanol) é adicionado ao meio de cultivo

para estimular a produção da proteína heteróloga. A indução com metanol é feita por pulso que consiste na adição de uma só vez de dada quantidade do indutor e aguardar que as células comecem a consumi-lo. O consumo do metanol é detectado pela variação da demanda de oxigênio pelas células (CORDOBA et al., 2003).

O metabolismo do metanol requer grandes quantidades de oxigênio (YURIMOTO; SAKAI; KATO, 2002). Como os níveis de oxigênio interferem na produção de proteínas recombinantes (BUSHELL et al., 2003; CEREGHINO; CREGG, 2000; LEE et al., 2003), a demanda de oxigênio é reduzida usando baixas densidades celulares, baixa temperatura de cultivo, ou estirpes com utilização de metanol lento (CHIRUVOLU; CREGG; MEAGHER, 1997; COS et al., 2005; CURVERS et al., 2001; JAHIC et al., 2003). Na maioria das vezes, a absorção de metanol é restrita com limitação no fornecimento de metanol, seja por taxas de alimentação pré-programadas (STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998) ou controlada pela capacidade metabólica das células, com a manutenção de uma saturação de oxigênio dissolvido constante (CHAROENRAT et al., 2005; JAHIC et al., 2003).

2.6.1. Agitação e aeração em biorreatores

A concentração de oxigênio dissolvido é a percentagem de oxigênio dissolvido no meio (OD). O crescimento de *P. pastoris* involucra o consome o oxigênio à medida que cresce o que leva a reduzir o teor de OD no meio de cultivo (INVITROGEN CORPORATION, 2002). Toda essa preocupação reside principalmente na expectativa de que a agitação e a aeração permitam transferir oxigênio para o micro-organismo, em condições de satisfazer suas necessidades metabólicas (SCHMIDELL et al., 2001).

Por esta razão, o suprimento de oxigênio é um fator crítico em todos os processos aeróbios. Uma insuficiente transferência de oxigênio conduz a uma redução do crescimento microbiano e a formação do produto. No cultivo submerso o coeficiente de transferência de oxigênio serve para comparar a eficácia de biorreatores e seus dispositivos de mistura (JEYA et al., 2009). Além disso, os objetivos de uma operação de mistura seriam a homogeneização da solução, manter sólidos em suspensão, ou, ainda, tornar eficientes os transportes de calor e massa (SCHMIDELL et al., 2001).

2.6.1.1. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

Nos bioprocessos aeróbicos, o substrato mais importante é o oxigênio que se consome durante o crescimento celular e libera o anidrido carbônico como produto principal. Este fato provoca que o oxigênio seja um substrato limitante durante as fermentações (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Portanto, a concentração de oxigênio no meio de cultivo é um parâmetro importante devido a que o oxigênio possui apenas uma baixa solubilidade em água (CHMIEL, 2006), somente 0,3 mM O₂ (9 ppm) são dissolvidos a 20°C em uma mistura de água e ar e pela influência dos componentes do meio de cultivo, o conteúdo máximo de oxigênio realmente é mais baixo que em água pura (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

A transferência de oxigênio no meio de cultivo é descrito pela taxa de transferência de oxigênio (OTR) e depende do coeficiente de transferência de massa volumétrica (k_La) e a diferença de concentração de oxigênio ($C_L^* - C_L$) entre o gás de arejamento e o meio de cultivo:

$$OTR = \frac{dC}{dt} = k_La \cdot (C_L^* - C_L) \quad (\text{Equação 6})$$

OTR = Oxygen Transference Rate mmol/(L·h)

k_La = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em h⁻¹

C_L^* = Concentração saturada de oxigênio em mmol/L

C_L = Concentração de oxigênio dissolvido em mmol/L

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio é um produto do coeficiente de transferência (k_L) e a área de transferência (a). Devido à dificuldade de determinar os valores por separado, mede-se o produto k_La (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). O k_La tem sido analisado como parâmetro crítico para o funcionamento do biorreator (CRUEGER; CRUEGER, 1993) e é influenciado pelo tempo de residência do gás no meio de cultura, que é influenciado pela taxa de fluxo de gás e a configuração do agitador. A área de transferência a é afetada pelo diâmetro de bolha e a altura em relação ao diâmetro em sistemas agitados ou a área em balanço sistemas de movimento e a energia dissipada afeta ambos os valores k_L e a

(GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Outros fatores que afetam o k_{La} são a densidade, viscosidade e composição da solução de nutrientes, a estrutura do micro-organismo, o agente antiespumante usado e a temperatura (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

2.7. Rompimento de células de *Pichia pastoris*

O aumento na demanda de produtos intracelulares, como proteínas e enzimas, pelas indústrias alimentícia e farmacêutica tem mostrado a importância dos processos de rompimento celular (PESSOA; VAHAN, 2005). A recuperação de produtos intracelulares dos micro-organismos tem interesse nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, sobretudo em função do grande crescimento desta área com o ingresso de produtos desenvolvidos com ajuda da engenharia genética (SALTON, 1964).

O rompimento celular é uma operação unitária que resulta crucial no processo de *Downstream* dos produtos intracelulares pela considerável influência na quantidade total da proteína de interesse liberada, na sua atividade biológica, sua associação com outros componentes celulares e a possível presença de degradação proteolítica e/ou contaminantes que podem influenciar nas etapas subsequentes (MEDEIROS et al., 2008). Por outro lado, atingir alto rendimento do rompimento proporciona maior flexibilidade nos tratamentos subsequentes aplicados à recuperação do produto (NEVES, 2003).

Existem diversos tipos de rompimento celular, pela mesma razão que existem muitos tipos de células. Embora existindo vários exemplos específicos de rompimento químico e enzimático, são os métodos mecânicos que tem encontrado aplicação nas escalas piloto e industrial. Fatores como o tipo de crescimento de micro-organismos e as condições de armazenamento das células são importantes na escolha apropriada do método de rompimento. No entanto, a eficácia de um método de rompimento é geralmente avaliada pelo grau de ruptura celular, e em que período de tempo é conseguido (NEVES, 2003).

Segundo PESSOA; VAHAN (2005), as leveduras e outras formas de fungos são mais difíceis de serem rompidas em comparação às bactérias, pois possuem paredes celulares mais rígidas. Por outro lado, conforme mencionado por MEDEIROS et al., (2008), micro-organismos de maior tamanho apresentam diferença na estrutura da parede celular e, por isso, a ruptura de leveduras em geral é mais fácil que a ruptura de bactérias. Porém, o processo de

ruptura varia com base na estabilidade mecânica do micro-organismo, e é função da espécie, da idade da cultura, da velocidade específica de crescimento, da temperatura de cultivo e do meio de cultura (BECERRA et al., 2001; GECIOVA; BURY; JELEN, 2002).

No caso de rompimento de leveduras existem seis métodos (entre mecânicos e não-mecânicos) possíveis de serem utilizados (NEVES, 2003):

- Rompimento com Homogeneizador
- Rompimento com Moinho de pérolas
- Rompimento Manual com pérolas de vidro
- Autólise por Tolueno
- Citólise por amônia
- Lise Enzimática

Para liberar os produtos intracelulares das leveduras é necessário romper a parede celular rígida, a qual é composta de várias camadas de ligação cruzada de β -1,3-glucano, quitina e manoproteínas glicosiladas (KOLLÁR et al., 1997; SMITS; VAN DEN ENDE; KLIS, 2001).

A medida da eficiência de ruptura pode ser determinada pela aplicação de métodos microscópicos diretos que permitem estimar o número de células lisadas enquanto os métodos indiretos medem a liberação dos componentes intracelulares específicos (MIDDELBERG, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir ASNase de *Saccharomyces cerevisiae* em *Pichia pastoris* através de estudos iniciais em agitador metabólico. A seguir, avaliar o desempenho do processo em biorreator de 3L de capacidade operado em regime descontínuo e nas melhores condições estabelecidas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de *Pichia pastoris* em Frascos *Erlenmeyer* em diferentes concentrações de glicerol (10,0; 20,0; 40,0; 50,0 g.L⁻¹), acompanhando a produção de biomassa, consumo de glicerol e a variação do pH;
- Avaliar de forma preliminar a indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer* em diferentes tempos de indução (24, 48, 72, 96 e 120 horas), concentrações de metanol (0,25; 0,5 e 1,0%) e diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C), acompanhando a produção de biomassa e determinando a localização da ASNase com respeito à levedura (extracelular, intracelular ou periplasmática);
- Construir a curva de rompimento das células de *P. pastoris* com pérolas de vidro acompanhando a quantidade de células intactas, proteínas totais e atividade da ASNase;
- Avaliar a indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer* em concentrações elevadas de metanol (1,0; 2,0 e 3,0 %) e em diferentes tempo de indução (24, 48, 72, 96 e 120 horas) e acompanhando a medida de atividade da ASNase e a produção de biomassa;
- Avaliar a indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer* em diferentes pH de indução (no intervalo entre 5,0 e 8,0), usando as condições determinadas previamente e acompanhando a medida de atividade da ASNase e a produção de biomassa;

- Avaliar a indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer* com suplementação de 0,5% (w/v) de aminoácidos (L-asparagina, L-arginina ou L-glutamina) e casaminoácidos, usando as condições determinadas previamente e acompanhando a medida de atividade da ASNase e a produção de biomassa;
- Avaliar a influência do tempo da fase de crescimento (8, 20 e 24 horas) com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol na indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer*, usando as condições de indução determinadas previamente e acompanhando a medida de atividade da ASNase e a produção de biomassa;
- Avaliar a influência da concentração de glicerol (10,0; 40,0 e 50,0 g.L⁻¹) na fase de crescimento na indução da ASNase na *P. pastoris* em Frascos *Erlenmeyer*, usando as condições de indução determinadas previamente e acompanhando a medida de atividade da ASNase e a produção de biomassa;
- Produzir a ASNase em biorreator de 3L em regime descontínuo usando as condições determinadas no agitador orbital (concentração de glicerol, tempo de indução, temperatura, concentração de metanol, pH, etc).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Métodos e protocolos gerais

4.1.1. Micro-organismo e plasmídeo

O ADN que codifica o gene ASP3 de *Saccharomyces cerevisiae* foi sintetizado, sendo o plasmídeo amplificado em *Escherichia coli* pET15b. Finalmente, a levedura *P. pastoris* KM71 (Mut^s) (adquirido da *Invitrogen Corporation*®), foi usada como hospedeiro para a expressão do gene ASP3. O vetor pGEM-T Easy (adquirido de *Promega*®) foi usado para a clonagem por PCR e o pPIC9K (*Invitrogen Corporation*®), foi usado como plasmídeo de expressão em *P. pastoris*.

4.1.2. Manutenção e reativação (pré- inóculo) da *P. pastoris*

Para a preservação das células de *P. pastoris*, as colônias foram repicadas a cada três meses em meio sólido YPD (Ver Tabela 2) e incubadas a 30 °C por 24h. Após esse período, as colônias foram retiradas das placas e inoculadas em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio líquido YPD (Ver Tabela 2) incubadas a 30 °C e 250 rpm durante 24 h ou até atingir uma densidade ótica ($\lambda = 600$ nm) igual ou maior a 50, depois foram estocadas a -70 °C em meio YPD contendo glicerol estéril a 20%. Para a etapa de reativação, as células da cultura em estoque foram descongeladas e 500 μ L foram inoculados em frascos *Erlenmeyer* com 4 deflectores de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio de crescimento BMGY (Ver Tabela 3) com 10,0 g L⁻¹ de glicerol e foram incubados a 30 °C em agitador orbital a 250 rpm durante 24 horas.

Tabela 2. Componentes do meio YPD* (*Yeast Extract Peptone Dextrose medium*)

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Dextrose	20,0
Peptona	20,0
Extrato de Levedura	10,0
Água deionizada	q.s.p.

*No caso do meio YPD sólido, adicionar 20,0 g.L⁻¹ de Agar.

Tabela 3. Componentes do meio BMY* (*buffered complex médium*)

<i>Componente</i>	<i>Concentração (g.L⁻¹)</i>
Peptona	20,0
Extrato de Levedura	10,0
YNB	13,4
Biotina	0,0004
Tampão de Fosfato de Potássio (100 mM) pH 6,0	q.s.p.

*BMGY ou BMMY quando o glicerol ou metanol for usado como fonte de carbono respectivamente.

4.1.3. Determinação da curva de crescimento do pré-inóculo

A determinação da curva de crescimento foi feita com a finalidade de determinar o tempo necessário para as células reativadas atingirem a fase exponencial; as células nesta fase serão empregadas para fazer o inóculo nos meios correspondentes. As células estocadas a -70 °C foram descongeladas e 500 µL foram inoculados em frascos *Erlenmeyer* com 4 deflectores de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0 g L⁻¹ de glicerol e foram incubadas a 30 °C em agitador orbital a 250 rpm durante 24 horas. As amostras foram retiradas a cada duas horas e lidas em espectrofotômetro a 600 nm. O ensaio foi repetido três vezes.

4.1.4. Quantificação de biomassa seca

Uma vez completado o tempo de cultivo os meios foram colocados em tubos Falcon secos, previamente pesados, e, a seguir, centrifugados a 5000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi guardado para análises posteriores (pH, quantificação de glicerol, etc), sendo o *pellet* celular submetido à secagem a 70°C em estufa até atingir massa constante. Finalmente, os tubos contendo a biomassa seca foram pesados e o cálculo da massa seca das células realizada por diferença de pesos entre os tubos. A biomassa seca foi expressa em g.L⁻¹ (Equação 7).

$$\text{Biomassa Seca (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Peso Tubo com biomassa} - \text{Peso Tubo}) \times 1000}{\text{Volume Cultivo (mL)}} \quad (\text{Equação 7})$$

4.1.5. Quantificação da concentração de glicerol

Para quantificação do glicerol foram usados 10 μL de meio de cultivo e as amostras foram misturadas com 1,0 mL do *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest®* [Lipase, Glicerolquinase, Glicerolfosfato oxidase e Peroxidase], e incubadas a 37°C durante 10 minutos. A intensidade da cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 505 \text{ nm}$). O branco foi preparado utilizando 10 μL de água.

Para elaborar a curva padrão foram preparadas soluções padrão de 5,0 g.L^{-1} de glicerol em água, em meio BMGY novo e em meio BMGY fermentado. A partir das soluções padrão foram feitas diluições nos meios respectivos para obterem concentrações de 0,1; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g.L^{-1} de glicerol.

4.1.6. Construção da curva padrão de densidade ótica e massa celular seca

Foi feito um cultivo em 50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L^{-1} de glicerol e inoculado com 1,0 g.L^{-1} de células a 30 °C, 250 rpm durante 8 horas. Após o tempo de cultivo, o meio foi centrifugado a 3500 $\times g$ a 10 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. Finalmente, as células foram ressuspensas em água destilada até atingir um volume final de 50 mL (suspensão mãe). Levando em consideração a absorbância total da suspensão mãe, foram elaboradas triplicatas de suspensões celulares nas densidades óticas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 (região comumente linear).

Com a finalidade de determinar alguma variação na relação densidade ótica e massa seca das células crescidas em metanol, foi feita uma segunda curva padrão a partir de um cultivo em 50 mL de meio BMGY crescido nas condições anteriores (50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L^{-1} de glicerol e inoculado com 1,0 g.L^{-1} de células a 30 °C, 250 rpm durante 8 horas) e induzidas em meio BMMY com 2% de metanol durante 72 horas a 20 °C e 250 rpm.

4.2. Estudos de crescimento em agitador orbital

4.2.1. Avaliação do crescimento de *P. pastoris* em diferentes concentrações de glicerol

O crescimento foi avaliado em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY modificado com diferentes concentrações de glicerol (10,0; 20,0; 40,0 e 50,0 g.L⁻¹) pH 6,0 a 30°C e 250 rpm durante 24 horas. Os frascos foram inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células e os ensaios realizados três vezes. Foram acompanhadas a produção de biomassa, o consumo de glicerol e a variação do pH nos tempos 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas.

4.2.2. Avaliação da produção de biomassa final em diferentes concentrações de glicerol

Com a finalidade de avaliar a máxima concentração do glicerol, que não afetasse o crescimento, a produção de biomassa foi avaliada em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL, contendo 50 mL de meio BMGY com diferentes concentrações de glicerol (10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 80,0 e 100,0 g.L⁻¹) e mantidos a pH 6,0, 30°C e 250 rpm durante 24 horas. Os frascos foram inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células. A produção de biomassa foi determinada depois de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 36, 44 horas, respectivamente.

4.2.3. Velocidades específicas de crescimento (μ_x)

A concentração microbiana (X) varia durante um cultivo descontínuo. Em função dessas variações, foi analisado o valor da velocidade instantânea com relação à referida concentração, ou seja, especificando essa velocidade em relação ao valor de X em um dado instante. Além disso, foi calculada na fase exponencial do crescimento a velocidade específica de crescimento máxima, conforme indicam as expressões (Equações 8 e 9):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 8})$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que:

μ_x = Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

X = Concentração de celular no meio (g L^{-1})

$\frac{dX}{dt}$ = Velocidade de variação da concentração celular em função do tempo ($\text{g matéria seca/L.h}$)

4.2.4. Tempo de geração (t_g)

Ao lado da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), a fase exponencial também é caracterizada frequentemente pelo tempo de geração t_g . Este parâmetro foi calculado segundo a equação 10.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equação 10})$$

Em que:

$\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

t_g = Tempo de geração (h)

4.2.5. Fator de conversão ($Y_{X/S}$)

Considerando um determinado tempo t de cultivo em biorreator, os correspondentes valores de X e S podem ser relacionados entre si, através do fator de conversão, como o fator de conversão de substrato em células (Equação 11).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_o}{S_o - S} \quad (\text{Equação 11})$$

Em que:

$Y_{X/S}$ = Fator de conversão de substrato limitante em células (g massa celular seca formada/g substrato consumido)

X = Concentração Celular no meio (g.L⁻¹)

S = Concentração de Substrato no meio (g.L⁻¹)

X_o = Concentração Celular inicial no meio (g.L⁻¹)

S_o = Concentração de Substrato inicial no meio (g.L⁻¹)

4.3. Determinação da localização da ASNase

4.3.1. Avaliação preliminar da indução de *P. pastoris* em diferentes temperaturas e concentrações de metanol

A indução foi avaliada em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMMY em diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C) e diferentes concentrações de metanol (0,25; 0,50 e 1,0%) a cada 24 horas durante 120 horas a pH 6,0 e 250 rpm. Foram acompanhadas as determinações da presença de ASNase (no espaço periplasmático e meio extracelular) e a produção de biomassa com a finalidade de determinar as melhores condições de indução (temperatura, concentração de metanol e tempo de indução). Adicionalmente, células do clone não transformado de *P. pastoris* (sem gene ASP3) induzidas nas mesmas condições foram avaliadas como controle negativo da expressão de ASNase.

