

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

LETÍCIA DE ALMEIDA PARIZOTTO

**Produção de L-asparaginase por *Pichia pastoris* em cultivos descontínuos-
alimentados em biorreatores**

São Paulo

2022

LETÍCIA DE ALMEIDA PARIZOTTO

**Produção de L-asparaginase por *Pichia pastoris* em cultivos descontínuos-
alimentados em biorreatores**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

Coorientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 05 de agosto de 2022

Assinatura do autor: Leticia de Almeida Parizotto

Assinatura do orientador: Sete

Catálogo-na-publicação

Parizotto, Leticia

Produção de L-asparaginase por *Pichia pastoris* em cultivos descontínuos alimentados em biorreatores / L. Parizotto -- versão corr. -- São Paulo, 2022. 293 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Engenharia Química 2. Biotecnologia 3. Reatores Bioquímicos 4. Proteínas Recombinantes I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II.t.

Nome: PARIZOTTO, Letícia de Almeida

Título: Produção de L-asparaginase por *Pichia pastoris* em cultivos descontínuos-alimentados em biorreatores

Tese apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em: 10/06/2022

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): Aldo Tonso

Instituição: Escola Politécnica – USP

Julgamento: Aprovada

Prof.(a) Dr.(a): Viviane Maimoni Gonçalves

Instituição: Instituto Butantan - ICB

Julgamento: Aprovada

Prof.(a) Dr.(a): Larissa Pereira Brumano

Instituição: UFABC

Julgamento: Aprovada

Prof.(a) Dr.(a): Elisabeth de Fatima Pires Augusto

Instituição: UNIFESP

Julgamento: Aprovada

Prof.(a) Dr.(a): Rosane Aparecida Moniz Piccoli

Instituição: IPT - ICB

Julgamento: Aprovada

*Ao meu mais fiel companheiro de escrita, Gê.
Descanse em paz, pois nós completamos essa missão.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer meu orientador Prof. Dr. Aldo Tonso pelas discussões produtivas, transmissão de conhecimento, por me dar autonomia e suporte sempre com bom humor desde 2011, quando me aceitou como aluna de iniciação científica e me inspirou a seguir o caminho da ciência. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior agradeço pela gentileza de me aceitar no seu grupo de pesquisa, por compartilhar seu conhecimento e experiência e colaborar no meu desenvolvimento como pesquisadora.

Agradeço à Profa. Dra. Ursula Rinas e ao Dr. Zhaopeng Li por me receberem no Instituto de Química da Universidade de Hanôver, por me darem total suporte para o desenvolvimento da tese e por compartilharem seu conhecimento, colaborando para um trabalho mais robusto.

Agradeço à Profa. Doutora Gisele Monteiro e seus alunos, Dr. Brían Effer e Me. Guilherme Lima, por toda sua paciência ao me ensinar técnicas importantes de microbiologia celular, que permitiram a viabilização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por terem tornado essa jornada mais leve e divertida. Em especial, agradeço ao Eduardo por toda parceria no laboratório e sua amizade, sua companhia me ajudou a superar os momentos mais difíceis e tornou muito mais divertidos os momentos de celebração. Também sou muito grata por compartilhar esse momento com a Larissa, Flaviana, Vanessa, Renata, Larissa (Bo), João, Karin, Rafael, Tales, Rominne, e muitos outros que passaram por nosso laboratório. Também agradeço as amigas do “bloco 20”, Gabriela e Daniela. Ademais, agradeço aos colegas que tornaram minha vida na Alemanha mais fácil, Francisco, Carla e John. Além das amizades que garantiram a diversão fora do laboratório, Bárbara, Mayron e Alana.

Enfim, agradeço o apoio incondicional da minha família e do meu parceiro de vida, Bruno, por toda sua paciência, compreensão, pelo tempo e muitos finais de semanas que foram necessários para completar esse trabalho. Essa vitória também é de vocês!

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos nº 2017/25065-9 e 2019/02657-3) agradeço pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa. Assim como o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 (Processo 1626676) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 131606/2016-6).

“Take what you need, do what you should, you will get what you want.”

— Gottfried Leibniz

RESUMO

PARIZOTTO, Letícia de Almeida. Produção de L-asparaginase por *Pichia pastoris* em cultivos descontínuos-alimentados em biorreatores. 2022. 293 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O Brasil é altamente dependente da importação de medicamentos biológicos, o que implica em risco de desabastecimento e dependência dos preços da flutuação cambial. Recentemente, a falta de insumos tem levado a rupturas no estoque do biofármaco L-asparaginase (ASNase), que é utilizado no tratamento de vários cânceres, em especial, da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), um dos principais tipos de câncer infantil. Apesar de dois medicamentos já terem sido registrados desde 2018, o fornecimento não é confiável. Ademais, as formas de ASNase aprovadas para uso clínico são derivadas de bactérias, *Escherichia coli* e *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*), e todas causam reações imunológicas nos pacientes e possuem tempo de meia-vida de apenas algumas horas. Portanto, foram estabelecidos projetos temáticos visando a desenvolver os primeiros passos para a produção nacional de uma ASNase menos imunogênica e mais estável. Em colaboração com esses projetos, esta tese objetiva o desenvolvimento da etapa de *upstream* do processo de produção da enzima recombinante L-asparaginase de *D. chrysanthemi* expressa por uma cepa de *Pichia pastoris* (Glycoswitch[®]) capaz de realizar glicosilação humanizada, desde a geração da linhagem celular até os cultivos em biorreator de bancada. Para alcançar esse objetivo, foi desenvolvida uma nova cepa produtora e foram realizadas melhorias nas estratégias operacionais do processo. Primeiramente, foram transformadas duas cepas da Glycoswitch[®], uma auxotrófica (His⁻) e outra prototrófica (His⁺) para histidina, caracterizadas em termos da expressão do gene *ansB*, codificante da ASNase, e estudadas as condições de cultivo em meio complexo em frascos e em meio sintético em biorreator de 2 L. A análise de qPCR mostrou que a cepa His⁺ possui o dobro de expressão gênica que a His⁻, o que foi condizente com a produtividade obtida em frascos e em biorreator, portanto ela foi selecionada para a continuidade do estudo. Em seguida, o protocolo de indução em biorreator foi modificado do controle da alimentação do indutor (metanol) de malha aberta em pulsos para malha fechada com *DO-stat*, o que resultou no dobro da atividade volumétrica. Posteriormente, adotando princípios de *Quality by Design*, como planejamento experimental, aplicação de ferramentas analíticas e análise com modelos matemáticos, foi realizado um delineamento estatístico para investigar os efeitos da concentração controlada de metanol, oxigênio dissolvido e temperatura sobre a atividade volumétrica da ASNase. Na melhor condição de cultivo, 5 g/L de metanol, 50% de oxigênio dissolvido e 35 °C, foi obtida atividade volumétrica final de 10700 U/L com 84 horas de processo, cerca de oito vezes maior do que em malha aberta. Além disso, o modelo preditivo revelou que o controle do metanol e o aumento da temperatura foram essenciais para esse resultado. Por meio de balanço de carbono foram calculados os coeficientes de conversão a biomassa e produto e observou-se que a temperatura mais alta resultou no aumento deles, o que favoreceu a formação de ASNase ativa. Finalmente, a caracterização da ASNase recombinante por análise MALDI-TOF revelou que ela é glicosilada em um epítipo causador de respostas imunológicas nos pacientes, provavelmente reduzindo seus efeitos colaterais. Portanto, foi desenvolvido um protocolo com alto rendimento de uma ASNase inovadora comparado a outros trabalhos já publicados, que tem potencial de prover um tratamento com mais qualidade de vida para o paciente.

Palavras-chave: L-Asparaginase (ASNase). *Pichia pastoris*. Biorreatores. Auxotrofia. Planejamento Experimental. Balanço de Carbono.

ABSTRACT

PARIZOTTO, Leticia de Almeida. L-asparaginase production by *Pichia pastoris* in batch-fed bioreactors. 2022. 293 p. Thesis (Doctor in Science) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Brazil is highly dependent on the imports of biological medicines, which poses the risk of shortages and price dependence on exchange rate fluctuations. Recently, the lack of supplies has led to disruptions in the stock of the biopharmaceutical L-asparaginase (ASNase), which is used in the treatment of various cancers, particularly Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), one of the main childhood cancers. Although two drugs have been registered since 2018, the supply is unreliable. Moreover, the forms of ASNase approved for clinical use are derived from bacteria, *Escherichia coli* and *Dickeya chrysanthemi* (*Erwinia chrysanthemi*), and all cause immunological reactions in patients and have a half-life of only a few hours. Therefore, thematic projects were established to develop the first steps for the national production of a less immunogenic and more stable ASNase. Collaborating on these projects, this thesis aims to develop the upstream stage of the production process of the recombinant enzyme L-asparaginase from *D. chrysanthemi* expressed by a *Pichia pastoris* strain (Glycoswitch[®]) capable of humanized glycosylation, from cell line development to bench bioreactor cultures. To achieve this goal, a new producing strain was created and improvements were made to the operational strategies of the process. First, two strains of Glycoswitch[®] were transformed, one auxotrophic (His⁻) and the other prototrophic (His⁺) to histidine, characterized in terms of expression of the *ansB* gene, encoding ASNase, and were studied cultures in complex medium in flasks and in synthetic medium in a 2 L bioreactor. The qPCR analysis showed that the His⁺ strain had twice the gene expression of the His⁻ strain, which was consistent with the productivity obtained in flasks and in the bioreactor, so it was selected to continue the study. Then, the induction protocol of the bioreactor was changed from an open-loop control for feeding inductor (methanol) in pulses to a closed-loop control with DO-stat, which resulted in a doubling of the volumetric activity. Subsequently, using Quality by Design principles, such as experimental design, application of analytical tools and analysis with mathematical models, a statistical design was performed to investigate the effects of the controlled methanol concentration, dissolved oxygen and temperature on the volumetric activity of ASNase. In the best cultivation condition, 5 g/L methanol, 50% dissolved oxygen and 35 °C, a final volumetric activity of 10700 U/L was achieved with 84 hours of process time, about eight times higher than in an open loop strategy. Furthermore, the predictive model showed that controlling methanol and increasing temperature were critical to this result. The biomass and product yields were obtained by carbon balance and it was observed that the higher temperature resulted in an increase in them, which favoured the formation of active ASNase. Finally, characterization of the recombinant ASNase by MALDI-TOF analysis revealed that it is glycosylated to an epitope that elicits immune responses in patients, reducing its side effects. Thus, a protocol with a high yield of an innovative ASNase compared to other published works was developed, which has the potential to provide treatment with a better quality of life for the patient.

Keywords: L-Asparaginase (ASNase). *Pichia pastoris*. Bioreactors. Auxotrophy. Experimental planning. Carbon Balance.

Lista de Abreviações

Sigla	Significado
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
3PGK	3-fosfoglicerato quinase
ADE1	Gene que codifica a amino-imidazol-succino carboxamida sintetase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOX	Gene que codifica a álcool oxidase
ARG4	Gene que regula reações para a produção de arginina
Asn	Asparagina
ASNase	L-asparaginase
ASNS	Asparagina sintetase
Asp	Aspartato
ASP3	Gene que codifica ASNase II de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CAT	Ciclo dos ácidos tricarbóxicos
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> - células de ovário de hamster chinês
CMAAs	<i>Critical material attributes</i> - atributos críticos de materiais
CPPs	<i>Critical process parameters</i> - parâmetros críticos de processo
CQAs	<i>Critical quality attributes</i> - atributos críticos de qualidade
DAK	Di-hidroxiacetona quinase
DAS	Di-hidroxiacetona-fosfato sintase
DHA	Di-hidroxiacetona
DHAP	Di-hidroxiacetona-fosfato
DHAS	Dihidroxiacetona
DoE	<i>Design of experiment</i> - planejamento experimental
EcA ou EcAII	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMP	Via Embden – Meyerhof – Parnas
ENO	Enolase
Era ou ErAII	L-asparaginase II de <i>Erwinia chrysanthemi</i> (<i>Dickeya chrysanthemi</i>)
F6P	Frutose-6-fosfato
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBA	Frutose fosfoglicerato mutase
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDH	Formato-desidrogenase
FLD	Formaldeído-desidrogenase
FLD1	Gene que codifica a formaldeído-desidrogenase
Fuc	Fucose
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
G418	Antibiótico geneticina
G6P	Glicose-6-fosfato
Gal	Galactose
GAP	Gene que codifica a G3P-desidrogenase
GK	Glicerol quinase
Glc	Glicose

GlcNAc	N-acetilglucosamina
GLI3P	Glicerol-3-fosfato
Gln	Glutamina
GLNase	Glutaminase
Glu	Glutamato
GMP	Fosfoglicerato mutase
GPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> - Geralmente Reconhecido como Seguro
GS115	Linhagem Mut ⁺ de <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella spp.</i>)
HIS4	Gene que regula reações para a produção de histidina
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KM71	Linhagem Mut ^s de <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella spp.</i>)
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
Lys	Lisina
Man	Manose
MC100-3	Linhagem Mut ⁻ de <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella spp.</i>)
Mut ⁻	Fenótipo de <i>Pichia pastoris</i> que não apresenta crescimento em metanol
Mut ⁺	Fenótipo de <i>Pichia pastoris</i> que apresenta crescimento rápido em metanol
Mut ^s	Fenótipo de <i>Pichia pastoris</i> que apresenta crescimento lento em metanol
NRRL	<i>US Agricultural Research Service Culture Collection</i>
OAA	Oxalacetato
OCH1	Gene que codifica Alfa-1,6-manosiltransferase específica de iniciação
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAOX	Promotor do gene AOX
PAT	Ferramentas analíticas de processo
PEG	Polietileno glicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEP4	Gene que codifica a protease A
PEX8	Gene que codifica enzimas do peroxissomo
PFLD1	Promotor do gene FLD1
PGAP	Promotor do gene GAP
PK	Piruvato quinase
PRB1	Gene que codifica a proteases B
PRPP	Fosforibosilpirofosfato
PYR	Piruvato
QbD	<i>Quality by Design</i>
Ser	Serina
SUS	Sistema Único de Saúde
TCI	Instituto Técnico de Química da Universidade de Hanôver
Thr	Treonina
TPI	Triose fosfato isomerase
Tyr	Tirosina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNB	Universidade de Brasília
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPR	<i>Unfolded protein response</i> - resposta para proteína desdobrada

URA3	Gene que regula reações para a produção de uracila
USP	Universidade de São Paulo
VP	Via das pentoses
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-33	Linhagem Mut ⁺ de <i>Pichia pastoris</i>
XU5P	Xilose-5-monofosfato
YPT1	Gene que codifica purina hidrolase

Lista de Símbolos

Símbolo	Significado
δ	Erro na medida
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima obtida por método gráfico (1/h)
$\mu_{m\acute{a}xbase}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima estimada pelo consumo de base (1/h)
$\mu_{m\acute{a}xCO_2}$	Velocidade específica de crescimento celular máxima estimada pela concentração de CO ₂ (1/h)
μ_X	Velocidade específica de crescimento celular (1/h)
ϵ	Matriz de resíduos dos fatores de conversão
λ	Comprimento de onda (nm)
v	Fator de correção de volume (mL/h)
p_g	Pressão parcial de O ₂ na fase gasosa (atm)
σ_i	Desvio padrão do composto i
ϕ	Matriz de propagação variância-covariância
φ_i	Vazão molar de gases na entrada (mol/h)
φ_o	Vazão molar de gases na saída (mol/h)
ψ	Matriz de variâncias
a	Área específica da superfície de transferência (m ⁻¹)
A	Atividade volumétrica (U/L)
A_P	Atividade específica (U/mg proteína)
A_X	Atividade por biomassa (U/g biomassa seca)
BM	Balço de Massa (g/g ou %)
\dot{C}	Vazão de carbono (gC/h)
C	Concentração de oxigênio dissolvido no meio (g/L)
c	Velocidades calculadas ou com erros grosseiros
C_0	Concentração inicial de oxigênio dissolvido no meio (g/L)
c_i	Coefficiente do soluto i
C_{Mi}	Concentração molar do soluto i (mol/L)
CPR	Velocidade de produção de CO ₂ (molCO ₂ /L/h)
C_s	Concentração de saturação O ₂ (g/L)
DO_{600}	Densidade óptica medida no comprimento de onda 600 nm por espectrofotometria
E	Matriz elementar
$evap$	Taxa de evaporação (mL/h)
exp	Fase exponencial do crescimento celular
F	Vazão volumétrica de alimentação de substrato (L/h)
fC_i	Fração de carbono no composto i (g/g)
f_{cinzas}	Fração de cinzas (g/g)
Gli	Glicerol
H	Constante de Henry (gO ₂ /L/atm)
H_{H_2O}	Constante de Henry para água (gO ₂ /L/atm)
H_i	Constante de Henry para o soluto i (gO ₂ /L/atm)
H_{meio}	Constante de Henry para meio de cultivo (gO ₂ /L/atm)
i	Soluto do meio de cultivo
k_L	Coefficiente de transferência de massa de oxigênio da película líquida (m/h)
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h ⁻¹)
lpm	Litros por minuto
m	Velocidades medidas
$m\acute{a}x$	Máximo
MetOH ou MET	Metanol

MM	Massa molecular (g/mol)
MM	Massa molecular (g/mol)
m_P	Massa de produto (g)
m_S	Massa de substrato (g)
m_X	Massa total da população celular (g)
Ni	Fonte de nitrogênio
OUR	Velocidade de consumo de O_2 (mol O_2 /L/h)
P	Concentração de produto (g/L)
P_{atm}	Pressão total do gás (atm)
p_{O_2}	Concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo (%)
Prot	Concentração de proteína (mg/L)
q_{CO_2}	Velocidade específica de consumo de CO_2 (g CO_2 /g biomassa seca/h)
q_{H_2O}	Velocidade específica de consumo de água (g H_2O /g biomassa seca/h)
q_N	Velocidade específica de consumo de nitrogênio (gN/gbiomassa seca/h)
q_{O_2}	Velocidade específica de consumo de O_2 (g O_2 /g biomassa seca/h)
q_P	Velocidade específica de formação de produto (gproduto/gbiomassa seca /h-1)
q_S	Velocidade específica de consumo de substrato (gsubstrato /gbiomassa seca /h-1)
R	Matriz reduzida do balanço generalizado
r	Velocidade de transformação (g/h)
r_M	Velocidade de transformação molar (mol/h)
RQ	Coefficiente respiratório (mol CO_2 /mol O_2)
\overline{RQ}	Coefficiente respiratório médio da divisão de CPR médio por OUR médio (mol CO_2 /mol O_2)
$RQ_{MÉDIO}$	Coefficiente respiratório médio dos valores pontuais de RQ a cada 60 minutos (mol CO_2 /mol O_2)
S	Concentração do substrato (g/L)
S_{alim}	Concentração de substrato na corrente de alimentação (g/L)
t	Instante t (h)
t_i	Instante de tempo i (h)
T_m	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
u	Velocidades com erros mínimos de medida
V	Volume (L)
v/v	Volume por volume
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
X	Concentração celular (g biomassa seca/L)
X_{MS}	Concentração celular obtida por secagem (g biomassa seca/L)
X_{OD}	Concentração de biomassa seca estimada por densidade óptica (g biomassa seca /L)
y	Vetor de fatores de conversão
\hat{y}	Vetor de fatores de conversão reais
$y_{CO_2,i}$	Fração molar de CO_2 na entrada (mol/mol)
$y_{CO_2,o}$	Fração molar de CO_2 na saída (mol/mol)
$Y_{i/X}$	Fator de conversão de biomassa ao composto i (gi/gbiomassa)
y_{O_2}	Fração molar de O_2 no gás (mol/mol)
$y_{O_2,i}$	Fração molar de O_2 na entrada (mol/mol)
$y_{O_2,o}$	Fração molar de O_2 na saída (mol/mol)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células (g biomassa seca / g de substrato)

