UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de
L-asparaginase II

Juan Carlos Flores Santos

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo (FCF/USP)

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa-Jr (FCF/USP)

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de
L-asparaginase II

Juan Carlos Flores Santos

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo (FCF/USP)

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa-Jr (FCF/USP)

São Paulo
2017

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

Santo s, J uan Carlo s Flo res

S2 3 7 c Cultivo d e *Escherich ia co li* B L2 1 (D E 3) p a r a p r o d u ç ã o d e L -
asp araginase II / J uan Carlo s Flo res Santo s . -- São P aulo , 2 0 1 6 . |

1 3 4 p .

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas d a U n i
versidade de São Paulo . D e p a r t a m e n t o d e T e c n o l o g i a
B i o q u í m i c o - F a r m a c ê u t i c a .

Orientador: Vitolo, Michele

Co-orientador: Pessoa-Junior, Adalberto

1. Biotecnologia farmacêutica 2 . Escherichia coli 3 . Leucemia I. T . II.
Vitolo, Michele, orientador, III. Pessoa-Junior, Adalberto, co-orientador.

615.1 CDD

Juan Carlos Flores Santos

Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de
L-asparaginase II

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Prof. Dr. Michele Vitolo
Orientador/Presidente

1o. Examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____.

“Ser o mais rico do cemitério não é o que
mais importa para mim...Ir para a cama à
noite e pensar que foi feito alguma coisa
grande. Isso é o que mais importa para mim.”

Steve Jobs

DEDICATÓRIA

Dedicado aos meus pais, Olga e Lucho
aos meus eternos avós, Elodia e Oscar
e aos meus irmãos Erika e Paris

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, que proporcionou meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq - que me concedeu uma bolsa e que otimizou o desenvolvimento deste trabalho.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Profa. Gisele M. de Souza e o equipe do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica da FCF-USP, pela construção da *E. coli* BL21 (DE3) produtora de ASNase recombinante utilizada neste trabalho.

À Profa. Carlota Rangel Yagui e os alunos do Laboratório de Nanobiotecnologia Farmacêutica da FCF-USP.

Ao Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FCF-USP, do Prof. Adalberto Pessoa, onde foi desenvolvido este trabalho.

Aos professores Michele Vitolo e Adalberto Pessoa, meus orientadores e exemplos profissionais, meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho e meu respeito e admiração pela capacidade no ensino da Ciência.

Aos amigos e colegas, Ignácio, Karin, Luciana, César, Valter, João, Romine, Talita, Omar, Karina, Lina, pelo incentivo, e por terem tornado o dia a dia na pós-graduação tão prazeroso!

A Katy, Richard, Alonso e em especial a Iván pelos anos de amizade e apoio incondicional, a minha enorme gratidão!

À minha família, pelo carinho, paciência e por acreditar em mim.

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e talvez eu não consiga citar todos os nomes, nem todo o agradecimento por meio de palavras, mas OBRIGADO e GRACIAS por tudo.

RESUMO

FLORES-SANTOS, J. C. **Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de L-asparaginase II**. 2017. 134f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Utilizada amplamente como agente terapêutico no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), a L-Asparaginase II (ASNase) é uma enzima que atua diminuindo a concentração de asparagina livre no plasma. Dessa forma, impede o fornecimento de asparagina para a proliferação de células malignas, as quais ao contrário das células saudáveis, não conseguem sintetizar a asparagina. A ASNase utilizada atualmente no Brasil é importada, o que gera problemas com custo e abastecimento. Sendo assim, é notavelmente atrativa a procura por sistemas que apresentem níveis elevados de expressão de asparaginase e o encontro de formas de produzir tal enzima para um fácil acesso e, se possível, com menor potencial alérgico. Isso nos incentiva a estudar a produção biotecnológica de ASNase produzida em *Escherichia coli* BL21 (DE3) recombinante que super expressa esta enzima. O objetivo deste trabalho foi estabelecer, em agitador orbital e sistema descontínuo, os parâmetros do cultivo e indução da bactéria *Escherichia coli* BL21 visando à produção de ASNase, os quais serão úteis para futuros estudos em sistema descontínuo-alimentado. Nosso trabalho avaliou fatores que influenciam a fase de crescimento e/ou a fase de indução da *E. coli* BL21 (DE3): meio de cultivo baseado na composição elementar, controle do pH, uso de glicose ou glicerol como fonte de carbono, formação de acetato, tempo inicial e final da indução, permeabilização celular para secreção da ASNase, concentração de indutor, temperatura de pós-indução. Nós apresentamos uma estratégia para produção extracelular de ASNase em *E. coli* BL21 (DE3) pelo crescimento em meio Luria Bertani (LB) modificado para permeabilização celular. A produtividade volumétrica de ASNase extracelular foi 484 IU L h^{-1} em agitador orbital, correspondendo a 89 % de secreção após 24h de pós-indução com IPTG a 37°C . Isto representou rendimento 50 % maior para a ASNase total e 15,5 vezes mais secreção de ASNase em relação ao uso do meio LB modificado. Entretanto no cultivo em biorreator de 3 L nas mesmas condições (exceto a forma de aeração: 500 rpm de agitação e 1 vvm de vazão de ar, $k_{La} = 88 \text{ h}^{-1}$) operado em regime descontínuo foram obtidos resultados semelhantes aos cultivos em agitador orbital, sendo a produtividade volumétrica da ASNase extracelular igual a 525 IU L h^{-1} após 20 h de pós-indução. A biomassa obtida para agitador orbital e biorreator foi 3,26 e 2,63 g L^{-1} , respectivamente. Por esse motivo, esses resultados foram considerados promissores para aumentar a produtividade nos futuros ensaios em biorreator operado em regime descontínuo-alimentado.

Palavras chave: L-asparaginase recombinante, permeabilização celular, *Escherichia coli*, Luria Bertani.

ABSTRACT

FLORES-SANTOS, J. C. **Culture of *Escherichia coli* BL21 (DE3) for the production of L-asparaginase II**. 2017. 134f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Widely used as a therapeutic agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), L-Asparaginase II (ASNase) is an enzyme that works by reducing the concentration of free asparagine in plasma. Thus, it prevents the delivery of asparagine to the proliferation of malignant cells, which unlike healthy cell, cannot synthesize asparagine. ASNase currently used in Brazil is imported, which causes problems with cost and supply. Thus, the search for systems with high levels of asparaginase expression and the finding of ways to produce this enzyme for easy access and, if possible, with a lower allergic potential, are strikingly attractive. This encourages us to study the biotechnological production of ASNase in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) which super expresses this enzyme. The objective of this work was to establish, in shaker and batch bioreactor system, growth and induction parameters of the *Escherichia coli* BL21 aiming the production of ASNase, which will be useful for future studies in a fed-batch system. Our work evaluated factors that influenced the growth and induction phase of *E. coli* BL21 (DE3): culture medium based on elemental composition, pH control, use of glucose or glycerol as carbon source, formation of acetate, initial and final induction time, cellular permeabilization for ASNase secretion, inducer concentration, post-induction temperature. We performed a strategy for extracellular production of ASNase in *E. coli* BL21 (DE3) by growing in modified Luria Bertani (LB) medium for cell permeabilization. The volumetric productivity of extracellular ASNase was 484 IU L⁻¹ h⁻¹ on shaker, which reached 89% secretion at 24 h of post-induction with IPTG at 37°C. This represented an increase yield of 50 % regarding to the total ASNase formed and 15.5 times the ASNase secretion as compared to that attained with LB modified. While in batch 2L-bioreactor cultivation under the same conditions (except for the aeration employed: 500 rpm of stirring and 1 vvm of air flow, $k_{La} = 88$ h⁻¹) it was obtained similar results in relation to shaker cultures. The volumetric productivity of extracellular ASNase was 525 IU L⁻¹ h⁻¹ at 20 h of post-induction. The biomass obtained for shaker and bioreactor were 3.26 and 2.63 g L⁻¹, respectively. For this reason, we consider these promising results to increase productivity in future studies in bioreactor operated as fed-batch regimen.

Key words: recombinant L-asparaginase, cell permeabilization, *Escherichia coli*, Luria-Bertani medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medula óssea e formação de células sanguíneas.....	22
Figura 2. Mecanismo de ação da L-asparaginase II.....	24
Figura 3. Curva logarítmica de crescimento típico para <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	26
Figura 4. Sistema pET.	29
Figura 5. Distribuição de metais em <i>E. coli</i> , representada em termos de moles por volume de células (amostra: $3,5 \times 10^{-12}$ mL de células crescidas até 0,5 - 0,6 de DO ₆₀₀ , em meio LB) e comparada com a concentração total dos metais no meio LB. As barras não preenchidas representam concentrações extremamente pequenas dos íons (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001).	35
Figura 6. Estrutura do envoltório celular de bactéria Gram-negativa.....	40
Figura 7. Esquema do sistema montado para rompimento de células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) com pérolas de vidro.	52
Figura 8. Banho gelado a partir de solução de cloreto de sódio 33% (w/w), utilizado para resfriamento do Eppendorf após agitação em vórtice	53
Figura 9. Curva de calibração para determinar o crescimento celular.....	62
Figura 10. Efeitos principais para o delineamento experimental 3 ² . Fatores: (a) Concentração inicial do cultivo (DO ₆₀₀ : 0,1; 0,3 e 0,5) e (b) Tempo do crescimento do inóculo (8; 10 e 12 h). A resposta correspondeu à concentração celular final (g L ⁻¹) após 5 h de crescimento.....	65
Figura 11. Curva de crescimento para <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inóculo células crescidas por 5 h (●) ou 12 h(○).....	65
Figura 12. Curva logarítmica do crescimento da <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inóculo células crescidas por 5 h (●, linha pontilhada) e 12 h(○, linha contínua).	66

- Figura 13. Efeito dos ciclos de agitação/resfriamento sobre a temperatura da suspensão durante o rompimento celular de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de pérolas de vidro..... 68
- Figura 14. Perfil de rompimento celular da *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de pérolas de vidro..... 70
- Figura 15. Perfil proteico do sobrenadante livre de células e detritos celulares após rompimento celular usando pérolas de vidro..... 71
- Figura 16. Perfil proteico de amostras submetidas ao choque osmótico em duas etapas..... 72
- Figura 17. Efeito da concentração de acetato de sódio no meio de cultivo na obtenção de biomassa de cultivos de *E. coli* BL21 em agitador orbital..... 73
- Figura 18. Efeito da concentração de acetato de sódio no meio de cultivo na expressão de ASNase em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital..... 74
- Figura 19. Curva de crescimento e monitoramento do pH durante o crescimento da *E. coli* BL21 (DE) em meio LB e meio LB tamponado, com ou sem adição de fonte de carbono; a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. 76
- Figura 20. Diferença na obtenção de Biomassa (X) (g L^{-1}), utilizando meio LB sem tamponar (A e C) ou meio LB com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (B e D) com adição de diferentes concentrações de glicose ou glicerol. 77
- Figura 21. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L^{-1} (—●—); 2,5 g L^{-1} (—○—); 5,0 g L^{-1} (—▼—) e 7,5 g L^{-1} (—△—). 79
- Figura 22. Monitoramento de pH em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L^{-1} (—●—); 2,5 g L^{-1} (—○—); 5,0 g L^{-1} (—▼—) e 7,5 g L^{-1} (—△—) 80
- Figura 23. Monitoramento da concentração de glicose ou glicerol nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com

adição de diferentes concentrações de glicose ou glicerol a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—)..... 80

Figura 24. Concentração de acetato (g L⁻¹) nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicose ou glicerol a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações da glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹; 2,5 g L⁻¹; 5,0 g L⁻¹ e 7,5 g L⁻¹. 81

Figura 25. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicose, obtida em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm. Biomassa obtida em diferentes concentrações de glicose: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—). pH (—□—); glicose (—★—)..... 82

Figura 26. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicerol, obtida em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm. Biomassa obtida em concentrações de glicerol: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—). pH (—□—); glicose (—★—)..... 83

Figura 27. Curvas logarítmicas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—). 84

Figura 28. Influência do início da indução pelo IPTG na obtenção de Biomassa, X (g L⁻¹) nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução de IPTG (1 mM) e 3 h de pós-indução. 86

Figura 29. Atividade ASNase (IU g⁻¹) obtida após liberação da ASNase pelo método de choque osmótico a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução com IPTG 1 mM e 3h de pós-indução. 87

Figura 30. Atividade ASNase (IU mL⁻¹) a partir do sobrenadante dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução de IPTG (1 mM) e 3 h de pós-indução 89

- Figura 31. Produtividade volumétrica ($\text{IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) obtida nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB fosfato tamponado 0,1 M (pH 7,0) com adição glicerol ou glicose, a 37 °C e 250 rpm. Indução com IPTG (1 mM) e 3h de pós-indução. 91
- Figura 32. Curva de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado (adição de tampão; glicose 5 g L^{-1} e sais de metais); a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Uso de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Biomassa, X (—▼—); pH (—□—); glicose (—★—)..... 95
- Figura 33. Diagrama de Pareto para os efeitos estudados. Respostas avaliadas: (A) Atividade ASNase Extracelular; (B) Atividade ASNase Intracelular; (C) Biomassa, X; (D) Viabilidade celular..... 97
- Figura 34. Superfície resposta e gráfico de contorno da atividade ASNase extracelular (EC) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso da glicina e n-dodecano..... 100
- Figura 35. Superfície resposta e gráfico de contorno da atividade ASNase intracelular (IC) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso da glicina e n-dodecano. 100
- Figura 36. Superfície de resposta e gráfico de contorno da biomassa (X) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de glicina e n-dodecano..... 101
- Figura 37. Superfície de resposta e gráfico de contorno da viabilidade celular para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de glicina e n-dodecano..... 102
- Figura 38. Perfil de expressão e secreção extracelular de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3). Condições da fase de crescimento: 37 °C e 250 rpm. Condições fase de expressão: início da indução no final da fase exponencial de crescimento (4 h) com IPTG (1 mM), 250 rpm e temperatura de pós-indução de 37 °C (A e B) ou 25 °C (C e D). Meio de cultivo: (A e C) Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L^{-1} de glicose e sais de metais; (B e D) Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L^{-1} de glicose, sais de metais, 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano. 105
- Figura 39. Produtividade de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) em relação ao tempo de pós-indução. Condições da fase de crescimento: 37 °C e 250 rpm. Condições da fase de expressão: início da indução no final da fase exponencial de crescimento com IPTG 1mM, 250 rpm e temperatura de pós-indução de 37 °C. Meio de cultivo: Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L^{-1} de glicose e metais (●); Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L^{-1} de glicose,

metais, 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano (○). Barra de erro para 3 repetições. 107

Figura 40. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do perfil de expressão ASNase extracelular pela *E. coli* BL21 (DE3). Cultivos crescidos em meio LB modificado para permeabilizar membrana celular (adição de glicina e n-dodecano) induzidos no final da fase exponencial com 1mM IPTG, a 250 rpm. Temperatura de crescimento/indução: 37/37 °C. (1) Marcador de massa molar; sobrenadante com tempo de pós-indução: (2) 0 h; (3) 4 h; (4) 8 h; (5) 12 h; (6) 16 h; (7) 20 h; (8) 24 h. (9) 1 mg mL⁻¹ de ASNase comercial (10) Referência das massas molares (Precision Plus Protein, BIORAD) .. 108

Figura 41. Efeito da proporção da concentração de IPTG (μM) por grama (massa celular seca, msc) de *E. coli* BL21 (DE3) na produtividade volumétrica total de ASNase (IU L⁻¹ h⁻¹). 110

Figura 42. Efeito da proporção da concentração de IPTG (μM) por grama (massa celular seca, msc) de *E. coli* BL21 (DE3) na produtividade volumétrica EC de ASNase (IU L⁻¹ h⁻¹). 111

Figura 43. Avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em água e n-dodecano (6% v/v) em diferente agitação (500, 600, 700 e 800 rpm) e vazão de ar (0,5 e 1,0 volume de ar por volume de meio por minuto, vvm). Uso do método estático de barrido com nitrogênio y reoxigenação para determinação do k_{La}. (○) água destilada e 0,5 vvm de vazão de ar (■) água destilada e 1,0 vvm de vazão de ar (△) 6% de n-dodecano em água destilada e 0,5 vvm de vazão de ar (▼) 6% de n-dodecano em água destilada e 1,0 vvm de vazão de ar. 113

Figura 44. Curva de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado para permeabilização celular (adição de glicose 5 g L⁻¹; metais traços; 0,1M tampão fosfato pH 7,0; 0,8% de glicina e 6 % de n-dodecano) a 37 °C, obtida em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500rpm de agitação (k_{La} = 88 h⁻¹). Biomassa obtida (—▼—); pH (—□—); glicose (—★—); oxigênio dissolvido (—◇—) 115

Figura 45. Perfil de expressão e secreção extracelular de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado (adição de glicose 5 g L⁻¹; metais traços; 0,1M tampão fosfato pH 7,0; 0,8% de glicina e 6 % de n-dodecano) a 37 °C, obtida em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500 rpm de agitação (k_{La} de 88 h⁻¹). Condições de indução: início da indução no final da fase exponencial (3,5 h) com IPTG (0,1mM). Atividade ASNase extracelular (□, barra branca); atividade ASNase

intracelular (■, barra cinza); % de secreção extracelular (--○--); produtividade volumétrica em relação à atividade ASNase total (—◇—)..... 116

Figura 46. Produtividade de ASNase EC em relação ao tempo de pós-indução, obtido em biorreator 116

Figura 47. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do perfil de expressão ASNase extracelular pela *E. coli* BL21 (DE3) em biorreator..... 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uso das formulações de L-Asparaginase	25
Tabela 2. Proteases de <i>E. coli</i>	27
Tabela 3. Sistemas promotores para expressão de proteínas recombinantes em <i>E. Coli</i> 28	
Tabela 4. Composição elementar (macroelementos) de <i>E. coli</i>	33
Tabela 5. Composição elementar (microelementos) de <i>E. coli</i>	34
Tabela 6. Composição dos meios de cultivo	44
Tabela 7. Etapa 1 do método Nessler para determinar atividade enzimática da L-Asparaginase II	48
Tabela 8. Segunda etapa do método Nessler para determinar atividade enzimática da L-asparaginase II	48
Tabela 9. Matriz de experimentos de um delineamento fatorial completo 3 ² , valores codificados (fatores: X1 e X2; níveis: 1, 2 e 3), valores reais e resposta medida.	55
Tabela 10. Meio de cultivos utilizados para avaliar a variação do pH.....	56
Tabela 11. Os valores reais e codificados para avaliação da atividade ASNase extracelular e intracelular, biomassa e viabilidade celular em cultivos de <i>E. coli</i> BL21 (DE3), utilizando planejamento fatorial de composição com $\alpha=\sqrt{2}=1,4142$	58
Tabela 12. Resumo do resultado do ANOVA para análise de regressão linear.....	63
Tabela 13. Matriz de experimentos do delineamento fatorial completo 3 ² , valores codificados (fatores: X1 e X2; níveis: 1, 2 e 3), valores reais e resposta medida	64
Tabela 14. ANOVA para estimativa dos efeitos principais.....	64
Tabela 15. Parâmetros cinéticos de crescimento da <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador metabólico	67
Tabela 16. Dados de desempenho para o método de rompimento celular e o método de choque osmótico.....	72

Tabela 17. Parâmetros cinéticos de crescimento da <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador. Utilizaram-se como inoculo células crescidas por 12 h.	85
Tabela 18. Parâmetros cinéticos de crescimento da <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inoculo células crescidas por 12 h.	85
Tabela 19. Tempo (h) de cultivo de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) para produção de ASNase em diferentes meios (LB; LB + 2,5 g L ⁻¹ glicose; LB + 5,0 g L ⁻¹ glicose; LB + 5,0 g L ⁻¹ glicerol; LB + 7,5 g L ⁻¹ glicose) induzidos pela adição de IPTG 1mM	90
Tabela 20. Composição elementar para a massa seca de células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e do meio Luria Bertani (expresso em g L ⁻¹).	93
Tabela 21. Análise de variância para falta de ajuste.	99
Tabela 22. Comparação dos parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de ASNase pela <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em agitador orbital e biorreator.....	118

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASNase: L-Asparaginase tipo II

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albumina de soro bovino

cfu: Unidades formadoras de colônias (termo em inglês *colony forming units*)

DO₆₀₀: Densidade ótica a 600 nm

EC: Extracelular

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

E. coli: *Escherichia coli*

EMA: Agência de Medicina da Europa (inglês *European Medicines Agency*)

IC: Intracelular

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

k_La: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

LB: meio de cultivo Luria Bertani

LPS: Lipopolissacarídeos

LNH: Linfoma não Hodgkin

min: minuto

mcs: massa celular seca

OD: oxigênio dissolvido

OTR: Taxa de transferência de oxigênio (termo em inglês *oxygen transfer rate*)

PMSF: Fenilmetilsulfonilflúor

R²: coeficiente de determinação

rpm: revoluções por minuto

s: segundo

SDS: tensoativos aniônico dodecil sulfato de sódio

SUS: Sistema Único de Saúde

TCA: ácido tricloroacético

TCR: Taxa de rompimento celular (%)

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

X: biomassa (g massa celular seca por L)

Ø: diâmetro (mm)

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	14
INDICE	15
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda.....	22
2.2. L-asparaginase	23
2.3. Expressão de proteínas recombinantes.....	25
2.3.1. Hospedeiro	26
2.3.2. Vetor de clonagem.....	28
2.4. Aumento da produtividade	30
2.4.1. Fatores que influenciam o crescimento dos cultivos	31
2.4.1.1. Composição do meio de cultivo.....	31
2.4.1.1.1. Adição de fonte de carbono	34
2.4.1.1.2. Adição de sais de metais.....	35
2.4.1.2. Oxigenação do meio de cultivo.....	36
2.4.2. Fatores que influenciam a expressão de ASNase.....	37
2.5. Secreção extracelular de ASNase	38
2.6. Liberação de ASNase de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	39
3. OBJETIVO GERAL.....	42
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Micro-organismo:	44
4.2. Meio de cultivo	44

4.3.	Métodos e protocolos gerais.....	44
4.3.1.	Preparo do estoque de células da <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	44
4.3.2.	Preparo do inóculo.....	45
4.3.3.	Cultivos de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	45
4.3.4.	Cultivos para expressão da ASNase	45
4.4.	Determinações analíticas	45
4.4.1.	Medição da densidade celular	45
4.4.2.	Determinação da concentração celular	46
4.4.3.	Massa seca em estufa.....	46
4.4.4.	Massa seca em membrana.....	46
4.4.5.	Determinação da viabilidade celular em relação à biomassa.....	47
4.4.6.	Atividade enzimática.....	47
4.4.7.	Quantificação de Proteínas Totais	48
4.4.8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	49
4.4.9.	Determinação de glicose.....	49
4.4.10.	Determinação de glicerol.....	49
4.4.11.	Determinação de acetato.....	50
4.5.	Medição do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_{La}	50
4.6.	Preparo para obtenção da curva de crescimento	51
4.7.	Estabelecimento da curva de biomassa em função da DO_{600}	51
4.8.	Estudo da liberação de ASNase.....	52
4.8.1.	Método de Rompimento celular.....	52
4.8.2.	Método de choque osmótico.....	54
4.9.	Estudos de cultivos em agitador orbital	54
4.9.1.	Avaliação do tamanho e idade do inóculo no cultivo.....	54
4.9.2.	Avaliação do efeito da concentração de acetato	55
4.9.3.	Avaliação do controle o de pH no crescimento celular.....	55
4.9.4.	Avaliação da fonte de carbono no crescimento celular	56

4.9.5.	Avaliação da fonte de carbono e início da indução na expressão de ASNase	56
4.9.6.	Análise do conteúdo de metais no meio de cultivo.....	57
4.9.7.	Avaliação da relação de indutor e a concentração celular.....	57
4.9.8.	Avaliação da permeabilização celular para secreção da enzima celular	58
4.9.9.	Avaliação da temperatura de pós-indução e perfil de expressão da ASNase ..	58
4.10.	Estudos de cultivos em bioreator	59
4.10.1.	Avaliação do k_{La} em presença de n-dodecano.....	59
4.10.2.	Avaliação da fase de crescimento.....	59
4.10.3.	Avaliação da fase de pós-indução	59
4.11.	Cálculos	60
4.11.1.	Porcentagem da recuperação de ASNase (% recup.)	60
4.11.2.	Velocidade específica de crescimento celular (μx).....	60
4.11.3.	Tempo de Geração (tg)	60
4.11.4.	Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).....	61
4.11.5.	Produtividade volumétrica volumetrica	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1.	Estabelecimento da curva de biomassa em função da DO_{600}	62
5.2.	Avaliação do tamanho e idade do inóculo no cultivo.....	63
5.3.	Estudo da liberação de ASNase.....	67
5.3.1.	Rompimento por pérolas de vidro	67
5.3.2.	Liberação de ASNase pelo método de choque osmótico	71
5.4.	Estudos em agitador orbital	73
5.4.1.	Avaliação do acetato no crescimento e expressão de ASNase	73
5.4.2.	Avaliação do controle do pH no crescimento celular.....	74
5.4.3.	Avaliação da fonte de carbono no crescimento celular	78
5.4.4.	Avaliação da fonte de carbono e início da indução na expressão de ASNase	86
5.4.4.1.	Efeito do início da indução no crescimento celular.....	86
5.4.4.2.	Efeito do início da indução na expressão	87

5.4.4.3.	Efeito do início da indução na produtividade da ASNase	90
5.4.5.	Análise do conteúdo de metais no meio de cultivo.....	92
5.4.6.	Avaliação da permeabilização celular para secreção celular	96
5.4.7.	Avaliação da temperatura de pós-indução e perfil de expressão da ASNase	103
5.4.8.	Avaliação da relação de indutor e a concentração celular.....	109
5.5.	Estudos de cultivos em biorreator	111
5.5.1.	Avaliação do k_{La} em presença de n-dodecano.....	111
5.5.2.	Avaliação da fase de crescimento.....	113
5.5.3.	Avaliação da fase de pós-indução	115
6.	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase II (ASNase), é uma enzima que hidrolisa a L-asparagina para amônia e ácido aspártico, sendo utilizada há mais de cinquenta anos no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda, LLA (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). A depleção intracorpórea de asparagina leva à morte seletiva das células cancerígenas, deixando incólumes as células normais, uma vez que estas são capazes de sintetizar o referido aminoácido. A LLA é o tipo de câncer de maior incidência em crianças, provocando o aumento descontrolado de células imaturas de linfócitos (linfoblastos). A proliferação de linfoblastos interfere na correta função das outras células sanguíneas (hemácias, plaquetas, leucócitos, etc.), podendo levar a pessoa a óbito, se não for tratada. Desde que a ASNase foi introduzida no mercado, na década de 1960, a taxa de cura da LLA aumentou e atualmente está próxima de 90% (EGLER et al., 2016). A eventual falta da enzima no mercado, por conseguinte, reduzirá a chance de cura para os pacientes.

No final do ano 2012 a Lundbeck (Deerfield, USA), uma das maiores indústrias produtoras e fornecedoras de ASNase, anunciou ao mundo a descontinuação da fabricação do medicamento, alegando insustentabilidade mercadológica no futuro (LUNDBECK, DEERFIELD, IL, 2012). Decorrente deste fato o Laboratório Bagó do Brasil, produtor do ELSPAR (único medicamento a base de ASNase aceita pela ANVISA), deixou de fornecê-lo no país; isto gerou alarme entre as autoridades da saúde, que só no ano 2014, aprovaram a importação de 52300 frascos-ampola de ASNase Medac (Laboratório Medac, Alemanha, produzido pela Kyowa Hakko Kirin, Japão) pelo valor de US\$ 152,93 cada frasco-ampola contendo 10000 IU ASNase liofilizada, perfazendo o custo total de US\$ 8 milhões (MINISTERIO DA SAÚDE, 2013).

No Brasil é utilizado o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI LLA-99) no tratamento da LLA, sendo a ASNase necessária e insubstituível nas primeiras fases do tratamento (13-17 doses de 5000 IU/m² por paciente) (CAZÉ; BUENO; DOS SANTOS, 2010). Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, estimam-se para 2016

cerca de 12600 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos, destes, aproximadamente, 25-35 % serão casos de LLA (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015). Disto infere-se que o volume do lote de asparaginase comprado em 2014 seria suficiente para suprir as necessidades de tratamento da LLA por um ano no máximo.

Frente ao exposto, compreende-se o interesse das autoridades de Saúde na produção da ASNase; por isso, este biofármaco foi incluído, a partir de 2015, na lista de produtos estratégicos do SUS, sendo sua produção no Brasil incentivada pelo programa de Parcerias para o Desenvolvimento Produtivo do Ministério de Saúde (MINISTERIO DA SAÚDE, 2014). No entanto, não houve proposição de projeto algum para a produção da enzima naquele ano.