4.3.2. Avaliação da localização periplasmática da ASNase

A avaliação da localização periplasmática foi feita através da quantificação da atividade da ASNase usando uma suspensão de células de *P. pastoris* após indução.

4.3.2.1. Preparação da suspensão de células vivas de *P. pastoris*

Um volume de 1,0 mL de meio de cultivo é retirado, centrifugado a 7000 $\times g$ a 10 °C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com água. As células

foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão tris-HCl (pH 8,6) para serem usadas na determinação de atividade periplasmática. A densidade ótica da suspensão foi lida em espectrofotômetro a 600 nm para determinação da biomassa seca pela conversão através da curva padrão.

4.3.2.2. *Quantificação da atividade no espaço periplasmático*

O volume de 0,2 mL da suspensão celular previamente preparada, foi colocado em um tubo de reação de 1,5 mL e acrescentado com 0,9 mL de tampão tris-HCl (pH 6,8), 0,2 mL de asparagina (100 mM) e 0,2 mL de hidroxilamina (1 M) a pH 7,0. A suspensão final foi colocada em Termoshaker Fisher® a 37 °C e 850 rpm. Depois de 30 minutos de incubação foi colocado 0,5 mL de solução ácida de cloreto férrico e centrifugado a 7000xg por 10 minutos para sedimentar as células. A intensidade da cor do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 500\text{nm}$). No caso do branco a solução ácida de cloreto férrico foi colocada antes da incubação.

O cálculo de atividade enzimática ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ de biomassa seca) é feito através da seguinte equação:

$$U \cdot g^{-1}_{\text{Biomassa seca}} = \frac{\mu\text{mol}_{\beta\text{-Hidroxamato Áspartico}}}{30 \text{ minutos}} \times \frac{1}{\text{Biomassa seca (g)}} \quad (\text{Equação 12})$$

4.3.2.3. *Avaliação do método de quantificação da atividade periplasmática em diferentes volumes de suspensão celular*

Volumes das amostras de células preparadas segundo o item 2.3.2.1. (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mL) foram misturados com tampão tris-HCl (pH 6,8), perfazendo o volume final de 1,1 mL, dentro de um tubo de reação de 1,5 mL de capacidade. A seguir a atividade foi avaliada segundo o item 2.3.2.2. A biomassa seca foi determinada pela conversão da densidade ótica a 600 nm. O ensaio foi feito três vezes.

4.3.3. Avaliação da localização extracelular da ASNase

A avaliação direta da presença de ASNase no meio de cultivo, não foi possível realizar por causa da interferência dos componentes do meio no método de quantificação. Por conseguinte, a determinação só poderia ser realizada com a mudança da composição do meio, o que em um primeiro momento poderia causar mudanças no crescimento da levedura ou da expressão enzimática. Este problema foi parcialmente resolvido através da avaliação preliminar mediante eletroforese em Gel (SDS – PAGE). Adicionalmente o meio extracelular do cultivo do clone não transformado de *P. pastoris* (sem gene ASP3) foi avaliado como controle negativo de expressão de ASNase.

4.3.3.1. ASNase avaliada por eletroforese em gel (SDS – PAGE)

A expressão extracelular da enzima foi avaliada pela presença de bandas de proteínas correspondentes com ASNase II no meio de cultura. As amostras dos meios de culturas foram centrifugadas (3,000xg/10min) a 10°C. A proteína solúvel presente no sobrenadante foi concentrada dez vezes com ácido tricloroacético (TCA). Um volume de 15 µL do concentrado foi misturado com 5 µL de tampão de carga [0,1 M Tris / HCl (pH 6,8), 0,2 M de DTT, 4% de SDS, 20% glicerol, 0,2% de azul de bromofenol] e fervidas durante 5 minutos. A análise de SDS-PAGE foi realizada num gel de separação de poliacrilamida a 12%. Após eletroforese a 90 volts, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie e descorados com ácido acético/metanol/água (1: 4: 5). Para a determinação molecular, as proteínas com massa molecular 250-10 kDa (BioRad®, Alemanha) foram utilizadas como marcadores.

4.3.4. Avaliação da localização intracelular da ASNase

Para avaliar a localização intracelular da enzima foi necessário fazer o rompimento das células de *P. pastoris* após a indução. Para conseguir um processo eficiente de liberação da ASNase intracelular, foi necessário padronizar o método de rompimento, que no presente caso foi do tipo mecânico com pérolas de vidro.

4.3.4.1. *Construção da curva de rompimento das células de *P. pastoris* com pérolas de vidro*

Foram avaliados um total de 14 ciclos de rompimento (resfriamento e agitação) e em cada ponto foram avaliadas a quantidade de células intactas, de proteínas totais e a atividade de ASNase. Além disso, a variação da temperatura em cada ponto do processo foi avaliada a fim de evitar um sobre aquecimento do sistema.

4.3.4.1.1. *Acondicionamento das pérolas de vidro e preparo do banho de gelo*

As pérolas foram mergulhadas em ácido clorídrico (2M) durante 16 horas e depois foram lavadas com água destilada e secadas a 50 °C durante 2 horas. Por outra parte, o banho de gelo foi feito em uma caixa térmica de Tecnopor com uma solução de NaCl 33% (*m/m*) congelada a -50 °C (CÁCERES, 1971).

4.3.4.1.2. *Preparação dos sistemas de rompimento*

O rompimento celular foi realizado em tubo de reação de 2,0 mL com 750,0 mg de pérolas de vidro (diâmetro de 0,5 mm) e 1,0 mL de suspensão celular na concentração de 250,0 mg.mL⁻¹ em tampão de lise [50,0 mM Tris – HCl (pH 7,5), 1,0 mM EDTA, 5,0 % (v/v) glicerol, 1,0 mM PMSF]. Os sistemas foram submetidos a ciclos de agitação de 30 segundos em vórtice na máxima velocidade (~3000 rpm), seguidos de ciclos de resfriamento de 60 segundos em banho de gelo (-10 °C).

4.3.4.1.3. *Controle da temperatura*

A temperatura dos sistemas foi determinada com uso de termômetro. As medidas de temperatura dos sistemas foram feitas depois do resfriamento e também depois da agitação. Com os dados obtidos foi construída uma curva de controle de temperatura depois do resfriamento e da agitação.

Figura 15. Esquema do ciclo de rompimento da biomassa úmida de *P. pastoris* com pérolas de vidro ($\phi = 0,5 \text{ mm}$).

4.3.4.2. Cultivo de *P. pastoris*

O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol inoculados com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a $3500 \times g$ a 10°C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuscitado em 50 mL de meio BMMY, sendo a indução feita com 3,0% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm e 20°C . Adicionalmente, células do clone não transformado de *P. pastoris* (sem gene ASP3) induzidas nas mesmas condições foram avaliadas como controle negativo de expressão de ASNase.

4.3.4.3. Contagem de células intactas de *P. pastoris*

A contagem de células foi feita em microscópio óptico comum mediante o uso da câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer empregada corresponde ao modelo $1/400 \text{ mm}^2 \times 0.100 \text{ mm}$. O azul de tripano (AT) foi usado para a análise da viabilidade celular. As amostras foram suspensas novamente em 800 μL de TL e depois foram diluídas para contagem. Uma alíquota desta suspensão foi misturada com AT na proporção 1/4. Depois de colocar em câmara de Neubauer, a contagem de células foi feita nos quadrados maiores localizados nas partes laterais da câmara (Figura 16).

Figura 16. Esquema da Câmara de Neubauer apresentando as zonas de contagem de leveduras.

Cada quadrado tem área de 1 mm^2 e é subdividido em 16 quadrados pequenos, cada um com uma área de $1/16 \text{ mm}^2$. A contagem é efetuada no sentido horário, com cuidado de observar a existência de células localizadas nas linhas que dividem os quadrados pequenos. A contagem foi feita nos 4 quadrados maiores.

$$\text{Número cél. Intactas}/\text{mm}^3 = \frac{A \times D}{V} \quad (\text{Equação 13})$$

Em que:

A = número de células contadas;

D = diluição da suspensão;

V = volume da câmara preenchido com a suspensão no qual a contagem é feita [para uma câmara de $(1/400) \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$ e considerando os 4 quadrados maiores (com 16 quadrículos cada um) como campo total para contagem] = $(64/160) \text{ mm}^3$.

$$\text{Número cél. Intactas}/\text{cm}^3 = \left(\frac{A \times D \times 160}{64} \right) \times 1000 \quad (\text{Equação 14})$$

Ou

$$\text{Número cél. Intactas}/_{mL} = A \times D \times 2500 \quad (\text{Equação 15})$$

4.3.4.4. *Quantificação das proteínas Totais*

A concentração de proteínas totais foi obtida pelo método do BCA (*BicinchoninicAcid*) (SMITH et al., 1985). Este método baseia-se na reação das ligações peptídicas e cadeias laterais dos aminoácidos cistina, cisteína, triptofano e tirosina com o cobre (Cu^{+2}) em solução alcalina, reduzindo-o a Cu^+ . Este por sua vez, forma um complexo solúvel em água com duas moléculas de BCA, de cor púrpura.

A reação colorimétrica foi feita misturando 25 μL da amostra com 200 μL da mistura dos reagentes BCA e sulfato de cobre (50:1), incubando-se a seguir, a 37°C durante 30 minutos. A intensidade da cor desenvolvida foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 562 \text{ nm}$). A curva padrão foi construída usando 5, 10, 15, 20 e 25 μg de BSA. As dosagens de proteína foram expressas em μg totais.

4.3.4.5. *Quantificação da atividade ASNase do meio intracelular*

Depois dos ciclos de rompimento, os sistemas foram centrifugados a 10.000 $\times g$ a 4°C durante 10 minutos. Um volume de 0,25mL do sobrenadante foi colocado em um tubo de vidro contendo 1,35 mL de tampão tris-HCl (pH 6,8) acrescidas de 0,2 mL de asparagina (100 mM) e 0,2 mL de hidroxilamina (1,0 M) a pH 7,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos. Depois foram adicionados 0,5 mL de solução ácida de cloreto férrico. A intensidade de cor do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro ($\lambda = 500 \text{ nm}$). No caso do branco a solução ácida de cloreto férrico foi adicionada antes da incubação. A atividade do meio intracelular foi calculada segundo a equação 16.

$$U. mL^{-1} = \frac{\mu\text{mol}_{\beta\text{-Hidroxamato Áspartico}}}{30 \text{ minutos} \times \text{Volume de amostra (mL)}} \quad (\text{Equação 16})$$

4.4. Estudos de indução da ASNase em agitador orbital

4.4.1. Avaliação da indução de *P. pastoris* em concentrações elevadas de metanol

Maiores concentrações de metanol na fase de indução foram estudadas com a finalidade de determinar a concentração máxima de metanol. O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células e crescidos a 30 °C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a 3500 *xg* a 10 °C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY em diferentes concentrações de metanol (1,0; 2,0 e 3,0 %) a cada 24 horas durante 120 horas a 250 rpm.. Foram acompanhadas as determinações da atividade ASNase e a produção de biomassa.

4.4.2. Planejamento fatorial fracionado das condições de indução da ASNase

Com a finalidade de determinar as melhores condições de indução da *P. pastoris* e também de avaliar outras temperaturas (15 e 25 °C), foi aplicado um desenho estatístico fracionado $3^{k-1} + 2$ para os fatores temperatura, concentração de metanol e tempo de indução. O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a 3500 *xg* a 10 °C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY. Os testes referentes à fase de indução seguiram o desenho experimental (Tabela 4), sendo acompanhados através das determinações da atividade ASNase e da produção de biomassa. A análise dos resultados foi feita através do programa STATISTICA® Versão 10.

Tabela 4. Fatores e níveis do desenho estatístico fracionado $3^{k-1}+2$

	<i>Metanol (%)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo de Indução (h)</i>
1	1,0	15	48
2	1,0	20	96
3	1,0	25	72
4	2,0	15	96
5	2,0	20	72
6	2,0	25	48
7	3,0	15	72
8	3,0	20	48
9	3,0	25	96

4.4.3. Avaliação da expressão de ASNase em diferentes valores de pH

Diferentes valores de pH foram testados na fase de indução com a finalidade de avaliar se este parâmetro tinha ou não influência na produção da ASNase. O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a 3500 *xg* a 10 °C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuscitado em 50 mL de meio BMMY em diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0). A indução foi feita com 3% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm. Foram acompanhadas as determinações da atividade ASNase e a produção de biomassa.

4.4.4. Avaliação da expressão de ASNase com suplementação de aminoácidos e casaminoácidos

Com a finalidade de melhorar a expressão de ASNase, foram adicionados aminoácidos e casaminoácidos durante a fase de indução. O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol inoculados

com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a $3500 \times g$ a 10°C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY suplementado com 0,5% (m/v) de diferentes aminoácidos (L-asparagina, L-glutamina e L-arginina) e casaminoácidos, sendo a indução feita com 3% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm. Foram acompanhadas as determinações da atividade ASNase e a produção de biomassa.

4.4.5. Avaliação da influência do tempo de crescimento na expressão de ASNase

Células induzidas - depois de crescer em diferentes períodos de tempo em uma mesma concentração de glicerol - foram estudadas com a finalidade de determinar a influência do estado (fase de crescimento na qual se encontra) na expressão de ASNase. O estudo foi feito em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol inoculados com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8, 20 e 24 horas. As células foram separadas por centrifugação a $3500 \times g$ a 10°C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY. A indução feita com 3% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm. Foram acompanhadas as determinações da atividade ASNase e a produção de biomassa.

4.4.6. Avaliação da influência da concentração inicial de glicerol da fase de crescimento na expressão de ASNase

Células induzidas - depois de crescerem em diferentes concentrações de glicerol - foram estudadas com a finalidade de determinar a influência da densidade celular na expressão de ASNase. O estudo foi conduzido em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com 10,0; 40,0 e $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol inoculados com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8, 20 e 24 horas, respectivamente. As células foram separadas por centrifugação a $3500 \times g$ a 10°C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspensionado em 50 mL de meio BMMY, sendo a indução feita com 3% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm. Foram acompanhadas as determinações da atividade ASNase e a produção de biomassa.

4.5. Estudos de produção de ASNase em Biorreator

O estudo em biorreator foi conduzido em duas fases. A fase de crescimento foi feita em regime descontínuo usando glicerol como fonte de carbono. Uma vez consumido todo o glicerol, foi iniciada a fase de indução em regime descontínuo alimentado por pulsos com metanol.

O estudo foi feito em biorreator *New Brunswick Bioflo*[®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY com 10,0 e 40,0 g.L⁻¹ de glicerol inoculados com 1,0 g.L⁻¹ de células e crescidas a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm. Depois do consumo de glicerol, foi iniciada a indução com 3% metanol a cada 24 horas durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm. O pH 6,0 foi mantido constante durante toda a fermentação pela adição de NaOH (2,0 M). Foram acompanhados o consumo de substrato, a produção de biomassa e a atividade ASNase.

4.6. Avaliação estatística (Teste F) dos métodos de quantificação

Os métodos de quantificação de atividade periplasmática, biomassa seca, concentração de glicerol e concentração de proteínas totais foram avaliados estatisticamente para determinar o nível de confiança e reprodutibilidade.

Para o método de quantificação da biomassa seca foram feitos três pré-inóculos de 50 mL de BMGY em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL. Cada um dos pré-inóculos foi inoculado com 1 g/L de células em cinco frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL com 50 mL de meio BMGY mínimo (1% de glicerol). O total de 15 frascos de cultivo foi mantido a 30°C e 250rpm durante 24 horas. A biomassa em cada frasco final foi determinada segundo o item 2.4.

Para o caso do método de quantificação do glicerol foram preparados três meios de cultivo BMGY modificado com 3,5 % de glicerol e cada um dos meios foram quantificados cinco vezes, sendo a concentração de glicerol feita segundo o método descrito no item 2.5.

Para o método de quantificação da atividade periplasmática foram feitos três cultivos em frascos *Erlenmeyer* com 4 defletores de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol inoculados com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células e crescidos a 30°C e 250 rpm durante 8 horas. As células foram separadas por centrifugação a $3500 \times g$ a 10°C durante 10 minutos e o *pellet* celular foi ressuspendido em 50 mL de meio BMMY, sendo a indução feita com 3% de metanol a cada 24 horas durante 48 horas a 250 rpm. Em cada cultivo se determinou a atividade periplasmática cinco vezes segundo o método descrito no item 2.7.2.

Para o caso do método de quantificação de proteínas totais foram preparadas três soluções de BSA ($500 \text{ }\mu\text{g/mL}$) em tampão de lise e cada uma das soluções foram quantificadas cinco vezes. A quantidade de proteínas totais foi determinada segundo o método descrito no item 2.7.1.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Quantificação da concentração de glicerol

A determinação de glicerol nos meios de cultura foi feita pelo *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest*® [Lipase, Glicerolquinase, Glicerolfosfato oxidase e Peroxidase] baseada nas reações bioquímicas catalisadas pelas correspondentes enzimas como se apresenta na Figura 17, evidentemente a determinação de glicerol começa a partir da segunda reação.