Lista de Tabelas

TABELA 1. VALORES DOS BIOFÁRMACOS POR DOSE DE ASNASE APRESENTADOS NA LICITAÇÃO REALIZADA PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE EM 2017. O NÚMERO DE DOSES POR TRATAMENTO DEPENDE DO BIOFÁRMACO. ESTIMA-SE QUE FORAM COMPRADAS 61.300 DOSES DA LEUGINASE® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).....	32
TABELA 2. BIOFÁRMACOS DE ASNASE QUE SÃO ATUALMENTE APROVADOS PARA TRATAMENTO E SUAS CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E TERAPÊUTICAS.	53
TABELA 3. PRODUTOS PRODUZIDOS POR <i>PICHIA PASTORIS</i> QUE JÁ ESTÃO DISPONÍVEIS NO MERCADO.	63
TABELA 4. CODIFICAÇÃO DAS CEPAS ADOTADA AO LONGO DO TEXTO.....	103
TABELA 5. SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> PARA A ANÁLISE DE qPCR. ESSES <i>PRIMERS</i> FORAM DESENHADOS PELO DR. MARCOS EDGAR HERKENHOFF.....	105
TABELA 6. COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO DE SAIS BASAIS BSM MODIFICADO DE INVITROGEN CORPORATION (2002).....	107
TABELA 7. COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO PTM ₁ (INVITROGEN, 2002).....	107
TABELA 8. QUADRO RESUMO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.	124
TABELA 9. RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) COM AGRUPAMENTO POR TUKEY PARA OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO MÁXIMA OBTIDOS EM BSM SUPLEMENTADO COM DIFERENTES NÍVEIS DE HISTIDINA.	126
TABELA 10. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A BATELADA COM 4% _{v/v} GLICEROL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ . OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	129
TABELA 11. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A FASE DE INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ REALIZADA COM PULSOS DE 10 mL DE SOLUÇÃO INDUTORA A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	132
TABELA 12. COMPARAÇÃO DAS QUATRO CEPAS EM RELAÇÃO À VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMO EM GLICEROL ($\mu_{MÁX}$, H ⁻¹), CONCENTRAÇÃO CELULAR ESTIMADA POR DENSIDADE ÓPTICA AO FIM DO ENSAIO ($X_{DOFINAL}$, G/L) E ATIVIDADE VOLUMÉTRICA MÁXIMA ($A_{MÁX}$, U/L) EM FRASCOS COM MEIO COMPLEXO E INDUÇÃO FEITA POR PULSOS COM 1 mL DE METANOL A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO. FORAM REALIZADAS TRIPLICATAS BIOLÓGICAS.	137
TABELA 13. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A BATELADA COM 4% _{v/v} GLICEROL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ E EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA (BSM_0) COM A CEPA HIS ⁺ . OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	138
TABELA 14. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A FASE DE INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ E EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA (BSM_0) COM A CEPA HIS ⁺ REALIZADA COM PULSOS DE 10 mL DE SOLUÇÃO INDUTORA A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	139
TABELA 15. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A BATELADA COM 4% _{v/v} GLICEROL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ E EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA (BSM_0) COM A CEPA HIS ⁺ COM INDUÇÃO POR PULSOS (BSM_0) E POR <i>DO-STAT</i> (BSM_0_ <i>DO-STAT</i>). OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	143
TABELA 16. PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A FASE DE INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO BSM CONTENDO 480 MG/L (BSM_480) E 600 MG/L DE HISTIDINA (BSM_600) COM A CEPA HIS ⁻ E EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA COM A CEPA HIS ⁺ REALIZADA COM PULSOS DE 10 mL DE SOLUÇÃO INDUTORA A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO (BSM_0) E COM INDUÇÃO POR <i>DO-STAT</i> (BSM_0_ <i>DO-STAT</i>). OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	144
TABELA 17. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE VOLUMÉTRICA DE NOVAS ASNASES RECOMBINANTES PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS ANOS.....	154
TABELA 18. COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO DE SAIS BASAIS BSM MODIFICADO E DA SOLUÇÃO PTM ₁ DE INVITROGEN CORPORATION (2002).	163
TABELA 19. COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO TCI E DA SOLUÇÃO YTM (YEAST TRACE METALS) DE GURRAMKONDA ET AL. (2010). A FORMA DE PREPARO DESSE MEIO É SIMILAR AO BSM+PTM ₁ COMO EXPLICADO NA TABELA 6 E TABELA 7.	163
TABELA 20. ENTRADAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA AVALIAR OS EFEITOS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (PO ₂), LOG DA CONCENTRAÇÃO DE METANOL E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA ASNASE..	165
TABELA 21. QUADRO RESUMO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.	178

TABELA 22. COMPARAÇÃO DAS DUAS CEPAS EM RELAÇÃO À VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMO EM GLICEROL ($\mu_{MÁX}$, H^{-1}), CONCENTRAÇÃO CELULAR ESTIMADA POR DENSIDADE ÓPTICA AO FIM DO ENSAIO ($X_{DOFINAL}$, G/L) E ATIVIDADE VOLUMÉTRICA MÁXIMA ($A_{MÁX}$, U/L) EM FRASCOS COM MEIO COMPLEXO E INDUÇÃO FEITA POR PULSOS COM 1 ML DE METANOL A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO. FORAM REALIZADAS TRIPPLICATAS BIOLÓGICAS NO LABORATÓRIO DO BRASIL E NO DA ALEMANHA.	179
TABELA 23. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES BANCOS DE TRABALHO DA CEPA HIS ⁺ EM RELAÇÃO À VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMO EM GLICEROL ($\mu_{MÁX}$, H^{-1}), CONCENTRAÇÃO CELULAR ESTIMADA POR DENSIDADE ÓPTICA AO FIM DO ENSAIO ($X_{DOFINAL}$, G/L) E ATIVIDADE VOLUMÉTRICA MÁXIMA ($A_{MÁX}$, U/L) EM BIORREATORES COM O MEIO BSM+PTM1 E INDUÇÃO FEITA POR PULSOS COM 10 ML DE METANOL A CADA 24 HORAS DE 24 A 120 HORAS DE CULTIVO. FORAM REALIZADAS TRIPPLICATAS BIOLÓGICAS NO LABORATÓRIO DO BRASIL E DA ALEMANHA.....	180
TABELA 24.PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A BATELADA COM 4% _{v/v} GLICEROL EM MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM A CEPA HIS ⁺ NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. OS DESVIOS DE CADA EXPERIMENTO SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS E PARA CÁLCULO DO DESVIO DA MÉDIA FOI CONSIDERADO QUE OS 6 CULTIVOS FORAM REPLICATAS EXPERIMENTAIS.	188
TABELA 25.PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO TCI COM A CEPA HIS ⁺ ATÉ O FIM DO TERCEIRO DIA DE CULTIVO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. OS DESVIOS DE CADA EXPERIMENTO SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS E PARA CÁLCULO DO DESVIO DO PONTO CENTRAL FORAM CONSIDERADOS OS EXPERIMENTOS 14E E 14F, QUE SÃO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.	193
TABELA 26.PRINCIPAIS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS OBTIDOS DURANTE A INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM A CEPA HIS ⁺ ATÉ O FIM DO TERCEIRO DIA DE CULTIVO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. PARA CÁLCULO DOS DESVIOS DO PONTO CENTRAL FORAM CONSIDERADOS OS EXPERIMENTOS 14E E 14F, QUE SÃO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.	193
TABELA 27. ENTRADAS REAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL PARA AVALIAR OS EFEITOS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (pO ₂), CONCENTRAÇÃO DE METANOL E TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA ASNASE (SAÍDA).	202
TABELA 28. ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O MODELO PREDITIVO MAIS ADEQUADO.	203
TABELA 29.PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A BATELADA COM 4% _{v/v} GLICEROL NO MEIO TCI COM A CEPA HIS ⁺ NOS EXPERIMENTOS 14D E 15. OS DESVIOS DE CADA EXPERIMENTO SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	206
TABELA 30.PRINCIPAIS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS DURANTE A INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO TCI COM A CEPA HIS ⁺ ATÉ O FIM DO TERCEIRO DIA DE CULTIVO NOS EXPERIMENTOS 14D E 15. OS DESVIOS DE CADA EXPERIMENTO SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	209
TABELA 31.PRINCIPAIS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS OBTIDOS DURANTE A INDUÇÃO COM METANOL EM MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM A CEPA HIS ⁺ ATÉ O FIM DO TERCEIRO DIA DE CULTIVO NOS EXPERIMENTOS 14D E 15.	209
TABELA 32. PRINCIPAIS VELOCIDADES ESPECÍFICAS, COEFICIENTE RESPIRATÓRIO E BALANÇO DE CARBONO MÉDIOS CALCULADOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15. O DESVIO PADRÃO DA MÉDIA FOI CALCULADO CONSIDERANDO OS SETE CULTIVOS COMO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.	211
TABELA 33. VALOR DA FUNÇÃO H DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 NA PRIMEIRA ETAPA DO MÉTODO COM COMPARAÇÃO COM χ^2 (4,61). EM AMARELO, AS GRANDEZAS CUJOS OS COEFICIENTES PRECISAM SER RECALCULADOS POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (MENOR H) E EM VERDE, AS GRANDEZAS CUJA A EXCLUSÃO DO COEFICIENTE RESULTOU EM $H < \chi^2$ (4,61).	213
TABELA 34. NOVOS COEFICIENTES E NOVO VALOR DA FUNÇÃO H DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 NA SEGUNDA ETAPA DO MÉTODO COM COMPARAÇÃO COM χ^2 (2,71). EM AMARELO, OS COEFICIENTES RECALCULADOS NA PRIMEIRA ITERAÇÃO POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (MENOR H) E, EM VERDE, AS GRANDEZAS CUJA A EXCLUSÃO DO COEFICIENTE RESULTOU EM $H < \chi^2$ (2,71).	215
TABELA 35. VALORES FINAIS DOS COEFICIENTES E DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15. EM AMARELO, OS COEFICIENTES RECALCULADOS POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (MENOR H) NA SEGUNDA ITERAÇÃO.	215
TABELA 36. PRINCIPAIS VELOCIDADES ESPECÍFICAS, COEFICIENTE RESPIRATÓRIO, BALANÇO DE CARBONO E COEFICIENTE DE CONVERSÃO CALCULADOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 APÓS A IDENTIFICAÇÃO DE ERROS SISTEMÁTICO. O	

DESVIO PADRÃO DA MÉDIA FOI CALCULADO CONSIDERANDO CULTIVOS COMO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.....	216
TABELA 37. PRINCIPAIS VELOCIDADES ESPECÍFICAS, COEFICIENTE RESPIRATÓRIO E BALANÇO DE CARBONO MÉDIOS CALCULADOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15. O DESVIO PADRÃO DA MÉDIA FOI CALCULADO CONSIDERANDO OS DOIS CULTIVOS DO PONTO CENTRAL COMO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.....	217
TABELA 38. PARÂMETROS CINÉTICOS ORIGINAIS E VALOR DA FUNÇÃO H DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 NA PRIMEIRA ETAPA DO MÉTODO COM COMPARAÇÃO COM χ^2 (4,61). EM AMARELO, AS GRANDEZAS CUJOS OS COEFICIENTES PRECISAM SER RECALCULADOS POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (A EXCLUSÃO RESULTA NO MENOR H) NA PRIMEIRA ITERAÇÃO DO MÉTODO.....	218
TABELA 39. NOVOS COEFICIENTES E NOVO VALOR DA FUNÇÃO H DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 NA SEGUNDA ETAPA DO MÉTODO COM COMPARAÇÃO COM χ^2 (2,70). EM AMARELO, OS COEFICIENTES RECALCULADOS POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (MENOR H) NA PRIMEIRA ITERAÇÃO E, EM VERDE, AS GRANDEZAS CUJA A EXCLUSÃO DO COEFICIENTE RESULTOU EM $H < \chi^2$ (2,70) NA SEGUNDA ITERAÇÃO.....	218
TABELA 40. VALORES FINAIS DOS COEFICIENTES E DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15. EM AMARELO, OS COEFICIENTES RECALCULADOS POR POSSUÍREM O MAIOR ERRO (MENOR H) NA SEGUNDA ITERAÇÃO.....	219
TABELA 41. PRINCIPAIS VELOCIDADES ESPECÍFICAS, COEFICIENTE RESPIRATÓRIO, BALANÇO DE CARBONO E COEFICIENTES DE CONVERSÃO CALCULADOS DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15 APÓS A IDENTIFICAÇÃO DE ERROS SISTEMÁTICO. O DESVIO PADRÃO DA MÉDIA FOI CALCULADO CONSIDERANDO OS DOIS CULTIVOS DO PONTO CENTRAL COMO REPLICATAS EXPERIMENTAIS.....	220
TABELA 42. COMPARAÇÃO DAS PRINCIPAIS CONDIÇÕES DE INDUÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO E COEFICIENTES DE CONVERSÃO CALCULADOS O CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E A LITERATURA. TABELA ADAPTADA DE PONTE ET AL., 2016.....	231
TABELA 43. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE VOLUMÉTRICA DE NOVAS ASNASES RECOMBINANTES PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS ANOS.....	233
TABELA APÊNDICE A. 1. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MEDIDA (X) E ESTIMADA (X _{DO}) PELA RELAÇÃO DO GRÁFICO ANTERIOR. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	255
TABELA APÊNDICE A. 2. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MEDIDA (X) E ESTIMADA (X _{DO}) PELA RELAÇÃO DO GRÁFICO ANTERIOR. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	256
TABELA APÊNDICE A. 3. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MEDIDA (X) E ESTIMADA (X _{DO}) PELA RELAÇÃO DO GRÁFICO ANTERIOR. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	257
TABELA APÊNDICE A. 4. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MEDIDA (X) E ESTIMADA (X _{DO}) PELA RELAÇÃO DO GRÁFICO ANTERIOR. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	258
TABELA APÊNDICE A. 5. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA MEDIDA (X) E ESTIMADA (X _{DO}) PELA RELAÇÃO DO GRÁFICO ANTERIOR. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	259
TABELA APÊNDICE A. 6. CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DE β -HIDROXAMATO ASPÁRTICO UTILIZADO PARA A CONSTRUÇÃO DAS CURVAS PADRÃO.....	261
TABELA APÊNDICE A. 7. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO PARA O MÉTODO DE β -HIDROXAMATO ASPÁRTICO.....	261
TABELA APÊNDICE A. 8. CURVA PADRÃO EMPREGADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE ASNASE PELO MÉTODO DE AHA CONSTRUÍDA COM TRIPPLICATA EXPERIMENTAL.....	262
TABELA APÊNDICE A. 9. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIDA (P _{ROT}) E ESTIMADA (P _{ROTEST}) PELA RELAÇÃO DA FIGURA B3.1. O VALOR DE T	

ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	266
TABELA APÊNDICE A. 10. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS MEDIDA (P_{ROT}) E ESTIMADA (P_{ROTEST}) PELA RELAÇÃO DA FIGURA B3.2. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	267
TABELA APÊNDICE A. 11. TESTE T PRESUMINDO VARIÂNCIAS EQUIVALENTES ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL MEDIDO (S_{GLI}) E ESTIMADA (S_{GLIEST}) PELA RELAÇÃO DA FIGURA B4.1. O VALOR DE T ABAIXO DE T-CRÍTICO INDICA QUE A HIPÓTESE NULA DE DIFERENÇA ENTRE AS AMOSTRAS FOI ACEITA, OU SEJA, OS VALORES SÃO ESTATISTICAMENTE IGUAIS.....	268
TABELA APÊNDICE A. 12. CONSTANTE DE HENRY PARA A ÁGUA DE ACORDO COM O U.S. GEOLOGICAL SURVEY (2007) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	269
TABELA APÊNDICE A. 13. COEFICIENTES PARA OS COMPOSTOS DE ACORDO COM SCHUMPE (1985) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	269
TABELA APÊNDICE A. 14. VALORES DE H_i ($MG O_2/L/ATM$) PARA O MEIO BSM CALCULADO DE ACORDO COM A EQUAÇÃO B6.2, EM QUE OS COEFICIENTES PARA CADA SOLUTO SÃO DADOS PELA SOMA DO PRODUTO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS DISSOCIADAS (N) PELOS COEFICIENTES PARA CADA ESPÉCIE DADOS PELA TABELA B6.2.....	270
TABELA APÊNDICE A. 15. VALORES DE H_i ($MG O_2/L/ATM$) PARA O MEIO TCICALCULADO DE ACORDO COM A EQUAÇÃO B6.2, EM QUE OS COEFICIENTES PARA CADA SOLUTO SÃO DADOS PELA SOMA DO PRODUTO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS DISSOCIADAS (N) PELOS COEFICIENTES PARA CADA ESPÉCIE DADOS PELA TABELA B6.2.....	270
TABELA APÊNDICE A. 16. CONSTANTE DE HENRY PARA OS MEIOS DE ACORDO COM O U.S. GEOLOGICAL SURVEY (2007) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	270
TABELA APÊNDICE A. 17. VALORES DE OSMOLARIDADE ($OSMOL/L$) PARA O MEIO BSM CALCULADO DE ACORDO COM A EQUAÇÃO B7.1, EM QUE A OSMOLARIDADE PARA CADA SOLUTO É DADA PELO PRODUTO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS DISSOCIADAS (N) PELA CONCENTRAÇÃO MOLAR C_{Mi} CADA ESPÉCIE... 271	271
TABELA APÊNDICE A. 18. VALORES DE OSMOLARIDADE ($OSMOL/L$) PARA O MEIO TCICALCULADO DE ACORDO COM A EQUAÇÃO B7.1, EM QUE A OSMOLARIDADE PARA CADA SOLUTO É DADA PELO PRODUTO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS DISSOCIADAS (N) PELA CONCENTRAÇÃO MOLAR C_{Mi} CADA ESPÉCIE... 271	271
TABELA APÊNDICE B. 1. VALORES REAIS DO VOLUME MEDIDO AO FIM DO EXPERIMENTO ($V_{REALFINAL}$, ML), FATOR DE CORREÇÃO DE VOLUME (N , ML/H) E ESTIMATIVA DE UMA TAXA DE EVAPORAÇÃO (<i>revap</i> , ML/H) NECESSÁRIA PARA QUE O VOLUME CALCULADO PELO BALANÇO DE MASSA SEJA IGUAL AO REAL.....	277
TAB. ANEXO B. 1. SOLUÇÕES PARA PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 13,5%.....	288
TAB. ANEXO B. 2. MÉTODO DE PREPARO DE COOMASSIE COLOIDAL.....	289

Lista de Figuras

- FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ERAII NATIVA SEM E COM GLICOSILAÇÕES. A NOVA VARIANTE (À DIREITA), DESENVOLVIDA POR EFFER ET AL. (2019), APRESENTA A ESTRUTURA DE TETRÂMERO DE 160 KDA COM N-GLICOSILAÇÕES NO RESÍDUO ASN₁₇₀, UM EPÍTOPO PREVISTO COMO IMUNOGÊNICO PARA CÉLULAS-T E, PORTANTO, A GLICOSILAÇÃO DESSE SÍTIOS TERIA O EFEITO DE ESCUDO CONTRA O SISTEMA IMUNE. 57
- FIGURA 2. ATUAIS APLICAÇÕES DE ASNASE COMO TERAPÊUTICO. COMO QUIMIOTERÁPICO, A APLICAÇÃO DA ASNASE SE BASEIA NA HIDRÓLISE DA ASPARAGINA SÉRICA LEVANDO À MORTE SELETIVA DE LINFOMAS OU DE TUMORES SÓLIDOS DEFICIENTES DE ASNS POR PRIVAÇÃO DE ASPARAGINA; COMO ANTIPROLIFERATIVO DE BACTÉRIAS, A ASNASE PODE OCASIONAR A MORTE POR DESNUTRIÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS QUE SÃO DEPENDENTES DA ASPARAGINA DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS (BARUCH ET AL., 2014); EM DOENÇAS AUTOIMUNES, ESTUDOS DEMOSTRARAM QUE A ASNASE POSSUI PROPRIEDADES IMUNOSSUPRESSORAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS MEDIANTE CÉLULAS T E B (GIELDANOWSKI, 1976); E EM DOENÇAS ONCOLÓGICAS VETERINÁRIAS, A ASNASE FOI USADA EM UM PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO PARA PROLONGAR A REMISSÃO DE TUMORES (SABA ET AL., 2009). 61
- FIGURA 3. ASPECTOS GERAIS DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *P. PASTORIS*. PRIMEIRAMENTE É FEITA A ESCOLHA DO HOSPEDEIRO ENTRE AS DIVERSAS LINHAGENS DISPONÍVEIS. EM SEGUIDA, SÃO SELECIONADOS OS ELEMENTOS DO PLASMÍDEO: O CASSETE DE EXPRESSÃO (GENE DE INTERESSE (GOI), O PROMOTOR (P) E A SEQUÊNCIA FINAL DE TRANSCRIÇÃO (TT)), O MARCADOR DE SELEÇÃO (M) (RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO OU SUPRESSÃO DA AUXOTROFIA OU AMBOS) E A SEQUÊNCIA SINAL (SS) (PRODUÇÃO EXTRACELULAR). NO CASO DE NECESSIDADE DE REPLICAÇÃO BACTERIANA ANTES DA TRANSFORMAÇÃO EM LEVEDURA, SÃO INCLUÍDOS O MARCADOR DE SELEÇÃO (COMO O GENE *AMP^r* DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO AMPILICILINA) E A ORIGEM DE REPLICAÇÃO (*Ori*). POSTERIORMENTE É REALIZADA A TRANSFORMAÇÃO DA CEPA, CASO SEJA ALMEJADA A INTEGRAÇÃO HOMÓLOGA É FEITA A LINEARIZAÇÃO DO PLASMÍDEO. O NÍVEL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEPENDE DA INTEGRAÇÃO, SE ELA OCORRE DE FORMA HOMÓLOGA OU HETERÓLOGA, E DA QUANTIDADE DE CASSETES DE EXPRESSÃO INTEGRADOS. A SECREÇÃO É ESTIMULADA PELA PRESENÇA DO PEPTÍDEO SINAL QUE ENCAMINHA A PROTEÍNA PARA O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (EM AZUL), ONDE A PROTEÍNA PASSA POR MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUÇIONAIS, COMO GLICOSILAÇÃO E PROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO E É ENCAMINHADA PARA O COMPLEXO DE GOLGI (EM VERDE) ANTES DA SECREÇÃO EXTRACELULAR. ALTERNATIVAMENTE, A SEQUÊNCIA SINAL PODE ESTAR AUSENTE E A PRODUÇÃO É INTRACELULAR OU AINDA AS PROTEÍNAS PODEM SER ANCORADAS NA MEMBRANA. 68
- FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ROTA DE GLICOSILAÇÃO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS, LEVEDURAS E LEVEDURAS GLICOENGENHEIRADAS. A GLICOSILAÇÃO É INICIADA NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO DE MANEIRA SEMELHANTE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS E EM LEVEDURAS COM A LIGAÇÃO DE UM OLIGOSSACARÍDEO, GLC₃MAN₉GLCNAC₂, AO RESÍDUO ASPARAGINA DO POLIPEPTÍDIO. EM SEGUIDA, ESSE OLIGOSSACARÍDEO É CORTADO EM MAN₈GLCNAC₂ POR GLICOSIDASES (I E II) E MANOSIDASES (I) E, QUANDO A PROTEÍNA ATINGE O COMPLEXO DE GOLGI, AS MODIFICAÇÕES NOS GLICANOS PASSAM A SE DIFERENCIAR ENTRE AS ESPÉCIES EUKARIÓTIAS. NA CÉLULA DE MAMÍFERO, A AÇÃO DE MANOSIDASES (I E II) E TRANSFERASES (GLCNAC I E II) RESULTAM EM OLIGOSSACARÍDEOS CONTENDO MAN₅₋₆GLCNAC₂ E/OU UMA MISTURA DE DIFERENTES AÇÚCARES (GAL, ÁCIDO SIÁLICO). JÁ EM LEVEDURAS, PELA AÇÃO DO GENE *OCH1* É INICIADO UM CONJUNTO DE REAÇÕES QUE RESULTAM EM ADIÇÃO DE LONGAS CADEIAS DE MANOSES PELA AÇÃO DE TRANSFERASES DE FORMA HETEROGÊNEA, CARACTERIZANDO UMA HIPERGLICOSILAÇÃO. A ESTRUTURA TÍPICA DO N-GLICANO DE *P. PASTORIS* CONTÉM DE 8 A 9 MANOSES. NA LEVEDURA GLICOENGENHEIRADA, A DELEÇÃO DO GENE *OCH1* RESULTA NA DESATIVAÇÃO DAS TRANSFERASES, O QUE TERMINA COM A HIPERMANOSILAÇÃO. ALÉM DISSO, A INSERÇÃO DO GENE *HDEL* PRODUZ MANOSIDASES QUE LEVAM À FORMAÇÃO DE GLICANOS COMPOSTOS POR MAN₅GLCNAC₂ DE FORMA HOMOGÊNEA E, POR FIM, PELA AÇÃO DA TRANSFERASE *KRE2P* HÁ FORMAÇÃO DE GLCNACMAN₅GLCNAC₂. 70
- FIGURA 5. REDE METABÓLICA DO CARBONO CENTRAL DA LEVEDURA *P. PASTORIS*. EM LARANJA, O METABOLISMO DO GLICEROL: O GLICEROL É TRANSPORTADO PARA O CITOPLASMA E POR AÇÃO DA ENZIMA GLICEROL QUINASE (GK) É TRANSFORMADO A GLICEROL-3-FOSFATO (GLI3P). ESTE É CONVERTIDO A DI-HIDROXIACETONA-FOSFATO (DHAP) PELA GLICEROL-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GPDH). DHAP É REARRANJADO EM GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO (G3P) PELA TRIOSE FOSFATO ISOMERASE (TPI) E SEQUE PELA VIAS DA GLICÓLISE E DAS PENTOSE. G3P É CONVERTIDO A FRUTOSE-6-FOSFATO (F6P) POR AÇÃO DA FRUTOSE FOSFOGLICERATO MUTASE (FBA) E POR ISOMERIZAÇÃO F6P SE CONVERTE A GLICOSE-6-FOSFATO (G6P) QUE SEQUE PELA VIA DAS PENTOSE. AO FIM DESSA VIA, XILULOSE-5-FOSFATO (XU5P) É TRANSFORMADO A G3P PELA AÇÃO DA DI-HIDROXIACETONA-