Por outro lado, desde a introdução da ASNase no mercado, foram desenvolvidas várias formulações de ASNase, obtidas principalmente de duas fontes (*Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*), sendo a ASNase de *E. coli* o biofármaco de primeira escolha no mundo inteiro (PIETERS et al., 2011). Até o ano 2015, apenas 3 tipos de asparaginase foram aceitas e aprovadas para o tratamento da LLA no mundo, as quais são de origem não recombinante: (1) ASNase de *E. coli*, (2) ASNase de *E. coli* modificada quimicamente pela adição de polietileno glicóis, PEG (ASNase peguilada); (3) ASNase de *E. chrysanthemi*. Decorrente do fato das asparaginases não serem recombinantes e obtidas segundo protocolos de produção desenvolvidos há duas ou três décadas, o processo de fabricação corrente é de baixa produtividade.

Em fevereiro de 2016 foi aprovada pela Agência de Medicina da Europa (EMA) a primeira ASNase de *E. coli* recombinante, chamada Spectrila (Laboratório MEDAC GmbH, Alemanha e produzido pela Wacker Biotech, Alemanha) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016). O avanço na produção desta ASNase, propiciado justamente pelo emprego do micro-organismo recombinante, residiu no fato que o processo fermentativo tornou-se menos oneroso, haja vista o aumento de produtividade conseguido, sobretudo, pela redução do volume de cultivo a ser produzido (de 20.000 L para 300 L)

(WACKER BIOTECH GMBH, 2016). Nesta dissertação propõe-se a produção de ASNase a partir de *E. coli* recombinante, baseada na estratégia de induzir a formação da enzima pelo micro-organismo, introduzindo no meio de fermentação uma substância indutora específica (IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

A medula óssea é responsável pela formação de todas as células sanguíneas (hematopoese), as quais se originam a partir das células-tronco. Há duas famílias principais de células-tronco: (1) células-tronco mieloides, que se desenvolvem em células vermelhas, células brancas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) e plaquetas; e (2) células-tronco linfoides que se desenvolvem em dois tipos de células brancas (linfócitos-T e Linfócitos-B) (Figura 1) (LEUKAEMIA & BLOOD FOUNDATION, 2013)

Figura 1. Medula óssea e formação de células sanguíneas. Fonte: Associação Portuguesa contra a Leucemia <disponível em: <http://www.apcl.pt/dadores/o-que-e-a-medula-ossea>>

A leucemia é um tipo de câncer que se desenvolve na medula óssea, e é chamada de aguda quando afeta as células imaturas (células blásticas), produzindo excessivo número de células blásticas anormais, as quais se acumulam na medula óssea, interferindo na produção de células sanguíneas normais. No caso da leucemia crônica há acúmulo de células brancas mais maduras, porém anormais, e progride mais lentamente que a aguda.

O termo LLA é quando a leucemia afeta a linhagem de células linfoides. Devido à função anormal da medula óssea em pacientes com LLA, ela não produz número adequado de células sanguíneas vermelhas, brancas e plaquetas. Inclusive essas células anormais podem ir para outros órgãos. Os

principais sintomas da leucemia decorrem do acúmulo destas células na medula óssea, causando anemia, infecções e hemorragias, etc. A doença progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico e classificação da leucemia, porque ao não ser tratada é fatal (CORTES; KANTARJIAN, 1995; WEINBERG; ARBER, 2010).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, estimam-se para 2016 cerca de 12.600 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 19 anos, destes, aproximadamente, 25-35% serão casos de LLA e 10240 de Linfoma não-Hodgkin, LNH (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015).

Um progresso extraordinário tem ocorrido no tratamento desta doença. Há quatro décadas a taxa de cura era menor que 10% e, atualmente, está próximo a 90% em crianças (KOKA et al., 2014; STARY et al., 2014; VORA et al., 2013). Em contraste, apenas 30 a 40% dos adultos com LLA são curados (LAPORT; LARSON, 1997). Essa discrepância pode ser atribuída em parte à alta frequência de anormalidades genéticas adversas na leucemia linfoblástica de adultos (CHESSELLS et al., 1998).

Protocolos de tratamentos atuais para a LLA utilizam um complexo de múltiplas drogas (KOKA et al., 2014; VORA et al., 2013). Sendo que, principalmente L-asparaginase, tem sido o suporte principal no tratamento da LLA em crianças (EGLER et al., 2016). O principal objetivo da terapia em pacientes com leucemia é induzir a completa remissão com a restauração da hematopoese normal (EGLER et al., 2016; KOKA et al., 2014).

2.2. L-asparaginase

Duas formas de L-asparaginase bacteriana já foram descritas: (1) Asparaginase tipo I, apresenta uma estrutura quaternária dimérica com baixa afinidade por L-asparagina; e (2) Asparaginase tipo II, ASNase, tem estrutura quaternária tetramérica e alta afinidade pela L-asparagina (CEDAR, H. SCHWARTZ, 1967; SRIKHANTA et al., 2013). ASNase é composta de 4 subunidades idênticas e tem massa molar de 141 kDa (cada monômero

contém 326 resíduos de aminoácidos); a enzima ativa é sempre um tetrâmero (SWAIN et al., 1993). A ASNase é a única com poder anticancerígeno.

A ASNase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é uma enzima que catalisa a hidrólise de L-asparagina para L-aspartato e amônia, e tem sido usada como agente terapêutico em tipos selecionados de doenças hematológicas, tais como LLA e LNH (MÜLLER; BOOS, 1998). Como as células de tumor dependem do fornecimento exógeno de asparagina, a presença da ASNase diminui a concentração de asparagina na corrente sanguínea, e provoca morte seletiva de células de tumor, como observado na Figura 2 (HEINEMANN; HOWARD, 1969). As células normais não são afetadas, devido à síntese endógena da asparagina pela enzima asparagina sintetase.

(A) Células normais sintetizam L-asparagina (N) com a ajuda da enzima asparaginasintetase (AS)

(B) Células cancerígenas são incapazes de sintetizar L-asparagina (N) devido à falta da AS e depende de uma fonte extracelular para sobreviver.

(C) L-asparaginase diminui a concentração extracelular de L-asparagina. As células cancerígenas morrem seletivamente e as células normais sobrevivem.

Figura 2. Mecanismo de ação da L-asparaginase tipo II (SHRIVASTAVA et al., 2015).

As formulações de ASNase disponíveis no mercado hoje em dia são derivadas de *E. coli* (Asparaginase®; Medac, Kidrolase®; EUSA Pharma, Elspar®; Merck) na sua forma nativa ou como enzima peguilada (fundida a moléculas de polietilenoglicol para aumento da sua biodisponibilidade; Oncaspar®; Sigma-Tau) e de *E. chrysanthemi* (Erwinase®; EUSA Pharma). Sendo a ASNase de *E. coli*, o biofármaco de primeira linha (Tabela 1) utilizado no tratamento da LLA (KUMAR et al., 2014; PIETERS et al., 2011).

Tabela 1. Uso das formulações de L-Asparaginase (PIETERS et al., 2011)

		América do Norte, Reino Unido, Nova Zelândia	Europa (zona BFM)	Resto do mundo
Crianças	Sem tratamento prévio	1ª linha: PEG-asparaginase	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase
		2ª linha: Erwinia asparaginase	2ª linha: PEG-asparaginase ou Erwinia asparaginase	2ª linha: Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase
	Com recidiva	1ª linha: PEG-asparaginase	1ª linha: PEG-asparaginase	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase
		2ª linha: Erwinia asparaginase	2ª linha: Erwinia asparaginase	2ª linha: Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase
Adultos	Sem tratamento prévio	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase ou PEG-asparaginase	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase ou PEG-asparaginase	1ª linha: <i>E. coli</i> -asparaginase
		2ª linha: PEG-asparaginase ou Erwinia asparaginase	2ª linha: Erwinia asparaginase	2ª linha: Erwinia asparaginase ou PEG-asparaginase

BFM: indicação Berlin-Frankfurt-Munster; PEG: polietilenoglicol

2.3. Expressão de proteínas recombinantes

A expressão de uma proteína recombinante torna-se possível pelo uso de vetores de clonagem, contendo o gene para uma proteína específica. Esse vetor precisa de um organismo hospedeiro como bactérias, fungos, leveduras, insetos, plantas e mamíferos transgênicos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Pela dualidade hospedeiro/vetor foram salientadas as principais características, que estão envolvidas neste trabalho.

2.3.1. Hospedeiro

A bactéria Gram-negativa *E. coli*, é muito utilizada atualmente como hospedeiro para produção de proteínas recombinantes porque oferece uma plataforma de expressão eficiente, devido ao fato de ser um hospedeiro bem caracterizado genética e fisiologicamente, rápido crescimento, capacidade para consumir fontes de carbono de baixo custo e permitir altos níveis de expressão de proteínas (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Das características da *E. coli* como hospedeiro, o metabolismo e a presença de proteases têm maior influência na produção de proteínas recombinantes.

Esta bactéria mostra tipicamente quatro fases durante o seu crescimento (Figura 3): (1) fase de adaptação (lag); (2) fase exponencial (logarítmica), quando ocorre divisão celular a velocidade constante, devido a concentrações não limitantes de nutrientes e fonte de carbono; (3) fase estacionária, ocorre quando as velocidades de divisão e morte celular são semelhantes, devido a condições limitantes de crescimento; (4) fase de morte, como consequência do esgotamento de nutrientes ou níveis tóxicos dos detritos celulares (MOULTON, 2014).

Figura 3. Curva logarítmica de crescimento típico para *E. coli* (MOULTON, 2014)

A *E. coli* apresenta metabolismo aeróbio facultativo, que permite assimilar a fonte de carbono para o crescimento com maior eficiência em condições aeróbias. Em condições de anaerobiose a *E. coli* pode formar subprodutos do metabolismo da fonte de carbono, como: etanol, acetato, lactato, succinato, formiato (CLARK, 1989; VUORISTO et al., 2015). De todos esses subprodutos, a formação de acetato é o mais importante; foi relatado inibição do crescimento para concentrações de acetato entre 33 e 167 mM

(LULI; STROHL, 1990; SHILOACH; BAUER, 1975). Inclusive, segundo Doelle (1982) excesso de glicose pode levar à formação de acetato, mesmo em condições aeróbias (DOELLE et al., 1982). O acetato, inclusive, pode inibir a expressão de proteínas recombinantes (Jensen & Carlsen, 1990).

Na produção de proteínas recombinantes, a proteína pode ser exposta às proteases do hospedeiro, tornando-a susceptível à degradação. Na tabela 2 mostram-se as proteases de *E. coli*, as quais são classificadas de acordo com a localização (citoplasmática, periplasmática ou na membrana citoplasmática), dependência de energia e a natureza do sítio ativo (protease serínica, ácida, sulfidrílica ou metaloprotease).

Tabela 2. Proteases de *E. coli*, modificado de Enfors (2004).

Proteases	Dependência de ATP	Localização	Tipo
Lon (La)	Sim	Citoplasma	Serina
ClpAP (Ti, Clp)	Sim	Citoplasma	Serina
ClpXP	Sim	Citoplasma	Serina
HslUV	Sim	Citoplasma	Serina
Fa		Citoplasma	Serina
So	Não	Citoplasma	Serina
Ci	Não	Citoplasma	Metaloprotease
HflA		Citoplasma	Serina
FtsH (HfiB)	Sim	Membrana citoplasmática	Metaloprotease
Mi	Não	Periplasma	Serina
Tsp (Re, Prc)	Não	Citoplasma e periplasma	Serina
HtrA (DegP, Do)	Não	Citoplasma e periplasma	Serina
Pi (protease III)	Não	Periplasma	Metaloprotease
OmpT (protease VII)	Não	Membrana externa	Serina

Levando em conta a presença de proteases do hospedeiro, podem se implementar estratégias para a redução desse efeito proteolítico, como por exemplo, proteínas expressas em compartimentos subcelulares com menor risco a serem degradadas por proteases ou expressão de proteínas em linhagens hospedeiras com genes para proteases deletados (OVERTON, 2014).

2.3.2. Vetor de clonagem

O vetor de clonagem permitiu a manipulação da expressão da proteína de interesse e a clonagem do gene pelo controle de um promotor, o qual começa a sua ação pela adição de um indutor. As características desejadas nos promotores são o controle rigoroso da inatividade do promotor na ausência do indutor e os níveis de expressão reguláveis pela concentração de indutor adicionado ao meio de cultura (OVERTON, 2014). Na Tabela 3, são descritos alguns sistemas promotores.

Tabela 3. Sistemas promotores para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* (modificado de OVERTON, 2014)

Sistema promotor	Fonte	Base da regulação	Nota
pET (DE3/T7)	A partir do promotor <i>lac</i> , gene polimerase RNA T7 e promotores T7	A enzima polimerase RNA T7 (RNAP) é necessária para a transcrição; este é codificado numa porção do genoma do hospedeiro (lócus DE3). A expressão da RNAP é regulada pelo promotor <i>lacUV5</i> , que é reprimido pelo repressor <i>lac</i> , <i>LacI</i> . IPTG inativa o repressor <i>lac</i> .	
Outros T7	Vários	Similar ao pET, mas a produção da RNAP é induzida por indutores diferentes de IPTG	
<i>lac</i> (<i>Plac</i> , <i>PlacUV5</i>)	Versão natural ou modificadas do promotor <i>lac</i> de <i>E. coli</i>	Expressão reprimida pelo repressor <i>lac</i> , <i>LacI</i> . A repressão é inativada pela adição de lactose ou IPTG.	
<i>tac/trc</i>	Híbrido dos promotores <i>lacUV5</i> e <i>trp</i>	Similar ao sistema <i>lac</i>	Foi relatado maior efetividade do que no sistema <i>lac</i>
pBAD	Operon arabinose de <i>E. coli</i>	O repressor do promotor <i>araBAD</i> é inativa pela adição de arabinose	Geralmente apresenta bom controle da expressão
λ pL	Promotor e repressor <i>cl</i> a partir fago λ	Promotor <i>p_L</i> é reprimida pela proteína repressor <i>cl</i> . O tipo <i>cl</i> (<i>cl857</i>) sensível à temperatura é estável a 30 °C, mas instável a 42 °C, por esta razão, a temperatura reprime o sistema.	A indução requer crescimento a 42 °C, a qual poderia afetar o correto dobramento das proteínas.

Desses promotores, o promotor T7 presente nos vetores pET é extremamente popular para a expressão de proteína recombinante, devido a trabalhos relatados onde a proteína recombinante representou 50% da proteína celular total (BANEYX, 1999; GRAUMANN; PREMSTALLER, 2006). Neste sistema, o gene de interesse é clonado atrás de um promotor reconhecido pela polimerase RNA T7 (T7 RNAP). Esta T7 RNAP altamente ativa deve ser inserida em um outro plasmídeo (comumente é colocada no fago λ DE3 inserido no genoma do hospedeiro) que codifica T7 RNAP controlada pelo promotor *lacUV5* (STUDIER; MOFFATT, 1986). O sistema pode ser induzido pela lactose ou pelo seu análogo não hidrolisável isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo, IPTG (observar a Figura 4).

Figura 4. Sistema pET. O gene da proteína alvo inserido no vetor sob o controle do promotor T7, que não pode ser ativado pela polimerase RNA nativa (Ec RNAP). Para transcrever o gene da proteína alvo é requerida a polimerase RNA T7 (T7 RNAP), que é codificada no locus DE3 dentro do genoma do hospedeiro. A expressão da T7 RNAP

é regulada pelo promotor lacUV5. (a) O promotor lacUV5 é reprimido pelo repressor lac; (b) O indutor IPTG se liga ao repressor LacI, isto ativa o promotor lacUV5 e começa a transcrição do T7 RNAP, que finalmente ativa o promotor T7 e a expressão da proteína alvo. Abreviatura: ori, origem de replicação. (Fonte: modificado de OVERTON, 2014)

Outros componentes do vetor de expressão pET, além do promotor, são: (a) origem de replicação que permite a propagação do vetor de uma geração para outra; (b) marcador de seleção, oferece resistência contra antibióticos para evitar crescimento de células livres de vetor; (c) sítios para inserção de genes de fusão e transporte (translocação) com vista a facilitar purificação da proteína ou dar condições de maior estabilidade à proteína expressa (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

No presente trabalho utilizou-se o vetor de super expressão pET-15b contendo o gene para ASNase de *E. coli* (*asnB*) com resistência a ampicilina e sequência do sinal de exportação para o espaço periplasmático. O hospedeiro do vetor é a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, uma forma modificada da *E. coli* linhagem B, que produz pouco acetato, sendo deficiente em duas proteases codificadas pelos genes *lon* (protease citoplasmática) e *ompT* (protease periplásmico), as quais participam na degradação de proteínas recombinantes.

No entanto, apesar das vantagens oferecidas pelo hospedeiro/vetor, a eficiência do cultivo para produção da proteína recombinante não é garantida. Por isso tornou-se preciso detalhar certos aspectos que influenciam no aumento da eficiência da produção e desta forma planejar uma estratégia de produção da ASNase em *E. coli* BL21 (DE3).

2.4. Aumento da produtividade

A eficiência de um cultivo de células é medida pela produtividade. A produtividade volumétrica determina o produto obtido em certo período de produção e pode ser medida como o produto da produtividade específica de células ($q_{p/x}$) (ou atividade ASNase específica por grama de massa celular seca) e a massa celular por unidade de volume, X (COONEY, 1983); dessa forma, notou-se que a produtividade era proporcional à densidade celular do cultivo.

Muita pesquisa e trabalho de desenvolvimento têm sido dedicados à obtenção de cultivos em alta densidade celular com o intuito de aumentar a produtividade (RIESENBERG; GUTHKE, 1999; YEE; BLANCH, 1992). Cultivos em alta densidade celular (CADC) referem-se à cerca de 10 vezes a densidade de células normais de um simples lote de cultura. Por exemplo, se 5 - 10 g L⁻¹ (massa seca por L de meio) é considerada uma densidade normal de células, então 50 - 100 g L⁻¹ seria chamado alta densidade celular (LEE, 1996). A maior parte dos trabalhos sobre a CADC para produção de proteínas recombinantes concentrou-se em *E. coli* devido à genética e fisiologia bem conhecidas.

As células de *E. coli* irão continuar se dividindo, desde que suas exigências nutricionais sejam supridas, e, também, fatores tóxicos ou inibitórios não sejam excretados ou pelo menos sejam controlados no meio; essas condições são possíveis pelo uso de sistema descontínuo-alimentado, no qual a fluidez do meio de cultura é o único obstáculo para o crescimento ilimitado das bactérias (LEE, 1996). De fato, o sistema descontínuo não cumpre com os requisitos para atingir CADC; como relatado em um estudo, que avaliou cultivos de *E. coli* BL21 para produção de interferon γ crescidos em sistemas descontínuo e descontínuo-alimentado, nos quais foram obtidos 7g L⁻¹ e 127 g L⁻¹ de biomassa, respectivamente (MARJAN et al., 2006). Não obstante, estudos em sistema descontínuo são importantes e necessários para estabelecer os parâmetros de crescimento do micro-organismo, haja vista cultivos em sistema descontínuo-alimentado serem precedidos de cultivos em sistema descontínuo, geralmente. Por isso, neste trabalho propôs-se uma estratégia de produção em sistema descontínuo com vistas à produção em descontínuo-alimentado; e esta estratégia focou-se no aumento da produtividade da ASNase.

2.4.1. Fatores que influenciam o crescimento dos cultivos

2.4.1.1. Composição do meio de cultivo

Os meios utilizados para cultivar micro-organismos normalmente requerem vários componentes essenciais para a biossíntese de metabólitos intermediários fundamentais para a manutenção e reprodução celular. Alguns

micro-organismos utilizam elementos na forma de compostos simples, outros exigem compostos mais complexos. Por isso, o conhecimento da composição elementar do micro-organismo é importante, para estabelecer o uso de um meio de cultivo baseado na solução da equação do equilíbrio elementar (estequiometria), como mostra a Equação 1 para um processo aeróbio (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1999).

Fonte de C e Energia + Fonte de N + O₂ + Outros → Biomassa + Produtos + Calor + CO₂ + H₂O (Eq.1)

A equação 1 é um modelo simples que não considera a complexidade de um sistema biológico. Existem estudos da avaliação da produção de biomassa baseados na análise dos componentes elementares que controlam as principais reações metabólicas ocorridas na célula. A saber, foi relatado que o rendimento de glucose-biomassa em *E. coli* depende fortemente do consumo de oxigênio Carlson (2004) e Henkel (2014). Apesar disso, o modelo estequiométrico pode servir como base para desenhar/analisar um meio de cultivo.

Em geral, três tipos de meios de cultivo são utilizados para *E. coli*: quimicamente definido (QD), meio complexo e semidefinido. O meio QD é composto por substâncias químicas definidas e em concentrações conhecidas; crescimento de *E. coli* recombinante neste tipo de meio atinge densidade ótica (DO₆₀₀) acima de 400 (indicador da densidade celular), porém, a capacidade de atingir alta densidade celular depende da linhagem do hospedeiro (MOULTON, 2014). O meio complexo contém ingredientes de origem natural, tais como extrato de levedura e hidrolisado de proteínas (triptona ou soytona), nos quais a composição não é completamente conhecida. O extrato de levedura tem papel benéfico para manter o nível de expressão da proteína recombinante, como foi relatado por Panda et. al. (2000). O meio semidefinido é constituído principalmente de componentes químicos definidos e componentes complexos. Meios semidefinidos e complexos são usados popularmente na indústria porque eles oferecem flexibilidade na formulação e permitem alta densidade celular e altos rendimentos de proteína (HUANG; LIN; YANG, 2012).

O meio Luria Bertani (LB) é o meio de cultivo comum para o cultivo de *E. coli*, porque sua formulação é fácil (10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl), permitindo um rápido crescimento celular. Por isso, este meio foi usado como meio de cultura base no presente estudo.

Sendo o aumento da densidade celular um dos focos do trabalho, cabe avaliar o que limita o crescimento de bactérias no meio de cultivo LB. As Tabelas 4 e 5 mostram a composição elementar dos macro e microelementos úteis para formação da massa celular seca de algumas linhagens de *E. coli*, respectivamente.

Tabela 4. Composição elementar (microelementos) de *E. coli*

Elemento	% massa celular seca						(ROUF, 1964)
	Roberts (1956)	Fase log ^b	Fase estacionária ^b	Final fase exponencial ^c	Fase exponencial precoce ^c	Segundo Neidhartel (1990)	
Carbono	50 ^a	49,23	61,11	40,29	ND	50	-
Nitrogênio	15 ^a	14,08	13,33	-	-	14	-
Fosforo	3,2 ^a	4,37	3,72	4,11	5,52	3	4,29
Enxofre	1,1 ^a	1,26	0,95	1,02	1,23	1	0,86
Oxigênio	23						
Hidrogênio	10						

^a Análise dos isótopos (ROBERTS, 1956)

^b *E. coli* B6 (FAGERBAKKE; HELDAL; NORLAND, 1996), a análise foi feita pelo uso de microanálises de Raios X com microscopia de transmissão de elétrons.

^c Heldal (1985), a análise foi feita pelo uso de microanálises de Raios X com microscopia de transmissão de elétrons.

Tabela 5. Composição elementar (microelementos) de *E. coli*

Elemento	^a	Final exponencial	fase exponencial ^b	Fase exponencial precoce ^b	Segundo Neidhartel (1990)	(ROUF, 1964)
Sódio	1,28	2,29		5,27	-	0,0074 ^c
Potássio	1,48	4,13		2,19	2	1,18 ^c
Cálcio	1,42	0,21		0,05	0,05	0,0143
Magnésio	0,54	0,64		0,86	0,05	0,62
Cloro	0,41	2,28		2,50	0,05	-
Ferro	0,25	-		-	0,02	0,021
Zn	-	-		-	-	0,0078
Mn, Co, Cu, Zn, Mo	-	-		-	0,3	-

^a Cálcio (como CaO), Magnésio (como MgO), Ferro (como Fe₂SO₃) (GUILLEMIN; LARSON, 1922)

^b Heldal (1985), a análise foi feita pelo uso de microanálises de Raios X com microscopia de transmissão de elétrons.

^c perda durante a lavagem da amostra.

2.4.1.1.1. Adição de fonte de carbono

De acordo com Sezonov (2007), o meio LB contém menos de 100 µM de açúcares fermentáveis, utilizáveis pela *E. coli* (açúcares livres, fosfatos de açúcar, oligossacarídeos, nucleotídeos, etc.). Nessas condições, a falta de fonte de carbono (assimilável) é a principal limitação do meio LB no aumento da densidade celular, mesmo em condições de cultivo em agitador orbital, em razão da maior porcentagem do carbono na composição elementar da *E. coli*.

Por outro lado, a formação de acetato pelo metabolismo da fonte de carbono, é um dos grandes problemas para o aumento da densidade celular. A inibição do crescimento por acetato em cultivos tem sido observada para concentrações de acetato entre 33 mM (1,95 g L⁻¹) e 167 mM (9,86 g L⁻¹) (LULI; STROHL, 1990; SHILOACH; BAUER, 1975). Cultivos de *E. coli* com excesso de glicose podem levar à formação de acetato, mesmo em condições aeróbias (DOELLE et al., 1982). Concentrações de glicose acima de 30 mg L⁻¹ resultam em superprodução de acetato (XU; JAHIC; BLOMSTEN, 1999). Estudos demonstram que o uso de glicerol, como fonte de carbono, evita a formação de acetato de *E. coli* em biorreator (GONÇALVES et al., 2014).

Considerando os pontos citados acima, foram estudados os parâmetros cinéticos de crescimento celular, formação de acetato e efeito na expressão de ASNase pelo uso de glicose ou glicerol como fonte de carbono.

2.4.1.1.2. Adição de sais de metais

As células precisam de sais de metais, mesmo como elementos traço, que apesar das pequenas concentrações são essenciais para o crescimento. A disponibilidade dos sais presentes no meio LB poderia ser o maior problema para cultivos desenvolvidos em biorreator, no qual se espera obter maior densidade celular, devido ao melhor controle do pH e oxigenação do meio, em relação aos cultivos desenvolvidos em agitador orbital.

Por exemplo, a enzima formiato-hidrogênio-liase, possui três isoenzimas as quais participam da formação de biomassa em condições anaeróbicas. Estas enzimas precisam de molibdênio, selênio e níquel no meio de crescimento para obter enzimas em estado funcional (PINSENT, 1954; SOINI; UKKONEN; NEUBAUER, 2008). Outten (2001) mostrou que o meio LB tem baixa concentração de molibdênio, selênio e níquel (10^{-7} - 10^{-8} M) (Figura 5) o que provocaria acúmulo de formiato pela *E. coli* e menor produção de biomassa em condições anaeróbicas pela falta da enzima FHL (SOINI; UKKONEN; NEUBAUER, 2008).

Figura 5. Distribuição de metais em *E. coli*, representada em termos de moles por volume de células (amostra: $3,5 \times 10^{-12}$ mL de células crescidas até 0,5 - 0,6 de DO_{600} , em meio LB) e comparada com a concentração total dos metais no meio LB. As barras não preenchidas representam concentrações extremamente pequenas dos íons (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001).

Continuando com a análise da composição de íons metálicos, foi relatado que cátions bivalentes (Ca^{+2} ou Mg^{+2}) ajudam na estabilização dos lipopolissacarídeos da membrana celular externa (HAMILTON-MILLER, 1966). A concentração de Mg^{+2} intracelular necessária para células de *E. coli* em fase exponencial de crescimento é de 100mM (MONCANY; KELLENBERGER, 1981), equivalente a 7,2 mg por grama de massa celular seca (3 mL célula úmida = 1 g célula seca). De acordo com Outten (2001) o meio LB contém 3 mg de Mg^{+2} por litro (2,4 vezes menos do que o requerido), podendo ocorrer a permeabilização não controlada da membrana celular. Da mesma forma, ocorre com a concentração de cálcio ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$). A concentração de Zn^{+2} requerida para o crescimento da *E. coli* é 0,2 mM (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001). Ressalta-se que em baixas concentrações deste íon a velocidade de crescimento da *E. coli* é reduzida (GRAHAM et al., 2009). Outros íons em baixas concentrações no meio LB são: Fe^{+2} ($0,56 \text{ mg L}^{-1}$), Cu^{+2} ($6,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e Mn^{+2} ($5,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).

Porém, o excesso de íons metálicos pode causar efeitos tóxicos nas células, pois a *E. coli* tem mecanismos de regulação, gerando acúmulo desses metais (FINNEY; O'HALLORAN, 2003). Foi reportado que Cobalto (em excesso) pode afetar as Ferro-Sulfeto enzimas (RANQUET et al., 2007), as quais estão envolvidas numa variedade de funções biológicas críticas, incluindo a transferência de elétrons na cadeia respiratória e em reações de oxido-redução e, a ligação/ativação dos substratos às enzimas, (DOS SANTOS; DEAN, 2008). O uso de 100 μM de cobalto no meio mínimo reduz a DO_{600} máxima em 71,4 % (RANQUET et al., 2007).