Figura 17. Fundamento bioquímico das reações na determinação de glicerol através do *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest*® em espectrofotômetro ($\lambda = 505 \text{ nm}$). GPO (Glicerolfosfato oxidase) e POD (Peroxidase).

Segundo a leitura das concentrações de glicerol nos três meios avaliados, a curva padrão foi linear até concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$. Então as equações de linearidade das curvas padrão foram calculadas segundo esse critério (Figuras 18, 19 e 20).

Figura 18. Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada água pelo *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest*® [Lipase, Glicerolquinase, Glicerolfosfato oxidase e Peroxidase] em espectrofotômetro ($\lambda = 505 \text{ nm}$).

Figura 19. Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada em meio BMGY novo pelo *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest*® [Lipase, Glicerolquinase, Glicerolfosfato oxidase e Peroxidase] em espectrofotômetro ($\lambda = 505$ nm).

Figura 20. Curva padrão de quantificação de glicerol solubilizada em meio BMGY fermentado pelo *Kit Triglicéridos Liquiform Labtest*® [Lipase, Glicerolquinase, Glicerolfosfato oxidase e Peroxidase] em espectrofotômetro ($\lambda = 505$ nm).

Uma unidade de absorbância ($\lambda = 505$ nm) da curva padrão feita em água foi 1,39 g.L⁻¹, em meio BMGY novo foi 1,31 g.L⁻¹ e em meio BMGY fermentado foi 1,36 g.L⁻¹. O que significa que não tem grande diferença entre os cálculos feitos usando qualquer uma das curvas, principalmente entre a feita em água e meio BMGY fermentado. Portanto o meio no qual o glicerol é dissolvido não afeta significativamente a determinação do substrato.

5.2. Quantificação da atividade no espaço periplasmático

A atividade asparaginásica foi determinada com base na reação de hidroxilaminólise do aminoácido asparagina catalisada pela enzima ASNase (DUNLOP; MEYER; ROON, 1980). Ambos os substrato (L-asparagina e hidroxilamina) difundem através da parede celular e atingem as enzimas localizadas no espaço periplasmático, sendo este mecanismo melhorado quando as células são expostas ao calor (MARTÍNEZ et al., 2014b). Dito mecanismo também foi relatado por CARLSON; BOTSTEIN, (1982) na conversão direta de sacarose no espaço periplasmático de células não-permeabilizadas de *S. cerevisiae* e por FERRARA et al., (2006) na quantificação da atividade periplasmática de ASNase em *P. pastoris*.

A L-asparagina reage com hidroxilamina gerando como produtos o aspartohidroxamato e o íon amônio. O aspartohidroxamato é determinado pela formação do complexo colorido com o Fe^{+3} , cuja intensidade é lida em espectrofotômetro ($\lambda = 500 \text{ nm}$). A reação é apresentada na Figura 21.

Figura 21. Reação de hidroxilaminólise da L-asparagina.

5.3. Determinação da curva de crescimento do pré-inóculo

A determinação da curva de crescimento é um passo fundamental na avaliação das características específicas de um cultivo, devido a que tanto o comportamento como a bioquímica das células se alteram significativamente em cada fase da curva (MORAES et al, 2008). Esses fenômenos são relacionados à proliferação, glicólise e respiração, atividade enzimática, síntese de produtos especializados e outras propriedades (NOVINA; ROY, 1996).

O fato de conhecer a cinética de crescimento do pré-inóculo permite determinar o tempo no qual as células se encontram no estado mais adequado para serem inoculadas. O uso

das células nas fases exponencial e estacionária podem gerar resultados diferentes quanto ao crescimento e produtividade. Durante a fase exponencial, as células estão no seu estado fisiológico mais ativo o que é ideal para os estudos de função celular, uma vez que aproximadamente 90 a 100% da população se encontra em divisão celular (MORAES et al, 2008). A transição entre a fase exponencial e a fase estacionária envolve um período desbalanceado do crescimento em que muitos componentes celulares são sintetizados em ritmos desiguais. Em consequência, as células em fase estacionária possuem composição diferente das células em fase exponencial (DUTTA, 2008). Adicionalmente, na fase estacionária, a composição das células pode mudar mesmo que a biomassa permaneça quase constante, porque a lise celular libera novos substratos (carboidratos e proteínas), que servem como fontes de energia para o crescimento lento das células sobreviventes (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Nesta fase apenas 0 a 10% das células estão se dividindo (MORAES et al, 2008).

A curva de crescimento do pré-inóculo (Figura 22) segue o comportamento sigmoide clássico do crescimento microbiano. A fase exponencial se estabelece no intervalo 14 e 18 horas de cultivo, sendo $\mu_{\text{máx}}$ igual a $0,25 \text{ h}^{-1}$. Então o pré-inóculo deve ser cultivado entre essa faixa de tempo para depois as células serem inoculadas em meios novos e aproveitadas no seu máximo estado de ativação (MORAES et al, 2008).

Figura 22. Curva de crescimento do pré-inóculo de *P. pastoris* em meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol a 30°C , 250 rpm durante 36 horas.

5.4. Construção da curva de correlação de densidade ótica e massa celular seca

A correlação entre a densidade ótica (DO) e a biomassa seca funciona muito bem em suspensões celulares diluídas, e parece ser segura independentemente do tamanho da célula. No entanto, em suspensões mais concentradas essa correlação não se sustenta (SUTTON, 2011). De fato, segundo WIDDEL (2010), aproximadamente a proporcionalidade é mantida só para $DO \leq 0,4$. Em valores mais elevados de DO perde-se a proporcionalidade pelo qual se recomenda diluir as amostras. A correlação entre as densidades óticas obtidas nas diferentes suspensões celulares e a biomassa seca (g.L^{-1}) para crescimento em metanol e glicerol são apresentadas nas Figuras 23 e 24 respectivamente. A proporcionalidade entre a DO e biomassa seca foi mantida até valores abaixo de 0,8.

Figura 23. Curva de correlação de DO e massa celular seca de *P. pastoris* crescida em meio BMGY com $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol a 30°C , 250 rpm durante 8 horas.

Por outra parte, a curva de correlação pode apresentar mudanças, dependendo do estado fisiológico das células quer pela variação do tamanho com a fase de crescimento (SUTTON, 2011) quer pelas condições de cultivo frente às diferentes distribuições de tamanho (KOCH et al, 1994). Segundo a equação da reta das curvas obtidas, não foram apresentadas diferenças nas curvas de correlação DO e biomassa seca nas células de *P. pastoris* crescidas em glicerol e metanol. Uma unidade de $DO_{600\text{nm}}$ foi equivalente a $0,52 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa seca em ambas condições de crescimento. Este resultado corrobora o encontrado

por HÉLÈNE et al., (2001), que não achou diferença significativa entre a biomassa crescida em glicerol (0,236 g.L⁻¹) e em metanol (0,222 g.L⁻¹). Porém, o valor da massa celular seca foi maior do referenciado por outros autores para *P. pastoris* (0,24 – 0,35 g.L⁻¹) (FERRARA et al., 2006; HÉLÈNE et al., 2001; JAHIC et al., 2003; MARKOŠOVÁ et al., 2015).

Figura 24. Curva de correlação de DO e massa celular seca de *P. pastoris* crescida em meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 8 horas e em meio BMMY 2% de metanol a 20°C, 250 rpm durante 72 horas.

5.5. Estudos de crescimento em agitador orbital

5.5.1. Avaliação do crescimento de *P. pastoris* em diferentes concentrações de glicerol

O crescimento de um micro-organismo é resultado das interações entre efetores intra- e extracelulares. Os efetores intracelulares são específicos do micro-organismo e estão relacionados com o genoma e expressão da informação genética. Os efetores extracelulares podem ser: a) físicos, que estão relacionados com as condições do sistema de cultura e b) químicos, incluem todos os nutrientes presentes no meio de cultivo (ASENJO; MERCHUK, 1995). Neste ensaio, foi estudada a influência da variação da concentração do efector químico (glicerol) na cinética de crescimento da *P. pastoris*.

Segundo as curvas de crescimento mediante a produção de biomassa (Figura 25), observamos que estas não se correspondem com as clássicas curvas de crescimento

microbiano, porque a fase de latência em todas as concentrações iniciais de glicerol (10 - 50 g.L⁻¹) não ocorreu. Este fato é uma vantagem porque diminui o tempo total de cultivo e pode acontecer pelas razões: 1) as células inóculadas se encontram em fase exponencial (PALOMARI, 2013) 2) as células foram pré-cultivadas em um meio com a mesma composição do meio de cultivo final (HISS, 2001), 3) o micro-organismo, que se encontra em um meio com alta concentração de nutrientes, é colocado em um meio com baixa concentração de nutrientes, pelo qual as células estão altamente estimuladas pelo meio inicial e produzem elevadas quantidades de enzimas para metabolizar os nutrientes disponíveis (DUTTA, 2008). Por outra parte, cultivos iniciados com baixa densidade celular se adaptam mais lentamente ao meio novo aumentando o tempo da fase de latência o que é indesejável (MORAES et al, 2008).

Figura 25. Crescimento de *P. pastoris* em função do tempo em diferentes concentrações iniciais de glicerol: (♦) 10,0 g L⁻¹, (■) 20,0 g L⁻¹, (▲) 40,0 g L⁻¹, (●) 50,0 g L⁻¹. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.

A comparação da Figura 25 com a curva de crescimento semi-logarítmica dos micro-organismos em função do tempo (Figura 26) proposta por HISS (2001), permite estimar com relativa exatidão as fases de crescimento da *P. pastoris*. Assim, a fase exponencial para todas as condições corresponderia ao intervalo de 0 a 4 horas. Na concentração de 10,0 g L⁻¹, a fase linear e a fase de desaceleração aparecem juntas no intervalo de 4 a 8 horas e a fase estacionária compreende o intervalo de 10 até 24 horas; com 20,0 g L⁻¹ a fase linear aparece

no intervalo 4-8 horas, a fase de desaceleração entre 8-12 horas e a fase estacionária desde 12 até 24 horas; as demais concentrações de glicerol (40,0 e 50,0 g L⁻¹), a fase linear acontece no intervalo de 4 a 12 horas entanto que a fase de desaceleração para 40,0 g L⁻¹ corresponde-se com o intervalo 12-16 horas e para 50,0 g L⁻¹ com 12-20 horas, a fase estacionária compreende desde o final da desaceleração até o final do cultivo. A fase de lise ou declínio não foi observada dentro das 24 horas de cultivo em nenhuma das condições.

Figura 26. Curva de Ln (X) de *P. pastoris* em função do tempo em diferentes concentrações de glicerol: (♦) 10,0 g L⁻¹, (■) 20,0 g L⁻¹, (▲) 40,0 g L⁻¹, (●) 50,0 g L⁻¹. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.

Ao comparar as Figuras 25 e 27, observa-se que a fase estacionária é atingida quando aproximadamente o glicerol foi completamente consumido. A baixa disponibilidade de nutrientes (incluindo o oxigênio) e o acúmulo de metabólitos inibitórios influenciam no fim da fase exponencial e no começo da fase estacionária (MORAES et al, 2008). O consumo total para cada concentração de glicerol ocorreu em diferentes tempos, mas foi dentro das 24 horas de cultivo. De acordo com (POUTOU et al., 2005a), a síntese de proteína na levedura aumenta de forma significativa durante a fase exponencial e diminui até menos de 10%, quando entra na fase estacionária. Assim, o momento ideal para iniciar a indução com metanol deveria ser apenas depois do consumo de glicerol e antes das células entrarem totalmente na fase estacionária.

Figura 27. Consumo de glicerol por *P. pastoris* em função do tempo em diferentes concentrações iniciais de glicerol: (♦) 10,0 g L⁻¹, (■) 20,0 g L⁻¹, (▲) 40,0 g L⁻¹, (●) 50,0 g L⁻¹. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.

O controle do pH ao longo do cultivo é importante tanto na fase de crescimento quanto na de indução, uma vez que ele tem papel importante na desestabilização e degradação das proteínas secretadas pelas células durante o cultivo. No entanto, as serina e ácido aspártico proteases secretadas por *P. pastoris* são ativas a baixos valores de pH (CREGG et al., 2000), o que pode explicar a atividade proteolítica pH-dependente do meio de cultivo desta levedura e, em consequência, o possível dano à estrutura da proteína de interesse. A curva de variação do pH, por sua parte, apresentada na Figura 28, correlaciona-se com as curvas de produção de biomassa e consumo de glicerol. Maiores concentrações de glicerol no meio provocam um descenso maior do pH devido ao maior crescimento da levedura. A diminuição do pH ocorreu durante o tempo no qual todo o glicerol foi esgotado e onde, também, foi atingida a fase estacionária no crescimento. A tendência a acidificar o meio durante o crescimento é uma característica importante da *P. pastoris* que evita a contaminação do cultivo por micro-organismos oportunistas (SERRANO, 2001). Segundo FICKE (2008), a acidificação do meio não é causada por um ácido específico, mas sim pela secreção de íons hidrônio pelas células. Por outra parte, o uso de sulfato de amônio também produz acidez quando os íons de amônio são consumidos durante o crescimento e os íons de sulfato são liberados (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995). Em seguida, o pH vai aumentando, possivelmente pela formação de amônia, já que a degradação das fontes orgânicas de nitrogênio (extrato de levedura e

peptonas) pelas leveduras leva à formação de três componentes chave na célula: amônia, glutamato e glutamina (ROSA; GÁBOR, 2006).

Figura 28. Curva de variação do pH em função do tempo do cultivo de *P. pastoris* em diferentes concentrações iniciais de glicerol: (♦) 10,0 g L⁻¹, (■) 20,0 g L⁻¹, (▲) 40,0 g L⁻¹, (●) 50,0 g L⁻¹. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.

5.5.2. Avaliação da produção de biomassa final em diferentes concentrações de glicerol

Em geral, a otimização da produção de biomassa é uma boa abordagem para atingir rendimento elevado de biomoléculas relacionadas com o crescimento. Sem dúvida, a produção de biomassa está ligada ao tipo de fonte de carbono utilizada, sendo o substrato (glicerol) adequadamente metabolizado por *P. pastoris*. Deste modo, é imperativo demonstrar a concentração de glicerol mais adequada, a fim de alcançar a formação de biomassa máxima com efeitos inibitório e tóxico mínimo (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A rota catabólica do glicerol envolve difusão passiva do glicerol através da membrana celular, seguida por fosforilação pela glicerol-quinase e oxidação pela glicerol fosfato-ubiquinona mitocondrial (CHIRUVOLU et al., 1998). O comportamento tão peculiar durante o consumo de glicerol em diferentes concentrações (Figura 27) permite inferir o tempo de duração desta fase mediante equação matemática. Assim, foi possível estabelecer correlação entre a concentração inicial do glicerol no meio e o tempo de consumo pelas células.

$$\text{Tempo Consumo (horas)} = 4,0 * \left(1 + \frac{\text{Glicerol (g.L}^{-1}\text{)}}{10} \right) \quad (\text{Equação 17})$$

Em que, o fator (4,0) corresponde à diferença no tempo de consumo do glicerol quando a concentração é incrementada em 10,0 g.L⁻¹.

A Equação 17 permite estimar o tempo da fase de crescimento, no qual o glicerol é esgotado completamente ou, também, seria o instante no qual as células atingem o início da fase estacionária. O tempo de consumo para todas as concentrações iniciais de glicerol foi calculado usando esta equação e a biomassa produzida nos instantes selecionados depois de ditos tempos é apresentada na Figura 29. Não foram encontradas concentrações de glicerol remanente após os tempos de cultivo, o que significa que todo o glicerol foi consumido.

Se bem o crescimento da *P. pastoris* em glicerol seja rápido, sua alta concentração no meio de cultivo pode inibir o crescimento celular. INVITROGEN (2002) recomenda não usar concentrações de glicerol maiores que 40,0 g.L⁻¹. Porém, os dados ora obtidos indicam que concentrações de glicerol até 50,0 g.L⁻¹ não provocam inibição sobre o crescimento celular. Outros autores como BRIERLEY et al (1990), recomendam concentrações máximas de glicerol de até 60,0 g.L⁻¹, embora pela Figura 29 – da qual se nota a relação direta entre produção de biomassa e concentração inicial de glicerol – observa-se que este limite pode ser estendido a valores de concentração da ordem de 100,0 g.L⁻¹.

Figura 29. Concentração de biomassa de *P. pastoris* em função de diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm. Os tempos de cultivo para cada concentração foram calculados usando a equação 17.

CHIRUVOLU et al., (1998), reportaram que a produção de biomassa de *P. pastoris* não foi afetada por concentrações iniciais de glicerol de até 120,0 g.L⁻¹. Frente ao exposto, fica claro que o limite da concentração inicial inibitória do glicerol sobre o crescimento deste micro-organismo, ainda, deve ser fixado. Provavelmente, a dificuldade de se estabelecer esse limite deve-se a eventuais características metabólicas distintas das cepas de levedura empregada pelos diferentes pesquisadores.

Adicionalmente e de maneira similar ao tempo de consumo, foi estabelecida uma equação matemática que permite estimar a quantidade potencial de biomassa obtida para cada concentração de glicerol inicial usada no cultivo.

$$Biomassa\ Seca\ (g.L^{-1}) = In\acute{o}culo\ (g.L^{-1}) + 4,6 * \left(1 + \frac{Glicerol\ (g.L^{-1})}{10}\right) \quad (\text{Equa\c{c}\~ao\ 18})$$

Em que, o fator (4,6) corresponde à diferença média de biomassa produzida quando a concentração de glicerol é incrementada em 10,0 g.L⁻¹. Por outra parte, a Figura 30 mostra a comparação entre as quantidades de biomassa obtida experimentalmente e a obtida teoricamente depois de serem calculadas usando a equação acima. A quantidade de biomassa teórica não é diferente daquela obtida experimentalmente, o que a equação estabelecida estima a produção de biomassa com relativa exatidão.