FOSFATO SINTASE (DAS). NA GLICÓLISE, G3P É CONVERTIDA A 3-FOSFOGLICERATO (3PG) POR AÇÃO DA GPDH E DA 3-FOSFOGLICERATO QUINASE (3PGK), QUE, EM SEGUIDA, É TRANSFORMADO A 2-FOSFOGLICERATO (2PG) PELA FOSFOGLICERATO MUTASE (GMP). A ENOLASE (ENO) CONVERTE 2PG A FOSFOENOLPIRUVATO (PEP) QUE POR AÇÃO DA PIRUVATO QUINASE (PK) SE TRANSFORMA EM PIRUVATO (PYR). ESTE SEGUE POR DOIS CAMINHOS: FORMAÇÃO DE ETANOL E FORMAÇÃO DE OXALACETATO (OAA) QUE ENTRA NO CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (CAT), QUE FORNECE PODER REDUTOR PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA POR MEIO DE MOLÉCULAS DE NADH. EM AZUL O METABOLISMO DO METANOL: O METANOL É TRANSPORTADO PARA O PEROXISSOMO, ONDE É TRANSFORMADO A FORMALDEÍDO POR AÇÃO DAS ÁLCOOL OXIDASES (AOX1 E AOX2). ESSA REAÇÃO LIBERA PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO QUE É TRANSFORMADO EM ÁGUA E OXIGÊNIO POR CATALASES (CAT). O FORMALDEÍDO SEGUE PARA AS VIAS DE DISSEMINAÇÃO E ASSIMILAÇÃO. NA VIA DE DISSEMINAÇÃO, POR AÇÃO DA FORMALDEÍDO-DESDROGENASE (FLD) É PRODUZIDO ÁCIDO FÓRMICO QUE É CONVERTIDO A CO₂ PELA FORMATO-DESDROGENASE (FDH). ESSAS REAÇÕES LIBERAM NADH QUE É UTILIZADO NA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA NAS MITOCÔNDRIAS. NA VIA DE ASSIMILAÇÃO, FORMALDEÍDO É CONVERTIDO A DI-HIDROXIACETONA (DHA) E G3P PELA AÇÃO DA DAS. ESSES DOIS PRODUTOS SÃO TRANSPORTADOS PARA O CITOPLASMA, ONDE DHA É CONVERTIDA A DHAP PELA DI-HIDROXIACETONA QUINASE (DAK). TANTO G3P QUANTO DHAP SÃO DESTINADOS PARA A VIA DAS PENTOSE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA, AMINOÁCIDOS E CARBOIDRATOS. NOVAMENTE, AO FIM DA VIA, O CARBONO É RECICLADO NA TRANSFORMAÇÃO DE XU5P A G3P PELA AÇÃO DA DAS. 73

FIGURA 6. ESQUEMA DO PLASMÍDEO pJAG_s1 QUE CONTÉM O GENE ANSB DE *D. CHRYSANTHEMI* SOB O CONTROLE DO PROMOTOR AOX1 PARA EXPRESSÃO DE L-ASPARAGINASE DE *D. CHRYSANTHEMI* (*ERAII*). POR AÇÃO DA ENZIMA *BsAI* O GENE ANSB É INSERIDO ENTRE O P_{AOX1} E O CÓDON DE PARADA DA TRANSCRIÇÃO. ALÉM DISSO, O VETOR APRESENTA O FATOR ALFA DE *S. CEREVISIAE* PARA SECREÇÃO EXTRACELULAR E O GENE DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO G418 PARA SELEÇÃO DE CÉLULAS TRANSFORMADAS. COMO É FEITA A PROPAGAÇÃO DO PLASMÍDEO EM *E. COLI* ANTES DA TRANSFORMAÇÃO, ELE TAMBÉM POSSUI OS GENES AMP^R PARA RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO AMPICILINA E O PMB DE ORIGEM DE REPLICAÇÃO BACTERIANA. PARA TRANSFORMAÇÃO EM *PICHTIA*, O PLASMÍDEO É EXTRAÍDO DA *E. COLI* E LINEARIZADO POR AÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *PMEI* SOBRE O P_{AOX1}, PORTANTO, HÁ UMA TENDÊNCIA PELA INTEGRAÇÃO NO GENE AOX1..... 102

FIGURA 7. CONJUNTO DE REAÇÕES QUE EMBASAM O MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ASNASE. PRIMEIRAMENTE, A ASPARAGINA É HIDROLISADA PELA ASNASE EM ÁCIDO ASPÁRTICO E AMÔNIA. EM SEGUIDA, A ASNASE CATALISA A REAÇÃO DE HIDROXILAMINÓLISE ENTRE HIDROXILAMINA E ÁCIDO ASPÁRTICO RESULTANDO NO O B – HIDROXAMATO ASPÁRTICO. ESSE COMPOSTO REAGE COM CLORETO FÉRRICO EM MEIO ÁCIDO GERANDO O B – HIDROXAMATO ASPÁRTICO FÉRRICO DE COLORAÇÃO AVERMELHADA. A INTENSIDADE DA COLORAÇÃO PODE SER RELACIONADA COM A ABSORBÂNCIA A 500 NM E, DESSA FORMA, É MEDIDA A CONCENTRAÇÃO DE ASNASE DE FORMA INDIRETA..... 113

FIGURA 8. PLACAS COM A CEPA His⁺ APÓS A TRANSFORMAÇÃO PARA CONFIRMAR AUSÊNCIA DE AUXOTROFIA PARA HISTIDINA (A) E RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO G418 NA CONCENTRAÇÃO 1 MG/ML (B). 135

FIGURA 9. A) SDS-GEL QUE FOI USADO PARA A ANÁLISE MALDI-TOF MS (BANDAS DESTACADAS EM VERMELHO) DE UM CULTIVO EM FRASCO DA CEPA PROTOTRÓFICA COM MEIO COMPLEXO, A PROTEÍNA COMPLETA É APRESENTADA NAS DUAS BANDAS MAIS FORTES ENTRE 35 E 45 kDa COM DIFERENTES NÍVEIS DE GLICOSILAÇÃO ENTRE ELAS. B) SDS-GEL DO TESTE DE DESGLICOSILAÇÃO, O TRATAMENTO COM PNGASE F (36 kDa) REVELOU A PRESENÇA DE N-GLICANOS, DESTACADOS COM A SETA VERMELHA; POR OUTRO LADO, O TESTE COM O-GLICOSIDASE (147 kDa) E NEURAMINIDASE (43 kDa) NÃO CONFIRMOU O-GLICANOS. 148

FIGURA 10. CROMATOGRAMAS DA ASNASE RECOMBINANTE: CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIONICA (A); CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DE TAMANHÃO (GEL FILTRAÇÃO) (B). FIGURA RETIRADA DE KLEINGESINDS ET AL. (2021) COM AUTORIZAÇÃO DO AUTOR..... 149

FIGURA 11. ESQUEMA DE MONTAGEM DO BIORREATOR PROJETADO NO TCI: A DORNA DE AÇO INOX ESTAVA CONECTADA À TORRE DE CONTROLE DO BIORREATOR BIOSTAT B E OS DADOS ERAM COLETADOS PELO SOFTWARE PROFISIGNAL E APRESENTADOS NA INTERFACE. A ENTRADA DE OXIGÊNIO PURO ERA CONTROLADA MANUALMENTE POR UM FLUXÔMETRO CONECTADO À TORRE DE CONTROLE. A ALIMENTAÇÃO DE METANOL ERA CONTROLADA PELO SOFTWARE CARO QUE, DE ACORDO COM A LEITURA DO SENSOR DE METANOL (NESSA FOTO, ELE ESTAVA SENDO ACONDICIONADO EM BANHO TÉRMICO PARA CALIBRAÇÃO), ATIVAVA A BOMBA DE SOLUÇÃO INDUTORA. A TEMPERATURA ERA CONTROLADA POR UM BANHO TÉRMICO EXTERNO E O pH PELA PRÓPRIA TORRE. 165

FIGURA 12. SDS-GEL DOS CULTIVOS EM MEIO BMGY COM A CEPA His⁺ E A His⁺ VAZIO REALIZADOS NA ALEMANHA, A PROTEÍNA COMPLETA É APRESENTADA NAS DUAS BANDAS MAIS FORTES ENTRE 35 E 45 kDa COM DIFERENTES NÍVEIS DE GLICOSILAÇÃO ENTRE OS MONÔMEROS. MW: MOLECULAR WEIGHT, PADRÃO PIERCE™ UNSTAINED PROTEIN MARKER. 180

FIGURA 13. SDS-GEL DOS CULTIVOS EM MEIO BSM E TCI, A PROTEÍNA COMPLETA É APRESENTADA NAS DUAS BANDAS MAIS FORTES ENTRE 35 E 45 kDA COM DIFERENTES NÍVEIS DE GLICOSILAÇÃO ENTRE ELAS. MW: MOLECULAR WEIGHT, PADRÃO PIERCE™ UNSTAINED PROTEIN MARKER.	183
FIGURA 14. GÉIS DE SDS-PAGE DOS EXPERIMENTOS 14A A 14F: APÓS A INDUÇÃO, É POSSÍVEL IDENTIFICAR DUAS BANDAS COM APROXIMADAMENTE 37 kDA CORRESPONDENTES AOS MONÔMEROS DA ASNASE COM DIFERENTES GRAUS DE GLICOSILAÇÃO. SENDO QUE: A, EXPERIMENTO 14A METOH0,8G/L_PO25%_25°C; B, 14B METOH5G/L_PO25%_25°C; C, 14C METOH0,8G/L_PO250%_25°C; D, 14D METOH5G/L_PO250%_35°C; E E F, EXPERIMENTOS 14E E 14F METOH2G/L_PO27,5%_30°C. MW: MOLECULAR WEIGHT (PADRÃO DE PROTEÍNAS); BLANK: BRANCO (SEM AMOSTRA). OS NÚMEROS NO TOPO DE CADA PISTA SÃO AS HORAS DE CULTIVO E OS NÚMEROS DA PISTA DO PADRÃO ESTÃO EM kDA.....	190
FIGURA 15. FOTO DAS AMOSTRAS COM AGREGADOS DE PROTEÍNAS.	226
FIG. ANEXO A. 1. VIA METABÓLICA DA HISTIDINA NO MICRORGANISMO <i>KOMAGATAELLA PHAFFI</i> , TAMBÉM DENOMINADO <i>PICHIA PASTORIS</i> GS115 (DE SCHUTTER ET AL., 2009).....	286
FIG. ANEXO A. 2. METABOLISMO DE ALANINA, ASPARTATO E DO GLUTAMATO NO MICRORGANISMO <i>KOMAGATAELLA PHAFFI</i> , TAMBÉM DENOMINADO <i>PICHIA PASTORIS</i> GS115 (DE SCHUTTER ET AL., 2009).....	287
FIG. ANEXO C. 1. GEL DE ELETROFORESE CONTENDO AS AMOSTRAS UTILIZADAS NA ANÁLISE MALDI-TOF. FORAM AVALIADAS AS BANDAS DE 7 A 12 DA COLUNA DE 144 HORAS DE CULTIVO DA CEPA PROTOTRÓFICA EM MEIO COMPLEXO EM FRASCO.....	290
FIG. ANEXO C. 2. ESPECTRO DE MASSA DAS BANDAS 7 (A), 8 (B), 9 (C), 10 (D), 11 (E) E 12 (F) DA COLUNA DE 144 HORAS DO GEL DA FIGURA C.1.1. FOI POSSÍVEL OBSERVAR QUE, NAS BANDAS INFERIORES, OS RESÍDUOS DO N-TERMINAL FORAM REDUZINDO, INDICANDO A PROTEÍNA ESTAVA TRUNCADA NESSAS BANDAS.	291
FIG. ANEXO C. 3. ESPECTRO DE MASSA DOS RESÍDUOS 49-72 COM PRESENÇA DE GLICANOS GLCNACMAN ₅ E GLCNACMAN ₆ (A), E DO RESÍDUO 169-178 COM PRESENÇA DE GLICANOS GLCNACMAN ₅ E GLCNACMAN ₆ (B) E COM AUSÊNCIA DE GLICANOS (C).....	293

Lista de Gráficos

GRÁFICO 1. RELAÇÃO ENTRE K_{LA} (h^{-1}) E AGITAÇÃO (RPM) QUANDO A AERAÇÃO É MANTIDA A 1 VVM E A TEMPERATURA EM 30°C PARA O BIOSTAT B® 2-L COM 1 L DE MEIO.	121
GRÁFICO 2. PERFIL DE CRESCIMENTO DA CEPA HIS ⁻ APRESENTADO EM CONCENTRAÇÃO CELULAR CALCULADA A PARTIR DE DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) EM FUNÇÃO DO TEMPO (T, H) EM TRÊS MEIOS DE CULTIVO DIFERENTES: BMGY, BSM E BSM + 10 G/L DE EXTRATO DE LEVEDURA. CULTIVOS REALIZADOS EM DUPLICATAS EXPERIMENTAIS.	125
GRÁFICO 3. CONCENTRAÇÃO CELULAR MÁXIMA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) EM FUNÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTIDINA ADICIONADAS AO MEIO BSM, SENDO ELAS: 40, 120, 360, 480 E 600 MG/L, E EM MEIO BMGY. DADOS PROVINDOS DE DUPLICATAS EXPERIMENTAIS.	126
GRÁFICO 4. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) E SECAGEM (X_{MS} , G/L), DE CONSUMO DE GLICEROL (S_{GLI} , G/L) E DE FORMAÇÃO DE ASPARAGINASE (A, U/L) NO EXPERIMENTO 5 COM A CEPA HIS ⁻ MEIO BSM ADICIONADO DE 480 MG/L DE HISTIDINA INICIADO COM BATELADA DE GLICEROL E INDUÇÃO COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML _{PTM1} /L A CADA 24 HORAS A PARTIR DE 24 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0 E PO ₂ > 20% COM CONTROLE EM CASCATA DA AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.	127
GRÁFICO 5. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) E SECAGEM (X_{MS} , G/L), DE CONSUMO DE GLICEROL (S_{GLI} , G/L) E DE FORMAÇÃO DE ASPARAGINASE (A, U/L) NO EXPERIMENTO 6 COM A CEPA HIS ⁻ MEIO BSM ADICIONADO DE 600 MG/L DE HISTIDINA INICIADO COM BATELADA DE GLICEROL E INDUÇÃO COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML _{PTM1} /L A CADA 24 HORAS A PARTIR DE 24 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0 E PO ₂ > 20% COM CONTROLE EM CASCATA DA AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.	128
GRÁFICO 6. DEMAIS PARÂMETROS PARA OS CULTIVOS COM CEPA HIS ⁻ : CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO (PO ₂ ,%) COM CASCATA DA AGITAÇÃO (RPM) PARA O CULTIVO BSM_480 (A) E BSM_600 (B); PERFIS DA VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, G _{O2} /L/H) E DE FORMAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CPR, G _{CO2} /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ, MOL _{CO2} / MOL _{O2}) PARA O CULTIVO BSM_480 (C) E BSM_600 (D).	131
GRÁFICO 7. DEMAIS DADOS DOS CULTIVOS COM A CEPA HIS ⁻ : PERFIS DE FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS (PROT, G/L) (A) E PROTEASES (U/ML) (B) NOS CULTIVOS BSM_480 E BSM_600; CONTROLE DO PH COM ADIÇÃO DE NH ₄ OH 25% (ML) E HCL 1 M (ML) PARA O CULTIVO BSM_480 (C) E BSM_600 (D). OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	134
GRÁFICO 8. COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR ESTIMADA POR DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) AO LONGO DO TEMPO (T) EM FRASCOS COM MEIO COMPLEXO DE CULTIVOS DE QUATROS CEPAS: HIS ⁺ , HIS ⁻ , HIS ⁺ VAZIO E SELVAGEM. FORAM REALIZADAS TRIPLICATAS BIOLÓGICAS.	136
GRÁFICO 9. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE DE ASNASE (U/L) AO LONGO DO TEMPO (T) EM FRASCOS COM MEIO COMPLEXO DE CULTIVOS DE QUATROS CEPAS: HIS ⁺ , HIS ⁻ , HIS ⁺ VAZIO E SELVAGEM. FORAM REALIZADAS TRIPLICATAS BIOLÓGICAS.	136
GRÁFICO 10. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) E SECAGEM (X_{MS} , G/L), DE CONSUMO DE GLICEROL (S_{GLI} , G/L) E DE FORMAÇÃO DE ASPARAGINASE (A, U/L) NO EXPERIMENTO 9 COM A CEPA HIS ⁺ EM MEIO BSM SEM HISTIDINA INICIADO COM BATELADA DE GLICEROL E INDUÇÃO COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML _{PTM1} /L A CADA 24 HORAS A PARTIR DE 24 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0 E PO ₂ > 20% COM CONTROLE EM CASCATA DA AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.	139
GRÁFICO 11. DEMAIS DADOS PARA OS CULTIVOS COM CEPA HIS ⁺ EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA (BSM_0): PERFIS DA VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, G _{O2} /L/H) E DE FORMAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO (CPR, G _{CO2} /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ, MOL _{CO2} / MOL _{O2}) (A); PERFIS DE FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS (PROT, G/L) E PROTEASES (U/ML) (B); CONTROLE DO PH COM ADIÇÃO DE NH ₄ OH 25% (ML) E HCL 1 M (ML) (C); CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO (PO ₂ ,%) COM CASCATA DA AGITAÇÃO (RPM) (D). OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. ...	141
GRÁFICO 12. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA (X_{DO} , G/L) E SECAGEM (X_{MS} , G/L), DE CONSUMO DE GLICEROL (S_{GLI} , G/L), DE ALIMENTAÇÃO DE METANOL MEDIDO POR BALANÇA (M_{MET} , G), E DE FORMAÇÃO DE ASPARAGINASE (A, U/L) NO EXPERIMENTO 10 COM A CEPA HIS ⁺ EM MEIO BSM SEM HISTIDINA INICIADO COM BATELADA DE GLICEROL E INDUÇÃO COM UM PULSO DE 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML _{PTM1} /L SEGUIDO DE DO-STAT COM PO ₂ EM 20% DA SATURAÇÃO COM AR. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0, AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.	143