Por tal motivo, neste estudo avaliou-se a suplementação de microelementos (a partir de solução de íons metálicos) durante a fase de crescimento e na fase de expressão da ASNase. No entanto, antes disso foi determinada a composição elementar para células de *E. coli* BL21 (DE3).

2.4.1.2. Oxigenação do meio de cultivo

O fornecimento de oxigênio é essencial para favorecer o crescimento de células. Para cultivos de *E. coli* recombinante, a densidade celular aumentou

com 40 % de oxigênio dissolvido e a quantidade de proteína aumentou de 1,5 a 4,5 IU (PILAREK; GLAZYRINA; NEUBAUER, 2011).

A solubilidade do oxigênio no meio é muito baixa (da ordem de 7 mg L⁻¹) e com o aumento da concentração de células durante o crescimento a solubilidade é reduzida ainda mais (BHATTACHARYA; DUBEY, 1997). A capacidade limitada de transferência de oxigênio em CADC pode ser resolvida pelo uso de vetores de oxigênio (solventes nos quais o O₂ é mais solúvel do que em água), por exemplo, n-dodecano, o que aumenta a taxa de transferência de oxigênio, sem efeitos tóxicos para as células (JUNKER et al., 1990; WEI; LIU, 1998). O n-dodecano foi testado como vetor de oxigênio e incrementou o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em cultivos celulares (ROLS et al., 1990; WEI; LIU, 1998). Ainda assim, deve-se ter em conta que o oxigênio não influencia apenas o crescimento das células, mas também tem efeito sobre a expressão do gene, influenciando o estado oxidativo de muitas enzimas (DE MARÉ et al., 2005).

2.4.2. Fatores que influenciam a expressão de ASNase

Deve-se considerar que a síntese de proteínas recombinantes em *E. coli*, como a ASNase, começa após a indução com indutor adequado (ÅKESSON et al., 2001; GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012). O uso de IPTG como indutor de produção de proteínas em *E. coli* recombinante foi avaliado em vários estudos (LECINA et al., 2013). A indução com IPTG aparece como causadora de uma variedade de respostas ao estresse na célula e, desse modo, pode levar inclusive à perda do plasmídeo que contém o gene recombinante de interesse (KOSINSKI; BAILEY, 1991; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Inclusive, a degradação proteolítica de proteínas heterólogas pode ser influenciada pelos níveis de indução com IPTG; e sua degradação pode aumentar ou diminuir conforme os níveis de IPTG (KOSINSKI; BAILEY, 1991).

O tempo pós-indução tem que ser o mínimo para evitar degradação e garantir a obtenção de uma enzima de alta qualidade, pois o estado fisiológico do cultivo pode afetar a resposta e eficiência metabólica. De acordo com vários

estudos, a super expressão de proteínas provoca a redução da produção de biomassa, devido à competição desigual pelo aparelho de tradução (ROZKOV et al., 2004). Se o início acontece na metade da fase exponencial de crescimento, as células podem fornecer energia e precursores metabólicos para a síntese proteica (máxima capacidade metabólica). Contudo, se a indução começa no final da fase exponencial ou na fase estacionária de crescimento, terá uma maior densidade celular, mas o estado das células é desfavorável (CURLLESS; POPE; TSAI, 1990; NEUBAUER et al., 1992).

A super expressão de proteínas recombinantes pode ser prejudicial para a célula ou simplesmente a proteína fica compartimentada em corpos de inclusão (VENTURA; VILLAVERDE, 2006). Em geral, pode-se melhorar a expressão e solubilidade da proteína, controlando as condições de expressão, por exemplo, a temperatura durante a pós-indução (VASINA; BANEYX, 1997). Altas temperaturas podem favorecer a reação de agregação proteica devido à forte dependência das interações hidrofóbicas com a temperatura, determinante da reação de agregação (KIEFHABER et al., 1991).

2.5. Secreção extracelular de ASNase

Segundo Lee (1996), *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado para produção de proteínas, principalmente porque é um sistema bastante estudado e muito bem caracterizado. A grande desvantagem da *E. coli* é que muitas vezes em um processo de expressão citoplasmática há dificuldade em obter a proteína em sua correta conformação original (SWARTZ, 2001).

A exportação para o espaço periplasmático da proteína recombinante oferece várias vantagens em relação à produção no citoplasma, proteólise reduzida e facilitar o dobramento correto das proteínas, pois o potencial redox é mais favorável no espaço periplasmático. Além disso, as células não precisam ser rompidas para purificar a proteína desejada, levando à redução no número de passos no processo de purificação (CHOI; LEE, 2004; JONASSON et al., 2002).

Caminhos eficientes para translocação através da membrana externa estão ausentes, embora algumas proteínas exportadas para o periplasma são

liberadas para o meio extracelular. Transporte passivo através da membrana externa pode ser estimulado pela desestabilização externa ou interna dos componentes estruturais da *E. coli*. Desestabilização é conseguida por meio de proteínas de lise a partir do interior da célula, utilizando cepas com falta de componentes estruturais da membrana ou pela permeabilização dirigida a partir do exterior das células (mecânica, enzimática ou quimicamente) (SHOKRI et al., 2003).

Foi reportado o uso de glicina na permeabilização da membrana celular de *E. coli*, com altas porcentagens de secreção ao meio extracelular (ARIGA et al., 1989; IKURA, 1986; LI et al., 2014). O mecanismo de ação da glicina ocorre ao nível das pontes peptídicas da membrana de peptidoglicano devido à substituição da D-alanina pela L-glicina (HAMMES; SCHLEIFER; KANDLER, 1973). No entanto, Kaderbhai e colaboradores (1997) mostraram que concentrações de 1,0 % e 1,5 % (w/v) diminuíram o crescimento celular em 20 e 50%, respectivamente.

Por outro lado, o uso de n-dodecano também poderia causar permeabilização da membrana celular pela desorganização da membrana celular externa, porém o efeito seria menor em relação a outros compostos da mesma classe (como o hexano) devido à maior massa molar do n-dodecano (BANSAL-MUTALIK; GAIKAR, 2003; DE LEÓN ET AL., 2003).

Neste sentido este projeto de Mestrado abrangeu a avaliação de estratégias de indução para aumentar o rendimento na expressão e exportação da ASNase para o meio extracelular. Para isto, foram avaliados os seguintes parâmetros: tempo de início e final de indução, concentração de glicina e n-dodecano, temperatura durante a pós-indução e concentração do indutor.

2.6. Liberação de ASNase de células *E. coli* BL21 (DE3)

Para avaliar a influência na expressão intracelular da ASNase dos fatores estudados foi necessário o uso de uma metodologia padronizada de liberação de ASNase desde a *E. coli* BL21 (DE3).

Antes de utilizar uma metodologia de liberação da ASNase, considerou-se o seguinte: (1) as bactérias Gram-negativas (*E. coli*), têm envoltório celular constituído por três camadas (Figura 6), a membrana celular interna (contendo proteínas e lipídios polares), uma fina parede celular de peptidoglicanos, e uma membrana externa (contendo lipopolissacarídeos, proteínas e lipídios) (BAYER; LEIVE, 1977; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010); (2) A enzima ASNase é expressa no citoplasma, depois ela é transloucada para o espaço periplasmático, através da membrana interna (possui uma sequência de sinais para translocação) e, finalmente, completa seu processo de maturação.

Figura 6. Estrutura do envoltório celular de bactéria Gram-negativa. IMP, proteína integral de membrana; LP, lipoproteína; LPS, Lipopolissacarídeos; OMP, proteína de membrana externa. Fonte: Silhavy et. al (2010)

Na liberação das proteínas intracelulares é possível utilizar, métodos com alta eficiência de liberação, como o rompimento celular, o qual é classificado em mecânicos (por exemplo, rompimento pelo uso de pérolas de vidro) e não mecânicos (uso de enzimas ou detergentes para lise celular) (HARRISON, 1991). O rompimento mecânico em bancada pelo uso de pérolas de vidro é um procedimento demorado e permite analisar apenas uma amostra

por vez. No entanto, seu estudo foi considerado a ponto de usá-lo como referência para comparação com o método de choque osmótico.

O método de rompimento de células pelo uso de pérolas de vidro foi estudado por muitos pesquisadores (KULA; SCHIITTE, 1987; RAMANAN; LING; ARIFF, 2008), sendo aplicável para a pequena escala. Sendo que este método gera calor pela colisão das pérolas e detritos celulares (HARRISON, 1991), sendo obrigatório manter a temperatura do sistema de rompimento abaixo de 10 °C. O rompimento por liberar proteases obrigou o uso do Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), inibidor de serina-proteases e de algumas cisteína proteases (não inibe metaloprotease, a maioria das tiol proteases e aspartil proteases) (ALONSO et al., 1996; JAMES, 1978).

O método do choque osmótico sem rompimento celular é um procedimento que permite permeabilizar a membrana celular externa, através de diferentes estratégias (uso de EDTA, por exemplo) (NEU; HEPPEL, 1965; NOSSAL; HEPPEL, 1966). Este método envolve duas etapas; na primeira, as células são submetidas à desestabilização da membrana celular externa pela presença de ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA (quelação de cátions bivalentes responsáveis pela estabilização dos lipopolissacarídeos, LPS) (HAMILTON-MILLER, 1966). Nesta primeira etapa não ocorre liberação da ASNase devido à hipertonicidade do meio (sacarose 20%). Na segunda etapa (com células permeabilizadas), ocorre aumento do volume celular, devido à troca do meio hipertônico para meio hipotônico com cátions Mg^{+2} (os quais estabilizam a membrana celular externa) e permite a liberação da ASNase para fora da célula (LEIVE, 1974; VAN ALPHEN et al., 1978).

No presente trabalho avaliou-se a porcentagem de liberação de ASNase pelo método do choque osmótico em relação ao método de rompimento celular, e dessa forma estabelecer um protocolo padronizado para a liberação de ASNase recombinante.

3. OBJETIVO GERAL

Estabelecer, em agitador orbital e biorreator de 3 L, os parâmetros do cultivo em sistema descontínuo da bactéria *E. coli* BL21 (DE3), visando à produção de L-asparaginase tipo II recombinante.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se as condições iniciais do cultivo em agitador orbital: concentração inicial e tempo de crescimento do inóculo influenciam na obtenção de biomassa.
- Avaliar a repressão do acetato no crescimento celular e expressão de ASNase em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conduzidos em agitador orbital.
- Avaliar o efeito do controle do pH no crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital.
- Avaliar o perfil de desempenho da liberação de ASNase para os métodos de: rompimento celular pelo uso de pérolas de vidro e choque osmótico.
- Avaliar a repressão do crescimento celular e síntese de L-asparaginase II em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conduzidos em agitador orbital, usando diferentes concentrações de glicose ou glicerol como fonte de carbono.
- Avaliar a influência do início da indução da expressão de ASNase em agitador orbital, na produtividade de expressão da ASNase.
- Análise da composição do meio de cultura requerida para cultivos de alta densidade celular, baseado na composição elementar da *E. coli* BL21 (DE3).
- Avaliar a concentração necessária de indutor em relação à biomassa, em agitador orbital, na expressão da ASNase.
- Avaliar a influência da glicina e n-dodecano na permeabilização celular da *E. coli* BL21 (DE3) para secreção extracelular da ASNase, em cultivos conduzidos em agitador orbital.

- Avaliar a temperatura de pós-indução (25 ou 37°C) e o tempo final da indução, em agitador orbital, com vistas a melhorar a produtividade de ASNase.
- Avaliar o crescimento celular da bactéria *E. coli* BL21 (DE3), pelo uso do meio de cultura modificado nas etapas anteriores, em sistema descontínuo (biorreator de 3 L) e traçar o perfil do crescimento celular e do consumo de substrato (glicose).
- Avaliar a fase da expressão da ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) crescida em sistema descontínuo (biorreator de 3 L), nas condições de crescimento e indução estabelecidas nos estudos prévios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo:

A *E. coli* BL21 (DE3) com vetor de expressão pET-15b (mais informação no item 2.3.2 e a Figura 4), possuindo gene de códons otimizados para expressão de ASNase de *E. coli* (GenBank KY305877), uma sequência sinal de exportação para o espaço periplasmático e gene de resistência à ampicilina como marcador seletivo, foi cedida pela Prof^a. Dra. Gisele Monteiro de Souza do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2. Meio de cultivo

Foi usado o meio de cultivo Luria Bertani, LB (BD Company, Maryland, USA) como meio de cultivo base. Devido à mudança na composição do meio ao longo do trabalho, por questões práticas, o meio foi nomeado de diferentes formas, como descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Composição dos meios de cultivo

Meio de cultivo	Composição
Meio LB*	Tryptona (10 g L ⁻¹), extrato de levedura (5 g L ⁻¹) e NaCl (10 g L ⁻¹)
Meio LB tamponado	Meio LB em tampão fosfato (K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄), 0,1M e pH 7,0
Meio LB modificado	Meio LB tamponado com adição de glicose (5 g L ⁻¹) e sais de metais (0,5 g L ⁻¹ de MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,05 g L ⁻¹ CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,1 mg L ⁻¹ de H ₃ BO ₄ ; 0,1 mg L ⁻¹ de CoCl ₂ .6H ₂ O; 25 mg L ⁻¹ de ZnSO ₄ .7H ₂ O; 4 mg L ⁻¹ de MnCl ₂ .4H ₂ O; 0,1 mg L ⁻¹ de NaMoO ₄ .2H ₂ O; 1,8 mg L ⁻¹ de CuSO ₄ .5H ₂ O; 20 mg L ⁻¹ de FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,1 mg L ⁻¹ de NiSO ₄ .6H ₂ O)
Meio LB modificado para permeabilização celular	Meio LB modificado com adição de glicina (0,8 % w/v) e n-dodecano (6 % v/v)

* LB: Luria Bertani

4.3. Métodos e protocolos gerais

4.3.1. Preparo do estoque de células da *E. coli* BL21 (DE3)

O micro-organismo foi cultivado em placa de ágar Luria Bertani contendo: triptona (10 g L⁻¹), extrato de levedura (5 g L⁻¹), NaCl (10 g L⁻¹) e ágar 1,5 % w/v, a pH 7,0 e suplementado com ampicilina (100 µg mL⁻¹); incubado à temperatura de 30°C por 24 h. Tomam-se cinco colônias isoladas da placa de

Petri e inoculam-se em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25mL de meio Luria Bertani, LB; o qual foi incubado a 37°C e 250 rpm durante 8 h em agitador orbital Excella® E24 (New Brunswick, Hamburgo, Alemanha). Amostras do micro-organismo foram tomadas e misturadas com glicerol para uma concentração final de 15 % (v/v), sob condições estéreis e armazenadas a – 80°C (estoque de células).

4.3.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de 0,25 mL do estoque de células em frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL de meio LB (relação volume de meio: volume do frasco = 1:10) suplementado com ampicilina (100 µg mL⁻¹), pH 7,0; incubado em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm durante 12 h.

4.3.3. Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3)

O cultivo foi realizado em frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL de meio de cultivo desejado (relação volume de meio: volume do frasco = 1:10) suplementado com ampicilina (100 µg mL⁻¹) a pH 7,0; foi transferido o volume de inóculo (ver item 4.3.2) para dar a densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) inicial de 0,1. O cultivo foi incubado a 37°C e 250 rpm em agitador orbital.

4.3.4. Cultivos para expressão da ASNase

O cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) foi preparado de acordo ao item 4.3.3 e crescido durante 3 h para iniciar a indução. Nesse momento foi adicionado IPTG (indutor da expressão) para concentração final de 1 mM. O tempo fase de pós-indução foi de 3 h a 37 °C e 250 rpm. Ao final desse período, as células foram colhidas por centrifugação (10000 g, 4 °C e 5 min), lavadas em solução NaCl 0,85 % (w/v) a 4 °C e centrifugadas novamente (10000 g, 4 °C e 5 min), a partir destas células obtidas foram determinados os níveis de expressão intracelular da ASNase, prévio uso de protocolos de liberação (ver item 4.5).

4.4. Determinações analíticas

4.4.1. Medição da densidade celular

A densidade celular foi estimada utilizando densidade ótica por espalhamento da luz a 600 nm (DO₆₀₀), usando espectrofotômetro UV/VIS

(Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). As células foram diluídas em densidades ópticas abaixo de 1,0 - com solução de NaCl 0,85 % w/v.

4.4.2. Determinação da concentração celular

A biomassa (X) foi determinada em relação à massa celular seca pelo método de secagem em estufa ou membrana.

4.4.3. Massa seca em estufa

Tubo tipo Falcon foi lavado com água destilada e secado em estufa a 70 °C por 24 h. A seguir, o tubo foi resfriado em dessecador. Uma vez frio, foi pesado em balança analítica (massa “A”). Uma alíquota (volume inicial) foi centrifugada (10 min a 10000 g) no tubo Falcon previamente frio e tarado, para colher as células. Foi desprezado o sobrenadante. Foi adicionada água destilada (mesmo volume inicial) e novamente centrifugada (Desprezar o sobrenadante). O tubo foi colocado para secar em estufa a 70 °C por 24 h. O tubo foi colocado em dessecador. Uma vez à temperatura ambiente, o tubo foi pesado em balança analítica (massa “B”). Determinar a massa celular seca, por diferença das massas “A” e “B” (considerar o volume inicial), e o resultado foi expresso em termos de g L⁻¹.

4.4.4. Massa seca em membrana

Uma alíquota de 5,0 mL da amostra foi filtrada em membrana de 0,22 µm (previamente seco e tarado). A membrana foi lavada, cuidadosamente sem ter perda de células com 5,0 mL de água destilada, através de uma nova filtração. Finalmente a membrana foi secada usando balança determinadora de umidade (Shimadzu modelo MOC 63). Calcular a massa celular seca da suspensão de acordo com a Equação 2:

$$X (g L^{-1}) = \frac{(m_f - m_o)}{5} \cdot 1000 \quad (\text{Equação 2})$$

m_f : Massa da membrana após a secagem (g)

m_o : Massa inicial da membrana (g)

4.4.5. Determinação da viabilidade celular em relação à biomassa

A partir de 1 mL do cultivo foram feitas diluições sucessivas utilizando como diluente cloreto de sódio 0,85 % (diluições desde 10^{-3} até 10^{-8}). 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em placas de Petri (90x15 mm) contendo 25 mL de meio LB ágar suplementado com ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), pelo método de espalhamento em superfície, em duplicatas. As placas foram levadas à estufa em 30°C por 24 h. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis. Após esse período, as colônias que cresceram no LB ágar, foram contadas. Por razões estatísticas, a contagem das unidades formadoras de colônias, cfu (do inglês *colony forming units*) foi realizada nas diluições que apresentaram condições favoráveis de leitura (30-300 colônias) e expressas em cfu mL^{-1} (ver equação 3).

$$\text{Número de cfu mL}^{-1} = \frac{(N \times 10^n)}{(v)} \quad (\text{Equação 3})$$

N: número de colônias na placa

10^n : fator de diluição da placa

v: volume inoculado na placa (mL)

O valor calculado pela Equação 3 foi dividido pelo valor da biomassa desta amostra, para finalmente obter uma relação de cfu por mg de massa celular seca da amostra.

4.4.6. Atividade enzimática

Foi utilizada a técnica de Nesslerização e expressa como IU mL^{-1} (IMADA et al., 1973). Na primeira etapa (Tabela 7), o volume de 0,1 mL da amostra foi incubado a 37°C por 30 min em 1 mL de Tris (50 mM e pH 8,6) com 0,1 mL de L-asparagina (189 mM) e 0,9 mL de água ultrapura. A reação foi interrompida com adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M. Os tubos foram agitados por inversão e centrifugados a 10000 g por 5 min a 4°C para clarificação (separação de sólidos insolúveis).

Tabela 7. Etapa 1 do método Nessler para determinar atividade enzimática da L-Asparaginase II

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Branco Padrão	Branco amostra	Amostra
-Tampão Tris-HCl	1	1	1	1	1	1
-Sulf. amônio	0,25	0,5	1	-	-	-
-Asparagina	-	-	-	-	0,1	0,1
-Água ultrapura	0,85	0,6	0,1	1,1	0,9	0,9
-Amostra	-	-	-	-	-	0,1
Incubar a 37°C por 30 min						
-TCA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
-Amostra	-	-	-	-	0,1	-

Depois, na segunda etapa ou etapa de coloração (Tabela 8), 0,2 mL de sobrenadante da etapa 1, 4,3 mL de água ultrapura e 0,5 mL de reagente Nessler foram misturados por inversão durante 1 min e foram medidos em leitora de microplacas a 436 nm. Para elaborar a curva padrão, o volume de L-asparagina foi trocado com diferentes volumes (0,25; 0,50 e 1,0 mL) de solução de sulfato de amônio (6 mM) e completadas com água ultrapura até 2,2 mL.

Tabela 8. Segunda etapa do método Nessler para determinar atividade enzimática da L-asparaginase II

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Branco Padrão	Branco amostra	Amostra
-Água ultrapura	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
-Sobrenadante da etapa 1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
-Reagente de Nessler	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

4.4.7. Quantificação de Proteínas Totais

Foi usado o Kit de ácido bicinconínico *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). A concentração de proteínas totais pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (SMITH et al., 1985), 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, que absorve fortemente a 562 nm. Foi utilizado como

padrão soro albumina bovino (BSA) em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹). A dosagem de proteínas totais foi expressa em mg mL⁻¹.

4.4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras foram analisadas pela técnica de SDS-PAGE. Amostras de 20 µL foram aplicadas em géis de poliacrilamida 12 % (10 x 10,5 cm x 0,75 mm de espessura) em condições redutoras de acordo com a metodologia de Laemmli (1970), onde foi feita a corrida eletroforética aplicando uma diferença de potencial de 120 V por, aproximadamente, 1 h e 30 min em sistema vertical Mini-Protean Tetra Cell (BIORAD, Califórnia, USA). Foram usados marcadores de proteínas de diferentes massas molares (Precision Plus Protein, BIORAD). Os géis foram corados com Coomassie ou prata, para visualização das bandas das proteínas.

4.4.9. Determinação de glicose.

A glicose, foi dosada pelo método enzimático de glicose-oxidase (THOMAS et al., 1968), pelo uso do *Kit* Glicose Bioliquid (Laborclin, Paraná, Brasil). Baseia-se na oxidação da glicose catalisada pela glicose-oxidase, de acordo com a seguinte reação:

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formado reage com a 4-aminofenazona e hidroxibenzoato presentes no meio, sob a ação da peroxidase, formando antipirilquinonimina, cuja intensidade de cor vermelha é proporcional à concentração de glicose no meio. O comprimento de onda usado foi 505 nm. Foi preparada uma curva padrão de glicose desde 0,1– 2,0 g L⁻¹.

4.4.10. Determinação de glicerol

O glicerol foi determinado pelo uso do kit Triglicéridos Liquiform (Labtest, Minas Gerais, Brasil). Para determinação do glicerol, de acordo ao manual do fabricante, ocorrem as seguintes reações:

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração do glicerol na amostra. O comprimento de onda usado foi 505 nm. Foi preparada uma curva padrão de glicerol desde 0,25– 2,0 g L⁻¹

4.4.11. Determinação de acetato.

A concentração de acetato foi determinada pelo kit enzimático comercial *Acetate Colorimetric Assay* (Sigma-Aldrich) de acordo com o protocolo do fornecedor. O acetato em presença de enzimas é convertido para um intermediário, o qual reage, com outros componentes do Kit, formando um composto colorido com absorbância no comprimento de onda de 450 nm. Foi preparada uma curva padrão de acetato.

4.5. Medição do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, k_La

Os ensaios para determinação de k_La pelo método descrito por Pirt et al (1975), foi executado mediante o uso de um eletrodo específico para medir oxigênio em meio líquido (InPro 6800 da Mettler Toledo, Ohio, USA). Foi borbulhado nitrogênio em 2 L de líquido contido no biorreator de 3 L (Bioflo 115 da New Brunswick) de modo a remover todo o oxigênio dissolvido, até que a sonda polarográfica indicasse zero. A seguir, iniciou-se a aeração e a agitação do meio líquido, nas condições pretendidas. Foram registrados os valores do sinal da sonda até o valor 100% (sonda previamente calibrada), ou seja, até atingir a saturação.

Durante o período de aeração a concentração de oxigênio dissolvido (C) varia em função do tempo e pode ser descrito pela Equação 4.

$$\frac{dC}{dt} = k_La \cdot (C_s - C) \quad (\text{Equação 4})$$

Que integrando permite obter a Equação 5.

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right) = -k_L a \cdot t \quad (\text{Equação 5})$$

Onde C_s é a concentração de saturação de oxigénio dissolvido (mg L^{-1}), C é o oxigénio dissolvido (mg L^{-1}) e $k_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio.

O valor do $k_L a$ para a condição desejada foi determinada pela relação linear do $\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right)$ em função do tempo (h^{-1}).

4.6. Preparo para obtenção da curva de crescimento

Na construção da curva de crescimento em agitador orbital, por cada ponto da curva, foram utilizados cultivos independentes crescidos nas condições requeridas. O crescimento celular foi monitorado pela medição da densidade ótica a 600 nm e/ou biomassa (X , expresso em g L^{-1}). Foi usado um fator de conversão de DO_{600} para g L^{-1} .

4.7. Estabelecimento da curva de biomassa em função da DO_{600}

Foram obtidas células *E. coli* BL21 (DE3), a partir de cultivos em agitador orbital de acordo ao item 4.3.3 em meio LB durante 4 h. As células foram colhidas e centrifugadas a 10000 g por 10 min a temperatura ambiente e suspensas em 10 mL de meio LB, sendo esta suspensão celular inicial medida a DO_{600} (foi feita diluição para leitura na faixa de 0,05 até 1,0). Esta suspensão inicial de células foi utilizada para o preparo de diferentes diluições em balão volumétrico. Foram determinadas DO_{600} e biomassa das respectivas diluições, a biomassa foi determinada pelo método de secagem em estufa. Finalmente, foram correlacionados biomassa em função da DO_{600} e obteve-se a reta correspondente. A curva foi validada pela análise de variância (ANOVA) e coeficiente de determinação (R^2).

4.8. Estudo da liberação de ASNase

4.8.1. Método de Rompimento celular

Foi avaliado o desempenho do método de rompimento celular pelo uso de pérolas de vidro ($\varnothing$ 0,17 mm de diâmetro e massa específica de $2,5 \text{ g cm}^{-3}$) com ciclos de agitação de 3000 rpm (máxima capacidade do agitador) em agitador tipo vórtice (Vixar VM 3000, Bioclassi, SC, Brasil) e resfriamento em banho gelado, para estabelecer um protocolo padronizado de liberação de ASNase desde células de *E. coli* BL21 (DE3).

Figura 7. Esquema do sistema montado para rompimento de células de *E. coli* BL21 (DE3) com pérolas de vidro. Fonte: produção do próprio autor.

A seguir são detalhadas as condições do método. As células de *E. coli* BL21 (DE3) foram obtidas de acordo com o item 4.3.4. Foram suspensas a 4°C para duas diferentes concentrações (50 ou 100 g L^{-1}), em tampão Tris-HCl 20 mM , $\text{pH } 8,0$. PMSF foi adicionado para concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, imediatamente antes de iniciar o rompimento celular para inibir ação das proteases. A relação dos volumes entre a suspensão celular e as pérolas de vidro foi $10:3$, ou seja, 1 mL de suspensão celular e 750 mg de pérolas de vidro ($0,3 \text{ mL}$ de acordo com a massa específica das pérolas). Foi mantido 35% de espaço vazio no tubo de polipropileno Eppendorf (2 mL de volume; $\varnothing$ 11 mm) para facilitar a formação do vórtice e conseguir o rompimento celular, como indica a Figura 7.

Antes de começar o processo de rompimento, as amostras foram resfriadas para aproximadamente 0°C em banho gelado (uso de solução

congelada de cloreto de sódio 33%, w/w) com capacidade para diminuir a temperatura até -21°C . O esquema do banho gelado e a forma de utilizá-lo é mostrado na Figura 8.

Figura 8. Banho gelado a partir de solução de cloreto de sódio 33% (w/w), utilizado para resfriamento do Eppendorf após agitação em vórtice durante o rompimento celular com pérolas de vidro. Acetona como líquido de arrefecimento. Fonte: produção do próprio autor

Os experimentos foram desenvolvidos em duas etapas: (1) Avaliação da temperatura de desempenho do rompimento; (2) Avaliação do perfil de rompimento celular para liberação da ASNase.