Figura 30. Concentração de biomassa de *P. pastoris* obtidas experimental e teoricamente em função de diferentes concentrações iniciais de glicerol. O crescimento foi feito em meio BMGY a pH 6,0, 30°C e 250 rpm.

5.5.3. Cálculo dos parâmetros cinéticos $\mu_{m\acute{a}x}$, tg e $Y_{x/s}$ nos ensaios de crescimento de *P. pastoris* em frascos *Erlenmeyer*.

Os parâmetros sobre a cinética do crescimento microbiano e a utilização do substrato, são essenciais no controle e otimização do sistema (ASENJO, MERCHUK, 1995). As condições ambientais (pH, temperatura, composição química do meio de cultivo) podem mudar os parâmetros cinéticos e portanto afetar a cinética de crescimento. Assim, uma ferramenta indispensável é determinar a relação entre a velocidade específica de crescimento (μ) e a concentração de substrato (S) (KOVAROVA-KOVAR; EGLI, 1998).

Na Tabela 5 são apresentados os parâmetros cinéticos para ambas as cepas, como se explicou anteriormente. A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foi calculada no intervalo de 0 a 4 h, que corresponde à fase exponencial do crescimento. Os valores calculados para o $\mu_{m\acute{a}x}$ dos ensaios em diferentes concentrações de glicerol foram similares entre eles (em torno de $0,34\text{ h}^{-1}$) o que indica que o crescimento da levedura não foi afetado pela quantidade inicial de glicerol no meio. Isto significa que a velocidade de crescimento é independente da concentração de substrato contando que não exista uma limitação de substrato (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Devido à similitude dos valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ os tempos de geração (tg), também, são semelhantes (em torno de 2,0 h). Este tempo de geração está em consonância com o valor mínimo observado em leveduras, que está na faixa de 1,5 a 2,0 h (HISS, 2001).

Tabela 5. Parâmetros da cinética de crescimento de *P. pastoris* em meio BMGY pH 6,0 a 30°C e 250 rpm em função da concentração de glicerol. A velocidade específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), tempo de geração (tg) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$).

Glicerol (g.L ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	tg (h)	$Y_{gl\acute{ic}/c\acute{e}l}$ (g.g ⁻¹)
10,0	0,37	1,9	0,9
20,0	0,34	2,0	0,7
40,0	0,34	2,0	0,6
50,0	0,35	2,0	0,6

Outros estudos de crescimento em frascos *Erlenmeyer* reportaram os seguintes resultados: $\mu_{max} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ e $tg = 2,3 \text{ h}$ usando $11,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol e $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de inóculo de *P. pastoris* (Mut^S) (FERRARA et al., 2006) e $\mu_{max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$ e $tg = 2,7 \text{ h}$ em $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, maiores concentrações de glicerol diminuíram a velocidade de crescimento de *P. pastoris* (Mut⁺) (CHIRUVOLU et al., 1998).

Por outro lado, os valores dos fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) também foram calculados. Na condição de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol foi obtido o maior valor do fator de conversão ($0,9 \text{ g.g}^{-1}$) igual ao descrito por ERICKSON (1978) como o máximo valor do $Y_{x/s}$ usando o glicerol como substrato. Este valor foi maior daquele reportado por Ferrara et al (2006), $Y_{x/s} = 0,56 \text{ g.g}^{-1}$ usando $11,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol. Quando $20,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol foram usados, foi obtido $Y_{x/s} = 0,7 \text{ g.g}^{-1}$. No entanto, CHIRUVOLU et al (1998) reportaram $Y_{x/s} = 0,6 \text{ g.g}^{-1}$ na mesma condição, mas quando o pH foi controlado com uso de biorreator, houve melhora no fator de conversão ($0,8 \text{ g.g}^{-1}$) mesmo em concentrações elevadas de glicerol como $70,0$ e $120,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Nas concentrações de glicerol de $40,0$ e $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ foi obtido o mesmo valor do fator de conversão ($0,6 \text{ g.g}^{-1}$) o que foi menor que no resto de concentrações do substrato, o que significa que a fonte de carbono foi usada mais eficientemente na geração de células em baixas concentrações de glicerol. Segundo CHIRUVOLU et al., (1998), existem dois motivos pelos quais as leveduras poderiam ter consumo ineficiente do substrato para produção de células: 1) Armazenamento de carboidratos em forma de glicogênio e trealose durante o início da fase estacionária. O glicogênio fornece glicose para a célula durante períodos de estresse nutricional e a trealose ajuda a proteger as células da dessecação ou outros tipos de estresse (WERNER-WASHBURNE et al., 1993); 2) Gasto energético para superar as grandes diferenças entre o pH intracelular ($\sim 6,0$) e do meio extracelular. Na célula em crescimento, o pH intracelular tende a mudar durante as fases do ciclo celular mesmo quando o pH extracelular é constante. Na célula em repouso, o pH intracelular é dependente do pH extracelular e o pH intracelular se mantém constante quando o pH extracelular também é constante. O gasto energético é causado pela ativação da bomba de prótons quando acontecem alterações do pH intracelular (IMAI; OHNO, 1995).

5.6. Determinação da localização da ASNase

5.6.1. Avaliação preliminar da indução de *P. pastoris* em diferentes temperaturas e concentrações de metanol

Diversos parâmetros podem afetar a produção das proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Entre os parâmetros físicos, a temperatura e a indução com metanol são os mais importantes. Por esta razão, manter a concentração de metanol em uma faixa adequada melhora a produção do sistema, haja vista que um baixo nível de metanol pode não ser suficiente para iniciar a transcrição (CEREHINO; CREGG, 2000), enquanto que um nível elevado de metanol (acima de 5,0 g.L⁻¹) pode ser tóxico para a célula (ZHANG et al., 2000). A toxidez proviria do acúmulo de formaldeído e peróxido de hidrogênio no interior das células durante a oxidação do metanol (COUDERC; BARATTI, 1980; CREGG; MADDEN, 1988; VAN DER KLEI; BYSTRYKH; HARDER, 1990). Além disso, o metanol é usado como fonte de carbono tanto na geração de energia como no anabolismo (JAHIC et al., 2002), indicando sua influência na produção de biomassa. Por outra parte, a mudança da temperatura de crescimento afeta muitos processos celulares (ex. Metabolismo de carbono central, resposta ao estresse e dobramento de proteínas). O aumento da temperatura do cultivo pode afetar a produtividade e a qualidade da proteína recombinante (JUNGO; MARISON; VON STOCKAR, 2007). No entanto, a baixa temperatura diminui o estresse sobre as células levando a uma maior quantidade de produto corretamente dobrado e se a temperatura for otimizada melhora a produtividade específica, já os fluxos de carbono são dirigidos para a produção da proteína heteróloga (GASSER et al., 2008).

As Figuras 31-33 mostram o crescimento celular em função do tempo após o início da indução. Aos 10 °C, *P. pastoris* segue cinética de crescimento semelhante em todas as concentrações de metanol. Em 20 °C e 30 °C, o crescimento foi melhor quando a concentração de metanol foi aumentada. No entanto, pode-se ver claramente que o crescimento celular foi maior a 20 °C (~20 g L⁻¹) (Figura 34). Provavelmente, quando a temperatura aumentou a difusão de metanol através da membrana plasmática celular foi favorecida e as enzimas intracelulares relacionadas com o crescimento e as vias de indução de metanol estavam na sua capacidade catalítica aumentada. No entanto, acima de 20 °C um menor aproveitamento do metanol como fonte de carbono poderia ter acontecido pela rápida evaporação do metanol que ocorre em cultivos de pequeno tamanho (COS et al., 2005).

provocado pelo aumento de temperatura do ambiente e pelo elevado calor de combustão do metanol (-727 kJ mol^{-1}) (WEAST, 1980).

Figura 31. Concentração de *P. pastoris* em meio BMMY (pH 6.0) a 10 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25% (●), 0,5% (■) e 1,0% (▲) em função do tempo e em agitador orbital.

Figura 32. Concentração de *P. pastoris* em meio BMMY (pH 6.0) a 20 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25% (●), 0,5% (■) e 1,0% (▲) em função do tempo e em agitador orbital.

Figura 33. Concentração de *P. pastoris* em meio BMMY (pH 6.0) a 30 °C, 250 rpm e concentração de metanol 0,25% (●), 0,5% (■) e 1,0% (▲) em função do tempo e em agitador orbital.

Figura 34. Concentração de biomassa seca de *P. pastoris* em meio BMMY (pH 6.0) a 10 °C, 20 °C e 30 °C, concentrações de metanol de 0,25% (●), 0,5% (■) e 1,0% (▲) após 120 horas de cultivo em agitador orbital a 250 rpm.

A formação ASNase não ocorreu no periplasma da levedura quando a indução foi realizada a temperaturas de 10 °C e 30 °C. Geralmente, nas temperaturas mais baixas e na presença de metanol, o rendimento do produto aumentou como consequência da redução de lise celular e a atividade proteolítica (JAHIC et al., 2002, 2003). Assim, JAFARI;

SUNDSTRÖM; HOLM, (2011) otimizaram a produção da Cadeia única de anti-queratina 8 Fv TS1-218 em *P. pastoris* usando uma temperatura de indução de 11 °C. Por outra parte, DRAGOSITS et al., (2009) observaram que uma redução da temperatura de 30°C para 20 °C, incrementou em três vezes a produtividade específica de um anticorpo Fab. Também observou uma redução de: a) o ciclo de ATC, b) os níveis de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e c) os níveis de chaperonas moleculares. Além disso, WHITTAKER; WHITTAKER, (2000) expressaram quatro vezes mais galactose-oxidase quando a temperatura do processo foi diminuída de 30 °C para 25 °C durante a indução de metanol. Por outro lado, a baixas temperaturas as enzimas *Cold-Active* apresentam flexibilidade conseguida por uma combinação das características estruturais, as quais podem incluir uma redução do núcleo hidrofóbico, diminuição das interações iônicas e eletrostáticas e *loops* superficiais adicionais (CAVICCHIOLI et al., 2002). Em comparação, as enzimas de micro-organismos mesófilos como *P. pastoris* tendem a ter propriedades estruturais que produzem estrutura mais rígida que, possivelmente, conduz à diminuição da resistência em baixas temperaturas. Em seguida, pode-se assumir que nas temperaturas de 10 °C e 30 °C, o estresse produz enovelamento incorreto das proteínas, conduzindo à produção de ASNase inativa.

Figura 35. Atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* em meio BMMY durante indução a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 0,25% (●), 0,5% (■) e 1,0% (▲).

Assim, a formação de ASNase ocorreu a 20 ° C e com adição de metanol em concentrações de 0,25; 0,50 e 1,0%. A partir da Figura 35 , podemos observar que a atividade periplasmática da enzima correlaciona-se com as concentrações de metanol, sendo melhor com 1%. Sob esta condição foi atingida uma atividade ASNase aproximada de 22 U.g⁻¹ após 72h de indução. Além disso, a produção de ASNase está relacionada ao crescimento, portanto é essencial otimizar a produção de biomassa a fim de obter maiores quantidades da proteína de interesse (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Por esta razão, o efeito de concentrações de metanol acima de 1% no crescimento celular e na produção de ASNase foram avaliadas em ensaios posteriores. Adicionalmente, o clone não transformado de *P. pastoris* não mostrou atividade periplasmática de ASNase em nenhuma das condições avaliadas.

5.6.2. Avaliação da localização periplasmática da ASNase

5.6.2.1. Avaliação do método de quantificação da atividade periplasmática em diferentes volumes de suspensão celular

Segundo a Figura 36, o aumento do volume de suspensão, o que também significa um aumento da quantidade de biomassa usada na reação, apresenta uma correlação direta com a atividade periplasmática encontrada, o que era o resultado esperado e que em outras palavras indicaria que cada célula participa da reação na mesma intensidade. Além disso, um aumento excessivo da concentração celular na reação aumenta a variabilidade do ensaio, resultando do fato que nem todas as células podem ser mantidas em suspensão simultaneamente e muitas tendem a sedimentar, o que gera variação na quantidade de enzimas periplasmáticas que participam da reação. Os testes de atividade em nosso trabalho foram feitos com aproximadamente 3,0 mg de biomassa seca.

Figura 36. Curva padra de correlação de Atividade periplasmática de ASNase e biomassa seca de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3,0% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol a 30°C, 250 rpm durante 8 horas.

5.6.3. Avaliação da localização extracelular da ASNase

5.6.3.1. ASNase avaliada por eletroforese em gel (SDS – PAGE)

A atividade do meio de cultura não foi avaliada pela interferência dos componentes do meio com o método de quantificação. Razão pela qual a eletroforese SDS-PAGE dos meios de cultivo livres de células foi usada para determinar a eventual presença de bandas de proteínas que poderiam indicar a possível secreção da enzima ASNase para o meio extracelular.

A Figura 37 mostra o gel de poliacrilamida dos meios de cultivo livres de células após 120 horas de indução com 1,0% de metanol e em diferentes temperaturas (10 °C, 20 °C e 30 °C) e adicionalmente o clone não transformado a 20°C. Em teoria a enzima ASNase II de *Saccharomyces cerevisiae* depois das condições redutoras e denaturantes da eletroforese deveria ser observada na sua forma monomérica como bandas de massa molecular de 44,6 e 48,6 kDa (DE CASTRO GIRÃO et al., 2016). Porém, não foram observadas bandas como o tamanho descrito em nenhuma das condições avaliadas, o que significaria que a ASNase não estaria sendo secretada para o meio extracelular e que concordaria como o proposto por

FERRARA et al (2006) em que a ASNase poderia estar ligada à parede celular por algum domínio não identificado.

Figura 37. Eletroforese SDS-PAGE dos meios de cultivo de *Pichia pastoris* em diferentes temperaturas de indução em meio BMMY a 250 rpm e 1,0% de metanol durante 120 horas. (1) 10 °C, (2) 20 °C, (3) 30 °C (4) Não transformante (20 °C) e (MM) Marcador de massa molar.

5.6.4. Avaliação da localização intracelular da ASNase

5.6.4.1. Construção da curva de rompimento das células de *P. pastoris* com pérolas de vidro

O parâmetro mais importante para a seleção da técnica de rompimento é a estabilidade do produto desejado. Os métodos mecânicos como rompimento por pérolas de vidro é um dos métodos mais amplamente utilizados para o rompimento de leveduras, tais como *Sacharomyces carlsbergensis*, *S. cerevisiae*, *Candida utilis*, e *P. pastoris* (CANALES et al., 1998). No entanto, esta técnica possui alguns inconvenientes para uso em pequena escala, como a manutenção de baixas temperaturas (MEDEIROS et al., 2008) e sua incapacidade para dissipar o calor gerado durante a operação, que foi identificada como a limitação mais importante no aumento de escala devido à sensibilidade dos produtos biológicos à

temperatura (por exemplo, as proteínas tendem a desnaturar com o aumento da temperatura); o calor gerado durante a operação pode aumentar a temperatura inicial acima de 10 °C (CANALES et al., 1998). Portanto, o controle da temperatura é parte importante durante o processo de rompimento, porque atingir temperaturas acima de 10°C durante o rompimento pode provocar desnaturação proteica. Este fenômeno pode ser causado pela própria ação da temperatura sobre determinados pontos da estrutura das proteínas – traduzida por desarranjos das ligações químicas fracas responsáveis pela estabilização do nível estrutural terciário da macromolécula - ou pelo incremento da atividade das proteases intracelulares da levedura, que são liberadas junto com a ASNase.

Os ciclos de rompimento consistiram de 30 segundos de agitação alternados com 60 segundos de resfriamento em banho de gelo. Este estudo foi realizado com 14 ciclos e as temperaturas foram mantidas sempre abaixo de 10 °C. Como no equilíbrio térmico não há absorção do calor do ambiente, o calor gerado na operação é controlado pela remoção conjunta de calor pelo sistema refrigerante e pela suspensão celular (CANALES et al., 1998). Então, temperaturas do sistema de resfriamento acima de -10 °C e/ou tempos curtos de resfriamento não permitiriam manter o sistema resfriado ao longo dos ciclos necessários para o rompimento eficiente das células. Por outra parte, tempos mais longos de resfriamento levariam à suspensão celular a atingir temperaturas abaixo de 0 °C e, em consequência, formação de cristais de gelo da fase aquosa da suspensão celular, reduzindo a eficiência dos choques das pérolas com as células. Já que como é sabido, o mecanismo de rompimento é uma combinação de forças de cisalhamento líquido e colisões entre corpos densos que se deslocam no interior da câmara de rompimento (REHACEK; BERAN; BICIK, 1969). Como se pode verificar na Figura 38, as curvas de temperatura (agitação e rompimento) têm comportamentos similares, ou seja, a variação de temperatura entre as etapas de resfriamento e agitação é mantida quase constante no intervalo de 4°C a 5°C. No ciclo zero só pode ser medida a temperatura de resfriamento e o tempo nesta etapa deve ser o suficiente longo para que a temperatura atinja valores próximos de zero, devendo-se, no entanto, evitar a formação de gelo.

Figura 38. Controle de temperatura durante o rompimento das células de *P. pastoris* (1 mL de suspensão celular de 250 g.L⁻¹, 750 mg de pérolas de vidro, pH 7,5). O ciclo consta de 30 segundos de agitação e 60 segundos de resfriamento em banho de gelo a -10°C. (●) Temperatura dos sistemas depois da etapa de resfriamento [Imediatamente antes da agitação] e (■) Temperatura dos sistemas depois da etapa de agitação [Imediatamente depois da agitação].

O ciclo 1 começa com a etapa de agitação em que o incremento da temperatura é resultado dos choques entre as pérolas de vidro. A etapa de resfriamento do ciclo 1 consegue diminuir quase totalmente o incremento da temperatura. Porém, ainda se verifica uma pequena diferença frente à temperatura inicial. Ciclos posteriores tendem a manter aquele intervalo de variação da temperatura entre as etapas de agitação e resfriamento. Aproximadamente a partir do ciclo sete, as temperaturas nas duas etapas mantêm-se constantes. Este fato seria devido ao equilíbrio na variação da temperatura do sistema pela constância na quantidade de calor gerado pelos choques entre as pérolas o que significaria que a carga de pérolas foi adequada.