GRÁFICO 13. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE EM RELAÇÃO À BIOMASSA ($U/G_{BIOMASSA\ SECA}$) NOS DIFERENTES EXPERIMENTOS. FOI OBSERVADA DIFERENÇA ESTATÍSTICA ENTRE AS CEPAS, SENDO QUE A HIS^+ APRESENTOU MAIS ATIVIDADE POR BIOMASSA DO QUE A HIS^- , NO ENTANTO, NÃO FOI OBSERVADA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE AS ESTRATÉGIAS DE INDUÇÃO POR PULSOS (BSM_0, EXPERIMENTO 9) E POR <i>DO-STAT</i> (BSM_0_ <i>DO-STAT</i> , EXPERIMENTO 10) COM CEPA HIS^+ . OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	145
GRÁFICO 14. DEMAIS PARÂMETROS PARA OS CULTIVOS COM CEPA HIS^+ EM MEIO BSM SEM ADIÇÃO DE HISTIDINA COM INDUÇÃO POR <i>DO-STAT</i> (BSM_0_ <i>DO-STAT</i> , EXPERIMENTO 10): CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO ($PO_2, \%$) COM CASCATA DA AGITAÇÃO (RPM) E DA ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO (M_{MET}, G) (A); PERFIS DA VELOCIDADE DE CONSUMO DE OXIGÊNIO ($OUR, G_{O_2}/L/H$) E DE FORMAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO ($CPR, G_{CO_2}/L/H$) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO ($RQ, MOL_{CO_2}/MOL_{O_2}$) (B); CONTROLE DO PH COM ADIÇÃO DE NH_4OH 25% (ML) (C); PERFIL DE FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS (PROT, G/L) (D). OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	146
GRÁFICO 15. RELAÇÃO ENTRE K_{LA} (H^{-1}) E AGITAÇÃO (RPM) QUANDO A AERAÇÃO É MANTIDA A 1 VVM E A TEMPERATURA EM 30°C PARA O BIORREATOR PROJETADO NO TCI.	167
GRÁFICO 16. MODELO DE ALIMENTAÇÃO DA SOLUÇÃO DE INDUÇÃO OBTIDO POR REGRESSÃO LINEAR DOS DADOS DE MASSA ALIMENTADA MEDIDA POR UMA BALANÇA NO EXPERIMENTO 14D.....	168
GRÁFICO 17. MODELO DE CONCENTRAÇÃO DE METANOL NO MEIO AO LONGO DO TEMPO OBTIDO POR REGRESSÃO POLINOMIAL DOS DADOS DE CONCENTRAÇÃO MEDIDA POR HPLC NO EXPERIMENTO 15.	169
GRÁFICO 18. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA ($X_{DO}, G/L$) NO EXPERIMENTO 13 COM A CEPA HIS^+ EM MEIO BSM E MEIO TCI COM BATELADA DE 4% _{v/v} DE GLICEROL E INDUÇÃO COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 MLPTM1/L OU YTM/L, RESPECTIVAMENTE, A CADA 24 HORAS A PARTIR DE 24 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0 E 5,6 (RESPECTIVAMENTE) E $PO_2 > 20\%$ COM CONTROLE EM CASCATA DA AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.....	182
GRÁFICO 19. PERFIS DE ATIVIDADE DE ASNASE CALCULADA PELO MÉTODO AHA NO EXPERIMENTO 10 COM A CEPA HIS^+ EM MEIO BSM E TCI COM BATELADA DE 4% _{v/v} DE GLICEROL E INDUÇÃO COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 MLPTM1/L OU YTM/L, RESPECTIVAMENTE, A CADA 24 HORAS A PARTIR DE 24 HORAS DE CULTIVO. OS DESVIOS SÃO DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. DEMAIS CONDIÇÕES DE CULTIVO: 30°C, PH 5,0 E 5,6 (RESPECTIVAMENTE) E $PO_2 > 20\%$ COM CONTROLE EM CASCATA DA AGITAÇÃO ENTRE 700 E 1000 RPM.	182
GRÁFICO 20. CONTROLE DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO ($PO_2, \%$) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C.	184
GRÁFICO 21. CONTROLE DA CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L) MEDIDA <i>ONLINE</i> PELO SENSOR AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C.	185
GRÁFICO 22. CONTROLE DA TEMPERATURA (°C) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C.	186
GRÁFICO 23. CONTROLE DO PH AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C.	186
GRÁFICO 24. PERFIS DE CRESCIMENTO CELULAR CALCULADOS POR DENSIDADE ÓPTICA ($X_{DO}, G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C. AS LINHAS TRACEJADAS INDICAM AS TENDÊNCIAS E OS DESVIOS PROVÊM DE DUPLICATAS ANALÍTICAS COM EXCEÇÃO DO PONTO CENTRAL, QUE É UMA DUPLICADA EXPERIMENTAL (14E E F).	187
GRÁFICO 25. PERFIS DE ATIVIDADE DE ASNASE CALCULADA PELO MÉTODO DO AHA (A, U/L) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_ PO_2 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_ PO_2 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_ PO_2 50%_25°C; 14D, METOH5G/L_ PO_2 50%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_ PO_2 27,5%_30°C. AS LINHAS TRACEJADAS INDICAM AS TENDÊNCIAS E OS DESVIOS PROVÊM DE DUPLICATAS ANALÍTICAS COM EXCEÇÃO DO PONTO	

- CENTRAL, QUE É UMA DUPLICADA EXPERIMENTAL (14E E F). OBS: APÓS 80 HORAS DE CULTIVO, O EXPERIMENTO 14E FICOU SEM ALIMENTAÇÃO DE METANOL, POR ISSO FOI ASSUMIDO QUE A TENDÊNCIA DE ATIVIDADE SERIA A DO EXPERIMENTO 14F. 189
- GRÁFICO 26. PERFIS DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNA CALCULADA PELO MÉTODO DO BCA (PROTEÍNAS TOTAIS, G/L) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_PO25%_25°C; 14B, METOH5G/L_PO25%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_PO250%_25°C; 14D, METOH5G/L_PO250%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_PO27,5%_30°C. AS LINHAS TRACEJADAS INDICAM AS TENDÊNCIAS E OS DESVIOS PROVÊM DE DUPLICATAS ANALÍTICAS COM EXCEÇÃO DO PONTO CENTRAL, QUE É UMA DUPLICADA EXPERIMENTAL (14E E F). 189
- GRÁFICO 27. PERFIS DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ NA SAÍDA DOS GASES MEDIDA PELO SENSOR BLUEINONE FERM (%) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14F. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_PO25%_25°C; 14B, METOH5G/L_PO25%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_PO250%_25°C; 14D, METOH5G/L_PO250%_35°C; 14E E 14F, METOH2G/L_PO27,5%_30°C. 192
- GRÁFICO 28. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14A COM CEPA HIS⁺ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML YTM/L E MANTIDA A PO2 5%, METANOL 0,8 G/L E TEMPERATURA DE 25 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH₄OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO2 (%) COM AGITAÇÃO (RPM); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. 194
- GRÁFICO 29. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14B COM CEPA HIS⁺ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML YTM/L E MANTIDA A PO2 5%, METANOL 5,0 G/L E TEMPERATURA DE 25 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH₄OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO2 (%) COM AGITAÇÃO (RPM); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. 195
- GRÁFICO 30. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14C COM CEPA HIS⁺ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML YTM/L E MANTIDA A PO2 50%, METANOL 0,8 G/L E TEMPERATURA DE 25 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH₄OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO2 (%) COM AGITAÇÃO (RPM) E OXIGÊNIO PURO (L); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. 196
- GRÁFICO 31. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14D COM CEPA HIS⁺ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML YTM/L E MANTIDA A PO2 50%, METANOL 5,0 G/L E TEMPERATURA DE 35 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH₄OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO2 (%) COM AGITAÇÃO (RPM) E OXIGÊNIO PURO (L); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR *ONLINE* (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS. 197
- GRÁFICO 32. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14E COM CEPA HIS⁺ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 ML DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 ML YTM/L E MANTIDA A PO2 27,5%, METANOL 2,0 G/L E TEMPERATURA DE 30 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA ($G_{BIOMASSA\ SECA}/L$), DE GLICEROL,

ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR ONLINE (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH ₄ OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO ₂ (%) COM AGITAÇÃO (RPM) E OXIGÊNIO PURO (L); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR ONLINE (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	198
GRÁFICO 33. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 14F COM CEPA HIS+ NO MEIO DE GURRAMKONDA ET AL. (2010) COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 24 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 30 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 mL DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 mL YTM/L E MANTIDA A PO ₂ 27,5%, METANOL 2,0 G/L E TEMPERATURA DE 30 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA (G _{BIOMASSA SECA} /L), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L), METANOL PELO SENSOR ONLINE (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH ₄ OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO ₂ (%) COM AGITAÇÃO (RPM) E OXIGÊNIO PURO (L); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC E PELO SENSOR ONLINE (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	199
GRÁFICO 34. PERFIS DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, GO ₂ /L/H), DE PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO (CPR, GCO ₂ /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ _{MÉDIO} , MOLCO ₂ /MOL O ₂) AO LONGO DO TEMPO NOS EXPERIMENTOS 14A A 14D. SENDO QUE: 14A, METOH0,8G/L_PO ₂ 5%_25°C; 14B, METOH5G/L_PO ₂ 5%_25°C; 14C, METOH0,8G/L_PO ₂ 50%_25°C; E 14D, METOH5G/L_PO ₂ 50%_35°C.....	200
GRÁFICO 35. PERFIS DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, GO ₂ /L/H), DE PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO (CPR, GCO ₂ /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ, MOLCO ₂ /MOL O ₂) AO LONGO DO TEMPO NO EXPERIMENTO 14E., METOH2G/L_PO ₂ 27,5%_30°C. OBS: APÓS DE 84 H HOUVE FALHA NA ALIMENTAÇÃO DE METANOL.	201
GRÁFICO 36. PERFIS DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, GO ₂ /L/H), DE PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO (CPR, GCO ₂ /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ, MOLCO ₂ /MOL O ₂) AO LONGO DO TEMPO NO EXPERIMENTO 14F., METOH2G/L_PO ₂ 27,5%_30°C. OBS: APÓS 80 H, A CONCENTRAÇÃO DE O ₂ NA SAÍDA MEDIDA FOI MAIOR DO QUE DE ENTRADA, POSSIVELMENTE POR ERROS NA MEDIDA DO EQUIPAMENTO SENDO OPERADO FORA DA FAIXA RECOMENDADA.....	201
GRÁFICO 37. A) GRÁFICO DE PARETO, INDICA QUAIS SÃO AS VARIÁVEIS MAIS RELEVANTES PARA O MODELO; B) GRÁFICOS DE RESÍDUOS, DEMONSTRA QUE HÁ HOMOSCEDASTICIDADE E INDEPENDÊNCIA DOS DADOS; C) GRÁFICO DE EFEITOS PRINCIPAIS E D) GRÁFICO DE SUPERFÍCIE DEMONSTRAM O EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L) E DA TEMPERATURA (°C) SOBRE A ATIVIDADE (U/L). GRÁFICOS A A C GERADOS NO SOFTWARE MINITAB E D EM MATLAB PELA AUTORA.....	204
GRÁFICO 38. GRÁFICO DE CONTOURNO DA RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L) E DA TEMPERATURA (OC) SOBRE A ATIVIDADE (U/L).	205
GRÁFICO 39. COMPARAÇÃO ENTRE OS EXPERIMENTOS 14D E 15: A) PERFIS DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA XDO (G/L) E DO CONSUMO DE GLICEROL SGLICEROL (G/L); B) PERFIS DE MASSA DE METANOL MEDIDA PELA BALANÇA (G); C) PERFIS DE ATIVIDADE (A, U/L) E DE CONCENTRAÇÃO MEDIDA POR HPLC E POR SENSOR <i>ONLINE</i> (G/L); D) PERFIS DO CPR (MGCO ₂ /L/H) AO LONGO DO TEMPO. OS DESVIOS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	207
GRÁFICO 40. PRINCIPAIS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO 15 COM CEPA HIS+ NO MEIO TCI COM BATELADA DE 4% v/v DE GLICEROL ATÉ APROXIMADAMENTE 34 HORAS, SEGUIDA DE TRANSIÇÃO SEM ALIMENTAÇÃO DE SUBSTRATO ATÉ 38 H E INDUÇÃO INICIADA COM 10 mL DE SOLUÇÃO DE METANOL + 12 mL YTM/L E MANTIDA A PO ₂ 50%, METANOL ALMEJANDO 5,0 G/L E TEMPERATURA DE 35 °C. A) PERFIS DE CRESCIMENTO MEDIDO POR DENSIDADE ÓPTICA (G _{BIOMASSA SECA} /L), DE GLICEROL, ETANOL E METANOL MEDIDOS POR HPLC (G/L) E ATIVIDADE PELO MÉTODO AHA (U/L); B) CONTROLE DO pH COM ADIÇÃO DE NH ₄ OH 25% v/v E HCL 1 M (mL); C) CONTROLE DO PO ₂ (%) COM AGITAÇÃO (RPM), OXIGÊNIO PURO (L) E AERAÇÃO (VVM) E CONTROLE DA TEMPERATURA (°C); D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL MEDIDA POR HPLC (G/L) E MASSA TOTAL DE METANOL ALIMENTADA (G). DESVIOS PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.....	210
GRÁFICO 41. PERFIS DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE OXIGÊNIO (OUR, GO ₂ /L/H), DE PRODUÇÃO DE GÁS CARBÔNICO (CPR, GCO ₂ /L/H) E DO COEFICIENTE RESPIRATÓRIO MÉDIO (RQ, MOLCO ₂ /MOL O ₂) AO LONGO DO TEMPO NO EXPERIMENTO 15, METOH5G/L_PO ₂ 50%_35°C.	211
GRÁFICO 42. PORCENTAGEM DO FLUXO DE CARBONO PARA BIOMASSA E GÁS CARBÔNICO EM RELAÇÃO AO FLUXO DE CARBONO DO SUBSTRATO DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM GLICEROL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15.....	216

GRÁFICO 43. PORCENTAGEM DO FLUXO DE CARBONO EM RELAÇÃO AO FLUXO DE CARBONO DO SUBSTRATO DURANTE A FASE EXPONENCIAL DO CRESCIMENTO EM METANOL PARA OS EXPERIMENTOS 14A A 14F E 15.	221
GRÁFICO 44. RELAÇÃO ENTRE AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E AS VELOCIDADES ESPECÍFICAS, SENDO ELAS: VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO MÁXIMO ($\mu_{MÁX}$, 1/H) POR A) TEMPERATURA (°C) E B) CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (PO_2 , %); C) VELOCIDADE ESPECÍFICA DE FORMAÇÃO DE PRODUTO (Q_P , $U/G_{BIOMASSA\ SECA}/H$) PELA TEMPERATURA (°C); D) VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CONSUMO DE O_2 (Q_{O_2} , $O_2/G_{BIOMASSA\ SECA}/H$) E FORMAÇÃO DE C_2 (Q_{CO_2} , $CO_2/G_{BIOMASSA\ SECA}/H$) PELA CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L).....	223
GRÁFICO 45. RELAÇÃO ENTRE AS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E OS COEFICIENTES DE CONVERSÃO, SENDO ELAS: COEFICIENTE DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO A BIOMASSA (Y_{XS} , $G_{BIOMASSA\ SECA}/G_{METANOL}$) POR A) TEMPERATURA (°C) E B) CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L); COEFICIENTE DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO A PRODUTO (Y_{PS} , $U/G_{METANOL}$) POR C) (°C) E D) CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L)...	224
GRÁFICO 46. ATIVIDADE VOLUMÉTRICA NO SOBRENADANTE (U/L) MEDIDA AO LONGO DO TEMPO (H) APÓS INÍCIO DA INCUBAÇÃO A A) 30 °C E B) 35 °C. OS ERROS SÃO PROVINDOS DE DUPLICATAS ANALÍTICAS.	225
GRÁFICO APÊNDICE A. 1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO_{600}) LIDA A $\lambda=600$ NM PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (X , $G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) PELA ABSORBÂNCIA COM LINEARIDADE DE ATÉ 25G/L OBTIDA POR FILTRAÇÃO EM MEMBRANA SEGUIDA DE SECAGEM EM TRIPPLICATA EXPERIMENTAL.	255
GRÁFICO APÊNDICE A. 2. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO_{600}) LIDA A $\lambda=600$ NM PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (X , $G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) PELA ABSORBÂNCIA COM LINEARIDADE DE ATÉ 20 G/L EM MEIO COMPLEXO BMGY OBTIDA POR SECAGEM EM ESTUFA EM DUPLICATA EXPERIMENTAL.	256
GRÁFICO APÊNDICE A. 3. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO_{600}) LIDA A $\lambda=600$ NM PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (X , $G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) PELA ABSORBÂNCIA COM LINEARIDADE ATÉ 10 G/L EM MEIO SINTÉTICO OBTIDA POR SECAGEM EM ESTUFA EM DUPLICATA EXPERIMENTAL.....	257
GRÁFICO APÊNDICE A. 4. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO_{600}) LIDA A $\lambda=600$ NM PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (X , $G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) PELA ABSORBÂNCIA COM LINEARIDADE ENTRE 10G/L E 15 G/L EM MEIO SINTÉTICO OBTIDA POR SECAGEM EM ESTUFA EM DUPLICATA EXPERIMENTAL.	258
GRÁFICO APÊNDICE A. 5. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO_{600}) LIDA A $\lambda=600$ NM PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (X , $G_{BIOMASSA\ SECA}/L$) PELA ABSORBÂNCIA COM LINEARIDADE ENTRE 15G/L E 40 G/L EM MEIO SINTÉTICO OBTIDA POR SECAGEM EM ESTUFA EM DUPLICATA EXPERIMENTAL.	259
GRÁFICO APÊNDICE A. 6. ESPECTRO UV- VIS (350 -750 NM) DO β -HIDROXAMATO ASPÁRTICO. CURVA CONSTRUÍDAS PELOS DOUTORES TALES COSTA E IGNÁCIO MOGUEL.....	261
GRÁFICO APÊNDICE A. 7. CURVA PADRÃO EM μ MOLS DE β -HIDROXAMATO ASPÁRTICO PH 8,6, TAMPÃO TRIS-HCL 20 MM, EM RELAÇÃO À ABSORBÂNCIA MEDIDA A 500 NM REALIZADA EM TRIPPLICATA EXPERIMENTAL.....	262
GRÁFICO APÊNDICE A. 8. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO ENZIMÁTICA, ESCOLHER UM TEMPO NA FAIXA DE AUMENTO LINEAR DA ABSORBÂNCIA (ESQUERDA) E QUE TENHA ATIVIDADE VOLUMÉTRICA CONSTANTE (DIREITA).	264
GRÁFICO APÊNDICE A. 9. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (μ G/M L) PELA ABSORBÂNCIA LIDA A λ 562 NM COM LINEARIDADE ATÉ 1000 μ G/M L OBTIDA POR TRIPPLICATA EXPERIMENTAL PELO MÉTODO BCA, SIGMA, LOTE SHBH4613V	266
GRÁFICO APÊNDICE A. 10. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS (μ G/M L) PELA ABSORBÂNCIA LIDA A λ 562 NM COM LINEARIDADE ATÉ 2000 μ G/M L OBTIDA POR TRIPPLICATA EXPERIMENTAL PELO MÉTODO PIERCE® BCA PROTEIN ASSAY KIT, THERMOFISHER, LOTE PI209533.	267
GRÁFICO APÊNDICE A. 11. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL (G/L) PELA ABSORBÂNCIA LIDA A λ 505 NM DADA PELO <i>KIT</i> LIQUIFORM (LABTEST) COM LINEARIDADE ATÉ 2,5 G/L DE GLICEROL OBTIDA POR TRIPPLICATA EXPERIMENTAL. LOTE 1909.	268
GRÁFICO APÊNDICE A. 12. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METANOL (G/L) PELA VOLTAGEM (MV) LIDA PELO SENSOR DE METANOL DA RAVEN BIOTECH: A) COM LINEARIDADE ATÉ 1,3 G/L DE METANOL E B) COM REGRESSÃO POLINOMIAL ACIMA DE 1,6 ATÉ 15 G/L À DIREITA, AMBAS OBTIDAS POR DUPLICATA EXPERIMENTAL.....	272

GRÁFICO APÊNDICE B. 1. DADOS EXPERIMENTAIS PARA DETERMINAR A EVAPORAÇÃO DE METANOL: VOLUME ADICIONADO DE METANOL, VOLUME MEDIDO POR HPLC PRESENTE NO MEIO E VOLUMES TOTAIS DO MEIO MEDIDOS NO INÍCIO E NO FIM DO EXPERIMENTO (A); FUNÇÃO DE ALIMENTAÇÃO DE METANOL OBTIDA POR REGRESSÕES LINEARES (B); FUNÇÃO DE CONCENTRAÇÃO REAL DE METANOL (HPLC) OBTIDA POR REGRESSÕES LINEARES (C); PERFIL DA TAXA DE EVAPORAÇÃO PELA CONCENTRAÇÃO REAL (D); NOVO PERFIL DA TAXA DE EVAPORAÇÃO PELA CONCENTRAÇÃO REAL USANDO A FUNÇÃO “ATINGIR META” (E); PERFIL DOS VOLUMES TEÓRICOS E VALORES MEDIDOS DO MEIO AO LONGO DO EXPERIMENTO (F).....	275
--	-----