– Avaliação da temperatura de desempenho do rompimento: Foi monitorada a temperatura durante o desempenho do método usando duas concentrações de células (50 e 100 g L^{-1}), com diferentes ciclos de agitação/resfriamento ($15\text{s}/30\text{s}$, $30\text{s}/30\text{s}$ e $60\text{s}/30\text{s}$) para avaliar a temperatura máxima no momento do rompimento celular.

– Avaliação do perfil de rompimento celular: Tomando em conta os resultados da avaliação da temperatura, foi preparada uma curva de rompimento. Foram monitorados os seguintes parâmetros: 1) densidade ótica a 600 nm (DO_{600}) da suspensão celular após rompimento; 2) concentração de proteínas totais; 3) e atividade da ASNase. Para a determinação de proteínas totais e atividade de ASNase, após os ciclos de rompimento celular, as amostras foram centrifugadas ($15\,000\text{ g}$, 20 min e 4°C), para eliminar os

detritos celulares, e preparadas diluições para não sair da faixa de linearidade dos métodos utilizados. O perfil de proteínas foi avaliado em SDS-PAGE.

4.8.2. Método de choque osmótico

Foi avaliado a liberação da ASNase de células *E. coli* BL21 (DE3) pelo método do choque osmótico. As células obtidas (item 4.3.4) foram suspendidas em tampão Tris-HCl 33 mM (pH 7,0), perfazendo a concentração final de 50 mg mL⁻¹. O método do choque osmótico de referência (NEU; HEPPEL, 1965) envolve duas etapas: (1) 1 mL da suspensão celular foi dispersada em 3 mL da solução I para choque osmótico (sacarose 0,5M; EDTA 1,0 mM; tampão Tris-HCl 33 mM, pH 7,2), agitando levemente por 10 min. A seguir, centrifugou-se (10000 g por 5 min), mantendo a temperatura a 4°C; (2) as células foram suspensas em 4 mL de solução II para choque osmótico (0,5 mM MgCl₂); esta suspensão foi agitada levemente durante 10 min. Após essa etapa, foi centrifugada (10000 g, 15 min a 4 °C). Em todo o processo do choque osmótico a temperatura foi mantida abaixo de 10 °C.

Finalmente foi analisado o sobrenadante da segunda etapa, para determinar a atividade enzimática pelo método de Nessler e proteínas totais pelo método de BCA. O perfil de proteínas foi avaliado em SDS-PAGE.

4.9. Estudos de cultivos em agitador orbital

4.9.1. Avaliação do tamanho e idade do inóculo no cultivo

Com o intuito de determinar o melhor estado metabólico das células para iniciar o cultivo foi avaliada a influência do tamanho inicial e idade do inóculo na produção de biomassa de cultivos crescidos durante 8 h. Para isso, cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB foram preparados de maneira similar ao item 4.3.3, porém, a partir de inóculos crescidos durante 8, 10 e 12 h; as células foram inoculadas para DO₆₀₀ inicial de 0,1; 0,3 ou 0,5. Após 8 h de crescimento desses cultivos, foram determinadas as biomassas pelo método de secagem em estufa. Foi feito um planejamento fatorial completo (Tabela 9) com dois fatores e três níveis, para determinar o gráfico de contorno e a interação dos fatores na resposta.

Tabela 9. Matriz de experimentos de um delineamento fatorial completo 3^2 , valores codificados (fatores: X1 e X2; níveis: 1, 2 e 3), valores reais e resposta medida.

Matriz codificada		Valores reais	
X1	X2	DO ₆₀₀	Tempo (h)
2	2	0,3	10
3	1	0,5	8
2	1	0,3	8
1	1	0,1	8
3	2	0,5	10
3	3	0,5	12
1	2	0,1	10
2	3	0,3	12
1	3	0,1	12

Baseados nos resultados do planejamento fatorial, foram feitas curvas de crescimento para cultivos iniciados com inóculo de diferente idade.

4.9.2. Avaliação do efeito da concentração de acetato

Para avaliar a repressão do acetato no crescimento celular e expressão da ASNase em cultivos conduzidos em agitador orbital, foram preparados cultivos crescidos em meio LB com adição de acetato de sódio (2, 4, 6, 8, 10 e 15 g L⁻¹) de acordo ao item 4.3.3. A biomassa foi determinada após 12 h de cultivo por método de secagem em estufa. Para avaliar os níveis de expressão foram preparados cultivos de acordo ao item 4.3.4 e foi determinada a produtividade específica por grama de célula para ASNase (expressa como IU g_{cel}⁻¹), após liberação da ASNase pelo método de choque osmótico. Para confirmar a presença da ASNase foi feito um SDS-PAGE. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.3. Avaliação do controle o de pH no crescimento celular

Foi avaliada a variação do pH durante o crescimento da *E. coli* BL21 (DE) em meio LB e meio LB tamponado (tampão fosfato K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0,1M e pH 7,0) e adição de glicose ou glicerol, como mostrado na Tabela 10. Foi monitorado a biomassa, pH e, se possível, a concentração da fonte de

carbono, durante 12 h de crescimento do cultivo. Cultivos foram preparados de acordo com o item 4.3.3. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 10. Meio de cultivos utilizados para avaliar a variação do pH

Meio de cultivo*	Composição
A	Meio LB
B	Meio LB + 1 g L ⁻¹ de glicose
C	Meio LB tamponado+ 1 g L ⁻¹ de glicose
D	Meio LB + 1 g L ⁻¹ de glicerol
E	Meio LB tamponado + 1 g L ⁻¹ de glicerol

* O glicerol e a glicose foram esterilizados separados e adicionados ao meio LB antes de começar o cultivo.

Para avaliar a influência do controle de pH no crescimento celular foram determinadas as biomassas (método da secagem em estufa) após 12 h de crescimento dos cultivos crescidos em meio LB e LB tamponado, com adição de glicose ou glicerol em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 g L⁻¹), de acordo ao item 4.3.3. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4. Avaliação da fonte de carbono no crescimento celular

Foram avaliados o crescimento celular usando meio LB tamponado com adição de glicose ou glicerol, como fonte de carbono, em diferentes concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 7,5 g L⁻¹). Foram monitorados: concentração de glicose ou glicerol, pH do cultivo e biomassa (método de secagem em membrana). Foi determinada a concentração de acetato nos cultivos após consumo total da fonte de carbono (5h) e calculados os parâmetros cinéticos (ver item 4.11) deste processo (velocidade específica de crescimento celular, μ_x ; fator de conversão de substrato em células, $Y_{x/s}$; e tempo de geração, t_g).

4.9.5. Avaliação da fonte de carbono e início da indução na expressão de ASNase

Foram feitos cultivos de acordo ao item 4.3.3 em meio LB tamponado com adição de glicose (2,5 ou 5 g L⁻¹) ou glicerol (5 ou 7,5 g L⁻¹). A indução foi iniciada pela adição de IPTG (1 mM concentração final) em diferentes etapas do crescimento: (1) metade da fase exponencial de crescimento; (2) final da

fase exponencial de crescimento; e, (3) fase estacionária de crescimento (2,5 h do final da fase exponencial de crescimento). Após 3 h de pós-indução, foram determinadas para cada cultivo: biomassa, atividade ASNase por grama de célula, atividade ASNase no meio extracelular (sobrenadante livre de células) e produtividade volumétrica da ASNase. Os experimentos foram feitos em triplicata e comparados com resultados de cultivos em meio LB tamponado sem adição de fonte de carbono.

4.9.6. Análise do conteúdo de metais no meio de cultivo

Foi feita análise elementar da composição de metais (para K, Mg, Na, S, P, Ca, Cu, Fe, Mn, Zn, Co e Mo) do meio de cultivo e das células de *E. coli* BL21 (DE3), para avaliar a adição desses componentes (sais de metais) no meio LB, prevendo obter 25 g L⁻¹ de biomassa em cultivos em sistema descontínuo. A composição de metais das células *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB, foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo uso de espectrômetro ótico de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos. Foram utilizadas as fórmulas químicas dos sais de metais disponíveis no nosso laboratório e compatíveis com nosso estudo (não foi considerado sais de amônio, devido à interferência com o método Nessler). Os dados foram processados e calculados pelo uso do editor de planilhas Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA). Finalmente foi avaliada experimentalmente a adição de sais de metais no meio LB tamponado e com glicose (2,5; 5,0; 7,5; 10 e 15 g L⁻¹). Foram preparados cultivos (em triplicata) de acordo ao item 4.3.3 e após 12 h de crescimento foram determinadas as biomassas e comparadas com os cultivos sem adição desses sais de metais.

4.9.7. Avaliação da relação de indutor e a concentração celular

Foram preparados cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) de acordo ao item 4.3.3 em meio LB modificado (adição de tampão fosfato 0,1M pH 7,0; 5 g L⁻¹ de glicose e sais de metais) até atingir o final da fase exponencial de crescimento (4h) e induzidos pela adição de IPTG para diferentes concentrações (5; 10; 25; 50; 100; 150 e 200 µM) durante 4 h, com intuito de determinar a concentração ótima de IPTG por cada grama de célula para induzir a expressão da ASNase.

Foi determinada a produtividade específica de atividade ASNase por grama de célula (e SDS-PAGE).

4.9.8. Avaliação da permeabilização celular para secreção da enzima celular

Para avaliar a influência da concentração de glicina (% w/v) e a concentração de n-dodecano (% v/v) na permeabilização celular, foi feito um planejamento composto central com $\alpha=\sqrt{2}$ e cinco repetições no ponto central (Tabela 11), considerando como respostas: atividade de ASNase extracelular a partir do sobrenadante livre de células (EC); atividade ASNase intracelular (IC) obtida após liberação pelo método do choque osmótico; biomassa; e viabilidade celular de acordo ao item 4.4.5.

Tabela 11. Os valores reais e codificados para avaliação da atividade ASNase extracelular e intracelular, biomassa e viabilidade celular em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3), utilizando planejamento fatorial de composição com $\alpha=\sqrt{2}=1,4142$.

Variáveis independentes	Unidade	Níveis				
		- 1,4142	-1	0	+1	+ 1,4142
Glicina	% (w/v)	0	0,35	1,2	2,05	2,4
n-dodecano	% (v/v)	0	1,03	3,5	5,97	7

Os cultivos foram feitos de acordo ao item 4.3.4, usando o meio LB modificado com adição de glicina e/ou n-dodecano, como detalhado na Tabela 11. A glicina e n-dodecano foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm .

4.9.9. Avaliação da temperatura de pós-indução e perfil de expressão da ASNase

Cultivos preparados de acordo ao item 4.3.3 em meio LB modificado para permeabilização celular (adição de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 5 g L⁻¹ de glicose; sais de metais; 0,8% de glicina e 6% de n-dodecano) foram induzidos no final da fase exponencial de crescimento (4 h) com IPTG 0,1 mM. Foram determinadas a atividade ASNase IC (após choque osmótico) e atividade EC (sobrenadante livre de células), biomassa e pH durante a fase de pós-indução

(4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h e 24h). Foi comparado com o perfil de expressão para células não permeabilizadas (meio de cultivo LB modificado sem adição de glicina e n-dodecano) e avaliadas em diferentes temperaturas de pós-indução (25 e 37 °C). Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.10. Estudos de cultivos em biorreator

4.10.1. Avaliação do k_{La} em presença de n-dodecano

Foi avaliada a influência do n-dodecano no coeficiente de transferência de oxigênio, k_{La} . Foi determinado o k_{La} de acordo ao item 4.5 em biorreator de 3 L contendo como líquidos n-dodecano em água (6% v/v) e água, em agitação (400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 rpm) e aeração (1 e 2 vvm). As medições foram feitas em triplicata a 37°C para cada condição.

4.10.2. Avaliação da fase de crescimento

Foi preparado um cultivo em biorreator Bioflo 115 de 3 L com sensor de pH InPro 3030 (Mettler Toledo) e eletrodo específico para medir oxigênio em meio líquido InPro 6800 (Mettler Toledo), contendo 2 L de meio LB modificado para permeabilização celular. Condições de cultivo: 500 rpm de agitação e 1 vvm de aeração ($k_{La} = 90 \text{ h}^{-1}$), a 37 °C. Foi inoculado com 50 mL de inóculo crescido em meio LB por 12 h a 37 °C a 250 rpm, em agitador orbital. Foi acompanhada/monitorada a biomassa, concentração de glicose, pH e oxigênio dissolvido durante 12 h de cultivo.

4.10.3. Avaliação da fase de pós-indução

Foi preparado um cultivo de acordo ao item 4.3.4 e induzido no final da fase exponencial do crescimento (3,5 h) com IPTG para concentração final de 0,1 mM a 37°C. Foram determinadas a atividade ASNase IC (após choque osmótico) e EC (sobrenadante livre de células), biomassa e pH durante a fase de pós-indução (4 h, 12 h, 16 h, 20 h e 24h).

4.11. Cálculos

4.11.1. Porcentagem da recuperação de ASNase (% recup.)

Uma vez padronizada a metodologia de rompimento celular pelo uso de pérolas de vidro, foram comparados protocolos, considerando que o método de rompimento liberou 100% da ASNase. A porcentagem de recuperação pelo método do choque osmótico foi determinada mediante a relação da atividade asparaginase total (IU) atingida pelo rompimento celular e o choque osmótico. O cálculo foi feito de acordo com a Equação 6.

$$\% \text{ recup.} = \left(\frac{\text{IU romp}}{\text{IU choque}} \times 100 \right) \quad (\text{Equação 6})$$

% recup.: porcentagem de recuperação da ASNase

IU romp: Atividade enzimática total após rompimento celular

U choque: Atividade enzimática total após choque osmótico.

4.11.2. Velocidade específica de crescimento celular (μ_x)

Foi estimada μ_x de acordo com a equação linear obtida do logaritmo neperiano da biomassa (X) em um tempo específico em função do tempo (h). A equação que representa o crescimento exponencial de uma população microbiana corresponde à seguinte equação linear:

$$\ln X_t = \ln X_o + \mu_x (t - t_0) \quad (\text{Equação 7})$$

Xt: Biomassa final para um tempo determinado

Xo: Biomassa inicial para um tempo determinado

(t - to): intervalo de tempo

Sendo assim, o valor de μ_x corresponde à inclinação da reta e é expresso em h^{-1} .

4.11.3. Tempo de Geração (t_g)

Definido como o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular, de acordo com a seguinte equação:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_x} = \frac{0,693}{\mu_x} \quad (\text{Equação 8})$$

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

t_g : Tempo de geração (h)

4.11.4. Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$)

Considerando um determinado tempo t de cultivo, os correspondentes valores de X e S podem ser relacionados entre si, pelo uso do fator de conversão definido:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_o}{S_o - S} \quad (\text{Equação 9})$$

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

X : Concentração celular no meio (g massa seca L⁻¹)

S : Concentração de Substrato no meio (g substrato L⁻¹)

X_o : Concentração Celular inicial no meio (g massa seca L⁻¹)

S_o : Concentração de Substrato inicial no meio (g substrato L⁻¹)

4.11.5. Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica determina a concentração de produto (atividade ASNase) acumulada em um volume de cultivo durante um período de tempo. O valor da produtividade volumétrica foi determinado pelo produto da concentração celular atingida (biomassa, X) e a produtividade específica de cada célula (IU por grama de células) durante o tempo de cultivo (Equação 10).

$$Q_p = \frac{q_{p/x} \cdot X}{t} \quad (\text{Equação 10})$$

Q_p : produtividade volumétrica (IU L⁻¹ h⁻¹)

$q_{p/x}$: produtividade específica de células (IU g_{células}⁻¹)

X : biomassa (g L⁻¹)

t : tempo de cultivo (h)

O valor da $q_{p/x}$ foi determinado pela relação da atividade ASNase total e massa de célula (em gramas) do cultivo, expresso como IU g_{cel}⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento da curva de biomassa em função da DO₆₀₀

Na Figura 9 apresenta-se a reta de calibração da absorbância da densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) em função da massa celular seca, (Biomassa, X). A referida figura resultou da análise de 18 pontos (n = 18), referentes a amostras de suspensão celular de *E. coli* BL21 (DE3), em diferentes concentrações, numa faixa de 0,05 até 1,0 de DO₆₀₀. Os resultados foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, no qual foi determinada a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2). A curva foi validada por meio da análise de variância (ANOVA).

Figura 9. Curva de calibração para determinar o crescimento celular. A equação da reta é $y = 1,516x - 0,017$; $R^2 = 0,994$

O coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,994 indicou excelente ajuste do modelo, demonstrando que a equação explica a relação das variáveis. Os dados analíticos foram validados por meio da tabela ANOVA (Tabela 12) que demonstraram regressão linear significativa ($F_{\text{calculado}} = 2694,43 > F_{\text{tabulado}} = 4,49$); no nível de significância de 95 %.

Tabela 12. Resumo do resultado do ANOVA para análise de regressão linear.

Fatores	Graus de liberdade	Soma Quad.	Quadrado Médio	Estat. F	Valor p
Regressão	1	2,079	2,079	2694,43	<0,0001
Erro residual	16	0,012	0,0008		
Total	17	2,092			

A relação biomassa/ DO_{600} foi 0,67 (1 DO_{600} foi equivalente a 0,67 g L⁻¹) de *E. coli* BL21 (DE3) crescida em meio LB. Essa relação foi maior em relação a outros trabalhos relatados, por exemplo, para *E. coli* MG1655O crescida em meio mínimo (biomassa/ DO_{600} = 0,5) (BAIG et al., 2014) ou *E. coli* JM109 crescida em meio mínimo modificado (biomassa/ DO_{600} = 0,36) (REN et al., 2013). Este resultado é produto das diferenças do espalhamento da luz através da amostra (células), as quais são atribuídas ao equipamento usado (espectrofotômetro) e à forma e distribuição no tamanho das células, devido às condições de cultivo do micro-organismo (KOCH, 1970). Além disso, para o uso adequado da relação biomassa/ DO_{600} , considerou-se o fato da homogeneidade de tamanho da população celular durante a fase exponencial (KOCH, 1993). Por conseguinte, a relação 0,67 (biomassa/ DO_{600}) foi utilizada, apenas, para a determinação da biomassa em etapas precoces de crescimento, onde a baixa concentração celular dificulta o uso do método de secagem da biomassa.

5.2. Avaliação do tamanho e idade do inóculo no cultivo

No crescimento bacteriano, uma prolongada fase de latência (fase lag) é considerada como desvantagem devido ao consumo de tempo e nutrientes do meio de cultivo para manutenção das células viáveis. A duração da fase lag é dependente principalmente do tamanho do inóculo e do estado fisiológico das células do inóculo (STANBURY; WHITAKER; HALL, 1999). Além disso, foi reportado que o tamanho (volume do inóculo) e a idade têm influência na produção da biomassa e na expressão de proteína recombinante (LU et al., 2015; ZHANG et al., 2010). Considerando esses pontos, o trabalho avaliou o efeito da concentração inicial do cultivo (0,1; 0,3 e 0,5 de DO_{600} inicial) e o tempo de crescimento do inóculo (8, 10 e 12 h) na obtenção final de biomassa após 8 horas de cultivo pelo uso de um delineamento experimental, como se

mostra na Tabela 13; os resultados foram submetidos a tratamento estatístico em *software* Minitab 16.0 (Minitab Inc., USA)

Tabela 13. Matriz de experimentos do delineamento fatorial completo 3^2 , valores codificados (fatores: X1 e X2; níveis: 1, 2 e 3), valores reais e resposta medida

Matriz codificada		Valores reais		Resposta
X1	X2	DO ₆₀₀	Idade (h)	X (g L ⁻¹)
2	2	0,3	10	2,27
3	1	0,5	8	2,15
2	1	0,3	8	2,22
1	1	0,1	8	2,45
3	2	0,5	10	2,11
3	3	0,5	12	2,04
1	2	0,1	10	2,40
2	3	0,3	12	2,36
1	3	0,1	12	2,34

A Tabela 14 mostra a estimativa dos efeitos principais individuais e de interação. Apenas o efeito estatisticamente significativo, com 95% de confiança ($p < 0,05$), correspondeu à DO₆₀₀ inicial do cultivo na forma Linear (L), sendo os demais sem importância estatística. A Figura 10 corrobora o anteriormente dito, e mostra melhor obtenção da biomassa final (g L⁻¹), quando a DO₆₀₀ para iniciar o cultivo foi 0,1 (equivalente a 0,07 g L⁻¹).

Tabela 14. ANOVA para estimativa dos efeitos principais.

Fonte	gl	SC sec.	SC. Ajust.	CM Ajust.	F	p
Regressão	5	0,1352	0,1352	0,0270	3,95	0,144
Linear	2	0,1353	0,1323	0,0661	9,67	0,049
DO ₆₀₀ inicial (L)	1	0,1314	0,1314	0,1314	19,19	0,022
Idade (L)	1	0,0009	0,0009	0,0009	0,14	0,735
Quadrática	2	0,0028	0,0028	0,0014	0,21	0,820
DO ₆₀₀ inicial (Q)	1	0,0028	0,0028	0,0028	0,42	0,562
Idade (Q)	1	0,00000	0,0000	0,0000	0,00	0,981
Interação	1	0,00000	0,0000	0,0000	0,00	0,988
DO ₆₀₀ inicial x Idade	1	0,00000	0,0000	0,0000	0,00	0,988
Erro residual	3	0,0205	0,0205	0,0068		
Total	8	0,1557				

DO₆₀₀: densidade ótica a 600 nm; L: forma linear; Q: forma quadrática; gl: graus de liberdade; SC sec: soma de quadrados sequenciais; SC Ajust: soma quadrados ajustadas; F: teste Fisher; p: valor p

Figura 10. Efeitos principais para o delineamento experimental 3^2 . Fatores: (a) Concentração inicial do cultivo (DO_{600} : 0,1; 0,3 e 0,5) e (b) Tempo do crescimento do inóculo (8; 10 e 12 h). A resposta correspondeu à concentração celular final ($g\ L^{-1}$) após 5 h de crescimento.

No entanto, considerando que a *E. coli* apresenta acelerado crescimento e atinge rapidamente estado fisiológico estável no meio LB (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007), foram avaliadas as curvas de crescimento para cultivos iniciados a partir de inóculos crescidos durante 5 h ou 12 h, e DO_{600} de 0,1. Como se mostra na Figura 11, o perfil de crescimento foi semelhante entre elas.

Figura 11. Curva de crescimento para *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inóculo células crescidas por 5 h (●) ou 12 h (○). A barra representa o erro para 3 repetições.

Para estes cultivos, o crescimento do micro-organismo foi rápido (5 h para atingir a máxima biomassa) e não se percebe claramente a fase de latência, provavelmente por causa do bom estado fisiológico das células que permitiu adaptação adequada das células ao meio de LB, como observado na Figura 12.

Figura 12. Curva logarítmica do crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inóculo células crescidas por 5 h (●, linha pontilhada) e 12 h (○, linha contínua). A barra representa o erro para 3 repetições.

A partir da curva logarítmica do crescimento (Figura 12) determinou-se que a *E. coli* BL21 (DE3) apresenta um comportamento diáuxico, ou seja, tem duas fases de crescimento acelerado. Este tipo de comportamento é característico do crescimento em meio com duas fontes de carbono. Observou-se o primeiro crescimento acelerado desde 0,5 h até 2,0 h, isto se explica devido ao consumo dos açúcares do meio LB base, menos de 100 μ M de açúcares (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Segue-se, desde 2,5 h até 4,5 h, uma segunda fase de crescimento, devido ao consumo de aminoácidos mais simples; e, a partir das 4,5 h, ocorre a fase estacionária, podendo ser consumidos os aminoácidos mais complexos do meio LB (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Porém, destas duas etapas, a primeira etapa apresenta o maior declive, tendo maior influência no

crescimento. Portanto, foram avaliados os trechos lineares, das curvas de crescimento (Tabela 15), considerando o intervalo de tempo de $0,5 \text{ h} \leq t \leq 2,0 \text{ h}$, com intuito de determinar as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_x) e os seus tempos de geração (t_g).

Tabela 15. Parâmetros cinéticos de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inóculo células crescidas por 5 h ou 12 h.

Idade do inóculo (h)	$\mu_x (\text{h}^{-1})$	$t_g (\text{min})$	$X (\text{g L}^{-1})$
5h	$1,24 \pm 0,04$	$33,5 \pm 0,94$	$2,01 \pm 0,01$
12h	$1,36 \pm 0,04$	$30,5 \pm 0,84$	$2,10 \pm 0,08$

Para ambos os cultivos, os parâmetros cinéticos de crescimento foram parecidos (Tabela 15) (teste t, $p < 0,05$), indicando que as células de *E. coli* BL21 (DE3) têm atividade fisiológica, podendo ser empregadas para iniciar cultivos a partir de inóculos crescidos desde 5 h até 12 h e para DO_{600} inicial de 0,1.

5.3. Estudo da liberação de ASNase

5.3.1. Rompimento por pérolas de vidro

O rompimento celular oferece alto rendimento de liberação de proteínas, mostrando, no entanto, baixa seletividade para proteínas devido a: (A) micronização, os detritos celulares gerados no início do rompimento são reduzidos para partículas mais finas durante prolongados tempos de rompimento; (B) viscosidade, devida à liberação de DNA; e (C) liberação de proteases. Por outra parte, o método mecânico de rompimento celular gera dissipação de calor e provoca elevação da temperatura, pela colisão entre as pérolas e as células (HARRISON, 1991). Esse aumento na temperatura favorece a ação das proteases liberadas, como foi relatado por Peterson (2007). Por tais motivos foi desenvolvido um protocolo de rompimento celular pelo uso de pérolas de vidro; no qual foi determinado o mínimo tempo de rompimento (para prevenir aumento da viscosidade) e mantendo a temperatura abaixo de 10 °C para diminuir a atividade das proteases.

Foi avaliado o uso de três sistemas de resfriamento (banho gelado) (mostrado na Figura 8) no protocolo de rompimento celular com pérolas de vidro; o qual apresenta ciclos de agitação em vórtice seguidos de ciclos de resfriamento. A Figura 13 mostra o efeito dos ciclos de agitação/resfriamento no aumento de temperatura da amostra (suspensão celular) por utilização de diferentes sistemas de resfriamento, com intuito de garantir temperatura abaixo de 10 °C.

Figura 13. Efeito dos ciclos de agitação/resfriamento sobre a temperatura da suspensão durante o rompimento celular de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de pérolas de vidro. (A) ciclos agitação/resfriamento 30s/30s, banho gelado de água (B) ciclos agitação/resfriamento 30s/30s, banho gelado de NaCl 33% w/w (C) ciclos agitação/resfriamento 60s/30s banho gelado de NaCl 33% w/w. Concentração da suspensão de células: 50 mg mL⁻¹ (Δ) e 100 mg mL⁻¹ ($\circ$). Ciclos de agitação a 3000 rpm. Líquido de arrefecimento: etanol (A e B) ou acetona (C). Barra de erro para 3 repetições.

No sistema de resfriamento, pelo uso do banho gelado preparado com água e etanol como líquido de arrefecimento (Figura 13A), o ciclo de agitação/resfriamento de 30s/30s foi ineficiente para resfriar a amostra, devido ao aumento da temperatura acima 10 °C em 2 min (tempo acumulado da agitação). O banho gelado preparado com cloreto de sódio a 33% (Figura 13B e 13C) manteve a temperatura abaixo de 10 °C durante mais tempo; além disso, o uso de acetona como líquido de arrefecimento, permitiu prolongar o tempo de agitação até 15 min sem exceder 10°C, mesmo quando foram feitos ciclos de agitação/resfriamento 60s/30s (Figura 13C).

Foi observado perfil de temperatura diferente influenciado pela concentração da suspensão celular; de acordo com as curvas de temperatura avaliadas para amostras de 50 e 100 mg mL⁻¹; de fato, a amostra de 50 mg mL⁻¹ de células gerou mais calor em comparação com 100 mg mL⁻¹ de suspensão de células (Figura 13B), isto se explica pelo aumento da viscosidade com o aumento da concentração celular, o qual reduz a eficácia da força de cisalhamento (Lovitt et al., 2000). Desta forma, o melhor desempenho, considerando o menor aumento da temperatura por cada ciclo de agitação, foi o ciclo de 60s/30s, usando-se o banho gelado de solução salina 33 % (w/v) e acetona (líquido de arrefecimento) para suspensão celular de 50 mg mL⁻¹.