O meio de cultivo e a cinética de crescimento influenciam de forma importante na resistência da parede celular. Assim, *P. pastoris* crescida em meio com metanol mostrou aumento na espessura da parede celular (88 e 146 nm quando cresceu em glicerol e metanol respectivamente) (CANALES et al., 1998). A partir do total de 14 ciclos de rompimento (Figura 39), determinou-se o número de células intactas, o teor de proteínas totais e a atividade ASNase. Evidentemente, com maior tempo de agitação o número de células rompidas também é maior. A partir do ciclo 10 a quantidade de células intactas mantém-se similar. Isto seria, provavelmente, devido ao reduzido número de células intactas passíveis de serem atingidas pelas pérolas de vidro e/ou pela alta quantidade de detritos celulares

formados, que por aumentarem a viscosidade do meio, também, contribuiria na redução das interações pérolas de vidro/células intactas remanescentes.

Figura 39. Curva de rompimento de células de *P. pastoris* (1 mL de suspensão celular de 250 g/L, 750 mg de pérolas de vidro, pH 7.5). Cada ciclo consta de 30 segundos de agitação a 3000 rpm e 60 segundos de resfriamento em banho de gelo a -10°C. (●) Número de células intactas (■) Proteínas totais e (▲) Atividade ASNase.

A curva de proteínas totais segue comportamento similar e inverso ao número das células intactas, porque com o maior número de células rompidas a quantidade de proteínas liberadas no meio, também, será maior até se atingir a invariabilidade desde o ciclo 10. Como a enzima está ligada ao espaço periplasmático, uma correlação entre a quantidade de proteína total liberada no meio e a atividade enzimática foi observada. Porém, a atividade encontrada no meio líquido foi muito baixa (ao redor de 2,0 U.g⁻¹), o que significaria que a eficiência do método é baixa ou que uma quantidade de ASNase ainda ficou ligada aos restos da parede celular separados durante a centrifugação, como na produção de Cisteína proteinase de milho (Mir1) que não foi detectada após lise celular, porque permaneceu na fracção de membrana onde foi mantida após iniciada a secreção (PECHAN; MA; LUTHE, 2004) ou como o antígeno de superfície da hepatite B, que devido ao seus vários domínios transmembrana é susceptível de ser sequestrado na membrana (VASSILEVA et al., 2001).

Assim também, a enzima, uma vez solubilizada no meio, ficará sujeita à degradação pelas proteases intracelulares, que são liberadas para o meio. Assim, maior número de ciclos e/ou maior tempo de duração das etapas rompimento/resfriamento aumentariam a possibilidade de degradação proteica e, em consequência, perda da atividade ASNase, além de representar uma simplificação da operação e redução dos seus custos diretos e indiretos do método. Portanto, de um ponto de vista bioquímico e econômico, parece adequado interromper o tratamento das suspensões de células de *P. pastoris* após 10 ciclos de rompimento, o que será fixado como procedimento de rompimento padrão. Por outra parte, o clone não transformado de *P. pastoris* sometido às condições de rompimento mostrou uma atividade intracelular de $0,7 \text{ U.g}^{-1}$, o que se poderia corresponder com ASNase da própria levedura (intrínseca).

5.7. Estudos de indução da ASNase em agitador orbital

5.7.1. Avaliação da indução de *P. pastoris* em concentrações elevadas de metanol

Os processos de produção utilizando *P. pastoris* geralmente são formados por duas fases. Na primeira fase, as leveduras usam o glicerol até consumo total com a finalidade de acumular biomassa. Na segunda fase, o metanol puro ou em combinação (com baixas concentrações de glicerol) é adicionado para iniciar a biossíntese da proteína recombinante (TRINH; PHUE; SHILOACH, 2003).

Figura 40. Curvas de crescimento celular (●), consumo de glicerol (◆) e variação do pH (▲) do cultivo de *P. pastoris* em meio BMGY 10 g.L⁻¹ de glicerol, a 30°C e 250 rpm.

A fase de crescimento já foi estudada nos itens anteriores, lembrando que a maior eficiência na conversão de substrato em células ($Y_{x/s} = 0,9 \text{ g.g}^{-1}$) foi obtido usando $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol. Assim, na Figura 40 são apresentadas em simultâneo as curvas de consumo de glicerol, formação de biomassa e variação de pH nesta condição. Após 8 horas de cultura, o glicerol foi consumido totalmente, o crescimento atinge o início da fase estacionária e o pH ao redor de 5,2.

Como já tínhamos discutido anteriormente, *P. pastoris* tende a acidificar o meio de cultivo. Com a finalidade de determinar se essa variação do pH durante a fase de crescimento tem influência na produção de ASNase, dois tipos de testes foram realizados: a) A indução foi iniciada após o consumo total de glicerol (8 horas de cultura), isto é, sem separação de células e sem alterar o meio inicial (Figuras 41, 42); b) após 8 horas de cultura as células foram separadas, lavadas e ressuspensas em meio BMMY fresco (pH 6,0) (Figuras 43, 44). A indução foi feita em concentrações elevadas de metanol (1,0; 2,0 e 3,0 %) porque, como foi concluído no ensaio anterior, maiores concentrações de metanol produziram maiores quantidades de ASNase. Além disso, permite avaliar a concentração máxima de metanol na qual a *P. pastoris* pode ser induzida sem provocar efeitos tóxicos.

Figura 41. Crescimento de *P. pastoris* em meio BMGY-BMMY (pH não ajustado) a 30°C-20°C, 250 rpm e concentrações de metanol de 1% (●), 2% (■) e 3% (▲). A linha vertical indica o início da fase de indução.

Figura 42. Atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* em meio BMMY (pH não ajustado) durante indução com metanol a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 1% (●), 2% (■) e 3% (▲). A linha vertical indica o início da fase de indução.

A comparação do crescimento celular nas condições com e sem ajuste do pH, resultaram em que não houve mudança no crescimento quando as células foram induzidas com 1 e 2% de metanol. Embora, houvesse diminuição no crescimento no meio sem ajuste de pH na concentração de 3% de metanol (Figura 41 e 43). Por outra parte, a atividade periplasmática foi consideravelmente afetada pelo pH inicial do meio de indução. No meio sem ajuste do pH após 48 horas de indução, pequenas ou nulas quantidades de atividade periplasmática foram observadas em todas as concentrações de metanol (Figura 40). No entanto, a atividade periplasmática no meio a pH 6,0 foi observada em 1% e 2% de metanol, enquanto que com 3% de metanol a atividade foi reduzida após 48 horas de indução até valores perto de zero (Figura 44). Este resultado pode estar relacionado com o forte estresse oxidativo e o risco de apoptose sofrido pela levedura e que é promovido por níveis elevados de metanol no meio (ZEPEDA et al., 2014).

Duas razões são propostas como causa da redução na produção de ASNase: 1) O acúmulo de metabólitos produzidos durante a fase de crescimento poderia ter causado toxicidade nas células durante a fase de indução do meio sem ajuste do pH, 2) A acidificação durante a fase de indução produzida pela presença de metanol. A espécie *Pichia pinus* tende a acidificar rapidamente o meio quando o metanol está presente (GONCHAR; SIBIRNYI, 1988). O que poderia significar que maiores concentrações de metanol produziram maiores

variações do pH. Este fato somado à acidez inicial do meio sem ajuste do pH afetariam a expressão da ASNase por inibição da transcrição do gene ou provocando incorreto enovelamento da enzima que afeta a estabilidade estrutural.

Figura 43. Crescimento de *P. pastoris* em meio BMGY-BMMY (pH 6,0) a 30°C-20°C, 250 rpm e concentrações de metanol de 1% (●), 2% (■) e 3% (▲). A linha vertical indica o início da fase de indução.

Figura 44. Atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* em meio BMMY (pH não ajustado) durante indução com metanol a 20°C e 250 rpm. Concentrações de metanol: 1% (●), 2% (■) e 3% (▲). A linha vertical indica o início da fase de indução.

Por outra parte, na indução feita no item 4.6.1, a atividade periplasmática máxima foi atingida após 48 horas (ao redor de 25 U.g^{-1}) com 1% de metanol. Contudo, neste ensaio com concentrações mais altas de metanol obteve-se no mesmo intervalo de tempo atividade enzimática de 15 U.g^{-1} . Esta redução da quantidade de enzima expressada pode ter sido causada pelo fato da indução do promotor AOX estar fortemente influenciada pelo substrato de crescimento; em células cultivadas previamente em outra fonte de carbono (glicerol, xilose, ribose ou sorbitol), a atividade específica da enzima AOX é aproximadamente 60% do atingido com metanol (POUTOU et al., 2005b).

Figura 45. Atividade volumétrica da ASNase de *P. pastoris* produzida em meio BMMY (pH 6.0) a 20°C, 250 rpm em diferentes concentrações de metanol durante 144 horas de cultivo.

A concentração de metanol é um parâmetro crítico no cultivo de *P. pastoris* (COS et al., 2006) desde que certos níveis de metanol afetam tanto o crescimento como a expressão do gene heterólogo (MAYSON et al., 2003). Em alguns casos, a máxima concentração do produto é atingida em baixas concentrações de metanol (KATAKURA et al., 1998; ZHANG et al., 2000) porque a indução com quantidades limitantes de metanol o promotor AOX é induzido entre 3 e 5 vezes mais que em excesso de metanol (CEREGRINO; CREGG, 1999). Assim, a formação de Albúmina Sérica Humana V, por exemplo, foi melhor em baixas concentrações de metanol ($0,45 \text{ g.L}^{-1}$ ou 0,56%) (KUPCSULIK; SEVELLA, 2004).

Em níveis elevados de metanol geram-se altas concentrações de metabólitos tóxicos para a célula como formaldeído, ácido fórmico ou formiato (forma ionizada do ácido fórmico). Estes metabólitos são até 100 vezes mais prejudiciais que o metanol na viabilidade celular (JONES; BELLION, 1991). Elevadas concentrações de formaldeído e ácido fórmico provocam a excreção para o meio extracelular, inibindo o crescimento celular porque afetam diretamente as proteínas da parede celular (atuam sobre uniões peptídicas provocando a desintegração das sequências fosfolipídicas) (JONES; BELLION, 1991; SWARTZ; COONEY, 1981). Além disso, o formaldeído no interior da célula provoca inativação da enzima AOX pela dissociação do grupo prostético FAD e finalmente a morte celular (VEENHUIS et al., 1983). A produção de ASNase expressada como atividade volumétrica (U.L^{-1}) (Figura 45) foi usada para determinar a melhor condição (concentração de metanol e tempo de indução). Diferentes comportamentos foram observados em cada uma das condições: a) metanol a 1%, a atividade volumétrica foi incrementando com o tempo e a melhor produção de ASNase foi alcançada a partir das 120 horas; b) metanol a 2%, a atividade volumétrica atinge seu valor máximo em 72 horas e foi mantida quase constante até o final do cultivo e c) metanol a 3%, a melhor atividade volumétrica foi obtida após 48 horas de cultivo. Após este instante, ocorreu uma redução considerável da produção de ASNase.

Segundo alguns autores, o efeito inibitório do metanol ocorre em concentrações acima de 5 g.L^{-1} (0,63%) (STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998; SWARTZ; COONEY, 1981) ou acima de 7 g.L^{-1} (0,89%) (KOBAYASHI et al., 2000). Porém, para MAYSON et al., (2003), os efeitos tóxicos em *P. methanolica* foram observados em 1,5% de metanol e KHATRI; HOFFMANN, (2006), reportaram que altas concentrações de metanol (3%) podem prevenir a acumulação de impurezas que são difíceis de remover durante o processo de purificação. Para efeito de comparação, tomemos como exemplo o aumento da produção extracelular de Human Pz-Glycoprotein I (pzGPZdV) por levedura em presença de alta concentração de metanol descrito por KATAKURA et al., (1998), que propuseram três interpretações para explicar o resultado: 1) incremento da transcrição do gene, 2) incremento da permeabilidade da proteína através da membrana e 3) incremento no fornecimento de energia para produção da proteína. Segundo os autores esta terceira hipótese seria a mais razoável para explicar o resultado relacionado à obtenção da PzGPZdV. Para nosso caso, poder-se-ia considerar que o aumento na expressão da ASNase seguiria o mesmo padrão. Com base nesta análise e levando em consideração a eficiência das quantidades de metanol usadas durante o processo, fixou-se em 3% a concentração de metanol e em 48 h o tempo.

5.7.2. Planejamento fatorial fracionado das condições de indução da ASNase

O importante do desenho experimental é que mostra como as interações entre os fatores de entrada podem influenciar nas respostas de saída. Muitos estudos envolvem os fatores do meio de cultivo em combinação com parâmetros operacionais do processo (temperatura, tempo de indução, agitação e aeração) (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Quando se for estudar o efeito de muitos fatores, não é recomendável fazer um planejamento completo de imediato, senão começar com um planejamento fracionário e tentar separar os fatores realmente significativos. Além disso, permite estudar mais fatores com menor número de experimentos (DE BARROS et al, 1996). A redução do conjunto de experimentos pode ser descrita matematicamente como $3^{(n-k)} + 2$, em que n é o número de fatores a serem investigados nos diferentes níveis (baixos, médios e altos) e k é o número de passos para reduzir o desenho experimental (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008).

Segundo os dados obtidos no item 4.7.1, nula atividade foi achada quando faixas amplas de temperaturas (10 °C - 30 °C) foram testadas; por esta razão faixas mais estreitas de temperatura (15 °C – 25°C) foram testadas com o fim de achar a temperatura ótima de expressão. O diagrama de Pareto permite determinar a magnitude e a importância de um fator. Assim, nas Figuras 44 e 45, mostram-se os diagramas de Pareto dos fatores [Temperatura (°C), Concentração de metanol (%) e Tempo de indução (horas)] no desempenho das respostas [Produção da biomassa seca (g.L^{-1}) e Atividade periplasmática (U.g^{-1})] respectivamente. Os coeficientes foram calculados com intervalo de confiança de 95% ($p = 0,05$) e aqueles fatores que se estendem para além da linha de referência são potencialmente importantes.

O diagrama de Pareto (Figura 46) mostra que a produção de biomassa seca não foi afetada em grande medida por algum dos fatores avaliados, embora certa influência do MeOH (%), Temperatura (°C) e pela interação de MeOH (%)/Temperatura (°C) tenha ocorrido. Entretanto, para a atividade periplasmática se observa que a temperatura tem efeito relevante, aliás como já constatado anteriormente. Além disso, a atividade ASNase foi afetada em menor grau pelo Tempo (h) e pela interação MeOH (%)/Temperatura (°C); o Tempo (h) e MeOH (%) mostraram ser significativos, porém em menor grau (Figura 47).

Figura 46. Diagrama de Pareto na análise da concentração de biomassa seca (g.L^{-1}), considerando o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios. Erro puro = 0,2865, $p = 0,05$. O coeficiente negativo de um fator principal indica que a diminuição do nível do fator, relativo ao seu ponto central, terá efeito positivo sobre a produção de biomassa.

Figura 47. Diagrama de Pareto na análise da Atividade Periplasmática (U.g^{-1}), considerando o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios. Erro puro = 0,0373, $p = 0,05$. O coeficiente negativo de um fator principal indica que a diminuição do nível do fator, relativo ao seu ponto central, terá efeito positivo sobre a expressão de ASNase.

A modelagem da superfície de resposta ajuda na identificação dos níveis em que se atinge o rendimento ótimo das respostas estudadas (produção de biomassa seca e ASNase). Os fatores avaliados podem ser descritos em termo de variação linear e em termo de variação quadrática (de curvatura) (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Na Figura 48, a produção de biomassa variou linearmente com a MeOH (%), o que significa que maiores concentrações de metanol produzem maiores quantidades de biomassa seca (g.L^{-1}). Além disso, a Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) varia em forma quadrática quando interage com MeOH (%), o que significa que em concentrações baixas de metanol (1,0 %), a maior produção ocorre na temperatura média (20°C). Entretanto, em elevadas concentrações de metanol (3,0 %), a maior produção de biomassa seca ocorre nas temperaturas inferior e superior, respectivamente, 15 e 25°C . Nas Figuras 49 e 50 observa-se que a temperatura foi o parâmetro mais influente sobre a atividade periplasmática da ASNase. Da Figura 49 – relacionada com efeito da interação MeOH(%)/Temperatura($^{\circ}\text{C}$) – observa-se que a ASNase foi produzida a 20°C e a sua produção melhorou paulatinamente, à medida que a concentração de metanol aumentou (da ordem de 3%). Entretanto, frente à interação Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) – Tempo (h) (Figura 50), a expressão de ASNase foi ligeiramente maior nos níveis inferior e superior do tempo de indução (48 e 96 horas).

Figura 48. Superfície de resposta na análise da concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) frente à interação Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)/MeOH(%) no planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios. Erro puro = 0,2865.

Figura 49. Superfície de resposta na análise da atividade periplasmática (U.g^{-1}) frente à interação MeOH (%) / Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) no planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios. Erro puro = 0,0373.

Figura 50. Superfície de resposta na análise da atividade periplasmática (U.g^{-1}) frente à interação Tempo de indução (h) / Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para o planejamento fatorial fracionado ($3^{n-k} + 2$), $n = 3$ e $k = 1$. O ensaio é composto por um bloco de 11 ensaios. Erro puro = 0,0373.

Embora a redução do número de fatores experimentais diminua a qualidade estatística obtida, devendo, por isso, ser aplicada com cautela, não impede, entretanto, que se obtenham predições significativas para os parâmetros escolhidos (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Assim, depois das análises respectivas, notou-se que a melhor condição para produzir maiores quantidades de biomassa (ao redor de 31 g.L⁻¹) era 15 °C com 3% de metanol durante 72 horas. Para expressar maiores quantidades de ASNase (ao redor de 16 U.g⁻¹) a condição foi a 20 °C com 3% de metanol durante 48 horas. Finalmente, em vista que a atividade periplasmática foi a resposta mais importante e as condições de maior produção de ASNase coincidiram com as determinadas no ensaio anterior, estas serão utilizadas nos ensaios seguintes.