Sumário

CAPÍTULO 1. Introdução Geral	30
1.1 Introdução.....	31
1.1.1. Objetivos Gerais.....	36
1.2. Revisão Bibliográfica	37
1.2.1. Aspectos da produção de proteínas terapêuticas	37
1.2.2. L-asparaginase: da descoberta às aplicações clínicas	51
1.2.3. <i>Pichia pastoris</i> : plataforma de expressão para proteínas recombinantes.....	62
1.2.4. O cultivo de <i>Pichia pastoris</i> em biorreatores.....	79
1.2.5. Ferramentas para avaliar diversos parâmetros ao mesmo tempo no cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	88
1.2.6. Avaliação da consistência dos dados experimentais.....	91
CAPÍTULO 2. Seleção de uma cepa de <i>Pichia pastoris</i> produtora de ASNase e desenvolvimento dos cultivos em batelada-alimentada.....	97
Resumo	98
2.1. Introdução.....	99
2.1.1. Objetivos Específicos.....	100
2.2. Materiais e Métodos	101
2.2.1 Procedimentos Experimentais	101
2.2.2 Métodos Analíticos	110
2.2.3 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos e de Transferência de Oxigênio.....	116
2.2.5 Análise Estatística Monovariada.....	123
2.2.6 Conjunto de Experimentos	124
2.3 Resultados.....	125
2.3.1 Experimentos de 1 a 4: cepa His ⁻ em frascos agitados.....	125
2.3.2 Experimentos 5 e 6: cepa His ⁻ cultivada em meio BSM em biorreator	127
2.3.3. Experimento 7: Transformação da cepa His ⁺	135
2.3.4. Experimento 8: comparação de cepas em frascos com meio complexo	135
2.3.5. Experimento 9: cepa His ⁺ cultivada em meio BSM em biorreator	138
2.3.6. Experimento 10: cepa His ⁺ cultivada em meio BSM com indução por meio de <i>DO-stat</i> em biorreator.....	142
2.3.7. Experimento 11: Caracterização da ASNase extracelular.....	147
2.4. Discussão	149
2.5. Conclusões Parciais	155
CAPÍTULO 3. Aumento da produção de L-Asparaginase com controle das condições de indução	156
Resumo	157

3.1. Introdução.....	158
3.1.1. Objetivos Específicos.....	161
3.2. Materiais e Métodos	161
3.2.1. Procedimentos Experimentais.....	161
3.2.2. Métodos Analíticos	170
3.2.3. Cálculos.....	172
3.2.4. Conjunto de Experimentos	178
3.3. Resultados.....	179
3.4. Discussão.....	226
3.5. Conclusões Parciais	233
CAPÍTULO 4. Conclusões	234
LISTA DE PUBLICAÇÕES	238
Referências Bibliográficas.....	240
Apêndice A. Métodos Analíticos usados nos capítulos 2 e 3.....	254
Apêndice B. Função de evaporação	273
Apêndice C. Algoritmos MATLAB	278
Anexos.....	285
Anexo A: Fluxos Metabólicos com Participação da Histidina.....	286
Anexo B: Protocolo de gel de poliacrilamida para Eletroforese SDS-PAGE.....	288
Anexo C: Análise MALDI-TOF da ASNase glicosilada	290

CAPÍTULO 1.
INTRODUÇÃO GERAL

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1 Introdução

O Brasil é extremamente dependente da importação de medicamentos biológicos. Segundo o Ministério da Saúde, 40% do orçamento disponível para o SUS (Sistema Único de Saúde) para compra de medicamentos é destinado à distribuição de medicamentos biológicos, que atendem apenas 2% do total de pacientes assistidos pelo SUS (MEGA, 2019). Além disso, entre os 15 maiores mercados farmacêuticos globais, o Brasil é o único que não domina a tecnologia de fabricação de biofármacos (GUIA, 2020). Mais ainda, segundo a Associação de Insumos Farmacêuticos do Brasil, a produção de insumos farmacêuticos reduziu em 50% nos últimos 40 anos (PAGLIA, 2021). Esta dependência em relação aos biofármacos importados é preocupante não apenas pelo fator econômico, mas também pelo risco de não abastecimento.

Um dos exemplos mais icônicos ocorreu durante o desenvolvimento dessa tese, período em que a pandemia de covid-19 afetou duramente o país e escancarou a sua dependência pela importação de insumos farmacêuticos para a fabricação de vacinas, sendo essa uma das causas da vacinação lenta que, conseqüentemente, resultou em prejuízos materiais e humanos sem precedentes (PAGLIA, 2021). Infelizmente, a falta de insumos já causou outros desabastecimentos recentemente, um desses casos foi a ruptura no estoque do biofármaco L-asparaginase (ASNase) que é utilizado no tratamento de diversos cânceres, em especial, da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), um dos principais tipos de câncer infantil (INCA, 2001).

Até 2013, a ASNase comercializada no Brasil era produzida pelo laboratório dinamarquês Lundbeck e distribuída no Brasil pelo laboratório argentino Bagó (GADELHA; LIMA, 2017; LEAL, 2014). Entretanto, por questões comerciais e problemas de logística, a produção foi descontinuada, deixando milhares de pacientes sem tratamento. Apesar de não possuir registro, pela necessidade de continuação desses tratamentos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permitiu a compra de ASNases por regime de emergência. Além disso, foi realizada uma chamada pública para propostas para a fabricação nacional do medicamento. Entre essas propostas, destaca-se a da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), ela estabeleceu parceria com as empresas *NT Pharma* e *Unitec Biotec* para início da produção nacional de ASNase em

2015 (SCHMIDT, 2014), entretanto, esse acordo não se concretizou (comunicação pessoal).

Por anos, ASNases foram compradas em regime emergencial pelo SUS de diversos fabricantes. Em 2017, o Ministério da Saúde adquiriu a ASNase do laboratório chinês *Beijing SL Pharmaceutical*, que foi distribuída pela empresa *Xetley S. A.* por um valor, aproximadamente, quatro vezes menor que em relação aos concorrentes (MINISTÉRIO PÚBLICO, 2017). A Tabela 1 apresenta os valores dos fármacos nessa licitação.

Tabela 1. Valores dos biofármacos por dose de ASNase apresentados na licitação realizada pelo Ministério da Saúde em 2017. O número de doses por tratamento depende do biofármaco. Estima-se que foram compradas 61.300 doses da Leuginase® (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Nome Comercial	Fonte	Preço (USD)/ dose
Leuginase®	<i>Escherichia coli</i> nativa	38,00
Oncaspar®	<i>E. coli</i> peguilada	1.619,10
Spectrila®	<i>E. coli</i> recombinante	582,17

Entretanto, especialistas afirmaram que a qualidade desse medicamento era inferior aos demais utilizados (G1, 2017; HARUMI, 2017). De acordo com os testes realizados pelo laboratório americano *MSBioworks* e o brasileiro Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), o fármaco chinês (Leuginase®) contém elevado grau de impurezas em comparação às referências produzidas no Japão e na Alemanha. Adicionalmente, Cecconello et al. (2018) demonstraram que ele possui meia-vida inferior à referência de *E. coli* nativa. Diante destes resultados, o Ministério Público Federal aconselhou seu recolhimento do SUS e a proibição da compra (MORAIS, 2017; VALOR, 2017).

A partir de fevereiro de 2018, com o registro da ASNase peguilada (nome comercial Oncaspar®, Exelead, EUA), adotou-se esse biofármaco como referência e a compra se tornou responsabilidade de cada hospital oncológico e não mais do SUS (DA ROSA, 2018). Adicionalmente, em 2019, também foi registrada uma ASNase recombinante (Spectrila®, Rentschler Biopharma SE, Alemanha) (ANVISA, 2019). Esses registros devem contribuir para a garantia do abastecimento interno, no entanto, ainda ocorrem desabastecimentos tanto no Brasil (RODRIGUES, 2019) quanto no exterior (AGHJAYAN, 2019). Por isso, desenvolver a produção nacional desse fármaco seria a alternativa mais adequada para reduzir a dependência externa e eliminar as variações cambiais que encarecem os medicamentos.

Portanto, visando atender a essa demanda nacional, foi criado o projeto temático da Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) intitulado “Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco antileucêmico” (processo 13/08617-7) em vigência entre julho de 2014 e dezembro de 2019, ao qual esta tese está vinculada. O principal objetivo do projeto foi a obtenção de variantes inovadoras da enzima L-asparaginase com potencial de se tornarem biofármacos com produção nacional. O projeto envolveu inúmeras instituições nacionais (USP, UFPE, UNICAMP, UNESP, UnB, entre outras) e internacionais (*King’s College London* (Inglaterra), *University of Genova* (Itália), Universidade do Minho (Portugal), *Universidad de La Frontera* (Chile), *Leibniz University Hannover* (Alemanha), *Technical University of Denmark* (Dinamarca)), com participação de ao menos 30 pesquisadores entre professores e alunos ao longo desses anos, já resultou em mais de 40 publicações entre artigos e trabalhos em congressos e uma patente e foi coordenado pelo Professor Doutor Adalberto Pessoa Junior da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Nos anos iniciais, os pesquisadores do projeto objetivaram a seleção de microrganismos produtores de ASNase. Duas vertentes foram adotadas: bioprospecção de produtores naturais e aplicação de ferramentas de biologia sintética para obtenção de microrganismos recombinantes capazes de produzir ASNase com os atributos de interesse. Entre os produtores naturais, destacam-se os fungos filamentosos *Aspergillus spp.* prospectados do cerrado e da caatinga e as leveduras prospectadas da Antártica, como a *Leucosporidium muscorum*. Essas enzimas apresentaram características interessantes e podem ser conferidas nos trabalhos de Costa-Silva et al., (2018), da Rocha et al. (2019), Freire et al. (2020) e Moguel, Yamakawa, Pessoa, & Mussatto (2020). Já a segunda vertente resultou em novas cepas de *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi* e *Pichia pastoris* capazes de expressar ASNases das mesmas bactérias ou de *Saccharomyces cerevisiae* com maior produtividade e atributos aprimorados, como glicosilações humanizadas e resistência a proteases. Destacam-se os trabalhos de Costa et al. (2016); Effer et al. (2017, 2020), Lima et al. (2020), M. A. D. Rodrigues et al. (2020) e de Moura et al. (2020).

Concomitante à seleção de cepas, foram estudadas condições de cultivo em biorreatores de bancada de algumas variantes, como os trabalhos de produção de uma ASNase de *Saccharomyces cerevisiae* expressa por *P. pastoris* de D. Rodrigues et al. (2019) e Pillaca-Pullo et al. (2021), assim como foram estabelecidas as primeiras

condições de *downstream*, como a purificação por etapas de cromatografia de uma ASNase de *S. cerevisiae* expressa em *E. coli* feita por Santos et al. (2017) e por separação aquosa de uma variante de ASNase de *E. coli* realizada por Santos et al. (2018), e de finalização com aplicação de nanotecnologias, como a peguilação de uma variante de ASNase de *D. chrysanthemi* realizada por Torres-Obreque et al. (2019) e a encapsulação em polimerossomos feita por Apolinário, Ferraro, de Oliveira, Pessoa Jr, & de Oliveira Rangel-Yagui (2019).

Entre todas as isoformas estudadas pelo grupo, ganharam relevância as ASNases produzidas em *E. coli* (EcA) com mutações-dirigidas para aprimoramento das propriedades farmacodinâmicas e a ASNase de *D. chrysanthemi* (ErA) produzida por *P. pastoris* com glicosilação humanizada, pois essas variantes apresentam atividade comparável ao biofármaco de referência com efeitos imunogênicos reduzidos, sendo consideradas como potenciais *biobetters* (produto inovador aprimorado em relação ao medicamento referência). Dentro desse contexto, o principal objetivo desse doutorado foi desenvolver as fases de *upstream*, desde a transformação da cepa produtora até cultivos em biorreator, da produção da ErA em *Pichia pastoris*. Essa variante foi construída pelo doutor Brían Effer, sob orientação da Profa. Gisele Monteiro, e as etapas de *downstream* foram desenvolvidas pelo doutor Eduardo Krebs Kleingsinds, sob orientação do Prof. Adalberto Pessoa Jr., concomitante a esta tese.

A escolha da plataforma de expressão *Pichia pastoris Glycoswitch*[®] (Biogramatics Inc.) foi essencial para a obtenção de uma nova variante de ErA promissora, pois essa linhagem é capaz de realizar glicosilações humanizadas. Naturalmente, cepas de leveduras são capazes de realizar glicosilações, no entanto, elas apresentam longas cadeias de manoses que causam efeitos imunogênicos em humanos, sendo inadequadas para a produção de proteínas terapêuticas. No entanto, a linhagem selecionada teve o gene nativo responsável pela hipermanosilação, OCH1, deletado e foi transformada para produzir glicanos com até cinco manoses, reduzindo a sua imunogenicidade (JACOBS et al., 2009).

Além disso, ela apresenta outras vantagens comuns ao gênero *Pichia*, como obtenção de alta concentração celular em meio definido, genoma bem conhecido e adequado para manipulação gênica, mecanismo de expressão heteróloga regulado por um promotor forte, possibilidade de desvincular crescimento da produção, capacidade de

produção heteróloga intracelular ou extracelular com alta eficiência de secreção, ausência de patogenicidade e imunogenicidade humana, entre outras. Além de ser considerada uma plataforma segura pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) desde 2006 e já ser utilizada em mais de 15 produtos registrados, inclusive para produção de biofármacos com glicosilação (CEREHINO; CREGG, 2000; FERREIRA, 2013; JUTURU; WU, 2018; POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012; VALERO, 2013).

Essa ErA inovadora foi caracterizada por Effer et al. (2020), que confirmaram que, em relação à ErA comercial, ela possui 68,5% da atividade de ASNase preservada, redução de 37,5% na atividade de glutaminase, e 30% a mais de estabilidade em sêrum humano após 48 horas de incubação. Além disso, ela apresenta glicosilação em um epítopo previsto como imunogênico para células-T e, portanto, a glicosilação desse sítio teria o efeito de escudo contra o sistema imune. Ademais, adicionam-se outras vantagens da glicosilação, como melhora da solubilidade, do dobramento correto de proteínas e da tolerância do organismo ao reduzir a agregação e a imunogenicidade (FDA, CDER, & CBER, 2014; Nadeem et al., 2018; L. Wang & Lomino, 2012). Apesar dessa variante ter alto potencial farmacológico, apenas cultivos em frascos haviam sido realizados anteriormente a esta tese. Portanto, o objetivo principal deste doutorado foi desenvolver as etapas iniciais da produção em biorreatores com potencial de escalonamento para uma futura produção industrial.

Os objetivos do trabalho apresentado no segundo capítulo foram a seleção da cepa produtora e a comparação de estratégias de indução em biorreator. Duas linhagens foram estudadas, uma auxotrófica e outra prototrófica para histidina, em frascos com meio complexo e em biorreator de 2 L com meio sintético. Para a viabilização do cultivo em meio sintético da cepa auxotrófica, foi realizado um estudo de seleção de meio em frascos com concentração crescente de histidina. Adicionalmente, as cepas foram caracterizadas em relação ao fenótipo e número de cópias de genes. Definindo como critério de seleção a atividade volumétrica final extracelular de ASNase, a cepa prototrófica foi escolhida para continuidade da tese. Posteriormente, foi modificada a estratégia de indução em biorreator de pulsos para malha fechada com controle do oxigênio dissolvido, pois o oxigênio é altamente demandado nesse processo. Essa mudança resultou em cerca de duas vezes mais atividade volumétrica.

O terceiro capítulo abordou a segunda fase da tese, que foi parcialmente realizada durante estágio no exterior (bolsa BEPE Fapesp 2019/02657-3) no Instituto Técnico de Química da Universidade de Hanôver (Alemanha) sob orientação da Profa. Dra. Ursula Rinas entre junho de 2019 e fevereiro de 2020. Os estudos focaram no aprimoramento dos cultivos em biorreatores de bancada com mudança no meio de cultivo e na estratégia de indução. Por meio de um planejamento experimental foram avaliados os efeitos da temperatura, do oxigênio e do metanol (indutor) sobre a expressão heteróloga. A combinação dessas modificações resultou em aumento de, aproximadamente, oito vezes na atividade volumétrica em relação à estratégia de pulsos. Ademais, foram realizados estudos de caracterização da estrutura da proteína e de estabilidade. Finalmente, os dados desses cultivos foram analisados por balanço de carbono e análise sistemática de erros, fornecendo informações que viabilizem o escalonamento da produção.

Enfim, no quarto capítulo foram apresentadas as principais conclusões, as limitações e as recomendações para continuidade deste estudo. Em seguida, foram apresentadas as publicações geradas durante esta tese, e os protocolos e os algoritmos que suportaram as análises de dados foram incluídos em Anexos e Apêndices.

1.1.1. Objetivos Gerais

Objetiva-se estabelecer as condições de cultivo de uma linhagem de *P. pastoris Glycoswitch*[®] geneticamente modificada para expressão de L-asparaginase II de *D. chrysanthemi* (ErA II) em biorreatores de bancada do tipo tanque agitado por meio do desenvolvimento de um sistema robusto de controle que permita a padronização dos cultivos e o futuro escalonamento da produção. Para atingir esse objetivo as seguintes etapas foram percorridas:

1. Definir e caracterizar a cepa de *Pichia pastoris* mais adequada para a produção de L-asparaginase inovadora;
2. Estudar o comportamento de crescimento e de produção da enzima em frascos agitados em meio complexo;
3. Estudar o comportamento de crescimento em frascos agitados em meio definido;

4. Analisar o crescimento e produção em biorreator de 2 L em meio definido com protocolo semelhante ao executado em frascos agitados (malha aberta);
5. Aprimorar o protocolo de produção em biorreator em meio definido por indução com metanol por meio de diferentes estratégias de controle em malha fechada;
6. Estudar os efeitos da temperatura, oxigênio dissolvido e metanol sobre a atividade volumétrica final com base em delineamento estatístico;
7. Elaborar modelo de regressão da atividade volumétrica com base no resultado do planejamento experimental;
8. Calcular os parâmetros cinéticos por balanço de carbono e análise sistemática de erros;
9. Caracterizar a ErA, como estabilidade em meio de cultivo, massa molecular, mapeamento peptídico e perfil de glicosilação.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Aspectos da produção de proteínas terapêuticas

1.2.1.1. Breve Panorama da Indústria Biofarmacêutica

Desde o primeiro registro de um medicamento biológico em 1982, a indústria biofarmacêutica vem crescendo impulsionada pelos avanços de múltiplos campos da ciência até se consolidar como uma indústria multibilionária. É considerado um biofármaco ou medicamento biológico qualquer produto manufaturado ou extraído de fontes biológicas, como vacinas, componentes do sangue, alergênicos, hormônios, proteínas, ácidos nucleicos, células e tecidos. Esses medicamentos têm revolucionado o tratamento de doenças metabólicas (diabetes, obesidade, hipoglicemia), doenças hematológicas (anemia, hemofilia, trombose), oncológicas (leucemias, melanomas, tumores sólidos), infecciosas (hepatite, gripe, HIV), e muitas outras. Além dos recentes

avanços no tratamento de doenças genéticas através de terapia gênica e celular (WALSH, 2018).

Nos últimos 5 anos, a indústria biofarmacêutica cresceu 8,6% ao ano, enquanto a indústria farmacêutica apenas 2,3% (TOLSTRUP, 2020). Esse crescimento foi impulsionado principalmente pelas vendas de anticorpos monoclonais. Entre os dez medicamentos mais vendidos no mundo em 2020, cinco são biológicos, sendo que quatro são anticorpos monoclonais e um é uma outra proteína recombinante (SAGONOWSKY, 2021). A venda de anticorpos monoclonais é alavancada sobretudo pelo mercado oncológico. De acordo com a OMS, câncer foi a segunda maior causa de mortes globalmente em 2018 (World Health Organization (WHO), 2019) e a maioria dos protocolos de tratamento ainda se baseia em cirurgia, radioterapia e quimioterapia com muitos efeitos colaterais para o paciente. Portanto, existe uma grande demanda por medicamentos mais precisos e seletivos como os biofármacos (SANCHEZ-GARCIA et al., 2016).

Para os próximos anos, é previsto um aumento significativo de biofármacos aprovados, pois mais de 1.200 estão em testes clínicos atualmente. Entre eles, há predominância de proteínas terapêuticas com destaque para anticorpos monoclonais produzidos em células animais para o tratamento de câncer e doenças imunológicas, consolidando a tendência atual. Além disso, o fim de muitas patentes impulsionará a produção de biossimilares, principalmente, em mercados não desenvolvidos. Adicionalmente, as terapias baseadas em células, em especial em células T, devem ganhar espaço no tratamento oncológico e se tornar um dos principais produtos da indústria biofarmacêutica (SANCHEZ-GARCIA et al., 2016; TOLSTRUP, 2020; WALSH, 2018).

1.2.1.2. *Biológicos: biofármacos, biossimilares & biobetters*

Por definição da FDA (*Food and Drug Administration*), biológicos são produtos isolados de fontes naturais, como seres humanos, animais e microrganismos, são caracterizados por estruturas complexas compostas de açúcares, peptídeos ou ácidos nucleicos e são produzidos por biotecnologia. Já para a EMA (*European Medicines Agency*), a definição é mais generalizada, sendo biológico qualquer produto cuja

substância ativa provém de organismo vivo. Enquanto para a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a definição se destina a moléculas complexas de alta massa molecular obtidas a partir de fluidos ou tecidos biológicos ou procedimento biotecnológico de manipulação de material genético (DNA recombinante ou outra técnica de mutação) que se enquadram em uma das seguintes categorias: alérgenos, anticorpos monoclonais, biomedicamentos, hemoderivados, probióticos ou vacinas.