O tempo ótimo de rompimento celular é o tempo mínimo em que se extraia a atividade enzimática total e a menor concentração de proteínas totais (HUMMEL; KULA, 1989; SCHÜTTE; KULA, 1988). Na curva de rompimento (Figura 14), foi observado comportamento esperado: diminuição da DO₆₀₀ (indicador de diminuição da concentração de células intactas); aumento na concentração de proteína totais e na atividade ASNase (indicador de liberação). A Figura 14 mostra que a partir de 10 minutos, a atividade ASNase e a DO₆₀₀ se mantêm estável. Isto é explicado porque o processo atingiu a disrupção máxima de células intactas com a liberação máxima de ASNase. A concentração de proteínas totais apresentou tendência a aumentar, devido à ruptura dos detritos celulares em partículas mais finas. Pode-se sugerir que tempo ótimo para uma suspensão celular de 50 mg mL⁻¹, de acordo ao número de ciclos (agitação/resfriamento, 60s/30s) foram 10 ciclos.

Figura 14. Perfil de rompimento celular da *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de pérolas de vidro. Ciclos de agitação a 3000 rpm durante 60 s, seguido de ciclo de 30 s de resfriamento em banho gelado de NaCl a 33 % w/w (acetona como líquido de arrefecimento). 50 mg mL⁻¹ de suspensão. Densidade ótica a 600 nm (—●—); Atividade enzimática (--◇--); concentração de proteínas totais (—△—). Barra de erro para 3 repetições.

Note-se que no tempo zero (Figura 14), ou seja, sem rompimento, existe presença de ASNase. Isto pode ser devido ao dano da membrana celular por um mecanismo congelamento/descongelamento (favorecido pela solução NaCl usada no tratamento prévio das células) (CALCOTT; MACLEOD, 1975), o qual permitiu a liberação da ASNase.

O perfil de proteínas liberadas pelo método de rompimento com pérolas de vidro foi observado pela análise SDS-PAGE (Figura 15). As bandas de aproximadamente 35 kDa correspondem à massa molar de uma subunidade da ASNase. No entanto, se observa a presença de grande quantidade de proteínas contaminantes, produto do rompimento das estruturas celulares e liberação de proteínas intracelulares.

Figura 15. Perfil proteico do sobrenadante livre de células e detritos celulares após rompimento celular usando pérolas de vidro. Colunas: (1) sem romper células; (2) - (5) rompimento ciclos 1 - 4, (6) marcador de massa molar (7) - (11) rompimento ciclos 5 - 9, (12) Referência das massas molares (*Precision Plus Protein*, BIORAD).

5.3.2. Liberação de ASNase pelo método de choque osmótico

O periplasma contém apenas sete das 25 conhecidas proteases celulares e compreende apenas 4 % a 8 % da proteína celular total (contaminantes potenciais) (FRENCH; KESHAVARZ-MOORE; WARD, 1996). O fato de desconhecer a eficiência de desempenho do choque osmótico na liberação de ASNase, e as vantagens, em relação à liberação por rompimento mecânico, motivou a avaliação do desempenho do choque osmótico na recuperação ASNase partir de *E. coli*.

O protocolo de referência de choque osmótico (NEU; HEPPEL, 1965) envolve duas etapas; no primeiro, as células são permeabilizadas através de EDTA (quelação de cátions bivalentes responsáveis pela estabilização de LPS) (HAMILTON-MILLER, 1966), a solução contém uma elevada concentração de sacarose (meio hipertônico) para manutenção da pressão osmótica da célula. Na segunda fase, ocorre a substituição do meio hipertônico por uma solução hipotônica, que favorece a liberação de proteínas.

A Tabela 16 mostra os dados de desempenho para os métodos avaliados. A liberação de grandes quantidades de proteínas contaminantes é uma desvantagem na especificidade de liberação no método de disrupção pelo uso de pérolas de vidro. Obteve-se 22 vezes mais concentração de proteínas

totais do que no método de choque osmótico ($0,28 \text{ mg mL}^{-1}$). Esta concentração de proteínas totais diminui a pureza do extrato bruto, levando à menor atividade específica (unidades de atividade de enzima por mg de proteína) (BECKER 1996). Por conseguinte, com o método do choque osmótico, utilizando EDTA $1,0 \text{ mM}$, foi obtida pureza 3,14 vezes maior ($4,33 \pm 0,14 \text{ IU mg}^{-1}$) em relação à ruptura mecânica ($1,38 \pm 0,02 \text{ IU mg}^{-1}$). Por outro lado, a recuperação percentual foi 57,5 %, a qual foi obtida da relação da atividade ASNase total do choque osmótico e da ruptura mecânica.

Tabela 16. Dados de desempenho para o método de rompimento celular e o método de choque osmótico.

Método	Atividade Total (IU)	Proteínas totais (mg mL^{-1})	Atividade específica (IU mg^{-1})	% recuperação
Rompimento	$8,55 \pm 0,19$	$6,19 \pm 0,06$	$1,38 \pm 0,02$	100
Choque Osm.	$4,92 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,04$	$4,33 \pm 0,14$	57,5

A Figura 16 mostra o perfil proteico para o protocolo do choque osmótico. A presença da enzima foi demonstrada, de acordo com a massa molar correspondente, 35 kDa. Foi corroborado que a liberação da ASNase ocorreu tanto na Etapa I (colunas 1-3) quanto na Etapa II (colunas 5-7), embora em maior proporção na etapa II, por causa da solução hipertônica durante a etapa I.

Figura 16. Perfil proteico de amostras submetidas ao choque osmótico em duas etapas. Etapa I com solução I (sacarose $0,5 \text{ M}$; Tris-HCl 33 mM pH 7,2; EDTA $1,0$) e etapa II hipotônica (MgCl_2). (1) (2) (3) sobrenadantes da etapa I; (5) (6) (7) sobrenadantes da etapa II; (4) marcador de massa molar. (8) Referência das massas molares (*Precision Plus Protein*, BIORAD).

5.4. Estudos em agitador orbital

5.4.1. Avaliação do acetato no crescimento e expressão de ASNase

Avaliar a biomassa formada num tempo determinado permitiu determinar o efeito do acetato (na forma de acetato de sódio) no crescimento da *E. coli* BL21 (DE3). Como observado na Figura 17, através da análise de variância pelo teste de comparação Tukey (GraphPad Prism 6), verificou-se as diferenças significativas entre as médias (considerando $p < 0,05$) no valor da biomassa. Foi sugerido que a capacidade de assimilar o acetato para obter biomassa pela *E. coli* BL21 (DE3), acontece até concentração de 6 g L^{-1} de acetato de sódio, inclusive aumentando até 50 % a geração de biomassa. Esse aumento da biomassa em presença de acetato, pode ocorrer porque a linhagem BL21 (DE3) expressa a enzima acetil-CoA sintetase, que participa no metabolismo do acetato, e os níveis de expressão desta enzima é mais alta comparada com outras linhagens de *E. coli* (CASTAÑO-CEREZO et al., 2015). A presença de extrato de levedura na composição do meio LB, também poderia favorecer o metabolismo do acetato (NANCIB; BRANLANT; BOUDRANT, 1991).

Figura 17. Efeito da concentração de acetato de sódio no meio de cultivo na obtenção de biomassa de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital, a 250 rpm e 37 °C. Barra de erro para 3 repetições.

Provavelmente, o efeito negativo na produção de biomassa a partir de 6 g L^{-1} de acetato de sódio, de acordo com Luli (1990) teria acontecido devido à redução da velocidade de crescimento; isto prolongaria o tempo para atingir a

fase estacionária (fase de máxima formação de biomassa) dependente da concentração de acetato de sódio no meio de cultivo, como sugerido pela Figura 17. Neste cultivo o pH diminuiu na fase exponencial (isto será detalhado nas próximas etapas). O efeito do pH no cultivo, pode ser um fator importante a considerar, devido a que o acetato em pH neutro (7,0 - 7,5) está em equilíbrio com a sua forma não carregada (ácido acético), a qual ultrapassa facilmente a membrana celular, alterando o pH intracelular (AXE; BAILEY, 1995). Em pH ácido, de outra parte, favorecer-se-ia a presença da forma não carregada.

A concentração de acetato na produção de proteínas recombinantes pode ser prejudicial, como o relatado por KIM (2015) na expressão de amilase maltogênica termoestável pela *E. coli* BL21 (DE3), que apresentou redução na produção da proteína recombinante em 40 e 90%, para 0,82 g L⁻¹ (10 mM) e 4,1 g L⁻¹ (50 mM) de acetato, respectivamente. De acordo, com a Figura 18, a concentração de acetato não mostrou diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$), na produção da ASNase (baseado na produtividade específica, expressa em IU por grama de biomassa). Portanto, até 15 g L⁻¹ de acetato não se observou efeito inibitório na expressão.

Figura 18. Efeito da concentração de acetato de sódio no meio de cultivo na expressão de ASNase em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital, a 250 rpm e 37 °C. Barra de erro para 3 repetições.

5.4.2. Avaliação do controle do pH no crescimento celular

Constatou-se que o crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) e o metabolismo

ocorrem em pH próximo a 7,0 (PADAN; ZILBERSTEIN; ROTTENBERG, 1976). No entanto, o pH inicial do cultivo pode mudar de acordo com o crescimento das células, as quais metabolizam o meio de cultivo, gerando subprodutos de caráter ácido ou básico.

Na Figura 19 mostram-se as curvas de crescimento e a mudança do pH durante o crescimento da *E. coli* BL 21 (DE3) em meio LB (triptona, 10 g L⁻¹; extrato de levedura, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹) e LB com adição de tampão e/ou adição de glicose ou glicerol. O pH sofre variação no intervalo 6,8 - 8,4 no meio LB (Figura 19A). Isto pode ocorrer devido à formação de ácidos como produto do metabolismo dos açúcares no começo do crescimento; e a partir de 2 h de crescimento o pH aumenta em decorrência da liberação de compostos nitrogenados no metabolismo das peptonas e aminoácidos do meio LB (KRAUSE et al., 2010; SOINI; UKKONEN; NEUBAUER, 2008).

Nos gráficos B e D da Figura 19 mostram-se a mudança do pH durante o crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB não tamponado com adição de glicose ou glicerol. Os pH nestes cultivos sofrem maior variação em relação ao meio LB, o quais foram 5,96, quando foi usado glicose e 6,22 no caso do uso de glicerol, que coincidem com o momento do esgotamento da fonte de carbono (3 h de crescimento). Essa relação pode ser consequência do acúmulo de acetato no cultivo (HOSONO; KAKUDA; ICHIHARA, 1995), uma vez que é o produto do metabolismo da fonte de carbono em condições limitadas de oxigênio. Outra forma do acetato se acumular, mesmo que as células não sejam cultivadas em meio com limitação de oxigênio, mas em meio de cultivo rico (como o LB), seria através da redução da capacidade de reoxidação de quinonas, que por participarem da regulação gênica de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, favorecem a formação de quantidade de acetato. Segundo LI, et al. (2014) a quantidade seria da ordem de 0,4 g L⁻¹.

O aumento do pH após o consumo total da fonte de carbono até atingir 8,48 (adição de glicose) ou 8,66 (adição de glicerol) (Figura 19B e 19D), pode ser devido à assimilação do acetato acumulado e à liberação de compostos nitrogenados no metabolismo das peptonas ou aminoácidos do meio LB, similar com o cultivo sem adição de glicose ou glicerol na Figura 19A.

Figura 19. Curva de crescimento e monitoramento do pH durante o crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB e meio LB tamponado, com ou sem adição de fonte de carbono; a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. (A) Meio LB; (B) Meio LB e adição de 1 g L⁻¹ glicose; (C) Meio LB tamponado e adição de 1 g L⁻¹ glicerol; (D) Meio LB e adição de 1 g L⁻¹ glicose; (E) Meio LB tamponado e adição 1 g L⁻¹ glicerol. Uso de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Biomassa, X (—●—); pH (—□—); glicose ou glicerol (—★—). Barra de erro para 3 repetições.

Nas Figuras 19C e 19E, utilizando meio LB tamponado, o perfil de variação do pH foi similar (entre 6,65 e 7,26). Sendo que o pH mínimo para ambos os casos ocorreu às 3 h de crescimento, o que correspondeu ao consumo total da fonte de carbono. O controle da variação do pH pode oferecer melhores condições de crescimento à *E. coli* BL21 (DE3), devido a que poderia neutralizar os efeitos negativos dos subprodutos de natureza ácida ou básica.

Os subprodutos de caráter ácido seriam os preferencialmente neutralizados, ressaltando que sua concentração dependeria da fonte de carbono.

Figura 20. Diferença na obtenção de Biomassa (X) (g L^{-1}), utilizando meio LB sem tamponar (A e C) ou meio LB com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (B e D) com adição de diferentes concentrações de glicose ou glicerol. Cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos a 37 °C e 250 rpm. O cultivo sem adição de glicose ou glicerol no meio LB foi tomado como controle. Barra de erro para 3 repetições.

Na figura 20, mostra-se como o uso de meio LB tamponado, permitiu aumentar a concentração de glicose ou glicerol na obtenção da biomassa (X , expresso em g L^{-1}). Foi observado que sem adição de tampão, a maior biomassa foi obtida pela adição de 1,0 g L^{-1} de glicose ($2,31 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 20A) ou de 2,5 g L^{-1} de glicerol ($2,42 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 20C); enquanto que no meio LB tamponado (Figura 20B e 20D), a maior biomassa foi obtida pela adição de 5,0 g L^{-1} de glicose ($3,16 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$) ou 7,5 g L^{-1} de glicerol ($3,43 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$). Isto indicou que o tamponamento do meio, de certa forma melhora a tolerância da *E. coli* BL21 (DE3) aos subprodutos do metabolismo da fonte de carbono (provavelmente ácidos orgânicos), os quais

podem provocar inibição da produção de biomassa. No entanto o controle do pH, é apenas uma estratégia para solucionar a acumulação de acetato, pois sua formação ocorre sempre que o ciclo ATC não funciona completamente ou quando o fluxo de carbono nas células excede sua capacidade e o de outras vias metabólicas centrais (WOLFE, 2005), consequência de duas condições de crescimento: limitação de oxigênio e excesso da fonte de carbono. Por conseguinte, os resultados sugerem que o crescimento celular foi inibido a partir de 2,5 g L⁻¹ (LB sem tampão) ou 5 g L⁻¹ de glicose (LB tamponado); para os cultivos com adição de glicerol (5 g L⁻¹) observou-se inibição, apenas, no cultivo sem tampão.

Foi necessário avaliar os perfis de crescimento em cada concentração de glicerol ou glicose em meio LB tamponado, para, baseado na comparação dos parâmetros cinéticos dos cultivos da *E. coli* BL21 (DE3), entender a inibição do crescimento e permitir maior geração de biomassa.

5.4.3. Avaliação da fonte de carbono no crescimento celular

O meio LB possui menos de 100 µM de açúcares fermentáveis que pode ser utilizado pela *E. coli* para o seu crescimento (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Nessas condições de falta de fonte de carbono o crescimento é limitado. Portanto foi avaliado o efeito da adição de concentrações (1,0; 2,5; 5,0; e 7,5 g L⁻¹) de glicose ou glicerol como fontes de carbono na obtenção de biomassa, de tal forma, a não atingir concentração de acetato em nível inibitório.

Na Figura 21, observa-se que, tanto a glicose quanto o glicerol têm efeito positivo no crescimento. No entanto, pelo uso de 2,5 ou 5,0 g L⁻¹ de glicose foram obtidas as maiores biomassas (Figura 21A); enquanto que para o uso de glicerol foram na concentração de 5,0 ou 7,5 g L⁻¹ (Figura 21B). Apesar do fornecimento de maior concentração de fonte de carbono (nutriente limitante), o uso de 7,5 g L⁻¹ de glicose não mostrou aumento significativa ($p < 0,05$) na obtenção de biomassa, devido à concentração inibitória da fonte de carbono para o seu próprio metabolismo. Foi relatada a produção de ácidos orgânicos no metabolismo da glicose, pela saturação do ciclo dos ATC e do

processo de fosforilação de transporte de elétrons (HAN; LIM; HONG, 1992), fenômeno conhecido como efeito Crabtree (DOELLE; EWINGS; HOLLYWOOD, 1982).

Figura 21. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L^{-1} (—●—); 2,5 g L^{-1} (—○—); 5,0 g L^{-1} (—▼—) e 7,5 g L^{-1} (—△—). Barra de erro para 3 repetições.

De acordo com a Figura 22, observou-se maior redução do pH quando foi aumentada a concentração de glicose ou glicerol; sendo isso indicador da formação de subprodutos ácidos. No entanto, o pH tende a voltar ao seu valor inicial à medida que o tempo de crescimento aumenta. Os mínimos valores do pH foram $5,92 \pm 0,01$ (às 5 h de crescimento) e $6,03 \pm 0,04$ (às 7 h de crescimento), os quais foram obtidos dos cultivos com adição de 7,5 g L^{-1} de glicose ou 7,5 g L^{-1} de glicerol, respectivamente. Esta diferença, pode ser devido ao metabolismo mais lento em glicerol, geralmente (ANDERSEN; VON MEYENBURG, 1980); por conseguinte, a formação de subprodutos que alteram o pH torna-se mais lenta. A discussão da variação do pH foi complementada com os resultados do monitoramento da concentração de glicose ou glicerol e acetato nos cultivos, apresentados a seguir.

Figura 22. Monitoramento de pH em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—). Barra de erro para 3 repetições.

Figura 23. Monitoramento da concentração de glicose ou glicerol nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose ou glicerol a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹ (—●—); 2,5 g L⁻¹ (—○—); 5,0 g L⁻¹ (—▼—) e 7,5 g L⁻¹ (—△—). Barra de erro para 3 repetições.

De acordo com a Figura 23, observa-se o monitoramento da concentração da glicose ou glicerol para cada cultivo; sendo que para ambas as fontes de carbono, a *E. coli* BL21 (DE3) apresentou uma fase inicial de adaptação ao meio de cultivo (consumo lento), seguindo-se a fase de consumo rápido, provavelmente devido à alta atividade metabólica das células (fase exponencial de crescimento) até atingir o consumo total. Não obstante, no cultivo com 7,5 g L⁻¹ de glicerol, não foi total o seu consumo, os quais apresentaram 0,1 g L⁻¹ de glicerol desde às 8,5 h até 12 h de cultivo (Figura 23B), devido às condições do cultivo, que tornam ineficiente o consumo do

glicerol pela *E. coli* BL21 (DE3), como foi descrito por Dhamardi (2006) e Murarka (2008).

Por outro lado, dentre os ácidos orgânicos (subprodutos do metabolismo da glicose ou glicerol), o acetato tem maior importância (LEE, 1996), pois a forma não carregada do acetato (ácido acético) pode migrar incontrolavelmente através da membrana celular, perturbando o diferencial do pH transmembrana, prejudicando a viabilidade celular (AXE; BAILEY, 1995) e afetando o crescimento celular ou inclusive a expressão de proteínas (JENSEN; CARLSEN, 1990; KOH et al., 1992).

Figura 24. Concentração de acetato (g L⁻¹) nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidos em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicose ou glicerol a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações da glicose ou glicerol: 1,0 g L⁻¹; 2,5 g L⁻¹; 5,0 g L⁻¹ e 7,5 g L⁻¹. A dosagem do acetato foi feita no mínimo pH dos cultivos. Barra de erro para 3 repetições.

A inibição do crescimento por acetato endógeno em cultivos celulares tem sido observada para concentrações entre 1,95 g L⁻¹ (33 mM) e 9,86 g L⁻¹ (167 mM) (LULI; STROHL, 1990; SHILOACH; BAUER, 1975). Na Figura 24, mostram-se as concentrações de acetato endógeno dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) (as quais correspondem com o tempo que o cultivo atingiu o seu mínimo valor de pH) em diferentes concentrações de glicose (Figura 24A) ou glicerol (Figura 24B). No caso dos cultivos com adição de glicerol, não há diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$), entre os valores de acetato, sendo que esses valores foram menores a 1,5 g L⁻¹ (Figura 24B). Nos cultivos com adição de glicose, os níveis de acetato aumentam conforme a concentração de glicose foi aumentada (diferença significativa entre todas as médias pelo teste

de Tukey, $p < 0,05$), até atingir uma concentração de $3,4 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ (pelo uso de $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose). Considerando que a biomassa obtida foi semelhante em cultivos pelo uso da mesma concentração de glicose ou glicerol (apesar da diferença do acetato formado); e, que nos resultados do estudo do acetato exógeno (Figura 17), a inibição foi a partir de 6 g L^{-1} de acetato. Pode-se inferir que a inibição na obtenção da biomassa tem como principal fator, o excesso de fonte de carbono pela saturação das vias metabólicas, sendo a formação de acetato uma consequência dessa saturação.

As Figuras 25 e 26, mostram os perfis de crescimento, monitoramento da concentração da glicose ou glicerol e o pH para cada cultivo com diferente concentração de glicose ou glicerol adicionada. Em todos os casos, observa-se, um comportamento similar: (1) o consumo rápido da fonte de carbono coincide com o rápido crescimento celular; (2) a queda do pH ocorre quando a fonte de carbono é consumida para, a seguir, o consumo total aumentar novamente; e (3) o crescimento é limitado à presença da fonte de carbono.

Figura 25. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicose, obtida em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm. Biomassa obtida em diferentes concentrações de glicose: $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (●-); $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (○-); $5,0 \text{ g L}^{-1}$ (▼-) e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ (△-). pH (□-); glicose (★-)

Figura 26. Curvas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de glicerol, obtida em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm. Biomassa obtida em concentrações de glicerol: 1,0 g L⁻¹ (●); 2,5 g L⁻¹ (○); 5,0 g L⁻¹ (▼) e 7,5 g L⁻¹ (△). pH (□); glicose (★). Barra de erro para 3 repetições.

Foram elaboradas as curvas logarítmicas de crescimentos de cada cultivo para determinar a velocidade específica máxima de crescimento (μ_x), de acordo com o trecho linear e a inclinação (Figura 27). A Figura 27A mostra as diferenças para atingir a fase estacionária (menor inclinação da reta), sendo menor o tempo quando foi utilizada glicose 1,0 g L⁻¹ (linha preta). Na linha correspondente à glicose 7,5 g L⁻¹ (linha azul) ocorreu uma precoce perda da linearidade (2 h) e, portanto, μ_x diminuiu até atingir a fase estacionária; isso pode ser devido à maior formação de acetato, o qual inibe o crescimento (Figura 27A). No caso dos cultivos utilizando glicerol (Figura 27B), observamos que o tempo da fase exponencial de crescimento foi mais prolongado quando a concentração de glicerol inicial no meio foi maior.

Figura 27. Curvas logarítmicas de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M pH 7,0) com adição de diferentes concentrações de glicose (A) ou glicerol (B) a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Concentrações de glicose ou glicerol utilizadas: 1,0 g L⁻¹ (●---); 2,5 g L⁻¹ (○---); 5,0 g L⁻¹ (▼---) e 7,5 g L⁻¹ (△---).

A Tabela 17 mostra o resumo dos parâmetros cinéticos do crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em diferentes concentrações de glicose. Conforme aumentou a concentração de acetato nos cultivos, a velocidade de crescimento máxima (μ_x) se reduziu ou o intervalo da fase exponencial diminuiu, como no caso do uso de glicose 7,5 g L⁻¹ ($0,3 \text{ h} \leq t \leq 2,0 \text{ h}$), onde foi determinado 3,4 g L⁻¹ de acetato. O efeito do acetato na redução de μ_x , é um mecanismo de equilíbrio fisiológico para restabelecer a alteração no pH intracelular (LULI; STROHL, 1990). Os parâmetros cinéticos para o uso de glicose 2,5 g L⁻¹ ($X = 2,97 \text{ g L}^{-1}$) ou 5,0 g L⁻¹ ($X = 3,24 \text{ g L}^{-1}$) foram semelhantes, atingindo 36% ou mais biomassa comparada com a biomassa obtida pela adição 1,0 g L⁻¹ de glicose ($X = 2,18 \text{ g L}^{-1}$). Além disso, a concentração de acetato durante o crescimento foi menor quando foi utilizado glicose 2,5 g L⁻¹ e o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi maior ($Y_{x/s} = 1,19$) em relação com o cultivo crescido com 5,0 g L⁻¹ de glicose ($Y_{x/s} = 0,65$).

A Tabela 18 mostra o resumo dos parâmetros cinéticos dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3), crescidos em concentrações diferentes de glicerol. Observamos que conforme aumentou a concentração de glicerol nos cultivos, a velocidade de crescimento máxima (μ_x) se reduziu, mas o intervalo da fase exponencial aumentou, devido ao metabolismo mais lento na presença do glicerol do que da glicose (ANDERSEN; VON MEYENBURG, 1980) ou pela presença de acetato formado mesmo em baixa concentração. Os parâmetros

cinéticos para o uso de glicerol 5,0 g L⁻¹ (X= 3,23 g L⁻¹) ou 7,5 g L⁻¹ (X=3,45 g L⁻¹) foram semelhantes, atingindo 46% ou mais biomassa comparada com a biomassa obtida pela adição 1,0 g L⁻¹ de glicerol (X= 2,21 g L⁻¹).

Tabela 17. Parâmetros cinéticos de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inoculo células crescidas por 12 h.

LB com adição de glicose (g L ⁻¹)	μ_x (h ⁻¹)	t_g (min)	Intervalo fase exponencial	$X_{m\acute{a}xima}$ (g L ⁻¹)	Acetato* (g L ⁻¹)	$Y_{x/s}$
1,0 g L ⁻¹	1,17 ± 0,03	35,6 ± 0,8	0,3h ≤ t ≤ 2,5h	2,18 ± 0,01	0,94 ± 0,08	2,18
2,5 g L ⁻¹	0,91 ± 0,01	45,8 ± 0,2	0,3h ≤ t ≤ 3,5h	2,97 ± 0,02	2,02 ± 0,14	1,19
5,0 g L ⁻¹	0,92 ± 0,02	45,4 ± 0,9	0,3h ≤ t ≤ 4,0h	3,24 ± 0,14	2,76 ± 0,13	0,65
7,5 g L ⁻¹	1,27 ± 0,04	32,6 ± 0,7	0,3h ≤ t ≤ 2,0h	2,95 ± 0,09	3,40 ± 0,06	0,39

*: dosagem de acetato após consumos total da glicose; μ_x : velocidade de crescimento; t_g : tempo de geração; X: biomassa; $Y_{x/s}$: Fator de conversão de substrato limitante em células.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB a 37 °C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Utilizaram-se como inoculo células crescidas por 12 h.

LB com adição de glicerol (g L ⁻¹)	μ_x (h ⁻¹)	t_g (min)	Intervalo fase exponencial	$X_{m\acute{a}xima}$ (g L ⁻¹)	Acetato* (g L ⁻¹)	$Y_{x/s}$
1,0 g L ⁻¹	0,88 ± 0,02	47,2 ± 0,9	0,5h ≤ t ≤ 3,5h	2,21 ± 0,01	1,21 ± 0,06	2,21
2,5 g L ⁻¹	0,92 ± 0,01	45,4 ± 0,7	0,5h ≤ t ≤ 3,5h	2,74 ± 0,03	1,36 ± 0,10	1,09
5,0 g L ⁻¹	0,81 ± 0,01	51,2 ± 0,3	1,0h ≤ t ≤ 4,0h	3,23 ± 0,05	1,36 ± 0,07	0,65
7,5 g L ⁻¹	0,75 ± 0,02	55,2 ± 1,4	1,0h ≤ t ≤ 4,7h	3,45 ± 0,05	1,57 ± 0,09	0,46

*: dosagem de acetato após consumos total do glicerol; μ_x : velocidade de crescimento; t_g : tempo de geração; X: biomassa; $Y_{x/s}$: Fator de conversão de substrato limitante em células.

Observou-se que a concentração da fonte de carbono (glicose ou glicerol) tem relação direta com a formação de biomassa, e no caso dos cultivos usando glicose existe, também, relação direta com a formação de acetato, o qual influenciou negativamente no crescimento celular dos cultivos executados. No entanto, até esta parte do trabalho não foi observado a vantagem de uma sobre a outra fonte de carbono avaliada, por esse motivo, foi necessário avaliar a expressão da ASNase em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) feito com glicose ou glicerol.

5.4.4. Avaliação da fonte de carbono e início da indução na expressão de ASNase

5.4.4.1. Efeito do início da indução no crescimento celular

A expressão de proteínas recombinantes começa a partir da adição de um indutor (IPTG) ao meio de cultivo para ativar o sistema expressor, isto provoca no hospedeiro (*E. coli*) a redução da velocidade do crescimento, porque os recursos para a produção de proteínas necessárias são desviados para a produção de proteínas recombinantes (proteínas desnecessárias) (JESPER et al., 1993; MALAKAR et al., 2014). Este trabalho (Figura 28) corroborou o fato de que a adição do IPTG (indutor da expressão) tem efeito negativo na obtenção de biomassa, sendo maior o efeito quanto mais cedo (na fase de crescimento) ocorreu o início da indução.