5.7.3. Avaliação da expressão de ASNase em diferentes valores de pH

P. pastoris pode tolerar uma faixa de pH entre 3,0 e 7,0 (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; WANDERLEY et al., 2009), mas o recomendado para os meios de cultura é pH 6,0 (INVITROGEN CORPORATION, 2002). Este parâmetro é muito importante tanto na secreção de proteínas quanto no crescimento celular. No entanto, diferentes valores de pH foram reportados como ótimos desde o ponto de vista da estabilidade da proteína recombinante: ao pH 6,0 para produção do Fator epidérmico de rato recombinante e Polipeptídeo semelhante à Elastina (CLARE et al., 1991; SCHIPPERUS et al., 2009), ao pH 8,0 de metionina adenosiltransferase (HU et al., 2014) e pH 3,0 para a produção de Antígeno SAG2 de *Toxoplasma gondii* (LING; ITHOI; YIK, 2010).

Nos ensaios anteriores, foi demonstrado que quando a indução foi iniciada em pH ácido (< 5,0) obte-se baixo ou nulo o valor da atividade periplasmática (Figura 42). Considerando isto, valores de pH entre 5,0 e 8,0 foram testados com o fim de determinar o melhor pH do meio durante a fase de indução (20°C e 3% de metanol durante 48 horas). Os resultados mostram que valores de pH na faixa entre 6,0 e 8,0 produzem maiores quantidades de biomassa seca, mas a atividade periplasmática foi semelhante em todos os valores de pH avaliados (Figura 51). Existe alta diversidade de valores ótimos para produção de biomassa e proteína heteróloga, de fato, poucas vezes esses valores tendem a coincidir. Os valores de pH mais utilizados em diferentes estudos esta entre 5,0 e 6,0 (CREGG et al., 1993). Assim, (CALIK et al., 2010b) reportou que a maior concentração celular foi obtida em pH 6,0 e a

maior produção de hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) a pH 5,0. Embora, para SHI et al., (2003), a maior produtividade do fragmento do anticorpo scFv foi achada na faixa de pH 7,5-8,0, mesmo que estes valores de pH não foram os melhores para atingir os níveis mais altos de crescimento celular após indução (pH 6,0-7,0). Por outra parte, estudos de crescimento em *P. pastoris* KM71H relataram que cultivos em baixa densidade celular foram obtidos em meio de cultivo com pH entre 5,5 e 6,0, mas que elevada densidade celular poderia ser obtida a pH 5,0 (WANDERLEY et al, 2009). Sendo assim, a escolha do pH ótimo deve ser feita considerando o critério mais importante, sem dúvida aquele que leva à maior produtividade da proteína de interesse.

Figura 51. Biomassa seca e atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY em diferentes valores de pH a 20 °C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.

Com a finalidade de determinar o melhor pH da fase de indução, foram representados os valores de atividade volumétrica (U.L⁻¹) da ASNase a cada condição (Figura 52). A atividade volumétrica nos diferentes valores de pH não mostrou diferença significativa entre um e outro valor. O que significa que em pH 6,0 a expressão da ASNase é eficiente. Dita eficiência pode estar relacionada com o discutido anteriormente, ou seja, que o pH intracelular das leveduras (em torno de 6,0) permite às células despendar menos energia para equilibrar o pH intra e extracelular (IMAI; OHNO, 1995). Segundo SHI et al., (2003), um maior número de células viáveis foram obtidas em meio BMMY a pH 6,0, 30 °C e após 36 h de indução com metanol, que é muito semelhante às condições usadas na expressão de ASNase. Por

consequente, não seria necessário mudar o pH da fase de crescimento para começar a fase de indução.

Figura 52. Atividade volumétrica de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY em diferentes valores de pH a 20 °C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.

O pH do meio de cultivo durante a fase de indução tende a diminuir. Por exemplo, (JAFARI; SUNDSTRÖM; HOLM, 2011), reportaram que após 72 h de indução o pH diminuiu significativamente nos diferentes ensaios, mesmo quando foram usados meios tamponados. Porém, este problema pode ser resolvido melhorando a capacidade de tamponamento no meio de cultivo ou pelo ajuste constante do pH através do uso de biorreator.

5.7.4. Avaliação da expressão de ASNase com suplementação de aminoácidos e casaminoácidos

As fontes de nitrogênio preferidas pelas leveduras são: sulfato de amônio, L-asparagina, ácido glutâmico (HAMPSEY, 1997) e L-arginina (CHUNG; PARK, 1998). Entretanto, os casaminoácidos, extrato de levedura e peptona geralmente são usados como fontes não definidas de nitrogênio para leveduras recombinantes (VASAVADA, 1995). A deficiência de nitrogênio e/ou outros componentes pode gerar estresse nutricional, o que leva à completa reorganização do metabolismo celular, podendo levar à diminuição da produção

de proteínas heterólogas (CHEN et al., 2000). Contrariamente, o excesso de aminoácidos pode melhorar significativamente a produção de proteínas heterólogas em leveduras recombinantes auxotróficas (GÖRGENS et al., 2005a).

CHEN et al., (2000), compararam a produção de α -amilase de rato por *S. cerevisiae* após suplementação do meio com 0,5% (w/w) de aminoácidos (ácido glutâmico, asparagina e arginina) e casaminoácidos. Assim, o mesmo ensaio foi realizado em *P. pastoris* com o fim de melhorar a produção de ASNase. Na Figura 53 se observa que maiores quantidades de biomassa seca foram obtidas quando o meio foi suplementando com L-arginina (ARG) e L-asparagina (ASN) e em menor medida com a L-glutamina (GLUT). Segundo ALBERS et al., (1996), os aminoácidos exógenos podem ser incorporados diretamente na produção de biomassa; no caso da ARG o resultado pode ter ocorrido pelo alto teor molar de nitrogênio, o que permitiria a sua utilização preferencial no meio (JIRANEK; LANGRIDGE; HENSCHKE, 1995). Entretanto, ASN e GLUT são aminoácidos classificados como fontes preferidas de nitrogênio porque eles são consumidos rapidamente a pesar da presença de amônio no meio de cultivo (GÖRGENS et al., 2005b)

Figura 53. Biomassa seca e atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) com diferentes suplementos de aminoácidos e casaminoácidos a 20 °C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.

Por outra parte, a atividade periplasmática não melhorou em nenhuma das condições estudadas. Inclusive, a atividade determinada foi menor daquela obtida no controle. Provavelmente, a presença dos suplementos no meio de cultura poderiam ter desviado o metabolismo da célula principalmente na produção de biomassa. Esta interpretação pode ser visualizada pela Figura 54, em que a atividade volumétrica obtida no controle foi maior daquelas obtidas com os meios suplementados. No caso do ASN, o alto valor da atividade volumétrica dever-se-ia à alta formação de biomassa.

Figura 54. Atividade volumétrica de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) com diferentes suplementos de aminoácidos e casaminoácidos a 20 °C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo.

Cabe a possibilidade de que a suplementação seja positiva só no caso de proteínas heterólogas extracelulares como o reportado por GÖRGENS et al., (2005b) que melhorou a produção de biomassa e xilanase em *S. cerevisiae* quando adicionou uma mistura equimolar de aminoácidos (L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-glutamina, L- ácido glutâmico e L-glicina). Segundo CHEN et al., (2000), a L-asparagina seria a responsável pelo aumento da capacidade proliferativa e a secreção de α -amilase em *S. cerevisiae*. Embora os mecanismos ainda não estejam bem esclarecidos, pode-se atribuir sua utilização ao aumento da expressão e secreção de proteínas heterólogas. Salienta-se que SHI et al., (2003) conseguiram aumentar o acúmulo de anticorpo de cadeia simples (scFv) entre três e cinco vezes mais em *P. pastoris* pelo uso L-arginina, comparável ao obtido com o uso dos casaminoácidos no cultivo de *P. pastoris* (SREEKRISHNA et al., 1997).

5.7.5. Avaliação da influência do tempo de crescimento na expressão de ASNase

A síntese dos componentes celulares é feita em ritmos desiguais durante o cultivo, gerando diferenças entre a composição das células nas fases exponencial e estacionária (DUTTA, 2008). A redução na velocidade de síntese de proteínas no período de transição entre as fases de crescimento citadas poderiam estar relacionadas às alterações na conformação global da cromatina nuclear das leveduras em fase estacionária (PIÑON, 1978; ROSE; HARRISON, 1989). Por outra parte, diferença entre o pH intracelular das leveduras em fase exponencial ($\sim 6,8$) e em fase estacionária ($\sim 5,6$) também foi observada (IMAI; OHNO, 1995). Por conta disto, foi avaliada a influência do estado celular durante o início da fase de indução sobre as diferenças na produtividade de ASNase.

Diferenças quanto à produção de biomassa seca não foram observadas nas várias condições de cultivo (Figura 55), devido à similaridade do consumo de glicerol pelas células, mesmo na presença do metanol. Isto poderia ser consequência do lento crescimento de *P. pastoris* em metanol ($\mu_x = 0,05 \text{ h}^{-1}$) (CREGG; MADDEN, 1989) ou tempo de geração entre 14-18 horas (INVITROGEN CORPORATION, 2002). A atividade periplasmática diminuiu quando as células passaram mais tempo no meio de crescimento sem glicerol e foram induzidas na fase estacionária.

Figura 55. Biomassa seca e Atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após diferentes tempo de crescimento em meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol.

O que acontece com *P. pastoris* poderia ser similar ao observado por BOUCHERIE (1985) em *S. cerevisiae*, que atribuiu à ocorrência de uma fase de transição antes da depleção total do substrato (glicose), caracterizada por diminuição da taxa de crescimento e redução progressiva da acumulação de ARN e da síntese de proteína. A quantidade ARN das células em fase estacionária representaria apenas o 5% do ARN total das células em fase exponencial (MC LAUGHLIN et al, 1973). Entretanto, a síntese de proteínas é dependente do ciclo celular e tende a diminuir até mais de 90% nas células em fase estacionária (ELLIOT, MC LAUGHLIN, 1983; BOUCHERIE, 1985). Embora para ROSE; HARRISON (1989), esta redução estaria mais relacionada com a diminuição da eficiência dos ribossomos que pela redução do ARNm, já que o número de ribossomos ativos é constante durante o ciclo celular (ELLIOT, MC LAUGHLIN, 1983). Esta redução da eficiência poderia ser causada pela diferença dos níveis de fosforilação nos ribossomos; células em fase exponencial apresentam maiores níveis de fosforilação o que sugere que este mecanismo controla a quantidade de fosfoproteínas ácidas unidas aos ribossomos e, portanto seu nível de ativação (CYTRYNSKA et al., 1995; JAHIC et al., 2003).

Figura 56. Atividade volumétrica de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após diferentes tempo de crescimento em meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol.

O fato da maior produtividade de ASNase obtida, quando as células são induzidas apenas com o glicerol esgotado e antes de entrarem completamente na fase estacionária, pode ser observado pela Figura 56. O maior valor após 8 horas de crescimento em glicerol (10,0 g.L⁻¹) proviria da maior atividade periplasmática já que a biomassa seca produzida foi similar em todas as condições. Outra razão da redução da expressão da ASNase poderia advir da queda na expressão do gene por *P. pastoris*, presumivelmente devido à limitação de ATP nas células em fase estacionária (KAMARTHAPU et al., 2013), acrescidos da proporção elevada de RNAm que estariam associados aos polissomos (associações de ribossomos) em células cultivadas em metanol; a alta produtividade da enzima durante a fase de indução estaria diretamente ligada à condição de crescimento e não só à força do promotor (PRIELHOFER et al., 2015). Por este motivo, um fator importante durante a indução é o de manter as células nas fases mais adequadas do ciclo celular, procurando, inclusive, reduzir o máximo possível o tempo de cultivo.

5.7.6. Avaliação da influência da concentração de glicerol da fase de crescimento na expressão de ASNase

A obtenção de alta densidade celular é uma característica desejável para produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* porque permite obter alto rendimento (HENSING et al., 1995; STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998). Após gerar suficiente biomassa durante a fase de crescimento através do uso de fontes de carbono como glicerol, segue a fase de indução com metanol em que normalmente são atingidos altos níveis de produção da proteína recombinante (GURRAMKONDA et al., 2009). Porém, alta densidade celular muitas vezes provoca níveis de estresse nas células, o que pode levar à diminuição da produtividade, diminuição da viabilidade celular e aumento da lise celular (LEE, 2008), podendo, também, resultar em rápido esgotamento dos nutrientes do meio. O acúmulo acentuado de proteases extracelulares devido à maior morte celular (CEREGHINO; CREGG, 2000; DALY; HEARN, 2005). Em contraste, culturas induzidas em baixa densidade de células a maior parte dos nutrientes termina sendo empregada na produção de biomassa ao invés de proteínas (SHI et al., 2003; WAN et al., 2008). Por esta razão, é importante alcançar um ponto de equilíbrio na densidade celular e minimizar as desvantagens a fim de obter alto nível de expressão da proteína desejada.

Observa-se da Figura 57 que maior quantidade de biomassa seca foi produzida quando maiores quantidades de glicerol foram empregadas na fase de crescimento, levando à maior disponibilidade de células para a indução. Porém, a atividade periplasmática em todas as condições foi similar, implicando a mesma expressão de ASNase por célula. A localização periplasmática da ASNase seria o aspecto negativo em relação à sua produtividade por célula, uma vez que o espaço de confinamento por ser pequeno, faria com que as moléculas de enzima se emaranhassem a ponto de ter sua performance catalítica afetada e, em consequência, dar a impressão de que a expressão da ASNase seria limitada. A Figura 58 mostra que a atividade asparaginásica total aumenta com o aumento da concentração inicial de glicerol, ou seja, à medida que a biomassa aumenta, corroborando o dado apontado na Figura 57 de que a quantidade aparentemente expressa da enzima seria função de sua localização em um espaço celular confinado. Segundo CEREHINO et al., (2002), a otimização da produção de biomassa permite atingir alta densidade celular o que é importante para produção de proteínas relacionadas ao crescimento como no caso de ASNase.

Figura 57. Biomassa seca e Atividade periplasmática de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em diferentes concentrações iniciais de glicerol em meio BMGY.

Figura 58. Atividade volumétrica de ASNase de *P. pastoris* induzida em meio BMMY (pH 6,0) a 20°C, 250 rpm e 3% de metanol durante 48 horas de cultivo após crescimento em diferentes concentrações iniciais de glicerol em meio BMGY.

5.8. Estudos de produção de ASNase em Biorreator

O estudo do processo fermentativo de *P. pastoris* geralmente começa com o uso de frasco agitado antes de transferir para um de maior volume (biorreator). O frasco agitado é considerado condição sub ótima devido à falta de armazenamento de dados e controle dos parâmetros (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992) e por isso os parâmetros de cultivo devem ser ajustados durante o escalamento (CEREGHINO et al., 2002). Sendo que a diferença mais importante é a capacidade do biorreator de controlar a taxa de crescimento específica ao redor dos valores máximos (LOOSER et al., 2014) e de identificar e regular as condições ótimas do crescimento de biomassa e formação de produto, incluindo pH, temperatura, fornecimento de oxigênio e nutrientes. A mudança de frasco agitado para biorreator aumenta o nível de oxigênio dissolvido (OD) pelo incremento da agitação, fluxo de ar ou suplementação de oxigênio puro na entrada de gases (LEE, 2008). Finalmente, altas densidades celulares podem ser atingidas nos cultivos em biorreator e, em consequência, gerar alto rendimento de produção (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992; STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998).

Dois processos fermentativos foram levados a cabo em diferentes concentrações iniciais de glicerol na fase de crescimento, o meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol

(estabelecida como a concentração base no crescimento e que apresentou a maior eficiência no aproveitamento para produção de biomassa) e 40,0 g.L⁻¹ de glicerol [recomendada pela INVITROGEN CORPORATION, (2002)] como a máxima quantidade de glicerol onde não se apresentam efeitos tóxicos, embora nossos dados apontam para maiores valores de concentração.

Nas Figuras 59 e 60, são apresentadas as curvas de crescimento, consumo de glicerol (10,0 e 40,0 g.L⁻¹) e curva de porcentagem de oxigênio dissolvido (OD). O crescimento da levedura ocorreu até que o consumo total do glicerol foi atingido, 9 horas em 10,0 g.L⁻¹ e 21 horas a 40,0 g.L⁻¹ de glicerol, estes tempos de consumo foram muito similares aos tempos obtidos nos ensaios em frascos *Erlenmeyer* nas mesmas concentrações de substrato (8 horas a 10,0 g.L⁻¹ e 20 horas a 40,0 g.L⁻¹). Por outra parte, nas condições de aeração e agitação de 1,0 vvm e 500 rpm, respectivamente, a 30°C, foi obtido valor de k_La igual a 94 h⁻¹. Este valor de k_La proporciona alta aeração no meio o que significa que minimiza a produção de etanol (DU PREEZ, 1994; HARTNER; GLIEDER, 2006).

Figura 59. Comportamento de *P. pastoris* em biorreator *New Brunswick Bioflo*® 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g L⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm. Curva de crescimento (●), curva de consumo de glicerol (◆) e variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (■).

Figura 60. Comportamento de *P. pastoris* em biorreator New Brunswick Bioflo[®] 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 40,0 g L⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm. Curva de crescimento (●), curva de consumo de glicerol (◆) e variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (■).