Medicamentos biológicos inovadores, biofármacos, levam de 10 a 15 anos em média desde a descoberta até a comercialização. Nesse período, além do desenvolvimento do processo de produção, ainda precisam ser aprovados em testes clínicos de fase I, II e III para a sua aceitação pelas agências reguladoras (TOLSTRUP, 2020). Apesar desse longo período de desenvolvimento e testes, a taxa média de sucesso de aprovação chega a apenas 27% (ULTEE, 2014) e, mesmo aprovados, continuam sob constante vigilância das agências com risco de serem retirados do mercado. Os riscos e os altos investimentos feitos no desenvolvimento de um biológico inovador são recompensados por patentes de forma a proteger o fabricante dos concorrentes e compensar os gastos do processo. Devido à complexidade do processo e ao rígido controle de qualidade, geralmente, biofármacos são mais caros do que medicamentos sintéticos.

Com o fim dessas patentes, apareceram no mercado os medicamentos biossimilares, que são produtos com o mesmo princípio ativo de um biofármaco inovador (referência), mas que apresentam diferenças em relação ao sistema de expressão usado, ou ao processo de produção, sem afetar as características de farmacocinética e farmacodinâmica, qualidade, eficácia e segurança. Esses medicamentos são registrados por meio de testes comparativos com o medicamento inovador, principalmente, por meio de caracterizações analíticas, como: massa molecular por cromatografia ou eletroforese capilar; sequenciamento da estrutura primária por espectrometria de massa com mapeamento de peptídeos; estrutura secundária por difração celular; terciária por cristalografia; análise de glicosilação, pontes dissulfeto e outras modificações por cromatografia e espectrometria mássica; ponto isoelétrico e pureza por cromatografia; e atividade por bioensaios (ULTEE, 2014; WALSH, 2018).

O registro de um biossimilar apresenta como vantagens tempo reduzido de desenvolvimento, testes clínicos mais enxutos e maior taxa de sucesso após os testes clínicos de, em média, 65%. Dadas essas vantagens, os preços dos produtos finais tendem

a ser menores do que os de referência e somado à concorrência, os preços de todos os produtos tendem a diminuir, tornando os tratamentos mais acessíveis. O primeiro biossimilar foi registrado em 2015 pela FDA, a proteína recombinante filgrastim (Zarzio[®], Sandoz), e desde então 50 outros biossimilares foram aprovados nas agências regulatórias americana e europeia. Com o fim das patentes de biológicos *best sellers*, como os anticorpos monoclonais, a tendência é de aumento no lançamento de novos biossimilares nos próximos anos (KESIK-BRODACKA, 2018; ULTEE, 2014; WALSH, 2018).

Uma outra classe de biológicos são os *biobetters*, que apresentam aprimoramentos em relação ao medicamento referência. Entre as melhorias almeçadas estão: efeito clínico mais eficiente, redução das doses de administração, melhora na especificidade em relação ao antígeno-alvo, redução das reações imunológicas, aumento no tempo de circulação, entre outras. Por se tratar de aprimoramentos que podem resultar em mudanças estruturais na molécula ativa, esses medicamentos são registrados pela mesma rota dos medicamentos inovadores. Portanto, as melhorias precisam ter um custo-benefício atrativo em relação ao medicamento referência já que o processo de aprovação é custoso e demorado e a taxa de sucesso média é de 41%. O primeiro *biobetter* foi aprovado em 1996, mas o mais bem sucedido foi o anticorpo monoclonal adalimumab (Humira[®], AbbVie), que hoje é o medicamento líder em vendas globais. Como consequência da entrada de *biobetters* no mercado, os preços dos medicamentos biológicos também devem reduzir (KESIK-BRODACKA, 2018; ULTEE, 2014; WALSH, 2018).

1.2.1.3. *Desafios e tendências da produção de proteínas terapêuticas*

Todo o processo de desenvolvimento de produtos a partir de organismos vivos é desafiador, a começar pela escolha do produtor (sistema ou plataforma de expressão ou hospedeiro). De forma geral, a escolha do sistema de expressão se baseia no equilíbrio entre os atributos de qualidade desejados para o produto e o custo do processo. Tomando como referência o desenvolvimento de proteínas terapêuticas, principais biológicos comercializados, há uma predominância do uso de células de mamíferos. Cerca de 80% dos biofármacos são produzidos por células de mamíferos, sendo que a maioria é

composta por anticorpos monoclonais que é majoritariamente (75%) produzida por células de ovário de hamster chinês (CHO, *Chinese hamster ovary*) (TOLSTRUP, 2020).

Células de mamíferos se destacaram devido à capacidade de produzir biomoléculas mais similares às humanas por realizarem modificações pós-traducionais, como glicosilações, pontes dissulfeto, fosforilação e processamento proteolítico. No entanto, apresentam desvantagens, como o risco de contaminação com viroses animais, requerimentos nutricionais exigentes, tempos de crescimento e produção mais longos, e maior suscetibilidade a contaminações microbianas, que são fatores que encarecem a produção. Contudo, por meio de ferramentas de biologia sintética, como técnicas de DNA recombinante e, mais recentemente, o sistema CRISPR/Cas9, e de análises ômicas (proteômica, metabolômica, transcriptômica), novas linhas celulares têm sido desenvolvidas para produzir proteínas recombinantes mais rapidamente e com melhores atributos de qualidade. Por exemplo, com a capacidade de realizar glicosilação humanizada e com baixa produção de proteínas nativas e de subprodutos. Portanto, com essas novas ferramentas, esse sistema deve continuar sendo o preferido da indústria (KESIK-BRODACKA, 2018; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Quando não é almejada uma biomolécula com modificações pós-traducionais, o hospedeiro mais escolhido são as bactérias, em especial a *Escherichia coli*, por seu baixo custo de produção, genoma bem conhecido, crescimento rápido e alta produtividade. Além da falta de modificações mais sofisticadas, esse sistema apresenta outras desvantagens, como a produção intracelular (exige a ruptura celular para a extração do bioproduto), e produção na forma de corpúsculos de inclusão. Apesar de que esses corpúsculos possam ser vantajosos para proteger a proteína recombinante da ação proteolítica. Mais uma vez, ferramentas de biologia sintética e de bioinformática junto com melhorias no processo de produção e purificação auxiliaram a superar essas desvantagens e consolidaram a *E. coli* como plataforma de expressão recombinante. Entre os mais recentes biofármacos aprovados produzidos por ela, destacam-se a insulina recombinante (diabetes) e o fator estimulador de colônia de granulócitos peguado (oncológico) (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019; WALSH, 2018).

A terceira plataforma mais utilizada são as leveduras. Elas apresentam inúmeras vantagens, como rápido crescimento, genoma bem conhecido, requerimentos nutricionais menos exigentes do que células animais, e capacidade de realizar modificações pós-

tradicionais. As leveduras mais usadas na indústria farmacêutica são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (*Komagataella spp., pastoris* e *phaffi*). Elas apresentam alta capacidade de produção heteróloga, de dobramento correto de proteínas e alta eficiência de secreção. No entanto, o padrão de glicosilação nativo é caracterizado por hipermanosilação, o que resulta em longas cadeias de manoses que causam reações imunológicas em humanos, limitando a sua aplicação. Pensando nisso, novas linhagens de *Pichia* foram desenvolvidas para realizar glicosilação com padrão humanizado, o que deve impulsionar sua aplicação nos próximos anos. Entre os biofármacos recentemente aprovados nessa levedura, destacam-se insulinas recombinantes e o VYEPTI[®], anticorpo monoclonal recombinante produzido em *P. pastoris* com glicosilação comparável ao medicamento referência produzido em células animais (FDA, 2020; JACOBS et al., 2009; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019; WALSH, 2018).

Outras plataformas menos comuns utilizadas são: animais transgênicos, cujos principais sistemas de entrega da biomolécula são laticínios e ovos; plantas transgênicas, que já são usadas como vacinas comestíveis entregues em arroz, banana, ervilha, batata, alface e milho; e células de inseto, com destaque para o sistema de expressão baseado no vetor de baculovírus, que resulta em altas taxas de transfecção e de produção heteróloga de proteínas glicosiladas e tem elevado potencial de aplicação biofarmacêutica (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Após a escolha do sistema de expressão, o desafio seguinte é o desenvolvimento do processo, que consiste nas operações que visam a produção (*upstream*) e as operações seguintes que visam separar a biomolécula de interesse dos demais contaminantes (*downstream*).

As operações de *upstream* consistem, de forma geral, em seleção e desenvolvimento da linhagem de expressão, cultivos em escala laboratorial em frascos, garrafas ou biorreatores, e escalonamento para biorreatores piloto e de produção industrial. O principal desafio dessa fase é encontrar as condições de processo e a formulação de meio de cultivo que favoreçam o crescimento celular e a produção heteróloga da linhagem mais adequada. A seleção dessa linhagem é feita geralmente por meio da identificação da expressão da proteína alvo com os atributos de qualidades desejados e com a produtividade adequada em cultivos de pequena escala. Em seguida, são feitos estudos para otimização do meio de cultura e dos parâmetros de operação do biorreator (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Entre os parâmetros de operação do biorreator, podem ser otimizados o pH, a temperatura, a agitação, a aeração, a composição da alimentação de gases (O_2 e CO_2) e a maneira como os nutrientes são fornecidos. Na operação em batelada ou descontínua, todos os nutrientes estão disponíveis no início do processo, sendo uma operação de fácil implementação e com baixa probabilidade de contaminação. No entanto, quando o substrato pode ter efeito tóxico ou inibitório sobre o produtor ou se objetiva obter altas densidades celulares, é mais comum a adoção da batelada-alimentada ou descontínua alimentada. Nessa modalidade, um ou mais nutrientes são alimentados ao longo do processo a vazões constantes, ou respeitando a um balanço de massa, ou outro algoritmo, resultando em maior controle metabólico. Alternativamente, quando se almeja aumento de produtividade do processo, a operação pode ser contínua, com alimentação de nutrientes a uma vazão constante igual à de remoção de meio, procurando manter o sistema em estado estacionário (quimiostato). Adicionalmente, quando o produto é lábil, pode-se adotar operação em perfusão, que é similar à contínua, mas com retenção de células e passagem do produto para o *downstream* (CARVALHO; SATO, 2001a, 2001b; FACCIOTTI, 2001).

Além do modo de operação, o design do reator deve ser escolhido, sendo mais comuns os tanques agitados, que apresentam diferentes conjuntos de impelidores que promovem a mistura do meio; os do tipo coluna de bolhas e *airlift*, cuja agitação é feita por bolhas que circulam no meio; os de leito fixo e fluidizado, em que o meio flui pelos produtores imobilizados ou não; e os de fibra oca, em que as células ficam confinadas em membranas e o meio flui por elas (TONSO; BADINO JR; SCHMIDELL, 2021). Escolhidos esses parâmetros em pequena escala é necessário adotar um critério de escalonamento para levar o cultivo para escala piloto e de produção, sendo os mais comuns baseados na transferência mássica, na mistura e no cisalhamento. O parâmetro de escalonamento é mantido constante nas diferentes escalas, entre os mais frequentemente utilizados estão: o coeficiente de transferência de oxigênio (k_La), o tempo de mistura, a potência por unidade de volume, a velocidade na extremidade do impelidor, a concentração de oxigênio dissolvido e o número de Reynolds. O escalonamento é considerado bem-sucedido quando no ponto final são obtidos concentração, viabilidade celular, título e atributos do produto comparáveis com a escala menor (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Posteriormente à operação em biorreator, são iniciadas as operações de purificação da biomolécula de interesse. O processo de *downstream* varia de acordo com o sistema de expressão e o modo de produção (intra- ou extracelular), mas, basicamente, se baseia em clarificação, purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução e tratamentos finais. O primeiro passo, a clarificação, consiste na coleta de células por centrifugação ou filtração. No caso de produção intracelular, é requerida a ruptura dos produtores que é geralmente realizada em homogeneizadores de alta pressão na indústria. Quando a proteína está em solução, ela é destinada para mais passos de separação e polimento. A partir desse momento, aparecem diferenças no processo de acordo com o produtor escolhido, como a necessidade de redobramento de proteínas produzidas em corpúsculos de inclusão em *E. coli* ou a inativação viral em produtos de células animais (KILIKIAN; PESSOA-JUNIOR, 2021; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

A etapa de purificação de baixa resolução objetiva separar a proteína-alvo de moléculas com característica físico-químicas significativamente diferentes e concentrar o produto de interesse. As operações mais comuns são precipitação, extração líquido – líquido e filtração (ultrafiltração, diafiltração). Já a etapa de alta resolução possui o desafio de separar moléculas com característica semelhantes, como as proteínas e os ácidos nucleicos do hospedeiro, e aumentar a pureza do produto. As operações mais utilizadas são as cromatografias. A cromatografia de afinidade, uma das mais aplicadas, consiste na separação pela interação do produto-alvo com algum componente da fase estacionária. Por exemplo, na purificação de anticorpos é amplamente utilizada a cromatografia com proteína A pelo alto poder de ligação com o produto. No entanto, muitas vezes, o lixiviado dessa proteína acaba se tornando um contaminante e precisa ser retirado em outros passos (KILIKIAN; PESSOA-JUNIOR, 2021; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Uma alternativa é a cromatografia de troca iônica (catiônica ou aniônica), que consiste na separação por afinidade eletrostática entre o produto-alvo e a fase estacionária. Esse é um dos métodos com o melhor custo-benefício e é largamente utilizado para remover variantes do produto, proteínas e ácidos nucleicos dos hospedeiros, componentes do meio, lixiviados de proteína A, endotoxinas e vírus. A escolha do tipo de resina para essa cromatografia depende do ponto isoelétrico do produto-alvo e do pH de operação. Outra opção é a cromatografia por exclusão molecular ou gel-filtração, que se baseia na separação por diferença no tamanho das biomoléculas. Moléculas menores difundem

pelos poros e se movimentam mais lentamente que as maiores, assim é possível calcular o tamanho molecular da biomolécula com base no tempo de retenção. Para essa modalidade, além do pH, a escolha da porosidade da resina é essencial para a boa resolução. Adicionalmente, outras opções de separação de cromatografia são por hidrofobicidade e por membranas (KILIKIAN; PESSOA-JUNIOR, 2021; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Geralmente, apenas uma etapa cromatográfica não é suficiente para a separação da proteína-alvo, portanto a combinação de várias operações resulta em utilização de quantidades relevantes de tampões e resinas, o que torna o *downstream* uma das etapas mais custosas na produção de um biofármaco. Escolhidas as colunas de cromatografia, a fase estacionária e o grau de empacotamento devem ser mantidos constantes para a ampliação da escala. Entre os critérios mais comuns adotados para o escalonamento estão: altura da coluna, velocidade linear de alimentação, e carga de proteínas. Comumente, as colunas são ampliadas em diâmetro e não em altura para evitar deformidade da parte central do leito. Após a purificação da proteína-alvo, ela ainda precisa ser submetida a tratamentos que visam o aumento da estabilidade e conservação até o processamento final do medicamento, entre esses tratamentos são mais comuns a liofilização, cristalização e estocagem em solução em baixas temperaturas (PESSOA-JUNIOR; KILIKIAN, 2015).

Atualmente, destacam-se quatro tendências da indústria biofarmacêutica: tecnologias de alto rendimento (*High-throughput*), equipamentos descartáveis (*single use*), princípios de *Quality by Design* e processo em operação contínua (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

a) Tecnologias de alto rendimento (High-throughput)

As tecnologias de alto rendimento são caracterizadas pela miniaturização dos equipamentos, como biorreatores e colunas de cromatografia, para escalas na ordem de mililitros ou ainda de microlitros. Essas tecnologias são aplicadas, principalmente, para a seleção do sistema de expressão ou dos parâmetros do processo. No *upstream*, biorreatores de alguns mililitros ou placas de 96 poços associados a plataformas altamente automatizadas foram utilizados para seleção de linhagens, otimização da composição do meio, escolha do modo de alimentação do substrato e estudo das condições hidrodinâmicas (HABICHER et al., 2019; KHANCHEZAR et al., 2019; KREYE et al., 2019). Esses biorreatores são escalonáveis até milhares de litros e permitem identificar

os melhores sistemas de expressão e as melhores condições de processo rapidamente. Já no desenvolvimento do *downstream*, a miniaturização foi aplicada na seleção dos melhores parâmetros para ruptura celular (sonicação, moagem, choque osmótico) e filtração. Assim como em estudos sobre resinas, tampões e condições de operação que resultaram no aprimoramento dos resultados de cromatografias. Além disso, diversos estudos aplicaram os princípios de microfluídica para otimizar a extração líquido – líquido (ANDAR et al., 2019; BAUMANN; HUBBUCH, 2017; SÃO PEDRO et al., 2019). Portanto, essas tecnologias devem acelerar o desenvolvimento de biofármacos.

b) Equipamentos descartáveis (Single use)

O desenvolvimento de sensores descartáveis e o aprimoramento do design de sacolas plásticas para substituir as dornas tradicionais de aço inox ou vidro resultaram na aceleração do desenvolvimento do processo de *upstream*. Atualmente, os biorreatores *single-use* apresentam capacidade de até 2.000L e são classificados geralmente em duas categorias: com agitador ou sem agitador e dependente do movimento de balanço de uma plataforma (*rocking-motion*). Concomitante com os reatores, equipamentos para coleta das células descartáveis também foram desenvolvidos, como centrífugas e filtros *single-use*, assim como colunas de cromatografia capazes de atender até 2.000 L de meio de cultura (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). De acordo com Boedeker, Goldstein, & Mahajan (2017), a adoção de tecnologias *single-use* resultou em aumento da flexibilidade da produção pois o processo se torna modular, facilitação do *start-up* e da própria operação, redução do risco de contaminação e simplificação da transferência do processo para outros locais. Além disso, as etapas de limpeza e esterilização são dispensáveis e o processo de validação é transferido para o fornecedor. Todas essas vantagens resultaram na redução dos custos do processo, principalmente, em relação ao custo inicial de capital, consumo de facilidades (energia, água, gás) e redução do quadro de funcionários. Por outro lado, a capacidade ainda é limitada, é necessário conectar os tubos manualmente a cada lote, há aumento de resíduos, cria-se uma dependência com o fornecedor e há risco de contaminação da produção com os materiais plásticos.

c) Operação em regime contínuo

Há uma tendência pela adesão de operação em regime contínuo para cultivos de células animais, principalmente, para produção de anticorpos, que já é praticada por grandes empresas, como Bayer, Sanofi e Janssen. Como consequência desse movimento,

as agências regulatórias estão se atualizando para fornecer manuais para produções totalmente contínuas e em 2021 foi registrado o primeiro biológico produzido dessa maneira, anteriormente apenas moléculas pequenas eram produzidas por manufatura ponta-a-ponta contínua (GLOBALDATA HEALTHCARE, 2022).

Biorreatores operados de forma contínua apresentam vantagens, como redução de tempos mortos, eliminação de produtos inibitórios durante o cultivo e manutenção de um estado fisiológico que resulte em um produto com os atributos adequados, fornecendo material para o *downstream* sem interrupções. Por outro lado, essa operação exige linhagens celulares estáveis, está mais sujeita a contaminações e apresenta baixo rendimento dada à baixa vazão praticada para se evitar a “lavagem” das células. No entanto, com a evolução das ferramentas de biologia sintética a expressão recombinante foi aprimorada e está cada vez mais estável. Além disso, com o desenvolvimento de dispositivos de retenção de células, os reatores passaram a ser operados em regime de perfusão, o que aumentou significativamente a produtividade e tornou esse modo de operação economicamente atrativa (FACCIOTTI, 2001; WEI-SHOU HU, 2020).

Da mesma maneira, foram desenvolvidos equipamentos de *downstream* para serem operados continuamente, como centrífugas, homogeneizadores de alta-pressão, reatores para precipitação, membranas adsorventes, filtros e cromatógrafos, entre outros. Em especial, as operações de cromatografia passaram a ser realizadas em paralelo ou em contracorrente e separando cada etapa (lavagem, eluição, regeneração e reequilíbrio) em colunas subsequentes. Estudos demonstram que dessa maneira há aumento da produtividade e redução substancial do custo da purificação por grama de produto (JUNGBAUER, 2013; SOMASUNDARAM et al., 2018). Processos totalmente contínuos ainda são raros pois há falta de sincronização entre o *upstream* e o *downstream*, como uma barreira de esterilidade (mais restrita no *upstream*) e a falta de mecanismos de *feedback*, pois o produto do *upstream* influencia as operações de purificação (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Por isso, atualmente, a maioria dos processos é híbrida, combinando cultivos em batelada-alimentada com purificação contínua ou perfusão com purificação em batelada (ZILJLSTRA, 2017).

d) Implementação do *Quality by Design*

Até o princípio do século 21, a produção biofarmacêutica era caracterizada pela falta de padronização e previsibilidade, alto grau de desperdício e baixa eficiência

produtiva, pois os processos eram baseados fundamentalmente em empirismo. Além disso, havia variação legislativa por região, o que dificultava o trabalho das agências regulatórias e a validação de processos em diferentes locais. A fim de se aprimorar o controle de qualidade, sustentar a inovação e atualizar a regulamentação, entidades regulatórias lançaram uma série de guias e princípios para se instituir a abordagem do *Quality by Design (QbD)* na manufatura farmacêutica. Destacam-se os guias de Boas Práticas de Fabricação do FDA e os guias Q8 – Desenvolvimento Farmacêutico, Q9 – Gestão de Riscos à Qualidade e Q10 – Sistema de Qualidade Farmacêutica do ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)(RATHORE; WINKLE, 2009).