Figura 28. Influência do início da indução pelo IPTG na obtenção de Biomassa, X (g L⁻¹) nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução de IPTG (1 mM) e 3 h de pós-indução. A indução foi iniciada em diferentes tempos de crescimento: metade da fase log (Met Fase log) ou final da fase log (Fin Fase log) e fase estacionária (Fase Estac). A fase estacionária corresponde 2,5 h após do final da fase log. Meio de cultivos utilizados: LB (□); LB + glicose 2,5 g L⁻¹ (▤); LB + glicose 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 7,5 g L⁻¹ (▨). No controle (Ctrl), as células utilizadas não foram induzidas. Barra de erro para 3 repetições.

5.4.4.2. Efeito do início da indução na expressão

Dependendo das características do sistema vetor-hospedeiro e o estado fisiológico das células, alguns cultivos podem ter influência no rendimento da expressão das proteínas recombinantes (SHIN et al., 1997). Há estudos que demonstram que o melhor momento para iniciar a indução da ASNase é no final da fase exponencial de crescimento (GALLOWAY; SOWDEN; SMITH, 2003), porque as células encontram-se no estado fisiológico mais adequado.

Figura 29. Atividade ASNase (IU g⁻¹) obtida após liberação da ASNase pelo método de choque osmótico a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução com IPTG 1 mM e 3h de pós-indução. A indução foi iniciada em diferentes tempos de crescimento: metade da fase log (Met Fase log) ou final da fase log (Fin Fase log) e fase estacionária (Fase Estac). A fase estacionária corresponde 2,5 h após do final da fase log. Meio de cultivos utilizados: LB (□); LB + glicose 2,5 g L⁻¹ (▤); LB + glicose 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 5,0 g L⁻¹ (▣); LB + glicerol 7,5 g L⁻¹ (▨). No controle (Ctrl), as células utilizadas não foram induzidas. Barra de erro para 3 repetições.

Na Figura 29, mostra-se a variação da produtividade específica (expressos IU g⁻¹) em relação ao início da indução, sendo a indução iniciada em diferentes tempos da fase exponencial do crescimento (metade ou final) ou

durante a fase estacionária da *E. coli* BL21 (DE3). Em geral, as células foram induzidas na metade ou final da fase exponencial de crescimento, os níveis de expressão foram mais altos do que quando foram induzidos durante a fase estacionária. Isto pode ser devido à falta de nutrientes (nutrientes limitantes) durante a fase estacionária, como observado em maior medida quando usado LB base, onde na falta de açúcares, os aminoácidos do meio foram depletados como fonte de carbono e energia (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007), deixando, dessa forma, menos nutrientes para a expressão de proteínas comparada aos cultivos em LB com adição de fonte de carbono (glicose ou glicerol). Em todos os casos, os níveis de expressão basal nos cultivos controle (cultivos sem induzir) foram mínimos, demonstrando que os meios de cultivo possuem quantidades desprezíveis de componentes de autoindução (lactose ou galactose).

Note-se que nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) com uso de glicerol a expressão foi igual ou menor daquele com adição de glicose. Isto provavelmente seria devido ao fato de que o glicerol, diferentemente da glicose, é uma fonte de carbono que fornece pouca energia química potencial para o seu metabolismo, necessitando, portanto, de maior quantidade de enzimas (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2012). Por conseguinte, a concentração de nutrientes disponíveis para a expressão de ASNase diminuiu. Os níveis de expressão de ASNase nas células crescidas em meio de cultivo com adição de 5,0 g L⁻¹ de glicose teve o valor máximo obtido da indução no final da fase exponencial (1916 ± 122 IU g⁻¹), apesar da maior concentração de acetato neste cultivo (Tabela 17), demonstrando que essa concentração de acetato endógeno não afeta a expressão da ASNase.

O melhor nível de expressão em glicose com 5 g L⁻¹, quando induzida no final da fase exponencial de crescimento, pode ocorrer pela variação na concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) durante as fases de crescimento. O AMPc participa na ativação do sistema promotor, especificamente promove a transcrição da RNA polimerase no lac promotor. A presença de glicose no cultivo de *E. coli* leva à baixa concentração de AMPc (PASTAN; ADHYA, 1976). Nessa condição o sistema promotor não se encontra

totalmente ativado, por conseguinte, a expressão da proteína recombinante está parcialmente reprimida (BOTSFORD, 1975; YAN et al., 2015). Como observado nas curvas de crescimento em cultivos com adição de glicose (Figura 25), a concentração de glicose na metade da fase exponencial de crescimento, ainda, era significativa.

Figura 30. Atividade ASNase (IU mL⁻¹) a partir do sobrenadante dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB ou LB tamponado (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0; adição glicerol ou glicose), a 37 °C e 250 rpm. Indução de IPTG (1 mM) e 3 h de pós-indução. A indução foi iniciada em diferentes tempos de crescimento: metade da fase log (Met Fase log) ou final da fase log (Fin Fase log) e fase estacionária (Fase Estac). A fase estacionária corresponde 2,5 h após do final da fase log. Meio de cultivos utilizados: LB (□); LB + glicose 2,5 g L⁻¹ (▤); LB + glicose 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 7,5 g L⁻¹ (▨). No controle (Ctrl), as células utilizadas não foram induzidas. Barra de erro para 3 repetições.

Por outro lado, quando existe superprodução de proteínas pela indução de IPTG, a célula sofre um estresse, porque a maquinaria metabólica da célula está à disposição da produção dessas proteínas. Nesse sentido, as células sofrem alteração estrutural, podendo, por exemplo, se tornar mais permeáveis e dessa forma ocorrer secreção da proteína expressa (DVORAK et al., 2015; GEORGIU; SHULER; WILSON, 1988). Essa maior permeabilização da membrana pode ser uma vantagem característica de uma proteína extracelular, centrada no favorecimento da formação da estrutura quaternária, proteção

contra a hidrólise causada por proteases intracelulares e na diminuição de etapas para a ulterior purificação (CHOI; LEE, 2004); porém a permeabilidade não controlada pode levar à lise celular. Por isso, compatibilizar as condições de crescimento com as de permeabilidade constitui condição necessária e suficiente para se conseguir uma viabilidade celular otimizada.

No presente trabalho foi avaliada a secreção da ASNase extracelular (Figura 30), observando-se secreção extracelular quando os cultivos eram induzidos na metade da fase exponencial de crescimento, o que é indicaria maior estado de estresse por parte das células, ou também ao fato do maior nível de expressão (atividade metabólica) por causa da maior concentração de nutrientes necessários para a expressão das proteínas recombinantes nesta fase de crescimento.

5.4.4.3. Efeito do início da indução na produtividade da ASNase

A produtividade depende diretamente dos níveis de expressão da linhagem hospedeira e da densidade celular do cultivo em relação a uma unidade de tempo (COONEY, 1983). Na Tabela 19, mostram-se os tempos (h) de cultivo para as células crescidas em diferentes meios e induzidas pela adição de IPTG.

Tabela 19. Tempo (h) de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) para produção de ASNase em diferentes meios (LB; LB + 2,5 g L⁻¹ glicose; LB + 5,0 g L⁻¹ glicose; LB + 5,0 g L⁻¹ glicerol; LB + 7,5 g L⁻¹ glicose) induzidos pela adição de IPTG 1mM. O tempo de cultivo foi considerado da soma do tempo para atingir fase de crescimento desejada e o tempo de pós-indução (3 h).

Início da indução	LB	LB + 2,5 g L ⁻¹ glicose	LB + 5,0 g L ⁻¹ glicose	LB + 5,0 g L ⁻¹ glicerol	LB + 7,5 g L ⁻¹ glicerol
Metade Fase Log	4,5	5,0	5,33	5,5	4,17
Final Fase Log	5,25	6,5	7,0	7,0	5
Fase estacionária	7,5	9,0	9,5	9,5	7,5

A Figura 31, mostra como a produtividade volumétrica da ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) (expressos como IU L⁻¹ h⁻¹), diminuiu quando foram induzidas na fase estacionária, devido a cultivos mais demorados ou baixos

níveis de expressão, como foi descrito na Figura 29. Observa-se boa robustez (valores próximos) das produtividades volumétricas obtidas para indução entre a metade e final da fase exponencial de crescimento.

Figura 31. Produtividade volumétrica (IU L⁻¹ h⁻¹) obtida nos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) crescidas em meio LB fosfato tamponado 0,1 M (pH 7,0) com adição glicerol ou glicose, a 37 °C e 250 rpm. Indução com IPTG (1 mM) e 3h de pós-indução. A indução foi iniciada em diferentes tempos de crescimento: metade ou final da fase log ou fase estacionária. A fase estacionária corresponde 2,5 h após do final da fase log. Meio de cultivos utilizados: LB (□); LB + glicose 2,5 g L⁻¹ (▤); LB + glicose 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 5,0 g L⁻¹ (■); LB + glicerol 7,5 g L⁻¹ (▨). Barra de erro para 3 repetições.

A melhor produtividade volumétrica foi obtida do cultivo com adição de glicose em relação aos cultivos com adição de glicerol como fonte de carbono. Consequência do maior tempo de crescimento e o menor nível de expressão (produtividade específica), devido ao maior requerimento de nutrientes para o metabolismo do glicerol. O máximo valor de produtividade volumétrica foi 683 ± 63 IU L⁻¹ h⁻¹ ao induzir no final da fase exponencial em cultivo com 5,0 g L⁻¹ de glicose, esse valor significou aumento de pelo menos 40% na produtividade em relação ao cultivo usando apenas meio LB (478 ± 12 IU L⁻¹ h⁻¹) ou meio LB com adição de glicerol 7,5 g L⁻¹ (485 ± 27 IU L⁻¹ h⁻¹).

Em resumo, pode-se dizer que a adição de glicose comparada à de glicerol no meio LB, favoreceu a produção de biomassa em cultivos induzidos de *E. coli* BL21 (DE3) em menor tempo, apesar da maior formação de acetato, embora não tenha atingido o nível inibitório. O consumo mais eficiente da glicose, permitiu que mais nutrientes do meio de cultura estivessem disponíveis

para a expressão de ASNase, levando à maior produtividade específica por grama de célula. Além disso, a indução na etapa final da fase exponencial nestes cultivos diminuiu o estresse na célula (causadora da perda de biomassa e permeabilização não controlada) e o efeito parcial de repressão da glicose sobre o promotor de expressão, e desta maneira foi melhorada a produtividade volumétrica.

5.4.5. Análise do conteúdo de metais no meio de cultivo

O meio Luria Bertani (Difco) contém 10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de NaCl, pH 7,0. A triptona usada é um digerido pancreático de caseína de leite de vaca, e o extrato de levedura é um autodigerido de *Saccharomyces cerevisiae*. Sendo a obtenção de alta densidade celular um dos focos do nosso trabalho, cabe perguntarmos se sabemos o que limita o crescimento de bactérias em meio LB.

Analizando a composição elementar da *E. coli* BL21 (DE3) e do meio LB (Tabela 20), observou-se que o principal fator limitante na obtenção de biomassa foi a fonte de carbono (inclusive em cultivos em agitador orbital), em razão da maior porcentagem do carbono na composição elementar (45,8%). Segundo Sezonov (2007), o meio LB contém o equivalente a 100 µM de açúcares fermentáveis, utilizáveis por *E. coli* (açúcares livres, fosfatos de açúcar, oligossacarídeos, nucleotídeos, etc.), havendo necessidade da adição de glicose ou glicerol como fonte de carbono; no entanto, a adição da fonte de carbono encontrava-se limitada em cultivos em agitador orbital, devido à baixa oxigenação do cultivo (BHATTACHARYA; DUBEY, 1997), a qual influenciou no baixo aproveitamento da fonte de carbono (HENKEL et al., 2014) e na formação de acetato (inibidor do crescimento).

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 17), a concentração de glicose máxima a ser adicionada em meio LB tamponado para crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital foi 5,0 g L⁻¹ (sem inibição do crescimento); considerando que cada grama de glicose representa 0,4 g de Carbono, podemos calcular que pelo uso de 5 g L⁻¹ de glicose ele vai permitir produzir aproximadamente 4 g L⁻¹ de biomassa. Porém na prática, atinge-se no

máximo 3,29 g L⁻¹ de biomassa, o que se explicaria pelos modelos que levam em conta o metabolismo da *E. coli*.

Tabela 20. Composição elementar para a massa seca de células de *E. coli* BL21 (DE3) e do meio Luria Bertani (expresso em g L⁻¹). Foram calculados os requerimentos de elementos para obtenção de diferentes concentrações de biomassa (5; 10; 25 e 50 gramas de massa celular seca por litro de cultivo)

Elemento	% ^a	Estimativa biomassa para:				Componentes LB (g L ⁻¹) ^b
		5 g L ⁻¹	10 g L ⁻¹	25 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹	
C	45,8	2,29	4,58	11,45	22,89	< 100µM ^c
H	7,1	0,35	0,71	1,76	3,52	--
O	29,0	1,15	2,30	5,75	11,50	--
N	13,6	0,68	1,36	3,40	6,80	1,67 ^d
P	1,6	0,082	0,163	0,408	0,815	0,038 ^d
S	0,54	0,027	0,054	0,134	0,268	--
K	0,29	0,015	0,029	0,073	0,145	0,39
Na	0,52	0,026	0,052	0,130	0,260	3,9
Mg	0,16	0,008	0,016	0,040	0,080	0,003
Cl	0,41	0,021	0,041	0,103	0,205	6,06
Ca	5,9 x 10 ⁻²	2,95 x 10 ⁻³	5,9 x 10 ⁻³	1,48 x 10 ⁻²	2,95 x 10 ⁻²	4,0 x 10 ⁻³
Fe	1,7 x 10 ⁻²	8,5 x 10 ⁻⁴	1,7 x 10 ⁻³	4,25 x 10 ⁻³	8,5 x 10 ⁻³	5,6 x 10 ⁻⁴
Cu	1,8 x 10 ⁻³	9,0 x 10 ⁻⁵	1,8 x 10 ⁻⁴	4,5 x 10 ⁻⁴	9,0 x 10 ⁻⁴	6,4 x 10 ⁻⁶
Mn	4,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻⁴	4,0 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	5,5 x 10 ⁻⁶
Zn	2,1 x 10 ⁻²	1,1 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻³	5,3 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁻²	6,5 x 10 ⁻⁴

^a Análise de células de *E. coli* BL21 (DE3) crescida em meio LB, feito na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo

^b Valores para meio LB foram expresso em grama por litro de meio (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001).

^c Sezonov (2007).

^d formas solúveis contidas em triptona e extrato de levedura (ZHOU; MCCASKEY; BRODER, 1996).

Outros elementos requeridos em maior quantidade na composição elementar são: Hidrogênio (7,1 %), Oxigênio (29 %), Nitrogênio (13,6 %), Fosforo (1,6 %) e Enxofre (0,54 %). O Nitrogênio necessário provém dos aminoácidos constituintes do LB (1,67 g L⁻¹ de nitrogênio total (SEZONOV; JOSELEAU-PETIT; D'ARI, 2007). Esses aminoácidos representam também a fonte principal de Fosforo e Enxofre.

Apesar do baixo teor requerido, os íons metálicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Zn, etc.) são essenciais para o crescimento, porque participam estrutural e funcionalmente em sistemas biológicos (HOLM; KENNEPOHL; SOLOMON, 1996). Como exemplo, foram analisadas as concentrações de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg). Foi relatado que cátions bivalentes (Ca^{+2} ou Mg^{+2}) ajudam na estabilização dos lipopolissacarídeos da membrana celular externa (HAMILTON-MILLER, 1966). De acordo com Moncany (1981), a concentração de Mg^{+2} intracelular necessária para células de *E. coli* em fase exponencial de crescimento é de 7,2 mg por grama de massa celular seca, mas o meio LB contém 3 mg L^{-1} de Mg, o qual segundo a nossa estimativa (Tabela 20) é limitante, mesmo, para obter 2,5 g de massa celular (8 mg L^{-1} de Mg permite obter 5 g L^{-1} de biomassa), podendo ocorrer a permeabilização não controlada da membrana celular. Da mesma forma, ocorre com a concentração de Ca^{2+} (4,0 mg L^{-1}), a qual não seria limitante para obter 5 g de células, pois, é necessário 2,95 mg L^{-1} de Ca^{2+} ; no entanto, se considerarmos que o meio deve fornecer estes íons para o aumento da densidade celular em 25 g de células, este micronutriente seria um fator limitante; observando na Tabela 20 que seria necessário 14,8 mg L^{-1} de Ca^{2+} (3,7 vezes mais). Outros íons em baixas concentrações no meio LB são: Fe^{+2} (0,56 mg L^{-1}), Cu^{+2} (6,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) e Mn^{+2} (5,5 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Em razão dos pontos citados acima, foi feito o cálculo para suplementar o meio de cultivo pelo uso de sais de metais, nas seguintes concentrações: 0,5 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g L^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg L^{-1} de H_3BO_4 ; 0,1 mg L^{-1} de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 25 mg L^{-1} de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 mg L^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg L^{-1} de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,8 mg L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 20 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 mg L^{-1} de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. As concentrações desses sais foram calculadas para a obtenção de 25 g L^{-1} de biomassa, e evitando o uso de sais de amônio, devido à interferência deste composto na determinação da atividade ASNase. Uma vez determinadas as concentrações necessárias, procedeu-se a avaliação em cultivos com diferentes concentrações de glicose no meio LB tamponado.

Frente à suplementação do meio LB tamponado, com sais e glicose (5,0 g L^{-1}), a *E. coli* BL21 (DE3) apresentou a curva de crescimento mostrada na Figura 32, e foram obtidos os seguintes parâmetros cinéticos de crescimento:

$\mu_x = 0,92 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$; $t_g = 45,4 \pm 0,3 \text{ min}$; intervalo da fase exponencial desde 0,5 h até 4 h, os quais não foram estatisticamente diferentes quando comparados àqueles obtidos com o cultivo crescido sem suplementação de sais no meio LB (valores mostrados na Tabela 17). No entanto, foi observada diferença significativa no valor de $Y_{x/s}$ ($0,79 \pm 0,03$) e na biomassa obtida $4,02 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$ (24 % mais biomassa). Esse melhor resultado pode ser devido à disponibilidade de elementos traços (no meio de cultivo) necessária como cofatores para enzimas do metabolismo celular, por exemplo, molibdênio, selênio e níquel, que são cofatores da enzima formato-hidrogênio-liase ligada à que participa produção de biomassa em condições anaeróbicas (SOINI; UKKONEN; NEUBAUER, 2008); à melhor estabilidade da membrana celular pelo uso dos cátions bivalentes; ou à maior disponibilidade do oxigênio (que forma parte dos sais), que segundo Carlson (2004) e Henkel (2014) a eficiência do consumo da glicose para formação de biomassa e energia depende fortemente do consumo de oxigênio.

Figura 32. Curva de crescimento da *E. Coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado (adição de tampão; glicose 5 g L^{-1} e sais de metais); a 37°C e 250 rpm, obtida em agitador orbital. Uso de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. Biomassa, X (—▼—); pH (—□—); glicose (—★—). Barra de erro para 3 repetições.

5.4.6. Avaliação da permeabilização celular para secreção celular

A produção extracelular de proteínas recombinantes em *E. coli* oferece vantagem maior em relação à produção citoplasmática e periplasmática, por exemplo, processo mais simples na purificação e detecção, condições do ambiente mais favoráveis para dobramento proteico e degradação pela ação de proteases, e em alguns casos melhora o impacto tóxico da expressão da proteína recombinante (NI; CHEN, 2009). Em condições naturais a *E. coli* apresenta baixa capacidade para secreção extracelular de proteínas, embora, como relatado por Ni e Chen (2009), isto pode mudar graças a 4 estratégias de biologia molecular: (1) melhora do sistema de secreção natural de *E. coli* patogênicas; (2) uso de proteínas de transporte; (3) uso de linhagens deficientes na formação das estruturas do envelope celular; (4) co-expressão de proteínas de lise. No entanto, em todos os casos, não é garantido o sucesso para cultivos em maior escala, devido à inibição do crescimento, lise precoce ou falta de robustez (MERGULHÃO; SUMMERS; MONTEIRO, 2005; SHOKRI; SANDÉN; LARSSON, 2003). Outra forma de aumentar a secreção extracelular é pela modificação das condições de crescimento, dentre elas, a adição de substâncias ao meio de cultivo (SHOKRI; SANDÉN; LARSSON, 2003), que alterem a funcionalidade da parede celular de maneira controlada (evitando atingir a lise celular).

Na figura 33, são mostrados os efeitos significativos ($p \leq 0,05$) da influência da concentração de glicina (% w/v), a concentração de n-dodecano (% v/v) ou a interação entre eles, sobre a permeabilização celular. Foi feito um planejamento experimental, considerando como respostas: atividade de ASNase extracelular (EC); atividade ASNase intracelular (IC); biomassa; e viabilidade celular.

Sendo que a forma quadrática para um fator, Q, indica a necessidade de maior volume deste fator para conseguir aumentar a resposta, (inclusive sugere uso de volumes não avaliados); a forma linear, L, indica que nas concentrações avaliadas mostra grande impacto desse fator na resposta. No caso da atividade EC (Figura 33A), que representa a ASNase liberada ao meio extracelular, mostra que o n-dodecano (Q) e a glicina (L) favorecem o aumento da atividade

ASNase no meio EC, enquanto a interação deles apresenta efeito negativo. Isto pode ser explicado pela diferença nas capacidades e os mecanismos de ação desses compostos na permeabilização celular.

A ação da glicina (massa molar = 75,1 g mol⁻¹) ocorre ao nível das pontes peptídicas da camada de peptidoglicano devido à substituição da D-alanina pela L-glicina, a qual em comparação com a D-alanina tem baixa capacidade para fazer reações de transpeptidação e formar pontes peptídicas, o que resulta em uma estrutura mais amorfa na camada de peptidoglicano (HAMMES; SCHLEIFER; KANDLER, 1973; JONGE et al., 1996). Isto explica a significância do fator glicina no aumento da atividade ASNase EC.

Figura 33. Diagrama de Pareto para os efeitos estudados. Respostas avaliadas: (A) Atividade ASNase Extracelular; (B) Atividade ASNase Intracelular; (C) Biomassa, X; (D) Viabilidade celular. Linha vermelha indica o valor $p \leq 0,05$.

A respeito do n-dodecano (massa molar = 170,3 g mol⁻¹), provavelmente ele entra em contato com a membrana celular externa, inserindo-se nela e desarranjando-a. Esta capacidade para desorganizar a bicamada lipídica da membrana celular externa seria menor em relação a outros compostos da mesma classe, embora de menor tamanho, como relatado com o hexano (massa molar = 86,2 g mol⁻¹) (BANSAL-MUTALIK; GAIKAR, 2003; DE LEÓN et

al., 2003). Outra forma de aumentar a permeabilidade seria pela interação com as proteínas de membrana OmpA da *E. coli*. A proteína OmpA, é uma proteína transmembrana de natureza anfifílica, as quais são estruturas importantes na estabilidade da membrana externa, sendo que a proteína interage com as pontes peptídicas da camada de peptidoglicano (CHEN et al., 1980). O uso da proteína OmpA, como agente surfactante, para estabilizar a emulsão água e n-dodecano (AGUILERA et al., 2014) pode sugerir o seu efeito na permeabilização celular. Não obstante, para conseguir o efeito, necessariamente, deve ocorrer o contato direto de suas moléculas com o envelope celular; esse contato é limitado pelo fato que o n-dodecano é imiscível e menos denso que a água, talvez, por esta razão este fator foi significativo em relação ao Q.

A interação negativa da glicina e n-dodecano (Figura 33A) pode ser devida à maior capacidade do n-dodecano para interagir com a proteína OmpA da membrana externa, porque a interação desta proteína com as pontes peptídicas na camada de peptidoglicanos foi alterada pela presença da glicina. Desta forma acontece uma permeabilização descontrolada na célula, podendo acabar na perda da viabilidade. Este resultado pode ser corroborado pela análise das outras respostas estudadas.

Na Figura 33B, a respeito da atividade ASNase IC, observamos que o fator glicina (na forma L ou Q) e a sua interação com n-dodecano, afeta negativamente na atividade ASNase IC. Isto parece concordar com a maior permeabilização das células, onde a secreção extracelular da ASNase diminuiria sua presença no interior da célula. Porém, isto também pode ser devido à perda de produtividade específica, consequência do estresse aumentado, ou, ainda, por causa da perda de viabilidade. A biomassa foi afetada negativamente pelo n-dodecano (Q) e a glicina (forma L ou Q) em maior extensão (Figura 33C). O efeito negativo da glicina no crescimento foi mostrado por Kaderbhai e colaboradores (1997), que relataram a redução até 50 % do crescimento da *E. coli* quando foi usado 1 % (w/v) no meio de cultivo. A viabilidade celular (Figura 33D) ajudou a entender o efeito da glicina e n-dodecano na produtividade específica, uma vez que mostra só células com capacidade de expressar ASNase. Sendo assim, se observou que apenas o n-

dodecano (L) favoreceu a viabilidade celular, provavelmente devido à melhor oxigenação do meio pela sua capacidade em dissolver o oxigênio no meio de cultivo (WEI; LIU, 1998). Por outro lado, o uso da glicina mostrou-se a principal causa da perda da viabilidade celular. Baseado na análise das quatro respostas, foi sugerido que o uso da glicina e n-dodecano podem favorecer a secreção extracelular da ASNase sem perda da produtividade, precisando, porém, ser determinadas as concentrações adequadas para conseguir a permeabilização controlada nas células de *E. coli* BL21 (DE3).

Na análise da superfície de resposta (SR) o modelo determinado foi testado para falta de ajuste fazendo-se o teste de Fisher (F) através da Análise de Variância (ANOVA) e teste t (Tabela 21). O modelo não mostra falta de ajuste significativo ao nível de confiança de 95% ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$) em todas as respostas avaliadas, demonstrando que é adequado para descrever o efeito dos fatores nas respostas avaliadas. Além disso, a qualidade do modelo foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2). Os valores de R^2 obtidos para as respostas avaliadas foram de 0,713 (Atividade EC); 0,933 (Atividade IC); 0,973 (X); 0,941 (Viabilidade), indicando, assim, 71,3; 93,3; 97,3 e 94,1 % da variabilidade na resposta, podendo ser explicadas pelo modelo, respectivamente.

Tabela 21. Análise de variância para falta de ajuste.

Fonte de variação	Resposta	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	Valor p	R^2
Falta de ajuste	EC	1,13	3	0,378	5,47	9,12	0,07	0,713
	IC	74607	3	24869	3,81	9,12	0,11	0,933
	X	0,33	3	0,11	5,28	9,12	0,07	0,973
	Viabil.	73441	3	24480	6,42	9,12	0,05	0,941
Erro puro	EC	0,28	4	0,07				
	IC	26114	4	6528				
	X	0,08	4	0,02				
	Viabil.	15259	4	3815				
Total	EC	4,91	12					
	IC	1512438	12					
	X	14,92	12					
	Viabil.	1490336	12					

EC: atividade extracelular; IC: atividade intracelular; X: biomassa; Viabil: viabilidade; R^2 : coeficiente de determinação.

Figura 34. Superfície resposta e gráfico de contorno da atividade ASNase extracelular (EC) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso da glicina e n-dodecano.

Figura 35. Superfície resposta e gráfico de contorno da atividade ASNase intracelular (IC) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso da glicina e n-dodecano.

De acordo com as Figuras 34 e 35, observamos que concentrações de glicina acima de 1,2% apresentaram altos valores de atividade da ASNase no meio extracelular e baixos valores de atividade IC; isto em princípio indica aumento da permeabilidade celular. No entanto, se observarmos os valores de biomassa (Figura 36) e viabilidade celular (Figura 37), as quais foram afetadas negativamente, poderemos considerar que concentrações acima de 1,2% de

glicina, provavelmente, causariam perda total da integridade da parede celular (esferoplastos) semelhante ao relatado por Amro et al. (2000), que, para permeabilizar células de *E. coli*, empregaram o EDTA. Essa formação de esferoplastos, facilitaria a lise celular e/ou as mudanças do metabolismo da célula, devido ao desbalanceamento da entrada dos nutrientes, em decorrência da desestruturação das camadas do envoltório da célula; devido ao desbalanceamento nutritivo, as vias metabólicas da bactéria se rearranjarão de modo preferencial para a manutenção da vida da célula em detrimento da formação de outros subprodutos (diminuindo a expressão da ASNase, por exemplo). Yang et. al. (1998) mostrou que a permeabilização celular pelo uso de 2% glicina pode causar níveis de estresse críticos para a célula, provocando lise celular na *E. coli*, explicando, assim, o aumento do valor da atividade ASNase EC, devido à liberação do conteúdo celular para o meio extracelular, sendo isso uma desvantagem uma vez que diminui o teor de pureza da proteína alvo (ASNase). A combinação dos mecanismos para glicina e n-dodecano citados poderia aumentar este efeito não desejado. O menor valor de R^2 da Tabela 21 em relação a atividade EC poderia refletir este evento (lise celular).