A medição e observação da concentração de OD em uma cultura oferecem informações importantes sobre o estado funcional da cultura (INVITROGEN CORPORATION, 2002). A monitorização do oxigênio permite determinar o momento em que a indução deveria ser feita, uma vez que a fonte de carbono primária se esgota e a concentração de oxigênio aumenta drasticamente (CORDOBA et al., 2003; SPADIUT et al., 2014). Redução da OD foi observada aproximadamente após 6 horas de cultivo nas duas concentrações de glicerol, e mantém-se baixa ao longo do cultivo até o que o consumo total da fonte de carbono não tenha sido atingido; isto acontece porque durante o crescimento logarítmico, a velocidade de absorção de O₂ aumenta enquanto que o conteúdo em O₂ no meio decresce até se tornar limitante (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Concentração aproximada de 40% de OD foi observada no instante em que o glicerol no meio de cultivo tinha sido esgotado.

Figura 61. Comportamento de *P. pastoris* em biorreator *New Brunswick Bioflo*® 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 g L⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução. Curva de crescimento (●), curva de produção de ASNase (▲) e variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (■).

Figura 62. Comportamento de *P. pastoris* em biorreator *New Brunswick Bioflo*® 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 40,0 g L⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução. Curva de crescimento (●), curva de produção de ASNase (▲) e variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (■).

A fase de indução é crítica, se for feita em momento inadequado (antes da depleção total do glicerol ou muito tempo depois), ou se a quantidade de metanol fornecida for muito excessiva ou muito limitada, a resposta pode ser muito lenta afetando o cultivo e a expressão da proteína (JIMÉNEZ et al., 1997). Durante o metabolismo do metanol se emprega oxigênio a altas velocidades pelo qual se observa diminuição do oxigênio dissolvido, então a expressão dos genes é afetada positivamente pelo fornecimento de oxigênio no meio (CORDOBA et al., 2003). Outro ponto importante a controlar é a concentração residual de metanol, porque a transição entre o efeito positivo de elevadas concentrações de metanol sobre a força de indução e o efeito negativo sobre a viabilidade celular emerge em concentração de metanol que não deve exceder 0,4% - 0,6% (HONG; MEINANDER; JÖNSSON, 2002), outros recomendam 0,3% para linhagem Mut^S (INVITROGEN CORPORATION, 2002).

A indução com metanol pode ser de forma contínua ou por pulsos. A indução do cultivo por pulsos é uma das formas mais tradicionais de indução e significa adicionar uma quantidade de metanol e aguardar que as células comecem a usá-lo (CORDOBA et al., 2003). SPADIUT et al., (2014) induziram a *P. pastoris* com um pulso de metanol de 0,5 % (v/v) seguido de pulsos de 1,0% (v/v) tão logo o teor de metanol dentro do biorreator se esgotaria. DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, (2011) fizeram-no com dois pulsos consecutivos de 1,0% (v/v) de metanol a cada 24 h. Durante a fase de indução nas condições de aeração e agitação (1,0 vvm e 500 rpm) a 20°C, o valor de k_{La} era igual a 90 h⁻¹. Nas Figuras 61 e 62, são apresentadas as curvas das variáveis de estado (biomassa e produto) e porcentagem de OD. A indução foi feita em ambos os casos depois do consumo total do glicerol, estimulando, a seguir, a expressão de ASNase com a adição de metanol a 3,0% (v/v). A atividade periplasmática foi encontrada após 12 horas de indução em ambos os casos. A produção de ASNase foi praticamente estável ao longo da fase de indução (120 horas). Este fato foi contrário ao que aconteceu no frasco *Erlenmeyer* em que a atividade ASNase tendeu a cair ao longo do cultivo. Isto poderia ser devido a que o pH (6,0) do meio foi mantido constante. Um incremento da produção de biomassa, também, foi observado em ambas às condições, indicando parte do uso do metanol pelas células como fonte de carbono. No caso do OD, picos da porcentagem foram observados no tempo em que as induções com metanol foram feitas, o que significa que o controle do metabolismo do metanol pode ser feito através do acompanhamento do OD, fato contrario ao sugerido pela (INVITROGEN CORPORATION, 2002), uma vez que o metabolismo de metanol pela linhagem Mut^S é tão lento que o consumo de oxigênio é muito baixo para poder ser avaliado pelo seguimento da percentagem do OD.

Segundo o comportamento do OD (%), o metanol deveria ter sido consumido aproximadamente 15 horas depois do pulso; fato a ser considerado negativo, porque as células sofreriam de inanição depois que todo o metanol fosse consumido e até a introdução de um novo pulso. Algo semelhante foi observado na expressão da α -L-rhamnosidase (MARKOŠOVÁ et al., 2015). Então, a expressão de ASNase talvez pudesse ter sido melhorada se um novo pulso de metanol tivesse sido feito após este tempo. Na condição com 40,0 g.L⁻¹ de glicerol não foi observado o último pico de OD, porque, aparentemente, a concentração de células foi tão alta que superou a quantidade de oxigênio disponível no cultivo e, portanto não houve incremento observável deste parâmetro. A fase de indução somente foi conduzida durante 120 horas, porque a viabilidade celular permanece elevada (>90%) durante as primeiras 90-100 horas de crescimento em metanol, tendendo a diminuir consideravelmente em seguida (GURRAMKONDA et al., 2009).

Segundo a Tabela 6, o $\mu_{m\acute{a}x} = 0,32$ e $0,27 \text{ h}^{-1}$ para 10,0 e 40,0 g.L⁻¹ respectivamente, foram menores que as obtidas em frascos *Erlenmeyer*. Esta diferença entre os cultivos em biorreator poderia ter sido causada, porque para 40 g.L⁻¹ de glicerol o tempo de limitação de oxigênio no meio foi maior. O fato de mais células estarem respirando a remoção de oxigênio do meio é bem maior. Embora, FERRARA et al., (2006) também reportaram diminuição da velocidade específica máxima de aeração, quando passaram do frasco agitado para o biorreator, respectivamente, de $0,30 \text{ h}^{-1}$ a $0,25 \text{ h}^{-1}$. Outros autores como JUNGO; MARISON; VON STOCKAR, (2007) determinaram $\mu_{m\acute{a}x} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ e LEE (2008), $\mu_{m\acute{a}x} = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Os fatores de conversão obtidos foram similares (em torno de 0,8), e foram maiores que $Y_{x/s} = 0,5$ conforme reportado por (HÉLÈNE et al., 2001) em 40,0 g.L⁻¹ de glicerol. Entretanto, CHIRUVOLU et al., (1998), reportaram em pH constante (5,0) um $Y_{x/s} = 0,8$ em concentrações de 20,0, 40,0 e 120,0 g.L⁻¹ de glicerol. Aparentemente, o pH mantido constante durante a fermentação poderia aumentar a eficiência da transformação de substrato em células. Porém, houve incremento na quantidade produzida de etanol, que poderia ter sido causado porque o pH ótimo para produção de etanol em leveduras é em torno de 6,0 (CHIRUVOLU et al., 1998).

Tabela 6. Parâmetros da cinética de crescimento e produção de ASNase do cultivo de *P. pastoris* em biorreator *New Brunswick Bioflo*® 115 de 3L contendo 2L de meio BMGY (pH 6,0) com 10,0 e 40,0 g L⁻¹ de glicerol a 30°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de crescimento e meio BMMY (pH 6,0) com 3% (v/v) de metanol durante 120 horas a 20°C, 500 rpm e 1,0 vvm na fase de indução.

<i>Parâmetro</i>	<i>Meio BMGY com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol</i>	<i>Meio BMGY com 40,0 g.L⁻¹ de glicerol</i>
Tempo da fase de crescimento (h)	9,0	21,0
Biomassa produzida na fase de crescimento (g.L ⁻¹)	9,0	31,8
Velocidade específica de crescimento em glicerol; $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,32	0,27
Fator de conversão de glicerol em biomassa; $Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	0,80	0,80
Rendimento de biomassa na fase de crescimento (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,0	1,5
Tempo da fase de indução (h)	120,0	120,0
Biomassa produzida na fase de indução (g.L ⁻¹)	33,9	21,2
Fator de conversão de metanol em biomassa; $Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	0,29	0,18
Produção máxima de ASNase (U.g ⁻¹ _{célula})	10,6	13,9
Tempo total do cultivo (h)	129,0	141,0
Biomassa total produzida no cultivo (g.L ⁻¹)	42,9	53,0
Atividade ASNase total ao final do cultivo (U)	909,6	1420,4

Por outra parte, a fase de indução nas bateladas foi iniciada com diferentes concentrações celulares, causada pela diferença na concentração inicial de glicerol, isto possivelmente provocou que as células crescidas em $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol, que atingiram aproximadamente $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa, preferiram usar a energia e o carbono procedentes do metanol na produção de biomassa no lugar de formar ASNase. Este fato foi reportado por SHI et al., (2003) e WAN et al., (2008) na expressão de anticorpos scFv. Isto seria justificado pelo maior fator de conversão de metanol em células ($Y_{x/s} = 0,29 \text{ g.g}^{-1}$) do cultivo a $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol comparado com aquele conduzido em $40,0 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, $0,18 \text{ g.g}^{-1}$ e $10,1 \text{ U.h}^{-1}$. Provavelmente, neste caso, o metanol seria dirigido para a geração de energia ao invés da produção de biomassa (TRINH; PHUE; SHILOACH, 2003). Salienta-se que HÉLÈNE et al., (2001) obtiveram $Y_{x/s} = 0,14 \text{ g.g}^{-1}$ em cultivo descontínuo-alimentado.

Frente ao exposto, parece ser bem razoável fixar $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ como a concentração de glicerol para obter a ASNase, uma vez que a diferença na atividade total entre as bateladas dever-se-ia tão somente à menor quantidade de biomassa atingida durante a fase de crescimento mas não pela melhor expressão de ASNase durante a fase de indução.

5.9. Avaliação estatística (Teste F) dos métodos de quantificação

Depois de calcular os parâmetros e comparar o F_{Calc} e o F_{Tab} dos métodos, se determinou com uma certeza de 99% de que não houve diferença significativa entre as médias dos grupos. O que significa que os métodos empregados nas determinações de biomassa seca, concentração de glicerol, proteínas totais e atividade periplasmática de ASNase são reprodutíveis e precisos.

6. CONCLUSÕES

- A maior eficiência na conversão de substrato em células em agitador orbital foi com 10,0 g.L⁻¹ de glicerol.
- A ASNase foi localizada no espaço periplasmático, a expressão ocorreu à temperatura de 20°C e a atividade correlaciona-se com a concentração de metanol.
- A melhor condição de expressão de ASNase em agitador orbital foi a 20 °C e 3% de metanol durante 48 horas.
- O pH de indução, a suplementação e concentração de glicerol na fase de crescimento não apresentam influência significativa na expressão. Entretanto, a expressão de ASNase melhorou quando as células foram induzidas imediatamente após o glicerol foi consumido.
- A manutenção do pH constante em biorreator afeta positivamente à expressão de ASNase. Entretanto a maior atividade total de ASNase ocorreram com 40,0 g.L⁻¹ de glicerol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, E. et al. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187–95, 1996.

ALARCÓN, M. R. Producción de la lipasa LIP2 de *Candida rugosa* en el sistema *Pichia pastoris*: caracterización y aplicación en reacciones de síntesis. 217 f. Tese (Doutorado em Biotecnología) - Escola Tècnica Superior d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona. 2008.

ALI, U. et al. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016.

ALMUZARA, C. et al. Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 5, p. 413–417, 2002.

ANDRADE, E. V et al. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. **Journal of biochemistry**, v. 128, n. 6, p. 891–5, 2000. 660 p.

ARNOLD, W. N. Periplasmic space. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **Yeast: Yeast Technology**. 2ª edição. Londres: Academic Press, 1991. p. 279-95.

ASENJO, J. A.; MERCHUK, J. C. **Bioreactor system design**. 1ª edição. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. 660 p.

ASLANIAN, A. M.; KILBERG, M. S. Multiple adaptive mechanisms affect asparagine synthetase substrate availability in asparaginase-resistant MOLT-4 human leukaemia cells. **The Biochemical journal**, v. 358, n. 1, p. 59–67, 2001.

BECERRA, M. et al. Extraction of Intracellular Proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135–139, 2001.

BOREK, D.; JASKÓLSKI, M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001.

BOUCHERIE, H. Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 1, p. 385-392, 1985.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. 1ª edição. Oxford: Editorial Offices. 2001. 660 p.

BRIERLEY, R. A. et al. Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing heterologous gene: bovine lysozyme. **Annal New York Academic of Science**, v. 589, p. 350-362, 1990.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1067–1072, 1991.

BUSHELL, M. E. et al. Cyclic fed-batch culture for production of human serum albumin in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p. 678–683, 2003.

BUTLER, M.; MENESES-ACOSTA, A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 885–894, 2012.

CABRAL, S. N. S. et al. Linha de base da leucemia linfocítica aguda para a vigilância da saúde ambiental no território de abrangência da refinaria de petróleo do Estado de Pernambuco, Brasil, 2004 a 2008. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 601–608, 2012.

CÁCERES, A. F. et al. Determinación de los descensos crioscópicos, equivalentes de cloruro de sodio y concentraciones isotónicas de algunos medicamentos en solución acuosa con verificación biológica en células vegetales y animales. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 1, n. 4, 1971.

CALIK, P. et al. Fermentation and oxygen transfer characteristics in recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris* in sorbitol batch and methanol fed-batch operation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 226–233, 2010a.

CALIK, P. et al. Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 12, p. 1628–1635, 2010b.

CANALES, M. et al. Mechanical disruption of *Pichia pastoris* yeast to recover the recombinant glycoprotein Bm86. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 1-2, p. 58–63, 1998.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, v. 28, n. 1, p. 145–154, 1982.

CAVICCHIOLI, R. et al. Low-temperature extremophiles and their applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 253–261, 2002.

CEREGHINO, G. P. L. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329–332, 2002.

CEREGHINO, G. P. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 422–427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.

CHAROENRAT, T. et al. Oxygen-limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, n. 6, p. 399–406, 2005.

CHEN, D. C. et al. Asparagine as a nitrogen source for improving the secretion of mouse α -amylase in *Saccharomyces cerevisiae* protease A-deficient strains. **Yeast**, v. 16, n. 3, p. 207–217, 2000.

CHIRUVOLU, V. et al. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 163–173, 1998.

CHIRUVOLU, V.; CREGG, J. M.; MEAGHER, M. M. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 277–283, 1997.

CHMIEL, H. Bioprozesstechnik. München: Spektrum akademischer. 3ª edição. KiinkelLopka GmbH: Springer Spectrum, 2006. 526 p.

CHUNG, B. H.; PARK, K. S. Simple approach to reducing proteolysis during secretory production of human parathyroid hormone in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 57, n. 2, p. 245–9, 1998.

CLARE, J. et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnology**, v. 9, p. 455–460, 1991.

CLEMENTI, A. La désamidation enzymatique de L'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans L'organisme. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, n. 4, p. 369–98, 1922.

CORDOBA, H. et al. *Pichia pastoris* one alternative for human glycoprotein production of therapeutic use. Fermentation strategies. Proteínas. **Revista Colombiana de Biotecnologia**, v. 5, n. 2, p. 16, 2003.

COS, O. et al. Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 86–94, 2005.

COS, O. et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 17, 2006.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. **Agricultural and biological chemistry**, v. 44, n. 10, p. 2279–2289, 1980.

CREGG, J. The *Pichia* System. **Keck Graduate Institute, Claremont, Calif**, p. 1–8, 1993.

CREGG, J. M. et al. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 29, p. 33–41, 1988.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 219, n. 1-2, p. 320–323, 1989.

CROWLEY, J. et al. Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 24, p. 1907–1912, 2000.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnología, Manual de Microbiología Industrial: Métodos de fermentación. 1ª edição. Madrid: Editora Acribia S.A., 1993. 650 p.

CURVERS, S. et al. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 495–502, 2001.

CYTRYŃSKA, M. et al. The acidic ribosomal proteins of different yeast species. Phosphorylation by ribosome-associated protein kinases. **Journal Basic of Microbiology**, v. 35, p. 367–73, 1995.

D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 1–11, 2001.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119–138, 2005.

DE BARROS, B. N.; SPACINO, I. S.; EDWARD, R. B. Planejamento e otimização de experimentos. 1ª edição. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de Campinas. 1996. 303 p.

DE CASTRO GIRÃO, L. F. et al. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118–125, 2016.

DIETZSCH, C.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 85, 2011.

DRAGOSITS, M. et al. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 3, p. 1380–1392, 2009.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944–956, 1994.

DUAN, H. et al. Both the AOX1 promoter and the FLD1 promoter work together in a *Pichia pastoris* expression vector. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1779 – 1783, 2009.

DUNLOP, P. C.; MEYER, G. M.; ROON, R. J. Reactions of Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. **OGrCAL CHEMISTRY**, v. 255, n. 4, p. 1542–1546, 1980.

DUNLOP, P. C.; ROON, R. J. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. **Journal of bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 1017–1024, 1975.

DUTTA, R. Fundamentals of Biochemical Engineering. 1ª edição. Nova Delhi: Ane Books India – Springer. 2008. 306 p.

EHRMAN, M.; CEDAR, H.; JAMES, H. L-Asparaginase II of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 1, p. 88–94, 1971.

ELLEM, K. A.; FABRIZIO, A. M.; JACKSON, L. The dependence of DNA and RNA synthesis on protein synthesis in asparaginase-treated lymphoma cells. **Cancer Res**, v. 30, n. 2, p. 515–527, 1970.

ELLIOT, S. G.; MCCLAUGHLIN, C. S. Progress in nucleic acid research and molecular biology. **Academic Press**, p. 143-176, 1983.

ELLIS, S. B. et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and cellular biology**, v. 5, n. 5, p. 1111–21, 1985.

ERICKSON, L. E.; MINKEVICH, L. G.; EROSHIN, V. K. Application of mass and energy balance regularities in fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1595-1621, 1978.

FABER, K. N. et al. Methylophilic yeasts as factories for the production of foreign proteins. **Yeast**, v. 11, p. 1331-1344, 1995.