A abordagem QbD se baseia no desenvolvimento da qualidade do produto final ao longo do processo, exigindo conhecimento profundo do processo por meio de ferramentas analíticas de processo (PAT) e gestão de risco. As PAT são, por definição do FDA (2004), um “*sistema para projetar, analisar e controlar a manufatura por medições temporais durante o processo dos atributos críticos de qualidade e de desempenho de matérias-primas, materiais e parâmetros do processo com o objetivo de garantir a qualidade do produto final*”. Já a gestão de risco consiste na identificação e avaliação de riscos considerando a probabilidade de ocorrência, severidade do impacto e a facilidade de detecção, auxiliando no monitoramento e controle do processo e na tomada de decisões (RATHORE; BHAMBURE; GHARE, 2010; RATHORE; WINKLE, 2009).

A maior vantagem do *QbD* é se ter um entendimento profundo do processo baseado em conhecimento científico e abordagem racional, que resulta em aprimoramento no desenvolvimento de medicamentos com redução dos problemas de fabricação, facilitação das modificações no processo após aprovação sem necessidade de nova autorização regulatória, mitigação de riscos do processo, redução nos custos pelo corte de desperdícios, redução da variabilidade do processo, aumento da eficiência produtiva, e facilitação da transferência de tecnologia. Em contrapartida, sua implementação ainda é desafiadora por falta de padronização da terminologia, pela complexidade de processos de biotecnologia e pela falta de pessoas qualificadas para sua implementação (CMC BIOTECH WORKING GROUP, 2009; RATHORE; WINKLE, 2009).

Para implementação do *QbD*, primeiramente é necessário estabelecer o perfil de qualidade alvo do produto, como aplicação clínica, rota de administração, forma de dosagem, sistema de entrega, potência da dose, tipo de embalagem, farmacocinética, e os critérios de qualidade da droga (pureza, esterilidade). Em seguida, são identificados os atributos críticos de qualidade (CQAs, *critical quality attributes*) que precisam ser alcançados para que o perfil alvo seja atingido, como propriedades biológicas e físico-químicas (grau de pureza, perfil de glicosilação, conteúdo úmido, limites microbiológicos, cor, forma, tamanho, entre outras). Além de se identificar essas propriedades, também é necessário estabelecer as faixas de aceitação para cada uma, priorizando aquelas que representam maior risco para o produto. Posteriormente, são identificados os parâmetros críticos de processo (CPPs, *critical process parameters*) e de materiais (CMAs, *critical material attributes*) que influenciam os CQAs (CMC BIOTECH WORKING GROUP, 2009; RATHORE; WINKLE, 2009).

Uma das ferramentas mais utilizadas para relacionar as entradas, CPPs e CMAs, com as saídas, CQAs, é o planejamento experimental (DoE, *design of experiment*), pois permite o estudo de inúmeras variáveis e suas interações com esforço de execução reduzido em relação à avaliação de um fator por vez. Existem basicamente duas modalidades de planejamento estatístico: estudos de triagem e de otimização. Estudos de triagem, como desenho fatorial completo de dois níveis, fatorial fracionado e de Plackett-Burman, objetivam selecionar os fatores com efeitos mais relevantes para os CQAs por análise de gráficos de Pareto ou de interação. Esses estudos conseguem avaliar inúmeras variáveis, mas são limitados quanto a suas interações. Já estudos de otimização, como fatorial completo de três níveis, composto central e de Box-Behnken, são capazes de identificar interações entre esses parâmetros previamente selecionados. Por meio de análise de regressão baseada em variância (ANOVA) é possível obter um modelo que correlacione os CPPs e CMAs com os CQAs (FUKUDA et al., 2018).

A partir desses modelos e das faixas de aceitação dos CQAs, é possível estabelecer as faixas de operação dos CPPs e de aceitação dos CMAs de forma que a sobreposição dessas faixas origine um espaço, denominado *design space*, em que todos os CQAs mais importantes (ranqueados por avaliação de risco) sejam atingidos. O estabelecimento do *design space* orienta o controle do processo, permite que mudanças no processo feitas dentro de seus limites dispensem autorização regulatória para sua implementação e permite que sejam feitas mudanças naqueles parâmetros que não influenciam os CQAs,

mas influenciam o processo, agregando flexibilidade à fabricação (CMC BIOTECH WORKING GROUP, 2009; FUKUDA et al., 2018; ANURAG S RATHORE & WINKLE, 2009).

Para a estratégia de controle, além da identificação do *design space*, as ferramentas analíticas são essenciais. Sensores conectados *on-line*, *at-line* ou *in-line* são capazes de fornecer dados rapidamente sobre as condições do processo, como concentração de substrato, células, produtos, estado fisiológico ou padrão de glicosilação no *upstream*, ou ainda formação de agregados, recuperação de proteína, presença de variantes ou de vírus no *downstream*. Esses dados são processados por modelos estatísticos, fenomenológicos ou baseados em fluidodinâmica e fornecem informações para os operadores tomarem decisões e agirem sobre o processo se necessário. Dessa forma, garante-se um processo robusto, automatizado e mais eficiente, facilitando sua validação junto com as agências regulatórias assim como o escalonamento, a transferência de local e o aprimoramento ao longo do ciclo de vida do produto (CMC BIOTECH WORKING GROUP, 2009; RATHORE; BHAMBURE; GHARE, 2010; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Portanto, a indústria biofarmacêutica está passando por um intenso processo de inovação. As altas demandas por proteínas terapêuticas, principalmente, impulsionadas pelos tratamentos oncológicos e pelos biossimilares pressionam a indústria a adotar medidas de redução de custo e aumento de eficiência. A partir da implementação da abordagem do *Quality by Design*, os processos passaram a ser desenvolvidos com base em dados de forma mais robusta, automatizada e eficiente. Adicionalmente, a miniaturização dos dispositivos (*high-throughput*) facilitaram os estudos estatísticos e a otimização dos parâmetros, que podem ser rapidamente escalonados. Além disso, a adoção de equipamentos descartáveis (*single-use*) permitiram a modularização das plantas, o que representa flexibilidade para a produção de diversos biofármacos em um mesmo ambiente e redução de tempos-mortos. Mais ainda, a tendência por operações de perfusão no *upstream* e contínua no *downstream* resultou em produtividades jamais alcançadas. No entanto, inúmeros desafios precisam ser superados para a implementação dessas tecnologias e a troca de conhecimento entre universidades, centros de pesquisa e indústrias se torna cada vez mais relevante.

1.2.2. L-asparaginase: da descoberta às aplicações clínicas

1.2.2.1. Descoberta da L-asparaginase e fontes naturais de produção

A L-asparaginase (ASNase) (EC 3.5.1.1) é uma enzima comumente tetramérica de aproximadamente 140 kDa que pertence à classe de amino hidrolases. Ela catalisa a hidrólise da asparagina e da glutamina em aminoácidos, aspartato e glutamato respectivamente, e amônia. Essa catálise está no cerne da aplicação clínica no tratamento de leucemias e de tumores sólidos, tornando-se uma das enzimas terapêuticas mais estudadas nos últimos anos. Em especial, com seu uso no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), um dos principais tipos de câncer infantil, a taxa de remissão completa da doença supera 90% baseado em um mecanismo seletivo contra células tumorais (BATOOL et al., 2016).

Diversas formas de ASNase já foram isoladas de plantas, animais, solo e microrganismos (bactérias, leveduras, fungos e algas) terrestres e marinhos. Devido à facilidade de extração, custo-benefício e necessidade de produção em larga-escala, a seleção de microrganismos produtores ganhou relevância (BATOOL et al., 2016; VERMA et al., 2007). Lopes et al. (2017) destacaram em sua revisão que ao menos 45 tipos de bactérias e 22 tipos de fungos (filamentosos e leveduras) já foram selecionados para a produção de ASNase. Entre as bactérias se destacam *Escherichia coli*, *Erwinia* spp., *Streptomyces* spp. e *Bacillus* spp.; e entre os fungos e leveduras, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., e *Candida* spp.

Esses microrganismos produtores foram prospectados em diversos ecossistemas, como no solo, no ambiente marítimo, na Antártica, no cerrado e na caatinga brasileira. A escolha de ambientes extremos se justifica pelas características interessantes que eles conferem para as enzimas. De acordo com Izadpanah, Homaei, Fernandes, & Javadpour (2018), enzimas que apresentam maior tolerância a condições extremas podem apresentar estabilidade em uma faixa mais ampla de temperatura, pH, pressão e osmolaridade.

Freire et al. (2020) selecionaram a levedura *Leucosporidium muscorum*, entre 134 leveduras prospectadas de resíduos marinhos da Antártica, e obtiveram uma ASNase extracelular, tolerante a baixas temperaturas, sem atividade de glutaminase, e com

atividade volumétrica de 4.600 U/L. Já Costa-Silva et al. (2018) também obtiveram uma ASNase com características interessantes, como efeito antiproliferativo sobre células leucêmicas, ausência de citotoxicidade contra células humanas normais e com atividade específica de 13,8 U/g produzida pelo fungos filamentos *Aspergillus terreus* isolado do solo brasileiro. Uma outra cepa de *A. terreus*, S-18, obtida da caatinga brasileira, uma das maiores florestas secas do mundo, se mostrou ser uma promissora produtora de ASNase com baixa atividade de glutaminase e com atividade específica de 3,4 U/g (DA ROCHA et al., 2019^a).

1.2.2.2. *L-asparaginase como biofármaco*

Apesar de formas bioprospectadas apresentarem características interessantes, muitas delas não são consideradas adequadas para aplicações terapêuticas devido aos requisitos das agências regulatórias (LOPES et al., 2017). Até o momento, apenas ASNases produzidas pelas bactérias *Escherichia coli* (EcA) e *Dickeya dadantii* (antigamente denominada *Erwinia chrysanthemi*) (ErA) são aceitas em aplicações clínicas. Essas bactérias expressam dois tipos de ASNase, a ASNase I que possui atividade sobre glutamina e asparagina e é produzida em largas quantidades, e a ASNase II que apresenta atividade específica para asparagina e tem ação antitumoral (BATOOL et al., 2016; CAMPBELL et al., 1967). Cedar & Schwartz (1968) foram pioneiros no estudo da expressão de ASNase II em *E. coli* (EcAII) em larga escala.

Por muitos anos, a EcAII foi a única forma comercial disponível devido à sua alta produtividade e eficiente ação antineoplásica (nomes comerciais Kidrolase[®], Leunase[®], Aginasa[®], Elspar[®], e Leuginase[®]). No entanto, foram relatados efeitos colaterais como alergia, vômito, trombose, disfunção hepática e outras reações ligadas à hipersensibilidade (BATOOL et al., 2016; DUVAL et al., 2002; NOURA EL-AHMADY; SARA; NANCY, 2014; VERMA et al., 2007). Além de reações imunológicas que causam inativação silenciosa por anticorpos e a redução do tempo de meia-vida da ASNase por ação de proteases séricas (KATO; MANABE, 2017; PIETERS et al., 2011), prejudicando o tratamento. Portanto, novas formas precisaram ser desenvolvidas.

Um avanço na fabricação desse biofármaco ocorreu nos anos 90 com o surgimento da tecnologia de modificação de proteínas terapêuticas com polietileno glicol (peguilação) (nome comercial Oncaspar[®]). Essa modificação resultou em melhorias na

ação do fármaco, como o aumento do período de circulação sanguínea, maior estabilidade e geração de menos efeitos colaterais (NUCCI; SHORR; ABUCHOWSKI, 1991). A primeira PEG-EcAII foi registrada em 1994 (FDA, 1994).

Apenas 17 anos depois, foi registrada a ASNase II de *D. chrysanthemi* (ErAII) (Erwinase[®]) com o objetivo de atuar como segunda ou terceira linha terapêutica quando o paciente apresentava alergia às outras formas (AVRAMIS; PANOSYAN, 2005). Em 2016, foi aprovada a primeira forma recombinante de EcAII (Spectrila[®]), visando ao aumento de produtividade e à redução de agregados (EMA, 2016^a). Após dois anos, a segunda EcAII peguilada (ASPARLAS[®]) foi aprovada pela FDA (FDA, 2018). Em 2021, a primeira EraII recombinante (RYLAZE[®]) foi aprovada (FDA, 2021). Ademais, atualmente, duas formas recombinantes de ErAII estão em testes clínicos, uma produzida por *Pseudomonas fluorescens* (ADIS INSIGHT, 2021; JAZZ PHARMACEUTICALS PLC, 2019) e outra peguilada (ADIS INSIGHT, 2017). Os biofármacos aprovados para tratamento são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Biofármacos de ASNase que são atualmente aprovados para tratamento e suas características farmacológicas e terapêuticas.

Nome Comercial (Empresa)	Origem	Aprovado em	Tempo de Meia – Vida	Pacientes positivos para produção de anticorpos (%)	Dose
^a Kidrolase [®] e Leunase [®] (Kyowa) – Aginasa [®] (Medac / Kyowa) – Elspar [®] (Merck) – Leuginase [®] (Beijing SL Pharmaceutical)	nativa <i>Escherichia coli</i>	1978 (FDA)	26 – 30 horas	45 -75	6000 U/m ² corpo 3x na semana
^a Oncaspar [®] (Sigma Tau)	<i>E. coli</i> peguilada	1994 (FDA)	5,5 – 7 dias	5 – 18	2000– 2500 U/m ² corpo a cada 2 ou 4 semanas 6000 U/m ² corpo 10x na semana + 3x na semana ou 30.000 U/m ² corpo x 10 doses
^a Erwinase [®] (Jazz Pharmaceuticals Inc.)	nativa <i>Erwinia chrysanthemi</i>	2011 (FDA)	16 horas	30 -50	5000 – 10.000 U/m ² corpo x 6 – 8 doses 2500 U/m ² corpo a cada 21 dias
^b Spectrila [®] (Medac)	recombinante <i>E. coli</i>	2016 (EMA)	14 – 44 horas	10 – 54	2500 U/m ² corpo a cada 21 dias
^c ASPARLAS [®] (Jazz Pharmaceuticals Inc.)	<i>E. coli</i> peguilada	2018 (FDA)	16 dias	15	25 mg/m ² corpo a cada 48 horas
^d RYLAZE [®] (Jazz Pharmaceuticals Inc.)	recombinante <i>D. chrysanthemi</i>	2021 (FDA)	18,2 horas	-	

Fontes: ^aAvramis & Panosyan, 2005; ^bEMA, 2016^a; ^cServier Pharmaceuticals LLC, 2020; ^dFDA, 2021.

Embora a EcA e a ErA possuam características farmacológicas distintas, estruturalmente, elas apresentam alta homologia, com cerca de 46% de suas sequências sendo homólogas. A ASNase está organizada em quatro monômeros esferoides com aproximadamente 330 aminoácidos arranjados em dois domínios, C-terminal e N-terminal, unidos por um ligante. As estruturas secundárias são dos tipos alfa-hélice e beta-folha. Os dímeros são unidos por ligações fortes, como forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. Essas mesmas forças conectam os dímeros que formam a estrutura tetramétrica final. O sítio ativo se encontra entre os dois domínios e os aminoácidos Thr¹² – Thr⁸⁹ – Gln⁵⁹ – Asp⁹⁰ -Ser⁵⁸ – Lys¹⁶² -Asn²⁴⁸ -Glu²⁸³ – Tyr²⁵ são responsáveis pela atividade catalítica, formando pontes de hidrogênio com os ligantes (JASKÓLSKI et al., 2001; LOPES et al., 2017; SWAIN et al., 1993; VERMA et al., 2007).

Os biofármacos aprovados apresentam vantagens e desvantagens, se por um lado a EcA apresenta mais toxicidade ao organismo do que a ErA (CAVANA et al., 1976; VERMA et al., 2007), por outro, apresenta menor atividade de glutaminase (GLNase) e maior tempo de meia-vida (COSTA-SILVA et al., 2018). A GLNase está associada à hiperamonemia e neurotoxicidade, por isso sua redução é importante na maioria dos casos (JÖRCK et al., 2011). Além disso, a peguilação da EcA resultou em maior estabilidade e menor quantidade de doses necessárias para a remissão do câncer. Dessa forma, a escolha medicamentosa dependerá da sensibilidade das células à terapia assim como da farmacodinâmica dos medicamentos e, sobretudo, das reações alérgicas e imunológicas do paciente (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). Geralmente, adota-se a EcA, nativa ou peguilada, como primeira e segunda linha e a ErA como terceira linha do tratamento. No caso da necessidade da ErA, o custo do tratamento pode dobrar (TONG et al., 2013).

Apesar da melhora na terapia, os efeitos colaterais ainda são reportados e novas ASNases estão sendo estudadas. Pesquisadores procuram enzimas com melhores atributos de qualidade, tais como: maior estabilidade; maior afinidade por asparagina; menor atividade de GLNase; menor resposta imunogênica; resistência às proteases humanas; menor formação de agregados; maior pureza, entre outros. Essa nova classe de *biobetters*, ou seja, biomoléculas modificadas para aprimorar alguma característica dos biofármacos-referência, tem sido desenhada com base em ferramentas de bioinformática que permitem a engenharia racional de enzimas por meio de mutações sítio-dirigidas. Além disso, novos hospedeiros são desenvolvidos por técnica de DNA recombinante e

novas formas de *drug delivery* (encapsulação, nanomateriais) também são estudadas (BRUMANO et al., 2019; COSTA-SILVA et al., 2018; FERNANDES et al., 2017; LOPES et al., 2017).

1.2.2.3. *Novas formas recombinantes de L-asparaginase*

Recentemente, multiplicaram-se os estudos com cepas recombinantes para a expressão de ASNase. Essas cepas apresentam melhorias como maior produtividade e menor imunogenicidade, sendo mais interessantes para aplicações terapêuticas (BATOOL et al., 2016; BRUMANO et al., 2019). Apesar dos estudos com bactérias serem majoritários e apenas ASNases bacterianas serem aprovadas para aplicação clínica, enzimas produzidas em eucariotos tem alto potencial de aplicação terapêutica devido à similaridade com proteínas humanas e menor probabilidade de reação imunológica (LOPES et al., 2017; SHRIVASTAVA et al., 2012). Em vista dessas vantagens, inúmeras cepas recombinantes de leveduras também têm sido desenvolvidas para expressar a ASNase bacteriana ou fúngica.

Em busca de maior produtividade, Barros et al. (2021) cultivaram uma cepa recombinante de *E. coli* BL21 expressando a EcAII e obtiveram atividade volumétrica de aproximadamente 44000 U/L após indução com lactose. Com o mesmo objetivo, Torres-Obreque et al. (2019) expressaram a ErAII em BL21 alcançando 1300 U/L. Além da produtividade, a criação de cepas recombinantes também pode objetivar reduzir a imunogenicidade da enzima. Como exemplo, dois grupos desenvolveram cepas recombinantes da levedura *Pichia pastoris* com expressão de ASNase II de *Saccharomyces cerevisiae* com ação antineoplástica demonstrada (GIRÃO et al., 2016; PILLACA-PULLO et al., 2021). Já Costa et al. (2016) construíram uma cepa de BL21 capaz de expressar ASNase I de *S. cerevisiae* com elevada similaridade com as enzimas bacterianas aprovadas clinicamente.

Baseando-se em engenharia racional de proteínas, Verma et al. (2014) desenvolveram variantes de EcA alterando aminoácidos nas superfícies dos dímeros resultando em menor atividade de GLNase, maior afinidade por asparagina e maior estabilidade térmica do que a enzima nativa. Já Maggi et al. (2017) criaram uma variante

de EcA resistente às proteases humanas (catepsina B e asparagina endopeptidase), mais estável e com atividade compatível com a nativa por meio de um algoritmo de bioinformática. Adicionalmente, Rodrigues et al. (2020) demonstraram que variantes resistentes a essas proteases também induzem menor resposta imunogênica e têm alto potencial de se tornarem biofármacos aprovados.

Ademais, Nguyen et al. (2018) projetaram mutantes de ErA com baixa atividade de GLNase, comparável atividade de ASNase e com menor potencial de toxicidade que a ErA comercial. Já Lima et al. (2020) desenvolveram uma EcA com glicosilação modulada por mutações sítio-dirigidas que apresentou maior estabilidade em sêrum humano e atividade comparável com a enzima nativa. A mesma estratégia foi adotada por Sajitha, Vidya, Varsha, Binod, & Pandey (2015), originando outra variante de EcA com glicosilações com padrão mais similar ao de mamíferos.

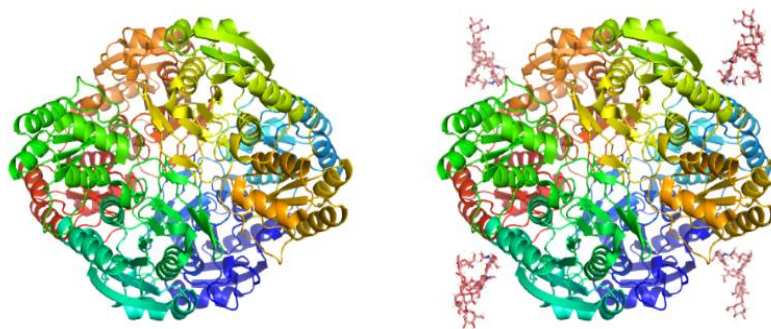
De fato, a glicosilação de proteínas é uma estratégia interessante e pode substituir a peguilação. Ela é recomendada pela FDA para proteínas terapêuticas para melhorar a solubilidade do produto e diminuir a imunogenicidade ao minimizar os agregados e ao esconder epítomos do sistema imune (COLE et al., 2004; FDA; CDER; CBER, 2014; WEI et al., 2003). Além disso, a glicosilação adequada facilita o dobramento correto da proteína, melhora a farmacocinética, a estabilidade, a funcionalidade e a ligação com os receptores, o que pode implicar em menos efeitos colaterais nos pacientes (NADEEM et al., 2018). Atualmente, cerca de 70% dos biofármacos aprovados são glicosilados (NADEEM et al., 2018).