Figura 36. Superfície de resposta e gráfico de contorno da biomassa (X) para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de glicina e n-dodecano.

Figura 37. Superfície de resposta e gráfico de contorno da viabilidade celular para cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pelo uso de glicina e n-dodecano.

Contudo, a glicina, que se mostrou um fator importante na permeabilização celular, promoveu queda na viabilidade celular. Isto poderia ser resolvido pelo uso de concentrações de glicina abaixo de 1,2 % e pelo uso de n-dodecano em concentração que ajudasse a reduzir a concentração de glicina como agente permeabilizador e diminuísse seu impacto negativo sobre a viabilidade celular.

Como foi descrito antes, o efeito do n-dodecano implica o contato com a célula, mas isto é limitado pelo fato que o n-dodecano é imiscível e menos denso que a água, pois o meio de cultivo em maior proporção é aquoso. Para resolver este problema, em primeiro lugar, uma intensa agitação do meio de cultura pode promover a dispersão do n-dodecano no meio aquoso e formar gotículas, as quais poderiam ter contato com as células. Mas a grande intensidade das forças de cisalhamento geradas e o alto consumo de energia, são fatores limitantes no crescimento da *E. coli* e na capacidade do equipamento, tornando-se impossível a implementação desta alternativa. Outra maneira de resolver esta dificuldade, como sugerido pelos nossos resultados, seria usar as mais altas concentrações avaliadas de n-dodecano, para aumentar o seu número de gotículas durante a agitação no cultivo. A Figura 34 mostra que em concentrações abaixo de 3,5%, o n-dodecano propiciou baixa atividade ASNase EC. O uso de concentrações maiores que 3,5% de n-dodecano favoreceram a permeabilidade celular, mostrando efeito de interação

com a glicina, o que permitiu diminuir a concentração do aminoácido, evitando níveis de estresse crítico para a célula, como foi descrito anteriormente. Foi observado, que apesar de reduzir a biomassa em altas concentrações de n-dodecano (Figura 36), ele apresentou efeito positivo na viabilidade celular (Figura 37). Isto seria devido à capacidade do n-dodecano em aumentar o coeficiente de transferência de oxigênio para a célula (WEI; LIU, 1998), fazendo com que a mesma viva em franca aerobiose com a concomitante diminuição da produção de acetato, como foi encontrado por Silva et al. (2008) para a cultivos da bactéria *Bacillus licheniformis thermophilic*.

Frente ao exposto, ficou claro que se deve alcançar um compromisso entre o crescimento (biomassa), a viabilidade e a permeabilidade celular de tal modo a permitir uma secreção alta de ASNase com o menor estresse celular. Por outro lado, temos considerado que em cultivos sem adição de glicina e/ou n-dodecano foram determinados: $0,17 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade ASNase EC; $2,94 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, e $1099 \pm 30 \text{ cfu} \times 10^6$ de células viáveis por mg de massa celular seca. No presente trabalho, os dados obtidos apontam ao uso simultâneo de glicina (0,6 - 1,0 % w/v) e n-dodecano (acima 5,0 % w/v), o que poderia aumentar a secreção de ASNase para meio extracelular em até 13,5 vezes, sem afetar a viabilidade celular e a biomassa.

5.4.7. Avaliação da temperatura de pós-indução e perfil de expressão da ASNase

O início da indução pelo uso de IPTG, implica uma sobrecarga metabólica que prejudica os parâmetros cinéticos de crescimento do hospedeiro; e decorrente da alta velocidade na super expressão, como mostrado neste trabalho anteriormente. Também podem ocorrer sérios problemas durante a expressão: conformação incorreta ou anormal da proteínas recombinantes, podendo sofrer degradação proteolítica ou formando agregados insolúveis de proteínas não nativas conhecidas como corpos de inclusão (BANEYX; MUJACIC, 2004). Várias estratégias têm sido empregadas para evitar estas limitações metabólicas ocorridas durante a expressão, as quais poderiam ser classificadas em duas abordagens: modificação genética ou modificação das

condições de cultivo (CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013). Neste trabalho foram avaliadas modificações no cultivo.

Dentro da estratégia de cultivo para melhorar a expressão, devem ser considerados os estudos anteriores realizados: (1) estudos de início da indução, no qual foi mostrado que a células eram mais eficientes quando induzidas no final da fase exponencial; e (2) a permeabilização das células, que oferece melhores condições para a proteína recombinante, cuja acumulação no espaço periplasmático poderia dar problemas de expressão similar ao caso da expressão citoplasmática, tendo como consequência a formação de corpos de inclusão (ARIÉ et al., 2006) ou atividade de proteases periplasmáticas (GOEMANS; DENONCIN; COLLET, 2014).

Não obstante, a expressão da ASNase para o espaço periplasmático, implica em um processo chamado translocação, onde a proteína recém expressa no citoplasma (pre-proteína) é ligada a uma sequência sinalizadora de exportação através da membrana celular interna, sendo os transportadores constituídos por proteínas de membrana específicas (Sec), os quais só aceitam proteína na forma primária (cadeia de aminoácidos sequenciais) (NATALE; BRÜSER; DRIESSEN, 2008). Esta translocação encontra-se limitada à quantidade de transportadores Sec, pelo qual em alta expressão da ASNase, a pre-proteína fica acumulada no citoplasma e exposta a condições deste local, o que poderia favorecer os problemas descritos acima.

Como estratégia de indução avaliou-se o tempo de pós-indução e a temperatura de pós-indução, com intuito de diminuir as condições de estresse para obter ASNase na forma solúvel e aumento da produtividade.

A Figura 38 mostra o perfil de expressão da ASNase após indução com IPTG (1 mM) no final da fase logarítmica de crescimento (4 h) durante 24 h (em células permeabilizadas e não permeabilizadas), com diferentes temperaturas de pós-indução (37 °C e 25 °C). A permeabilização celular foi conseguida pelo crescimento em meio com suplementação de glicina (0,8% w/v) e n-dodecano (6,0% v/v) (Figura 38B e 38D). Na literatura tem sido apontada a redução da temperatura de pós-indução como fator de aumento da produtividade da

asparaginase (LI et al., 2014; SEVASTSYANOVICH et al., 2009). Segundo os autores citados, a menor velocidade de expressão ajudaria a equilibrar a velocidade de síntese de pre-proteínas e a velocidade de translocação. Porém, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o uso de temperaturas baixas de pós-indução (25 °C) (Figuras 38A e 38B), foi desfavorável na produtividade volumétrica do processo. Inclusive foi afetada a secreção extracelular de ASNase nas células permeabilizadas, como observado no rendimento de ASNase EC durante as 24 h de pós-indução (Figura 38B). Isto pode acontecer devido ao maior tamanho da ASNase na forma ativa (estrutura quaternária tetramérica de MM 140 kDa), que, uma vez completada a sua conformação no espaço periplasmático, tem dificuldade para passar através da membrana celular externa, porque a 25 °C, a fluidez da membrana celular externa estaria alterada pela reorganização dos lipídeos integrantes da bicamada proteico-lipídica da membrana celular, onde se passa de uma forma cristalina-líquida para uma forma de gel (Di Rienzo e Inouye, 1979). Nesta situação, poderia ocorrer acúmulo de pre-proteínas no citoplasma e no espaço periplasmático, gerando os corpos de inclusão, o que explicaria o baixo rendimento, comparado aos cultivos induzidos a 37 °C (Figura 38C e 38D).

Figura 38. Perfil de expressão e secreção extracelular de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3). Condições da fase de crescimento: 37 °C e 250 rpm. Condições da fase de expressão: início da indução no final da fase exponencial de crescimento (4 h) com

IPTG (1 mM), 250 rpm e temperatura de pós-indução de 37 °C (A e B) ou 25 °C (C e D). Meio de cultivo utilizado: (A e C) Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M e pH 7,0) e suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose e sais de metais; (B e D) Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M e pH 7,0) e suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose, sais de metais, 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano. (□, barra branca) atividade ASNase extracelular; (■, barra cinza) atividade ASNase intracelular; (○) % de secreção extracelular; (◇) produtividade volumétrica em relação à atividade ASNase total. Barra de erro para 3 repetições.

Na pós-indução a 37 °C sem permeabilização celular (Figura 38C) foi encontrado o máximo rendimento (10201 ± 326 IU L⁻¹) da atividade ASNase total às 12 h; depois de 16 h de processo o rendimento diminuiu em 40 % (6120 ± 251 IU L⁻¹). Isto provavelmente ocorreu pela ação das proteases intracelulares e formação de corpos de inclusão, em resposta à alta expressão ASNase, provocando perda da produtividade volumétrica a partir das 8 h de pós-indução. Como esperado, os valores relativos da secreção ASNase ao meio EC mostra mínima variação gradual até atingir $13,6 \pm 0,56$ % às 24 h. No entanto se observamos os valores absolutos (IU mL⁻¹) da atividade EC, notamos que permanece constante a partir das 12h de pós-indução.

No caso da indução de células permeabilizadas (Figura 38D) foram obtidos os melhores valores de produção de ASNase em *E. coli* BL21 (DE3). A diminuição da atividade IC talvez seja consequência do aumento da permeabilidade, corroborado pelo aumento da atividade ASNase no meio EC, que atingiu $89,7 \pm 0,55$ % de secreção de ASNase para o meio de cultivo em 24 h de pós-indução e aumento do rendimento em 50% (15108 ± 346 U L⁻¹ às 24h); além disso, a biomassa não foi afetada significativamente. Esta melhora na produção de ASNase pode ser atribuída a: maior concentração de nutrientes no meio de cultivo, pela suplementação com glicina, a qual de acordo com a classificação feita por Gschaedler e Boudrant (1994) é considerado aminoácido fornecedor de energia (considerando que, na *E. coli* os aminoácidos são catabolizados para fornecer energia ou aminoácidos que são incorporados em proteínas). Também pode ser considerada a presença do n-dodecano, que favorece a oxigenação do cultivo, devido a sua capacidade como carreador de oxigênio. Outras razões do aumento no rendimento podem

ocorrer pela redução do estresse celular durante a expressão (menor ativação das proteases intracelulares e formação de corpos de inclusão) nas células permeabilizadas. Tudo isto contribui para o aumento da produtividade de ASNase.

Considerando a atividade ASNase total, a máxima produtividade volumétrica foi obtida às 8 h de pós-indução para ambos os casos (sem ou com permeabilização de células) (Figura 38). Depois desse período a produtividade diminuiu, o qual não significa que tenha ocorrido perda do produto senão que o aumento da duração do cultivo não compensa a obtenção do produto. No entanto, se considerarmos que o produto de maior interesse é a ASNase EC, a produtividade volumétrica tendeu a aumentar no decorrer da indução, atingindo $480 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ após 24h de pós-indução (Figura 39).

Figura 39. Produtividade de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) em relação ao tempo de pós-indução. Condições da fase de crescimento: 37 °C e 250 rpm. Condições da fase de expressão: início da indução no final da fase exponencial de crescimento com IPTG 1mM, 250 rpm e temperatura de pós-indução de 37 °C. Meio de cultivo: Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose e metais (●); Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose, metais, 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano (○). Barra de erro para 3 repetições.

Como esperado para esta estratégia de obtenção de expressão de ASNase EC, a permeabilidade foi inespecífica na liberação da ASNase do espaço periplasmático da *E. coli* BL21 (DE3) para o espaço extracelular, como observado no SD-PAGE da Figura 40, que mostra o perfil proteico do

sobrenadante livre de células a partir de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) em diferentes tempos pós-indução. Nota-se o aumento na banda correspondente à ASNase (35 kDa), que explica a maior secreção em tempos de pós-indução mais prolongados, embora a maior permeabilidade celular também permitiu a secreção de outras proteínas periplasmáticas (bandas adicionais). No entanto, esta estratégia de produção extracelular oferece grandes vantagens, pois o espaço periplasmático contém apenas 4 % a 8 % da proteína celular total (FRENCH; KESHAVERZ-MOORE; WARD, 1996). Dessa forma, e considerando os pontos descritos acima, a estratégia proposta neste trabalho para a expressão extracelular da enzima é simples e implica o uso de agentes de permeabilização baratos e amplamente encontrados no mercado. Inclusive pode ser aplicada para a obtenção extracelular de outras proteínas recombinantes, sem uso de ferramentas de biologia molecular.

Figura 40. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do perfil de expressão ASNase extracelular pela *E. coli* BL21 (DE3). Cultivos crescidos em meio LB modificado para permeabilizar membrana celular (adição de glicina e n-dodecano) induzidos no final da fase exponencial com 1mM IPTG, a 250 rpm. Temperatura de crescimento/indução: 37/37 °C. (1) Marcador de massa molar; sobrenadante com tempo de pós-indução: (2) 0 h; (3) 4 h; (4) 8 h; (5) 12 h; (6) 16 h; (7) 20 h; (8) 24 h. (9) 1 mg mL⁻¹ de ASNase comercial (10) Referência das massas molares (Precision Plus Protein, BIORAD)

5.4.8. Avaliação da relação de indutor e a concentração celular

Comumente o indutor IPTG é usado para concentração final entre 0,1 e 1mM, na indução da expressão de proteínas recombinantes, que usam sistema promotor *lac*, o qual não é metabolizado pela *E. coli* (MOULTON, 2014). No entanto, foram relatadas perdas no rendimento do processo relacionadas à concentração de IPTG, provavelmente, por concentração insuficiente ou pelo excesso de IPTG, sendo que este último poderia estar associado a efeitos tóxicos e/ou estresse (LAKSHMI G et al., 2014; RAMIREZ et al., 1994).

Como descrito anteriormente, a ativação de nosso sistema promotor hospedeiro-vector (*lac/T7*) implica reação em cascata, que começa com a ligação do IPTG com o repressor *lacI*, o qual se encontra ligado ao promotor *lac* no DNA do hospedeiro (OVERTON, 2014). Apesar disto poder sugerir que, para a ativação do sistema promotor, precisa-se de uma concentração de IPTG relacionada diretamente com a concentração de células do cultivo. Também deve considerar-se que a entrada do IPTG na *E. coli* ocorre por difusão ou em maior medida através do transportador lactose permease da membrana celular da *E. coli* (FERNÁNDEZ-CASTANÉ et al., 2012).

A Figura 41 mostra as produtividades volumétricas totais da ASNase em diferentes proporções de IPTG por grama de massa celular seca, $g_{(msc)}$. Foi determinado que não havia diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) desde 20 até 800 $\mu M_{(IPTG)} g_{(msc)}^{-1}$, enquanto que para menores proporções (4 e 10 $\mu M_{(IPTG)} g_{(msc)}^{-1}$) ocorreu perda da produtividade volumétrica. Isto pode acontecer porque, a partir da proporção de 20 $\mu M_{(IPTG)} g_{(msc)}^{-1}$, foi atingida a concentração de saturação de IPTG intracelular, o que permitiu a ligação completa entre o IPTG e o repressor *lacI*, por conseguinte, a ativação do sistema promotor *lac* da *E. coli*. No caso da proporção 4 e 10 $\mu M_{(IPTG)} g_{(msc)}^{-1}$, situação em que as células não foram induzidas completamente e, por isso, não atingiram a concentração de saturação adequada de IPTG. A deficiência no mecanismo de transporte pela permease, a qual se dá em baixas concentrações de IPTG extracelular, deixaria a entrada de IPTG na célula na dependência do mecanismo de difusão, (FERNÁNDEZ-CASTANÉ; CAMINAL; LÓPEZ-SANTÍN, 2012).

Figura 41. Efeito da proporção da concentração de IPTG (μM) por grama (massa celular seca, msc) de *E. coli* BL21 (DE3) na produtividade volumétrica total de ASNase ($\text{IU L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado para permeabilização celular, em agitador orbital a 250 rpm e 37 °C. Indução com IPTG foi iniciada no final da fase exponencial de crescimento (3,5 h) para as proporções de 4; 10; 20; 40; 200; 400; 600; 800 $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$, durante 24 h de pós-indução. A proporção 0 representa cultivos não induzidos.

A Figura 42, mostra que não há diferença significativa (Tukey, $p < 0,05$) desde 20 até 800 $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$, na produtividade volumétrica da ASNase EC, similar ao encontrado para produtividade volumétrica total, indicando que a secreção da ASNase não foi afetada.

Em comparação com o trabalho de Fernández-Castané e Caminal (2012) para produção de proteína recombinante ramnulose-1-fosfato aldolase (RhuA) em *E. coli* M15 ΔglyA [pREP4] com vetor de expressão *pQE α brham*, o rendimento de expressão aumenta proporcionalmente à proporção $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$ usado (considerando o IPTG inicial), atingindo o máximo rendimento a partir de 2,7 $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$. No nosso caso, essa relação foi 7,4 vezes mais IPTG por grama de célula (20 $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$). Isto seria devido, provavelmente, à maior facilidade do indutor para entrar em contato com o repressor *lacI*, cujo efeito, como descrito por Becker et. al. (BECKER et al., 2014), pode variar dez vezes dependendo da localização do repressor (ligado ao promotor *lac*) no DNA.

Figura 42. Efeito da proporção da concentração de IPTG (μM) por grama (massa celular seca, msc) de *E. coli* BL21 (DE3) na produtividade volumétrica EC de ASNase ($\text{IU L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado para permeabilização celular, em agitador orbital a 250 rpm e 37 °C. Indução com IPTG foi iniciada no final da fase exponencial de crescimento (3,5 h) para as proporções de 4; 10; 20; 40; 200; 400; 600; 800 $\mu\text{M}_{(\text{IPTG})} \text{g}^{-1}_{(\text{msc})}$, durante 24 h de pós-indução. A proporção 0 representa cultivos não induzidos.

Contudo, com a determinação da concentração do IPTG necessária para iniciar a indução, conseguimos reduzir em 20 vezes a concentração de IPTG usada anteriormente, resultando em melhoria da eficiência do processo, uma vez que o excesso do indutor significa maior custo econômico, e no caso da falta de IPTG perda de rendimento e produtividade, como observado neste estudo.

5.5. Estudos de cultivos em biorreator

5.5.1. Avaliação do k_La em presença de n-dodecano

O oxigênio é um importante nutriente em cultivos aeróbios, como para a *E. coli*. No entanto, o seu fornecimento é limitado em meio aquoso; por isso, o conhecimento da taxa de transferência de oxigênio, OTR (termo em inglês *oxygen transfer rate*), é importante para a previsão da via metabólica para o seu crescimento e produção da proteína recombinante; este parâmetro pode ser avaliado pelo valor do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio,

k_{La} , que descreve a eficiência do biorreator para fornecer oxigênio em condições específicas (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

Na Figura 43 observa-se como adição de n-dodecano 6% (v/v) no meio aquoso aumenta os valores de k_{La} para as condições de aeração e agitação avaliadas. Como esperado, para biorreator de tanque agitado, foi observado o aumento do k_{La} , pela relação direta da aeração (fornece oxigênio) e a agitação (fator dispersante) (SCHAEPE et al., 2013). O efeito do n-dodecano no aumento do k_{La} , já foi reportado na literatura científica (DA SILVA et al., 2008; ROLS et al., 1990); como descrito por Garcia-Ochoa e Gomez (2009), para um cultivo em meio aquoso, o oxigênio é transferido desde a bolha de gás para a fase líquida e, finalmente, para dentro da célula (no sítio de fosforilação oxidativa); neste processo a transferência do oxigênio é limitada pela resistência de cada etapa (interface), porém, geralmente, a resistência do filme líquido em torno das bolhas controla a taxa de transferência global. No caso da adição de n-dodecano, por ser de natureza orgânica é imiscível com água, forma-se uma quarta fase líquida orgânica, além das outras três fases: gás (ar), líquido aquoso e sólida (células). Provavelmente, o efeito do n-dodecano ocorre ao nível da interface líquido-gás, diminuindo a tensão superficial do líquido e o diâmetro da bolha de gás, aumentando, desta forma, a área superficial (ROLS et al., 1990). No entanto, como outros hidrocarbonetos, o mecanismo seria complexo, estando envolvidos outros parâmetros: rigidez de interface gás-líquido, retenção de gás, tensão superficial, viscosidade e difusividade (CLARKE; CORREIA, 2008).

Figura 43. Avaliação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em água e n-dodecano (6% v/v) em diferente agitação (400-1000 rpm) e vazão de ar (1,0 e 2,0 volumes de ar por volume de meio por minuto, vvm). Uso do método estático de varredura com nitrogênio y reoxigenação para determinação do k_{La} . (○) água destilada e 1,0 vvm de vazão de ar; (●) água destilada e 2,0 vvm de vazão de ar; (△) 6% de n-dodecano em água destilada e 1,0 vvm de vazão de ar; (▼) 6% de n-dodecano em água destilada e 2,0 vvm de vazão de ar. A barra representa o erro para 3 repetições.

O efeito do n-dodecano seria de menor impacto quando fossem utilizadas condições mais altas de agitação (1000 rpm) e/ou de fluxo de ar (2 vvm) (Figura 43). Mas, operar em condições altas de agitação e de fluxo de ar, acarreta problemas no escalonamento do processo, devido ao maior custo do processo ou limitações mecânicas (MERCHUK, 1991). Por isso, seria vantajoso o uso do n-dodecano, que nas condições operacionais de 500 rpm e 1vvm, que foram utilizadas nos cultivos em biorreator deste trabalho, obteve-se o valor de $88,3 \pm 0,6 \text{ h}^{-1}$ para o k_{La} , o qual representou aumento de 14% em relação à ausência do n-dodecano (6% v/v) no meio de cultivo.

5.5.2. Avaliação da fase de crescimento

De acordo com o esquema de bioprocessos de David et al. (2011), o escalonamento de cultivo para biorreator (0,5 - 5L) complementa os estudos realizados em agitador orbital, na qual foram determinadas as melhores

condições que favorecem a produtividade, e contribui para a compreensão do processo, o que vai permitir o escalonamento para uma maior escala. Nosso estudo em biorreator, envolve a avaliação do comportamento das etapas de crescimento e indução, a partir dos parâmetros cinéticos obtidos em cada etapa.

Foi feito a ampliação da escala do meio LB modificado para permeabilização celular, utilizando as mesmas condições dos estudos em agitador orbital, porém com controle da oxigenação do cultivo; o volume de cultivo usado nos estudos de agitador orbital foi aumentado 80 vezes. A Figura 44, mostra o cultivo de 2L sem indução da *E. coli* BL21 (DE3), observando-se diferenças no crescimento em relação a cultivos feitos em agitador orbital. O crescimento neste sistema permitiu obter até $4,5 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que para agitador orbital foi $4,2 \text{ g L}^{-1}$, isto devido, provavelmente, ao aumento da eficiência do consumo de glicose para formação de biomassa e energia; ou então pelo aumento do oxigênio no meio de cultivo. A Tabela 22 mostra os valores de $Y_{s/x}$ e os intervalos da fase logarítmica de crescimento. Esta última diminuiu, provavelmente, pelo rápido consumo da glicose presente no meio de cultivo.

A porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD), é um parâmetro de controle em cultivos em biorreator, sendo mantido entre 20 e 40% pela modificação da agitação e/ou aeração (MOULTON, 2014). A %OD durante todo o cultivo foi maior que 20 % (Figura 44), o qual não é comum em cultivos em biorreator com agitação e aeração constante, que geralmente apresentam falta de oxigênio (REN et. al., 2013; KHANDUANG et. al., 2009; TRINH e SRIENC, 2009). Isto se deve à maior demanda de oxigênio na fase exponencial de crescimento, cuja disponibilidade é garantida pela presença do n-dodecano e que leva ao consumo mais intenso da glicose, decorrendo disto um aumento generalizado da atividade do micro-organismo. Note-se que a disponibilidade de oxigênio durante a fase exponencial de crescimento contribui na eficiência do consumo da glicose pela *E. coli*, e nessa condição, o ciclo de ATC não estaria em condição de saturação (aumento do limiar para atingir inibição pelo substrato), diminuindo a formação de subprodutos inibitórios; isto sugere o aumento da concentração de glicose em cultivos conduzidos em biorreator, que

seria benéfico para obter maior biomassa. A variação do pH seguiu o consumo de glicose pela célula, devido à formação de subprodutos ácidos. O pH inicial se restabelece após o consumo total da glicose.

Figura 44. Curva de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado para permeabilização celular (adição de glicose 5 g L⁻¹; metais traços; 0,1M tampão fosfato pH 7,0; 0,8% de glicina e 6 % de n-dodecano) a 37 °C, obtida em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500rpm de agitação ($k_{La} = 88 \text{ h}^{-1}$). Biomassa obtida (—▼—); pH (—□—); glicose (—★—); oxigênio dissolvido (—◇—)

5.5.3. Avaliação da fase de pós-indução

Uma vez determinado o final da fase exponencial de crescimento, de acordo com resultado da curva de crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 44) foi avaliado o perfil de expressão da ASNase (Figura 45), de forma semelhante aos cultivos conduzidos em agitador orbital. A porcentagem de ASNase secretada para o meio extracelular não excede 80%. No entanto, isto se deve ao aumento da atividade ASNase IC, pois os valores de rendimento ASNase total e ASNase EC foram próximos (Tabela 22).

Figura 45. Perfil de expressão e secreção extracelular de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) em meio LB modificado (adição de glicose 5 g L⁻¹; metais traços; 0,1M tampão fosfato pH 7,0; 0,8% de glicina e 6 % de n-dodecano) a 37 °C, obtida em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500 rpm de agitação (k_{La} de 88 h⁻¹). Condições de indução: início da indução no final da fase exponencial (3,5 h) com IPTG (0,1mM). Atividade ASNase extracelular (□, barra branca); atividade ASNase intracelular (■, barra cinza); % de secreção extracelular (--○--); produtividade volumétrica em relação à atividade ASNase total (—◇—). Barra de erro para 3 repetições.

Figura 46. Produtividade de ASNase EC em relação ao tempo de pós-indução, obtido em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500 rpm de agitação (k_{La} de 88 h⁻¹), 37 °C. Condições fase de indução: adição de IPTG (0,1 mM) no final da fase exponencial a 37 °C. Meio de cultivo: Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L⁻¹ de glicose; metais; 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano. Barra de erro para 3 repetições.

A máxima produtividade volumétrica do cultivo foi obtida em 20 h de pós-indução (Figura 46) (ou 23,5 h de cultivo), que representa obter semelhantes parâmetros de produção com redução de 4 h no tempo de cultivo, comparado com o cultivo em agitador orbital. Provavelmente as melhores condições de oxigenação do biorreator, foram favoráveis para expressão de ASNase, como relatado para a expressão de outras proteínas recombinantes (BHATTACHARYA; DUBEY, 1997; REN et al., 2013). Talvez o oxigênio funcione como ativador da expressão de mais de 200 genes, visando ao ajuste da capacidade metabólica da célula (UNDEN et al., 1995) ou no aumento da estabilidade do vetor de expressão (KONZ; KING; COONEY, 1998). Não obstante, no biorreator às 24 h de pós-indução observou-se perda significativa da produtividade volumétrica, como consequência da redução da atividade ASNase EC (Figura 46). Este resultado, também, foi observado na análise em SDS-PAGE (Figura 47). Considerando que o cultivo em biorreator às 16 h de pós-indução levou a 75% de secreção de ASNase, superior, portanto, aos 50% obtidos com agitador orbital (Figura 38D), a perda da produtividade poderia estar relacionada à estabilidade da ASNase, decorrente do maior tempo que a proteína fica exposta às condições do meio extracelular.

Figura 47. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do perfil de expressão ASNase extracelular pela *E. coli* BL21 (DE3) em biorreator. Condições de cultivo: 1vvm vazão de ar e 500 rpm de agitação ($k_L a$ de 88 h^{-1}), 37°C . Condições fase de indução: adição de IPTG (0,1 mM) no final da fase exponencial a 37°C . Meio de cultivo: Luria Bertani fosfato tamponado (0,1 M pH 7,0) e suplementado com 5 g L^{-1} de glicose; metais; 0,8 % (w/v) de glicina e 6,0 % (v/v) de n-dodecano. (1) Marcador de massa molar;

sobrenadante com tempo de pós-indução: (2) 0 h; (3) 4 h; (4) 12 h; (5) 16 h; (6) 20 h; (7) 24 h; (8) 1 mg mL⁻¹ de ASNase comercial (10) Referência das massas molares (Precision Plus Protein, BIORAD)

Tabela 22. Comparação dos parâmetros cinéticos de crescimento e de produção de ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) em agitador orbital e biorreator.