FAUCI, A.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.; WILSON, J. Principios de medicina interna. 4ª edição. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1998. 1268 p.

FELBER, M.; PICHLER, H.; RUTH, C. Strains and molecular tools for recombinant protein production in *Pichia pastoris*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1152, p. 87–111, 2014.

FERRARA, M. A. et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1457–1463, 2006.

FICKE, L. Role of TLR4 accessory proteins CD14 and MD-2 in the combinatorial recognition of pathogens. 111 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), University of Toledo. 2008.

FISHER, S. H.; WRAY, L. V. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated

genes encoding L-asparaginase. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 8, p. 2148–2154, 2002.

FOLHA DE SÃO PAULO. Médicos avaliam falta de droga para leucemia. Disponível em <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/1218941-medicos-avaliam-falta-de-droga-para-leucemia.shtml>. Acesso em 23 Jan. 2016. 2003a.

FOLHA DE SÃO PAULO. Governo anuncia produção nacional de medicamento para leucemia. Disponível em <http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2013/06/1297254-governo-anuncia-producao-nacional-de-medicamentos-biologicos.shtml>. Acesso em 18 Jan. 2016. 2003b.

GAO, Y. J. et al. Improved outcome for children with non-high risk acute lymphoblastic leukaemia after using an ALL IC-BFM 2002-based protocol in Shanghai, China. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 3, p. 363–367, 2013.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 153-176, 2009.

GASSER, B. et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 11, 2008.

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 6, p. 541–553, 2002.

GONCHAR, M. V.; SIBIRNYI, A. A. The nature of methanol-induced acidification of the medium by products of metabolism of *methylophilic yeasts*. **Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal**, v. 60, n. 1, p. 97-100, 1988.

GÖRGENS, J. F. et al. Amino acid supplementation, controlled oxygen limitation and sequential double induction improves heterologous xylanase production by *Pichia stipitis*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 6-7, p. 677–683, 2005a.

GÖRGENS, J. F. et al. Amino acid supplementation improves heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 684–691, 2005b.

GRETSCHMANN, A. S. Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada. In: X ENCONTRO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA. Anais. Ijuí: Trabalhos X EGEM. 2009.

GURRAMKONDA, C. et al. Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 13, 2009.

HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, n. 12, p. 1099-1133, 1997.

HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts.

Microbial cell factories, v. 5, n. 1, p. 39, 2006.

HÉLÈNE, B. et al. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 907–913, 2001.

HENSING, M. C. M. et al. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 67, n. 3, p. 261–279, 1995.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. **Pichia Protocols**. 1ª edição. New Jersey: Human Press, 1988. 270 p.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.R (Coord.) *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 93-122.

HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JÖNSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438–449, 2002.

HORST FELDMANN. *Yeast: Molecular and Cell Biology, Yeast Cell Architecture and Functions*. 2ª Edição. Verlag GmbH: Springer. 2012. 464 p.

HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS. Disponível em <https://www.hcancerbarretos.com.br/leucemia>. Acesso em 27 Jun. 2016.

HU, X. et al. Comparative performance of S-adenosyl-L-methionine biosynthesis and degradation in *Pichia pastoris* using different promoters and novel consumption inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 94–99, 2014.

IMAI, T.; OHNO, T. Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 165–172, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS (INEN). Departamento de Oncología Médica. *Guia de Práctica Clínica de Leucemia Linfática Aguda*. 2013. 12 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. 2016. 126 p.

INVITROGEN CORPORATION. *Pichia Fermentation Process Guidelines Overview*, v. 31, n. 619, p. 1–11, 2002.

JAFARI, R.; SUNDSTRÖM, B. E.; HOLM, P. Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 34, 2011.

JAHIC et al. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, p. 385–393, 2002.

JAHIC, M. et al. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial cell factories**, v. 2, n. 1, p. 6, 2003.

JEYA, M. et al. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 225–231, 2009.

JIMÉNEZ, E. R. et al. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. **Biotechnology techniques**, v. 11, n. 7, p. 461–466, 1997.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 1, p. 75–83, 1995.

JONES, J.; BELLION, E. Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. An analysis by ¹³C n.m.r. in vivo. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 475–481, 1991.

JUNGO, C.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 4, p. 824–837, 2007.

KAMARTHAPU, V. et al. Engineered *Pichia pastoris* for enhanced production of S-adenosylmethionine. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 40, 2013.

KATAKURA, Y. et al. Effect of methanol concentration on the production of human 2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 482–487, 1998.

KATO, M. et al. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? **Yeast**, v. 5, n. 3, p. 3953–3966, 2013.

KHATRI, N. K.; HOFFMANN, F. Oxygen-limited control of methanol uptake for improved production of a single-chain antibody fragment with recombinant *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 492–498, 2006.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–82, 1953.

KOBAYASHI, K. et al. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 90, n. 3, p. 280–288, 2000.

KOCH, A. L. et al. Growth Measurement: Methods for general and molecular bacteriology. **American Society for Microbiology**, p 248-277, 1994.

KOLLÁR, R. et al. Architecture of the yeast cell wall in a previous study. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 28, p. 17762–17775, 1997.

KOUTZ, P. et al. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. **Yeast**, v. 5, n. 3, p. 167–177, 1989.

KOVAROVA-KOVAR, K.; EGLI, T. Growth kinetics of suspended microbial cells: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 646–666, 1998.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L -asparaginases. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, p. 1–18, 2015.

KUPCSULIK, B.; SEVELLA, B. Effect of methanol concentration on the recombinant *Pichia pastoris* Mut^S fermentation. **Periodica Polytechnica: Chemical Engineering**, v. 48, n. 2, p. 73–87, 2004.

LAMANNA, N. et al. Treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia: Do the specifics of the regimen matter?: Results from a prospective randomized trial. **Cancer**, v. 119, n. 6, p. 1186–1194, 2013.

LEE, C. Y. et al. High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1147–1154, 2003.

LEE, Y. C. Development of high cell density recombinant *Pichia pastoris* culture for human growth hormone production. 158 f. Tese (Mestrado em Ciencias). Universiti Sains Malaysia. 2008.

LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY®. Leucemia linfoblástica aguda. Algún día es hoy. Fighting blood cancers. 2014. Disponível em <http://espanol.lls.org/diseaseinformation/leukemia/acutelymphoblasticleukemia/>. Acesso em 27 Jun. 2016.

LI, T. et al. Construction, production, and characterization of recombinant scFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 867–874, 2008.

LIN-CEREGHINO, G. P. et al. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 3, p. 883–97, 2006.

LING, L. Y.; ITHOI, I.; YIK, F. M. Optimization for high-level expression in *pichia pastoris* and purification of truncated and full length recombinant sag2 of *toxoplasma gondii* for diagnostic use. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 41, n. 3, p. 507–513, 2010.

LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1177–1193, 2014.

LOUREIRO, C. B. Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A). 50 f. Tese (Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2010.

LOZANO, J. A. Leucemias agudas. **Offarm**, v. 21, n. 6, p. 117–122, 2002.

LUBINEAU, A. et al. Chemo-enzymatic synthesis of a selectin ligand using recombinant yeast cells. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 229–234, 1998.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock Biología de los Microorganismos. 8ª edição. Editora Prentice Hall Iberia. 1999. 1096 p.

MANDENIUS, C. F.; BRUNDIN, A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, 2008.

MARKOŠOVÁ, K. et al. Upscale of recombinant α -L-rhamnosidase production by *Pichia pastoris* Mut^S strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1140, 2015.

MARTÍNEZ, D. et al. A thermostable exo- β -fructosidase immobilised through rational design. **Food Chemistry**, v. 145, p. 826–831, 2014a.

MARTÍNEZ, D. et al. Complete sucrose hydrolysis by heat-killed recombinant *Pichia pastoris* cells entrapped in calcium alginate. **Microbial cell factories**, v. 13, p. 87, 2014b.

MAYSON, B. E. et al. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 291–298, 2003.

MC LAUGHLIN, C. J. et al. Polyadenylic acid sequences in yeast messenger ribonucleic acid. **Journal of Biology Chemistry**, v. 248, p. 1466-1471, 1973.

MEDEIROS, F. et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **QUímica Nova**, v. 31, n. 2, p. 336–339, 2008.

MEHMET, I.; MEAGHER, M. M. The Effect of Ethanol and Acetate on Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 4, p. 337–341, 2001.

MENÉNDEZ, C. et al. Constitutive high-level expression of a codon-optimized β -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermotoga maritima* in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1201–1212, 2013.

MIDDELBERG, A. P. J. Process-scale disruption of microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 491-551, 1995.

MINISTERIO DE SALUD DE CHILE. Guía clínica Leucemia en menores de 15 años. 2010. 40 p.

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ. Hospital Nacional Dos de Mayo. Departamento de especialidades médicas. Guías de práctica clínica. Servicio de Hematología Clínica. 2010. 36 p.

MITCHELL, L. et al. Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: risk of thrombotic complications in L'Asparaginase-induced antithrombin III deficiency. **Blood**, v. 83, n. 2, p. 386–91, 1994.

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. **Hermann & Cie, Paris**. p. 211. 1942.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371–394, 1949.

MORAES, A. M.; PIRES, E.; CASTILHO, L. Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia genica. 1ª edição. São Paulo: Editora Roca Ltda. 2008. 528 p.

MULLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, p. 97-113, 1998.

NAGARETHINAM, S. et al. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**, v. 1, n. 4, p. 159–168, 2012.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, p. 208-221, 2007.

NASCIMENTO, P. T. S. Exogenous factors in the development of flexible fuel cars as a local dominant technology. **Journal Technology Management and Innovation**, v. 4, p. 110-119, 2009.

NEVES, L. C. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. 260 f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Fermentações). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 2003

NOVINA, C. D.; ROY, A. L. Core promoters and transcriptional control. **Trends Genet**, v. 12, p. 351-355, 1996.

OGATA, K.; NISHIKAWA, H.; OHSUGI, M. A Yeast Capable of Utilizing Methanol. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1519–1520, 1969.

ORTEGA, M. et al. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. **Pediatria Integral**, v. 12, n. 6, p. 551–558, 2008.

PALOMARI, D.; DUQUE, C. Odontología Esencial, Microbiologia e imunologia geral e odontológica. Artes médicas. 1ª edição. Sao Paulo: Série Abeno, v. 1, 2013. 144 p.

PANOSYAN, E. H. et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. **Journal of pediatric hematology/oncology: official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.

PARMENTIER, J. H. et al. Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. **Leukemia Research**, v. 39, n. 7, p. 757–762, 2015.

PECHAN, T.; MA, P. W. K.; LUTHE, D. S. Heterologous expression of maize (*Zea mays* L.) Mir1 cysteine proteinase in eukaryotic and prokaryotic expression systems. **Protein Expression and Purification**, v. 34, n. 1, p. 134–141, 2004.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 1, p. 63–68, 2002.

PESSOA, J. R.; VAHAN, B. Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2005. 444 p.

PIÑON, R. Folded chromosomes in non-cycling yeast cells: Evidence for a characteristic g0 form. **Chromosoma**, v. 67, n. 3, p. 263–274, 1978.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.

POUTOU, R. et al. Expresión de iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDShr) en *Pichia pastoris*. **Universitas Scientiarum**, v. 10, n. 1, p. 75–96, 2005a.

POUTOU, R. A. et al. Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. **Nova**, v. 3, n. 3, p. 75–87, 2005b.

PRIELHOFER, R. et al. *Pichia pastoris* regulates its gene-specific response to different carbon sources at the transcriptional, rather than the translational, level. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 167, 2015.

RAFAEL, J. et al. Leucemia Linfoblástica Aguda. **Cancerología**, p. 111–115, 2011.

REHACEK, J.; BERAN, K.; BICIK, V. Disintegration of microorganisms and preparation of yeast cell ' walls in a new type of disintegrator. **Applied Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 462–466, 1969.

RICHARDS, N. G. J.; KILBERG, M. S. Asparagine synthetase chemotherapy. **Annual review of biochemistry**, v. 75, p. 629–54, 2006.

RÖHM, K. H.; VAN ETTEN, R. L. The 18O isotope effect in 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy: mechanistic studies on asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 244, n. 1, p. 128–136, 1986.

ROMANOS, M. A; SCORER, C. A; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v. 8, n. 6, p. 423–488, 1992.

ROSA, C.; GÁBOR, P. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. 1^a edicao. Berlín: Springer. 2006. 580 p.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. The Yeast. Metabolism and Physiology of Yeast. **London, Academic Press**, v. 3, 1989.

SAKAI, Y. et al. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: Identification of specific steps and morphological intermediates. **Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 3, p. 625–636, 1998.

SALTON, M. R. The bacterial cell wall. **Elsevier Publishing Corporation**, p. 42-65, 1964.

SARQUIS, M. I. DE M. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

SCHERRER, R.; LOUDEN, L.; GERHARDT, P. Porosity of the yeast cell wall and membrane. **Journal of bacteriology**, v. 118, n. 2, p. 534–540, 1974.

SCHIPPERUS, R. et al. Secreted production of an elastin-like polypeptide by *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 293–301, 2009.

SCHMIDELL, W.; DE ALMEIDA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, A. Biotecnología Industrial – Engenharia Bioquímica. 1^a edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v. 2, 2001. 111 p.

SERRANO, A. Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. 129 f. Tese (Doutorado em Ciencias Biologicas). Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona. 2001.

SHI, X. et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 2, p. 321–330, 2003.

SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574–81, 2012.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1–10, 2016.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SMITS, G. J.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. **Microbiology**, v. 147, n. 4, p. 781–94, 2001.

SØRENSEN, H. P. Towards universal systems for recombinant gene expression. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 27, 2010.

SPADIUT, O. et al. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 54-60, 2014.

SREEKRISHNA, K. et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry**, v. 28, p. 4117-4125, 1989.

SREEKRISHNA, K. et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2ª edição. Oxford: Elsevier Science Inc. 2003. 376 p.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L.; WHEELIS, M. L.; PAINTER, P. R. Microbiologia. 2ª edição. Madrid: Editora Reverté. 1989. 768 p.

STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M. High cell-density fermentation. **Methods in molecular biology**, v. 103, n. 1, p. 107–120, 1998.

SUTTON, S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. **Journal of validation technology**, v. 17, n. 1, p. 46-49, 2011.

SWARTZ, J. R.; COONEY, C. L. Methanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1206-1213, 1981.

TANI, T.; KATO, N.; YMADA, H. Utilization of methanol by yeast. **Advances in Applied Microbiology**, v. 24, p. 165-186, 1978.

TESTÓN, D. L. La carga de las leucemias en el Perú. Boletín epidemiológico. Dirección general de epidemiología, v. 23, n. 32, p. 1–18, 2011.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (2016). Catalogo de produtos. Disponível em <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C18200>. Acesso em 15 Mai. 2016.

TRINH, L. B.; PHUE, J. N.; SHILOACH, J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 438–444, 2003.

TRUJILLO, L. E. et al. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p. 139–144, 2001.

UENO, T. et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. **Leukemia**, v. 11, n. 11, p. 1858–61, 1997.

VAN DER KLEI, I. J.; BYSTRYKH, L. V; HARDER, W. Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. **Methods in enzymology**, v. 188, n. 1979, p. 420–427, 1990.

VAN DIJKEN, L. P.; OTTO, R.; HARDER, W. Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat - Physiological responses due to the involvement of methanol oxidase as a key enzyme in methanol metabolism. **Archives of Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 137–144, 1976.

VASAVADA, A. Improving productivity of heterologous proteins in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 41, p. 25-54, 1995.

VASSILEVA, A. et al. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 21–35, 2001.

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 82, 1983.

VIADER, J. M.; GALLEGOS, J. A.; GUERRERO, M. Diseño y producción en *Pichia pastoris* de fitasas termoestables con estructura de hélice. **Ciencia UANL**, v. 14, n. 4, p. 417-427, 2011.

VOGL, T.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, p. 1094-1101, 2013.

WAGNER, L. W. et al. Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 11, p. 791–795, 1997.

WAN, L. et al. High-level expression of a functional humanized single-chain variable fragment antibody against CD25 in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 33–41, 2008.

WANDERLEY, M. S. et al. Influence of pH on cellular growth of *Pichia pastoris* KM71H by fed- batch process. Departamento de Engenharia Biológica - Universidade do Minho, p. 29. 2009.

WARANGKAR, S. C.; KHOBRAGADE, C. N. Purification, Characterization, and Effect of Thiol Compounds on Activity of the *Erwinia carotovora* L-Asparaginase. **Enzyme research**, v. 1, p. 10, 2010.

WEAST, R. C. Handbook of Chemistry and Physics. 58^a edição. Florida: CRC Press Inc. 1980. 540 p.

WEINACKER, D. et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1043–1048, 2013.

WERNER-WASHBURNE, M. et al. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 2, p. 383–401, 1993.

WHITTAKER, M. M.; WHITTAKER, J. W. Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 20, n. 1, p. 105–11, 2000.

WIDDEL, F. Theory and Measurement of Bacterial Growth. **Grundpraktikum Mikrobiologie - Universität Bremen**. 2010. 11 p.

YUAN, W.; STROMHAUG, P. E.; DUNN, W. A. Glucose-induced autophagy of peroxisomes in *Pichia pastoris* requires a unique E1-like protein. **Molecular biology of the cell**, v. 10, n. 5, p. 1353–1366, 1999.

YURIMOTO, H.; SAKAI, Y.; KATO, N. Methanol metabolism. In: GELLISEN, G. (ed). *Hansenula polymorpha* – biology and applications. 1^a edição. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2002. p. 61-75.

ZEPEDA, A. B. et al. Biomarkers to evaluate the effects of temperature and methanol on recombinant *Pichia pastoris*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 475–483, 2014.

ZHANG, W. et al. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein, the Heavy-Chain Fragment C of Botulinum Neurotoxin, Serotype A. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, p. 1-8, 2000.

ZHAO, J.; FLEET, G. H. Degradation of DNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 175–182, 2003.

ZHOU, X. et al. Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 4, p. 420–425, 2014.