Parâmetro	Agitador orbital		Biorreator
	LB modificado	LB modificado para permeabilização	LB modificado para permeabilização
μ_x (h ⁻¹)	0,92 ± 0,01	0,95 ± 0,09	1,013
t_g (min)	45,4 ± 0,3	43,8 ± 3,4	40,03
Intervalo fase exponencial (h)	0,5 h ≤ t ≤ 4,0 h	1,0 h ≤ t ≤ 4,0 h	1,0 h ≤ t ≤ 3,5 h
X após indução (g L ⁻¹)	3,33 ± 0,02	3,26 ± 0,01	2,63
$Y_{x/s}$	0,78 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,85
Tempo cultivo (h) *	20	28	23,5
$Pv_{(EC)}$ (IU L ⁻¹ h ⁻¹)	43,6 ± 3,6	484 ± 14	525 ± 17
Rendimento ASNase EC (IU L ⁻¹)	872 ± 72	13551 ± 394	12340 ± 402
Rendimento ASNase Total (IU L ⁻¹)	10140	15107	16927
% ASNase secretada	8,6 ± 0,4 %	89,7 ± 0,55	72,9 ± 1,2

*: tempo de cultivo para atingir a máxima $Pv_{(EC)}$; μ_x : velocidade de crescimento; t_g : tempo de geração; X: biomassa; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em células; $Pv_{(EC)}$: produtividade volumétrica extracelular.

A Tabela 22, é um resumo dos parâmetros de crescimento e produção, para observar as vantagens do cultivo em meio LB modificado para permeabilização celular. Em geral se observam melhoras nos parâmetros cinéticos de crescimento em biorreator, havendo redução da biomassa obtida após indução. Talvez a maquinaria metabólica da *E. coli* BL21 (DE3) em biorreator estivesse mais voltada à expressão de ASNase, como os parâmetros de produção sugerem. Contudo, o cultivo em meio LB modificado para permeabilização celular ofereceu aumento de 14 vezes no rendimento e de 12 vezes na produtividade volumétrica EC.

Na literatura científica existem trabalhos bem-sucedidos para produção ASNase EC, onde pelo uso de sistema descontínuo alimentado, a densidade celular conseguiu aumento da biomassa acima de 40 g L⁻¹. Por exemplo, AGHAEPOOR et al. (2011) relata ter atingido rendimento de 130 IU mL⁻¹ (mais de 10 vezes o nosso resultado) de atividade ASNase EC produzido em

E. coli BL21 (DE3) com vetor de expressão *pEPasp3*, porém em cultivos desenvolvidos em sistema descontínuo alimentado. Outro estudo mostrou que o rendimento de ASNase EC, obtido em *E. coli* BLR (DE3) e vetor de expressão *pET-22b*, foi aumentado 41,5 vezes pelo uso de sistema descontínuo alimentado para crescimento comparado com cultivos em agitador orbital, atingindo $8,5 \times 10^5$ IU L⁻¹ (KHUSHOO et al., 2004; KHUSHOO; PAL; MUKHERJEE, 2005). Frente aos resultados obtidos em regime descontínuo alimentado descrito na literatura, os obtidos no presente trabalho são promissores, sobretudo, levando em conta a possibilidade futura de se realizar cultivos em regime descontínuo alimentando com alta densidade inicial de células.

6. CONCLUSÕES

- O início do cultivo em agitador orbital com inóculo crescido de 5 ou 12 h para concentração de 0,1 de DO₆₀₀ (0,07 g L⁻¹ de biomassa) permitiu melhor obtenção de biomassa.
- O acetato exógeno tem influência significativa na obtenção de biomassa a partir de 6 g L⁻¹, enquanto que para expressão de ASNase em cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) conduzidos em agitador orbital não há diferença significativa.
- No crescimento da *E. coli* BL21 (DE3), a variação do pH nos cultivos influencia negativamente a obtenção de biomassa. A adição de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 foi necessário para neutralizar os efeitos dos subprodutos do metabolismo celular, trazendo como vantagem o aumento da concentração da fonte de carbono (fator limitante do meio LB) para favorecer o aumento da biomassa.
- O método do choque osmótico ofereceu 57,5% de liberação de ASNase intracelular em relação à liberação obtida no método padronizado de rompimento pelo uso de pérolas de vidro em ciclos de agitação/resfriamento.

- Os cultivos tiveram maior produtividade na expressão de ASNase, quando foi iniciada a indução no final da fase exponencial de crescimento.
- Melhor rendimento ($1916 \pm 122 \text{ IU g}^{-1}$) e produtividade volumétrica ($683 \pm 63 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de atividade ASNase foi obtido quando a glicose para concentração de 5 g L^{-1} foi adicionada no meio de cultivo LB tamponado.
- A suplementação de sais de metais no meio LB tamponado oferece os micronutrientes necessários para cultivos de 25 g L^{-1} de *E. coli* BL21 (DE3).
- A proporção de $20 \mu\text{M}$ de IPTG por grama de células contribuiu na melhor eficiência do processo, evitando condições limitantes ou uso em excesso de indutor (IPTG).
- Uso de glicina 0,8% (w/v) e n-dodecano 6% (v/v) aumentou a permeabilização celular da *E. coli* BL21 (DE3) para secreção do 89% da ASNase, em cultivos conduzidos em agitador orbital, sem causar perda significativa da biomassa e viabilidade celular.
- A melhor produtividade volumétrica de ASNase EC ($484 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ocorreu em temperatura de pós-indução de 37°C durante 24 h, obtendo 89% de secreção extracelular de ASNase em cultivos conduzidos em agitador orbital.
- O crescimento da *E. coli* BL21 (DE3) em biorreator de 3L atingiu o final da fase exponencial às 3,5 h de cultivo em meio LB modificado para permeabilidade celular, e foi obtida melhoria da eficiência do consumo da glicose ($Y_{X/S} = 0,85$) em comparação aos cultivos em agitador orbital ($Y_{X/S} = 0,75$).
- Em meio LB modificado para permeabilidade celular, foi obtida a maior expressão da ASNase pela *E. coli* BL21 (DE3) crescida em sistema descontínuo (biorreator de 3L), às 20 h de pós-indução (23,5 h de cultivo), atingindo 72 % de secreção ASNase e $525 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de produtividade volumétrica EC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEPOOR, M. et al. High level of extracellular fermentation and alternative purification of *Escherichia coli* Asparaginase II. **Biharean Biologist**, v. 5, n. 2, p. 96–101, 2011.
- AGUILERA, S. et al. *Escherichia coli*'s OmpA as biosurfactant for cosmetic industry: stability analysis and experimental validation based on molecular simulations. **Advances in intelligent system and computing**, v. 232, n. January, p. 265–273, 2014.
- ÅKESSON, M.; HAGANDER, P.; AXELSSON, J. P. Probing control of fed-batch cultivations: analysis and tuning. **Control Engineering Practice**, v. 9, n. 7, p. 709–723, jul. 2001.
- ALONSO, M. et al. Degradation of aggrecan precursors within a specialized subcompartment of the chicken chondrocyte endoplasmic reticulum. **Biotechnology Journal**, v. 495, p. 487–495, 1996.
- AMRO, N. A. et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: Structural basis for permeability. **Langmuir**, v. 16, n. 15, p. 2789–2796, 2000.
- ANDERSEN, K. B.; VON MEYENBURG, K. Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 114–123, 1980.
- ARIÉ, J. P. et al. Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 427–437, 2006.
- ARIGA, O. et al. Release of Thermophilic α -Amylase from Transformed *Escherichia coli* by Addition of Glycine. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 4, p. 243–246, 1989.
- AXE, D. D.; BAILEY, J. E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 1, p. 8–19, 1995.
- BAIG, F. et al. Dynamic transcriptional response of *Escherichia coli* to inclusion body formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 5, p. 980–999, 2014.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411–421, 1999.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, 2004.
- BANSAL-MUTALIK, R.; GAIKAR, V. G. Cell permeabilization for extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* by reverse micellar solutions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 1, p. 14–26, 2003.

BAYER, M. E.; LEIVE, L. A. Effect of Ethylenediaminetetraacetate *Escherichia coli* the Surface of. **Journal of Bacteriology**, v. 130, n. 3, p. 18–20, 1977.

BECKER, N. A. et al. Bacterial promoter repression by DNA looping without protein-protein binding competition. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 9, p. 5495–5504, 2014.

BHATTACHARYA, S. K.; DUBEY, A. K. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 5, p. 355–360, abr. 1997.

BOTSFORD, J. L. Induction of Tryptophanase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, n. 1, p. 380–390, 1975.

CALCOTT, P. H.; MACLEOD, R. A. The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage. **Canadian journal of microbiology**, v. 21, n. 12, p. 1960–1968, 1975.

CARLSON, R.; SRIENC, F. Fundamental *Escherichia coli* Biochemical Pathways for Biomass and Energy Production: Identification of Reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 1–19, 2004.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 396–408, 10 abr. 2013.

CASTAN, A.; ENFORS, S.-O. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli*. **Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 6, p. 509–515, 13 jun. 2000.

CASTAÑO-CEREZO, S. et al. Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N^ε-lysine acetylation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3533–3545, 2015.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; DOS SANTOS, M. E. F. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. **Revista HCPA**, v. 30, n. 1, p. 5–11, 2010.

CEDAR, H. SCHWARTZ, J. Localization of the Two L-Asparaginases in Anaerobically Grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, n. August, p. 3753–3755, 1967.

CHEN, R. et al. Primary structure of major outer membrane protein II * (ompA protein) of *Escherichia coli* K-12 Biochemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 8, p. 4592–4596, 1980.

CHESELLES, J. M. et al. The impact of age on outcome in lymphoblastic leukaemia; MRC UKALL X and XA compared: a report from the MRC Paediatric and Adult Working Parties. **Leukemia**, v. 12, n. 4, p. 463–73, abr. 1998.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625–

35, jun. 2004.

CLARK, D. P. The fermentation pathways of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology reviews**, v. 5, n. 3, p. 223–34, 1989.

CLARKE, K. G.; CORREIA, L. D. C. Oxygen transfer in hydrocarbon-aqueous dispersions and its applicability to alkane bioprocesses: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 405–429, 2008.

COONEY, C. L. Bioreactors: Design and Operation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, p. 728–33, 1983.

CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer**, v. 76, n. 12, p. 2393–2417, 1995.

CURLESS, C.; POPE, J.; TSAI, L. Effect of preinduction specific growth rate on recombinant alpha consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. **Biotechnology progress**, v. 6, n. 2, p. 149–52, 1990.

DA SILVA, T. L. et al. Physiological effects of the addition of n-dodecane as an oxygen vector during steady-state *Bacillus licheniformis thermophilic* fermentations perturbed by a starvation period or a glucose pulse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 208–216, 2008.

DAVID, F. et al. Antibody production in *Bacillus megaterium*: Strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 12, p. 1516–1531, 2011.

DE LEÓN, A. et al. Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 301–305, 2003.

DE MARÉ, L. et al. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 14, p. 983–90, jul. 2005.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DHAMARDI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: A new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 821–29, 2006.

DIRIENZO, J. M.; INOUE, M. Lipid fluidity-dependent biosynthesis and assembly of the outer membrane proteins of *E. coli*. **Cell**, v. 17, n. 1, p. 155–161, 1979.

DOELLE, H. W.; EWINGS, K. N.; HOLLYWOOD, N. W. Regulation of Glucose Metabolism in Bacterial Systems. **Springer Berlin Heidelberg**, 1982. (Nota técnica).

DOS SANTOS, P. C.; DEAN, D. R. A newly discovered role for iron-sulfur clusters.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 33, p. 11589–11590, 2008.

DVORAK, P. et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 201, 2015.

EGLER, R.; AHUJA, S.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62, 2016.

ENFORS, S.-O. Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: **Physiological stress responses in bioprocess**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2004. v. 89p. 163–95.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Spectrila asparaginase**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002661/WC500200541.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2016.

FAGERBAKKE, K. M.; HELDAL, M.; NORLAND, S. Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 10, n. 1, p. 15–27, 1996.

FERNÁNDEZ-CASTANÉ, A. et al. Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 3, p. 391–398, 2012.

FERNÁNDEZ-CASTANÉ, A.; CAMINAL, G.; LÓPEZ-SANTÍN, J. Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures. **Microbial cell factories**, v. 11, p. 58, 2012.

FINNEY, L. A; O'HALLORAN, T. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5621, p. 931–936, 2003.

FRANDSEN, T. L. et al. Complying with the European Clinical Trials directive while surviving the administrative pressure - an alternative approach to toxicity registration in a cancer trial. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 50, n. 2, p. 251–9, jan. 2014.

FRENCH, C.; KESHAVARZ-MOORE, E.; WARD, J. M. Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 5, p. 332–338, 1996.

GALLOWAY, C. A.; SOWDEN, M. P.; SMITH, H. C. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. **BioTechniques**. [s.l: s.n.].

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in

microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009.

GEORGIU, G.; SHULER, M. L.; WILSON, D. B. Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of beta-lactamase overproduction in *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 32, n. 6, p. 741–748, 1988.

GOEMANS, C.; DENONCIN, K.; COLLET, J. F. Folding mechanisms of periplasmic proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1517–1528, 2014.

GONÇALVES, G. A L. et al. Engineering of *Escherichia coli* strains for plasmid biopharmaceutical production: Scale-up challenges. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2847–50, 19 maio 2014.

GRAHAM, A. I. et al. Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: Roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 18377–18389, 2009.

GRAUMANN, K.; PREMSTALLER, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 164–186, 2006.

GSCHAEDLER, A.; BOUDRANT, J. Amino acid utilization during batch and continuous cultures of *Escherichia coli* on a semi-synthetic medium. **Journal of Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 235–251, 1994.

GUILLEMIN, M.; LARSON, W. The relation between the fixed and free salts of bacteria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 349–355, 1922.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923–9, jul. 2012.

HAMILTON-MILLER, J. M. Damaging effects of ethylenediaminetetra-acetate and penicillins on permeability barriers in Gram-negative bacteria. **The Biochemical journal**, v. 100, n. 3, p. 675–682, 1966.

HAMMES, W.; SCHLEIFER, K. H.; KANDLER, O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. **Journal of Bacteriology**, v. 116, n. 2, p. 1029–1053, 1973.

HAN, K.; LIM, H. C.; HONG, J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 39, n. 6, p. 663–671, 1992.

HARRISON, S. T. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology advances**, v. 9, p. 217–240, 1991.

HEINEMANN, B.; HOWARD, A. J. Production of Tumor-Inhibitory L-Asparaginase by Submerged Growth of *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 4, p.

550–554, 1969.

HELDAL, M.; NORLAND, S.; TUMYR, O. X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1251–1257, 1985.

HENKEL, S. G. et al. Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.

HO, C. S.; JU, L. K.; BADDOUR, R. F. Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of n-hexadecane. **Biotechnology and bioengineering**, v. 36, n. 11, p. 1110–8, 20 dez. 1990.

HOLM, R. H.; KENNEPOHL, P.; SOLOMON, E. I. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2239–2314, 1996.

HOSONO, K.; KAKUDA, H.; ICHIHARA, S. Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. February 2015, p. 256–261, 1995.

HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399, 2012.

HUMMEL, W.; KULA, M.-R. Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 9, n. 3, p. 201–209, 1989.

IKURA, Y. Effect of Glycine and Its Derivatives on Production and Release of γ - Galactosidase by *Escherichia coli*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2747–2753, 1986.

IMADA, A et al. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of general microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85–99, maio 1973.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. 2014. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

JAMES, G. T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 574–579, 1978.

JENSEN, E. B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 1, p. 1–11, 1990.

JESPER, V. et al. Synthesis of proteins in *E. coli* is limited by the concentration of free ribosomes. **Journal of Molecular Biology**, 1993. Disponível em: <www.sciencedirect.com>

JONASSON, P. et al. Genetic design for facilitated production and recovery of

recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 35, n. Pt 2, p. 91–105, abr. 2002.

JONGE, B. L. M. D. et al. Effect of exogenous glycine on peptidoglycan composition and resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 6, p. 1498–1503, 1996.

JUNKER, B. H.; HATTON, T. A; WANG, D. I. Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. experimental observations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 35, n. 6, p. 578–85, 15 mar. 1990.

KADERBHAI, N. et al. Glycine-induced extracellular secretion of a recombinant cytochrome expressed in *Escherichia coli*. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 25 (Pt 1), n. March 1997, p. 53–61, 1997.

KHUSHOO, A. et al. Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein expression and purification**, v. 38, n. 1, p. 29–36, nov. 2004.

KHUSHOO, A.; PAL, Y.; MUKHERJEE, K. J. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 189–97, ago. 2005.

KIEFHABER, T. et al. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. **Nature**, v. 9, p. 825–829, 1991.

KIM, T.-S. et al. Reduction of Acetate and Lactate Contributed to Enhancement of a Recombinant Protein Production in *E. coli* BL21. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1093–1100, 2015.

KOCH, A. L. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. **Analytical Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 252–259, 1970.

KOCH, A L. Biomass growth rate during the prokaryote cell cycle. **Critical reviews in microbiology**, v. 19, n. 1, p. 17–42, 1993.

KOH, B. T. et al. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *E. coli* K12 strains. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 12, p. 1115–1118, 1992.

KOKA, A. et al. A 17-year experience with ALL-BFM protocol in acute lymphoblastic leukemia: Prognostic predictors and interruptions during protocol. **Leukemia research**, 28 mar. 2014.

KONZ, J. O.; KING, J.; COONEY, C. L. Effects of oxygen on recombinant protein expression. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 3, p. 393–409, 1998.

KOSINSKI, M. J.; BAILEY, J. E. Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal beta-galactosidase in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 18, n. 1–2, p. 55–68, abr. 1991.

KRAUSE, M. et al. A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 11, 2010.

KULA, M.; SCHIITTE, H. Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells. **Biotechnology Progress**, v. 3, n. 1, p. 31–42, 1987.

KUMAR, K. et al. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 55, n. 2, p. 256–62, fev. 2014.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 670–685, 1970.

LAKSHMI G, J. et al. Molecular Cloning, High Level Expression and Activity Analysis of Constructed Human Interleukin – 25 Using Industrially Important IPTG Inducible *Escherichia coli* BL21 (DE3). **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v. 6, n. 3, p. 19–30, 2014.

LAPORT, G. F.; LARSON, R. A. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Seminars in oncology**, v. 24, p. 70–82, 1997.

LECINA, M. et al. IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 78–83, jan. 2013.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, mar. 1996.

LEIVE, L. The barrier function of the gram-negative envelope. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, p. 109–129, 1974.

LEUKAEMIA & BLOOD FOUNDATION. **Leucemia Linfoblástica Aguda**. [s.l: s.n.].

LI, T.-H.; CHEN, T.-L. Enhancement of glucose oxidase fermentation by addition of hydrocarbons. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 4, p. 298–303, jan. 1994.

LI, Z. et al. Novel insight into the secretory expression of recombinant enzymes in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 599–603, abr. 2014.

LI, Z.; NIMTZ, M.; RINAS, U. The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 45, 2014.

LU, J. et al. Fermentation optimization of maltose-binding protein fused to neutrophil-activating protein from *Escherichia coli* TB1. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 281–285, 2015.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004–11, abr. 1990.

LUNDBECK, DEERFIELD, IL, U. **Discontinuation of Elspar**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/DrugShortages/UCM321556.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2016.

MALAKAR, P. et al. Effect on β -galactosidase synthesis and burden on growth of osmotic stress in *Escherichia coli*. **Springer Open Journal**, v. 3, p. 1–10, 2014.

MARJAN, S. et al. Physiological and morphological changes of recombinant γ *E. coli* during over-expression of human interferon- γ in HCDC. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 230–238, 2006.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, K. et al. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 46, 2012.

MERCHUK, J. C. Shear effects on suspended cells. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 44, n. July 1988, p. 65–95, 1991.

MERGULHÃO, F. J. M.; SUMMERS, D. K.; MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 3, p. 177–202, 2005.

MINISTERIO DA SAÚDE. **SIPAR 25000.041679/2013**. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/12/25000-041679-2013-inexigibilidade-medicamento.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Portaria 2888: Lista de produtos estratégicos para o SUS 2015**. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/images/portarias/dezembro2014/dia31/portaria2888.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2011.

MONCANY, M. L.; KELLENBERGER, E. High magnesium content of *Escherichia coli* B. **Experientia**, v. 37, n. 8, p. 846–847, 1981.

MOULTON, G. G. Capítulo 3: Recombinant fed-batch fermentation using *Escherichia coli*. Fed-batch fermentation: A practical guide to scalable recombinant protein production in *Escherichia coli*. UK: Elsevier, 2014. p. 63-106

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

MURARKA, A. et al. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1124–1135, 2008.

NANCIB, N.; BRANLANT, C.; BOUDRANT, J. Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of a recombinant strain of *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 165–169, 1991.

NATALE, P.; BRÜSER, T.; DRIESSEN, A. J. M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and

mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 9, p. 1735–1756, 2008.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J.L. Physiology of bacterial cell. A molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 1-30, 1990 (ISBN: 0-87893-608-4)

NEU, H. C.; HEPPEL, L. A. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 9, p. 3685–3692, 1965.

NEUBAUER, P. et al. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 36, p. 739–744, 1992.

NI, Y.; CHEN, R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1661–1670, 2009.

NOSSAL, N. G.; HEPPEL, L. A. The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 13, p. 3055–3062, 1966.

OUTTEN, C. E.; O'HALLORAN, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5526, p. 2488–2492, 2001.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590–601, 2014.

PADAN, E.; ZILBERSTEIN, D.; ROTTENBERG, H. The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 63, n. 2, p. 533–541, 1976.

PANDA, A.; KHAN, R.; MISHRA, S. Influences of yeast extract on specific cellular yield of ovine growth hormone during fed-batch fermentation of *E. coli*. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 379–383, 2000.

PASTAN, I.; ADHYA, S. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. **Bacteriological reviews**, v. 40, n. 3, p. 527–551, 1976.

PETERSON, M. E. et al. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. **The Biochemical journal**, v. 402, n. 2, p. 331–337, 2007.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia asparaginase*. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–49, 15 jan. 2011.

PILAREK, M.; GLAZYRINA, J.; NEUBAUER, P. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escherichia coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-batch cultures. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 50, jan. 2011.

PINSENT, J. The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria. **The Biochemical journal**, v. 57, n. 1, p. 10–16, 1954.

PIRT, S. J. (1975): Principles of Microbe Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. **Seminars in hematology**, v. 50, n. 3, p. 185–96, jul. 2013.

RAMANAN, R. N.; LING, T. C.; ARIFF, A. B. The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 613–623, 2008.

RAMIREZ, T. et al. Kinetic Study of Penicillin Acylase Production by Recombinant *E. coli* in Batch Cultures. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 197–206, 1994.

RANQUET, C. et al. Cobalt stress in *Escherichia coli*: The effect on the iron-sulfur proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30442–30451, 2007.

REN, Q. et al. High level production of tyrosinase in recombinant *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 18, 2013.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422–430, 1999.

ROBERTS, R. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1956.

ROLS, J. L. et al. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 35, n. 4, p. 427–35, 20 fev. 1990.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

ROUF, M. A. Spectrochemical Analysis of Inorganic Elements in Bacteria. Spectrochemical Analysis of Inorganic Elements in Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 88, n. 6, p. 1545–1549, 1964.

ROZKOV, A et al. Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 909–15, 30 dez. 2004.

SCHAEPE, S. et al. K_{La} of stirred tank bioreactors revisited. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 576–583, 2013.

SCHÜTTE, H.; KULA, M.-R. Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 9, p. 552–558, 1988.

SEVASTSYANOVICH, Y. et al. Exploitation of GFP fusion proteins and stress avoidance as a generic strategy for the production of high-quality recombinant proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, n. 1, p. 86–94, 2009.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746–8749, 2007.

SHILOACH, J.; BAUER, S. High- $\bullet$ yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XVII, n. 2, p. 227–239, 1975.

SHIN, C. S. et al. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pET-3aT2M2]. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 3, p. 249–257, 1997.

SHOKRI, A; SANDÉN, A M.; LARSSON, G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 6, p. 654–64, fev. 2003.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, p. 1–12, 2015.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2010.

SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 76–85, 1985.

SOINI, J.; UKKONEN, K.; NEUBAUER, P. High cell density media for *Escherichia coli* are generally designed for aerobic cultivations - consequences for large-scale bioprocesses and shake flask cultures. **Microbial cell factories**, v. 7, p. 26, 2008.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–28, 26 jan. 2005.

SRIKHANTA, Y. N. et al. Distinct physiological roles for the two L -asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 436, p. 362–365, 2013.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Media for Industrial Fermentations. In: **Principles of Fermentation Technology**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 1999. p. 93–110.

STARY, J. et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 3, p. 174–84, 20 jan. 2014.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of molecular biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1474–8, 15 fev. 1993.

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current opinion in biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 195–201, abr. 2001.

THOMAS, A.; SCHLENDER, K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-C-glucose. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 486–499, 1968.

UNDEN, G. et al. O₂ -Sensing and O₂ -dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 81–90, 1995.

VAN ALPHEN, L. et al. Architecture of the Outer Membrane of *Escherichia coli* III. **Journal of Bacteriology**, v. 134, n. 3, p. 1089–1098, 1978.

VASINA, J. A; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. **Protein expression and purification**, v. 9, n. 2, p. 211–8, mar. 1997.

VENTURA, S.; VILLAVARDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 179–85, abr. 2006.

VORA, A. et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. **The lancet oncology**, v. 14, n. 3, p. 199–209, mar. 2013.

VUORISTO, K. S. et al. Metabolic engineering of the mixed-acid fermentation pathway of *Escherichia coli* for anaerobic production of glutamate and itaconate. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 61, 2015.

WACKER BIOTECH GMBH. **Press release 6**. Disponível em: <https://www.wacker.com/cms/media/en/documents/pressrelease-pdf/medac_asparaginase.pdf>. Acesso em: 1 nov. 2016.

WEI, D. Z.; LIU, H. Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 2, p. 129–131, fev. 1998.

WEINBERG, O. K.; ARBER, D. A. **Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition Leukemia**, 2010.

WOLFE, A. J. The Acetate Switch The Acetate Switch. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005.

XU, B.; JAHIC, M.; BLOMSTEN, G. Glucose overflow metabolism and mixed-acid

fermentation in aerobic large-scale fed-batch processes with *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 51, p. 564–571, 1999.

YAN, H. et al. Cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex regulates heparosan production in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 22, p. 7687–7696, 2015.

YANG, J. et al. One Hundred Seventy-Fold Increase in Excretion of an FV Fragment-Tumor Necrosis Factor Alpha Fusion Protein (sFV/TNF- α) from *Escherichia coli* Caused by the Synergistic Effects of Glycine and Triton X-100. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2869–2874, 1998.

YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. **Nature**, v. 10, p. 1550–1556, 1992.

ZHANG, C. et al. Optimization of Fermentation Process for Human-like Collagen Production of Recombinant *Escherichia coli* Using Response methodology. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 1, p. 137–142, 2010.

ZHOU, S. D.; MCCASKEY, T. A.; BRODER, J. Evaluation of nitrogen supplements for bioconversion of municipal solid waste to lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57–58, n. 1, p. 517–524, 1996.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
BIOQUIMICO-FARMACEUTICA
Av. Lineu Prestes 580 – Ed. Semi Industrial – Cidade Universitária
CEP 05508-000 São Paulo – SP

São Paulo, 08 de dezembro de 2016

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o presente projeto de pesquisa intitulado como “Cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) para produção de l-asparaginase II”, sob orientação do professor titular Michele Vitolo, dispensa avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal e/ou da Comissão Interna de Biossegurança.

Cordialmente,

Prof. Tit. Michele Vitolo
Orientador

Juan Carlos Flores Santos
Orientando

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 8466234/1 - Juan Carlos Flores Santos

Email: jc.flores.santos@usp.br
Cédula de Identidade: Passap - 5759850 -
Local de Nascimento: Peru
Nacionalidade: Peruana
Graduação: Bachiller en Farmacia Y Bioquímica - Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Peru - 2014

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 28/08/2014
Início da Contagem de Prazo: 28/08/2014
Data Limite para o Depósito: 02/01/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Michele Vitolo - 28/08/2014 até o presente. Email: michenzi@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 28/08/2014
Português, Aprovado em 17/08/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 28/08/2016 até 26/12/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/10/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 28/08/2014
Prorrogação em 14/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 14/07/2016

Impresso em: 10/12/2016 20:59:59

9134 - 8466234/1 - Juan Carlos Flores Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	100	A	N	Concluída
PSC5964-1/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	30/09/2014	10/11/2014	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5707-6/2	Técnicas Analíticas de Separação. Parte II. Eletroforese Capilar (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/10/2014	25/11/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5733-5/7	Uso Industrial de Enzimas	02/02/2015	05/04/2015	90	6	95	A	N	Concluída
FBT5738-1/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica III	02/03/2015	10/05/2015	30	2	90	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	80	A	N	Concluída
BTC5704-7/3	Engenharia Bioquímica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	29/09/2015	11/01/2016	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 14/07/2016

Impresso em: 10/12/2016 20:59:59