Dessa forma, almejando a esses atributos, Effer et al. (2019) desenvolveram uma ErAII produzida pela plataforma *Pichia pastoris* Glycoswitch[®] capaz de realizar glicosilações humanizadas. Essa variante inovadora se apresenta como um tetrâmero de 160 kDa com atividade específica de 302 U/mg e com 68,5% da atividade da ErA comercial. A diferença na massa molecular se deve a N-glicosilações nos resíduos Asn₆₄ e Asn₁₇₀. Em especial, este segundo resíduo é parte de um epítomo previsto como imunogênico para células-T e, portanto, a glicosilação desse sítio teria o efeito de escudo contra o sistema imune (EFFER et al., 2020).

Além disso, essa ErA apresenta atividade de GLNase de 7,5% em relação à de ASNase, enquanto a ErA comercial é de 12%. Adicionalmente, ela apresentou preservação de 80% de atividade em soro humano após 48 horas de incubação, enquanto

a ErA não glicosilada, apenas 50%. Portanto, é uma variante com alto potencial de redução de alergias em pacientes, atividade de GLNase reduzida e maior estabilidade, sendo promissora para o desenvolvimento de um novo biofármaco de ASNase (EFFER et al., 2020). No entanto, até o momento, apenas cultivos em frascos foram relatados, portanto, estudos em biorreatores visando ao escalonamento da produção se fazem necessários. Essa nova ErAII é representada na Figura 1.

Figura 1. Representação da ErAII nativa sem e com glicosilações. A nova variante (à direita), desenvolvida por Effer et al. (2019), apresenta a estrutura de tetrâmero de 160 kDa com N-glicosilações no resíduo Asn₁₇₀, um epítipo previsto como imunogênico para células-T e, portanto, a glicosilação desse sítio teria o efeito de escudo contra o sistema imune.



Fonte: Figura produzida no software PyMOL Molecular Graphics System pela autora.

1.2.2.4. Aplicações clínicas da ASNase: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e outras doenças

O interesse pela ASNase surgiu de sua aplicação no tratamento de tipos de câncer, em especial, a LLA. A descoberta da ação antitumoral da ASNase levou vários anos de pesquisa. Em 1953, Kidd (1953) observou que o soro de porquinho da Índia induziu a regressão de linfomas. Apenas oito anos depois, Broome (1961) identificou que a ASNase é o agente responsável por essa ação. Além disso, o autor explicou o mecanismo de ação, notando que células tumorais necessitam de asparagina exógena para sobreviverem e, portanto, a depleção da asparagina sérica pela ação da ASNase levaria à morte seletiva desses tumores (BROOME; SCHWARTZ, 1967). Ainda na década de 70, iniciou-se a produção de ASNase por bactérias (CEDAR; SCHWARTZ, 1968; PETERSON; CIEGLER, 1969). Finalmente, o primeiro biofármaco de ASNase produzida por *E. coli* foi aprovado para o tratamento da LLA pelo FDA em 1978 (FDA, 1978).

As leucemias são tipos de câncer que afetam os glóbulos brancos do sangue (linfócitos) e que levam ao acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, o que prejudica a produção de glóbulos brancos e vermelhos e plaquetas (DOBBIN, [s.d.]; LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, [s.d.]). A doença é classificada como aguda quando se agrava em um curto intervalo de tempo; já quando o crescimento de células leucêmicas é lento, denomina-se crônica (LARSON, 2016). A leucemia pode afetar as células linfóides ou as mielóides. Portanto, a Leucemia Linfoblástica Aguda é uma doença que afeta as células linfóides de maneira rápida e agressiva, inviabilizando o seu funcionamento e ela ocorre sobretudo em crianças brancas do sexo masculino com pico entre 2 e 5 anos de idade (DOBBIN, [s.d.]; INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; SOUZA, 2014).

Estima-se que 56.000 pessoas foram diagnosticadas com LLA no mundo em 2020, sendo que 40% dos casos ocorreram em adultos (BRUMANO et al., 2019; SOLOMON et al., 2017). No Brasil, estima-se 10.800 novos casos de leucemias entre homens e mulheres por ano no triênio 2020-22 (INCA, 2019). Para a população infanto-juvenil brasileira, até 19 anos, a média é de 3.250 novos casos de pacientes com leucemias por ano (26% do total de novos casos de câncer em crianças e adolescentes) (INCA, 2017).

No quadro clínico da LLA, lesões genéticas afetam células progenitoras que se diferenciariam em células B e T causando mutações que resultam em renovação ilimitada e interrupção do amadurecimento celular (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). As células mais afetadas são células precursoras B, células T e células B maduras, respectivamente (KATO; MANABE, 2017). Essas células leucêmicas se multiplicam rapidamente de forma imatura e muitas apresentam deficiência na produção de asparagina sintetase (ASNS). Consequentemente, são incapazes de produzir asparagina e tornam-se dependentes do aminoácido sérico (BROOME, 1961). Ao injetar ASNase na corrente sanguínea do paciente, a asparagina circulante é hidrolisada, causando a morte por desnutrição das células deficientes. Dessa maneira, há uma eliminação seletiva de linfomas (BATOOL et al., 2016; KULLAS et al., 2012; VERMA et al., 2007).

O primeiro estudo sobre o uso efetivo de quimioterapia para o tratamento de LLA foi desenvolvido por Farber, Diamond, Mercer, Sylvester, & Wolff em 1948. Nas décadas seguintes, entre os anos de 1950 a 70, as principais drogas antileucêmicas foram desenvolvidas (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). Entretanto, as taxas de sobrevida após o

tratamento eram baixas, em torno de 20% (PUI; EVANS, 2013). Estes percentuais motivaram o uso combinado de drogas com outras técnicas, como radiação cranial, que ficou conhecido como terapia total (PUI; EVANS, 2013). Estes esforços resultaram no aumento da taxa de sobrevida para 70% na década de 70 (PUI; EVANS, 2013). Atualmente, a taxa de sobrevida para adultos alcança percentuais acima de 60% em regiões desenvolvidas; já em relação à leucemia infantil, esse valor pode ultrapassar 90% nos centros modernos de pesquisa (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013; INCA, 2015; PUI; EVANS, 2013).

Hoje em dia, o tratamento de LLA consiste em basicamente três fases: indução da remissão; terapia de consolidação e manutenção; e avaliação de doença residual (HOELZER et al., 2016; LARSON, 2016; LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, [s.d.]). A primeira fase visa eliminar os sintomas da leucemia do sangue e da medula através de poliquimioterapia que, geralmente, combina o uso de Daunorubicina, ou Doxorubicina, corticoides, Vincristina, L-asparaginase, e outros medicamentos (LARSON, 2016; LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, [s.d.]). Essa fase dura entre 1 e 2 meses (LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, [s.d.]). A segunda fase objetiva evitar o retorno do câncer e também consiste em quimioterapia, porém com outros medicamentos, além disso, sua duração se estende por meses até anos (LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY, [s.d.]).

Em alguns casos, podem ser necessárias seções de radiação (linfoblastos no cérebro) e transplante de células tronco ou transplante de medula quando há alto risco de relapso ou segunda remissão (LARSON, 2016). Finalmente, a terceira fase consiste em avaliação da medula por até cinco anos, quando o paciente é considerado curado (LARSON, 2016).

Nesses protocolos, a ASNase é utilizada na primeira fase e sua dosagem varia de 80.000 a 100.000 U/m² de área corpórea do paciente (INCA, 2001). Cerca de 95% dos pacientes já atingem completa remissão em 6 semanas de terapia (KATO; MANABE, 2017). Os protocolos de tratamento são selecionados de acordo com o grau de risco do paciente, que depende do número e morfologia de blastos e do tamanho do fígado e do baço, e se diferem em relação à dosagem e ao tempo de tratamento (INCA, 2001).

A asparagina é um aminoácido não essencial, ou seja, é produzida pelas células através da reação de conversão de aspartato e glutamina em asparagina e glutamato catalisada pela ASNS (asparagina sintetase). Ela está envolvida na síntese de outros

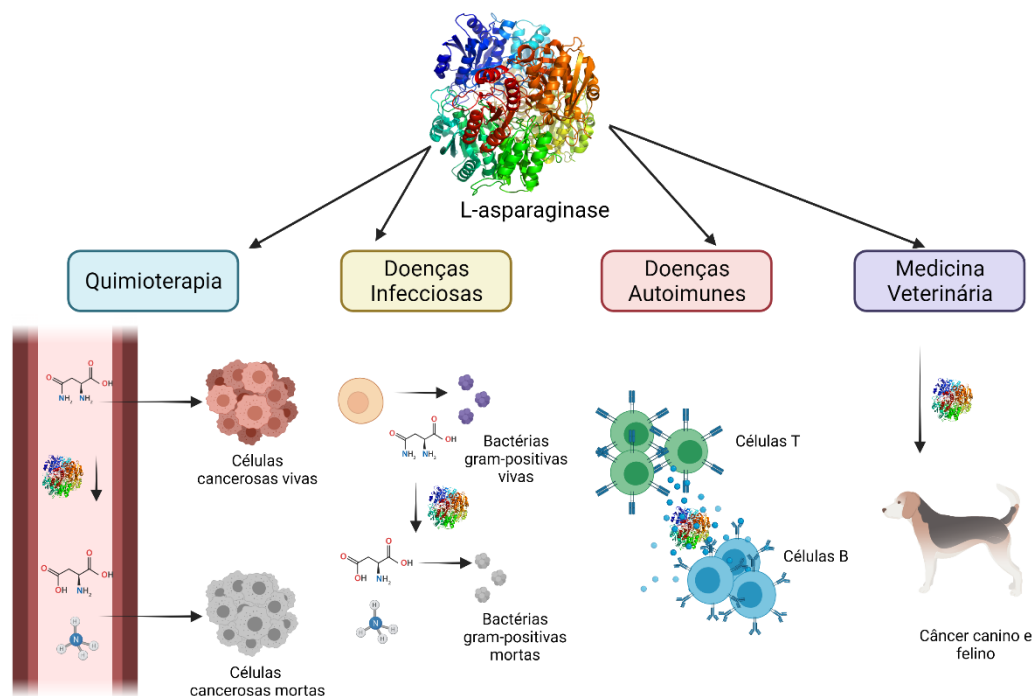
aminoácidos, de glicoproteínas e de ácidos nucleicos (FERNANDES et al., 2017; KWONG LAM FUNG; CHI-FUNG CHAN, 2017). Ela é importante para a manutenção do rápido crescimento das células tumorais. Além disso, em células tumorais, ela possui papel essencial na supressão da apoptose celular (ZHANG et al., 2014) e sua biodisponibilidade está relacionada com o potencial metastático do tumor (KNOTT et al., 2018). Inúmeros estudos reportam que células tumorais capazes de expressar ASNS apresentam resistência ao tratamento com a ASNase (COSTA-SILVA et al., 2020; LOMELINO et al., 2017; ZHANG et al., 2014). Logo, nesses casos, outros alvos terapêuticos são necessários para complementar o tratamento, como a glutamina.

A glutamina é outro aminoácido não essencial. Ela exerce papel importante como fonte de energia e é precursora na biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (CHEN; RUSSO, 2012; KWONG LAM FUNG; CHI-FUNG CHAN, 2017). Células cancerosas consomem altas quantidades de glutamina para manterem o seu crescimento acelerado (ZHANG; PAVLOVA; THOMPSON, 2017). Portanto, o tratamento com uma ASNase com alta atividade de glutaminase (GLNase) seria capaz de exaurir a glutamina sérica e ocasionaria a morte seletiva de células com alto consumo (CHIU et al., 2014; TARDITO et al., 2007; VAN DEN BERG, 2011). Por outro lado, a glutamina é um dos aminoácidos mais abundantes do sangue e sua hidrólise leva à formação de amônia. Portanto, altas taxas reacionais poderiam resultar em hiperamonemia e neurotoxicidade, prejudicando as células saudáveis (JÖRCK et al., 2011). Por isso, a escolha de uma ASNase com alta ou baixa atividade de GLNase deve ser avaliada para cada caso (COSTA-SILVA et al., 2020).

Atualmente, há uma tendência pela personalização do protocolo de tratamento da LLA, como o ajuste de dosagem de acordo com o fenótipo e genótipo das células leucêmicas (PUI; EVANS, 2013) e farmacogenômica (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). Acredita-se que, futuramente, cada paciente terá um tratamento único de forma a minimizar as taxas de falha causadas pelos mecanismos de resistência e sensibilidade aos fármacos (HOLLEMAN et al., 2004; SCHERF et al., 2000), pois todos apresentam algum grau de toxicidade (PUI; EVANS, 2013). Entretanto, enquanto os custos de análises genômicas impedirem sua escalabilidade, principalmente, em países não desenvolvidos, justifica-se a pesquisa pelo desenvolvimento de fármacos que reduzam os efeitos colaterais (PUI; EVANS, 2013) e melhorem a qualidade de vida do paciente.

Além da aplicação no tratamento de LLA, outras finalidades foram identificadas. Por exemplo, o uso de L-asparaginase no tratamento de outros linfomas (linfoma nasal, linfoma não Hodgkin, e leucemia mieloide aguda), e inclusive em animais (Saba, Hafeman, Vail, & Thamm, 2009). Ademais, há um grande potencial como antitumoral para o câncer de mama (SHIROMIZU et al., 2018) e como agente inibitório da evolução deste câncer para metástase (KNOTT et al., 2018). Acrescentam-se estudos em outros tumores sólidos, tais como câncer pancreático (DUFOUR et al., 2012) e de ovários (LORENZI et al., 2006). Outras aplicações clínicas são em doenças infecciosas e autoimunes (Baruch et al., 2014; Gioldanowski, 1976). Essas aplicações de ASNase são expostas na Figura 2. Adicionalmente, há crescente uso na área alimentícia, como agente inibidor da formação de acrilamida, um composto cancerígeno que é liberado durante o aquecimento de alimentos que contém amido (VIMAL; KUMAR, 2018).

Figura 2. Atuais aplicações de ASNase como terapêutico. Como quimioterápico, a aplicação da ASNase se baseia na hidrólise da asparagina sérica levando à morte seletiva de linfomas ou de tumores sólidos deficientes de ASNS por privação de asparagina; como antiproliferativo de bactérias, a ASNase pode ocasionar a morte por desnutrição de bactérias gram-positivas que são dependentes da asparagina das células hospedeiras (BARUCH et al., 2014); em doenças autoimunes, estudos demonstraram que a ASNase possui propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias mediante células T e B (GIELDANOWSKI, 1976); e em doenças oncológicas veterinárias, a ASNase foi usada em um protocolo quimioterápico para prolongar a remissão de tumores (SABA et al., 2009).



Fonte: Figura adaptada de Vimal & Kumar (2018) e produzida em BioRender.com pela autora.

1.2.3. *Pichia pastoris*: plataforma de expressão para proteínas recombinantes

1.2.3.1. Origem, vantagens e aplicações

Pichia pastoris, atualmente denominada como *Komagataella spp. (pastoris e phaffi)*, é uma levedura da família *Saccharomycetales* do gênero *Komagataella*. Todas as linhagens de *P. pastoris* são derivadas da cepa NRRL-Y 11430. Ela é uma das poucas leveduras metilotróficas, ou seja, capazes de utilizar metanol como única fonte de energia e de carbono. Essa capacidade se deve à existência de genes que regulam a expressão de enzimas que permitem tanto o metabolismo do metanol, como álcool oxidases reguladas pelos genes AOX, quanto sua degradação e eliminação, como catalases e desidrogenases, evitando que níveis tóxicos de metanol ou subprodutos sejam atingidos intracelularmente (BÖER et al., 2007; KURTZMAN, 2009; PEÑA et al., 2018).

No início da década de 70, Koichi Ogata relatou pela primeira vez a existência de leveduras metilotróficas. Isso despertou interesse na *Phillips Petroleum Company* que desenvolveu os primeiros protocolos para cultivo de *P. pastoris* para comercialização como fonte de proteína para alimentação animal. No entanto, com a crise do petróleo, o custo de produção inviabilizou essa aplicação. Como alternativa, a companhia petroleira contratou a *Salk Institute Biotechnolgy/Industrial Associates, Inc.* para tornar a *P. pastoris* em uma plataforma de expressão heteróloga. Na década de 90, a patente foi vendida para a *Research Corporation Technologies* e a tecnologia licenciada para a *Invitrogen Corporation* (CEREGHINO; CREGG, 2000). Desde então, essa levedura tem sido amplamente aplicada em pesquisa e em produção de produtos recombinantes.

Esta levedura apresenta ampla aplicação biotecnológica em função de suas inúmeras vantagens, tais como: a sua capacidade de crescer tanto em glicose ou glicerol quanto em metanol, provendo cultivos de alta densidade celular em meio definido; o seu sistema de expressão heteróloga induzido por metanol, que permite a manipulação de genes AOX para a produção recombinante; o mecanismo de repressão / de-repressão dos genes AOX que permite separar crescimento da produção recombinante; a capacidade de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação e formação de pontes dissulfeto; alta produção heteróloga intracelular e extracelular; alta eficiência de secreção;

genoma bem conhecido e com semelhanças com *Saccharomyces cerevisiae*; ausência de endotoxinas, de patogenicidade e imunogenicidade humana; e a existência de kits comerciais (CEREGHINO; CREGG, 2000; DE et al., 2021; FERREIRA, 2013; JUTURU; WU, 2018; POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012; VALERO, 2013).

Desde 2006, quando a *Pichia* foi rotulada como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) pela FDA, ou seja, que consumo de substâncias produzidas nessa plataforma foi considerado seguro para humanos, sua aplicação na pesquisa e indústria aumentou significativamente. Em 2009, foi aprovado o primeiro medicamento produzido por *Pichia* e desde então são mais de 15 produtos já aprovados para comercialização como mostra a Tabela 3. Essa ampliação de produtos aprovados não se deve apenas às vantagens já citadas, mas também pela evolução de técnicas de engenharia genética e metabólica que permitiram a criação de novas cepas capazes de fornecer produtos mais sofisticados que atendam aos requisitos regulatórios, como, por exemplo, proteínas com glicosilação humanizada.

Tabela 3. Produtos produzidos por *Pichia pastoris* que já estão disponíveis no mercado.

Produto	Empresa	Aplicação
Kalbitor® Proteína inibidora de calicreína	Dyax (EUA)	Tratamento de angioedema hereditário
Insugen® Insulina recombinante	Biocon (India)	Terapia para diabetes
Medway® Albumina humana recombinante	Mitsubishi Tanabe Pharma (Japão)	Expansão do volume de Sangue
Shanvac® Vacina recombinante para hepatite B	Shanta / Sanofi (India)	Prevenção de Hepatite B
Shanferon® Interferon alfa 2b recombinante	Shanta / Sanofi (India)	Hepatite C e Câncer
Ocrisplasmin® Plasmina recombinante	ThromboGeneics (Bélgica)	Tratamento de tensão vítreo-macular
Nanobody® ALX-0061 Fragmento de anticorpo anti-IL6 recombinante	Ablynx (Bélgica)	Tratamento de artrite reumatoide
Nanobody® ALX-0071 Fragmento de anticorpo anti-VRS recombinante	Ablynx (Bélgica)	Tratamento de infecção pelo vírus respiratório sincicial (VRS)
HB-EGF Fator de Crescimento Epidérmico Ligante de Heparina	Trilium (Canda)	Tratamento de cistite intersticial e síndrome de dor na bexiga
Purifine® Fosfolipase C recombinante	Verenium / DSM (EUA / Países Baixos)	Desgomagem de óleos com alto teor de fósforo
Tripsina recombinante	Roche Applied Sciences (Alemanha)	Digestão de proteínas
Colágeno recombinante	Fibrogen (EUA)	Reagente para pesquisa clínica e preenchimento dérmico
AQUAVAC IPN® Proteínas de capsídeos de vírus causador de necrose pancreática	Merck / Schering Plough Animal Health (EUA)	Vacina para infecção de necrose pancreática em salmão

Continua

Continuação		
Produto	Empresa	Aplicação
Fítase recombinante	Phytex, LLC (EUA)	Aditivo de ração animal
Redutase de Nitrato recombinante	The Nitrate Elimintaion Co. (EUA)	Produtos para testagem e tratamento de água
Cistatina C humana recombinante	Scipac (Reino Unido)	Reagente para pesquisa
VYEPTI®	Lundbeck Seattle	
Anticorpo monoclonal recombinante	BioPharmaceuticals, Inc (EUA)	Tratamento de enxaqueca

Fonte: www.pichia.com

1.2.3.2. Construção de novas cepas

Embora todas as cepas sejam provenientes do mesmo microrganismo, novas linhagens foram construídas a partir da manipulação de genes da via do metabolismo do metanol e de expressão de proteases, e da inserção de vetores para recombinação gênica, além da humanização das vias de glicosilação. Atualmente, existem ao menos sete kits comerciais de *Pichia* e 50 linhagens com diferentes fenótipos sendo utilizadas como plataforma de expressão (AHMAD et al., 2014).

A levedura *P. pastoris* possui dois genes AOX reguladores da atividade da enzima álcool oxidase, AOX1 e AOX2, a primeira enzima da via do metabolismo do metanol (BÖER et al., 2007; CREGG et al., 1989). Esses genes são reprimidos na presença de glicerol, glicose, etanol, entre outras fontes de carbono, e são fortemente induzidos na presença de metanol. O mecanismo de repressão / desrepressão é complexo e ainda não foi totalmente elucidado, resumidamente, ele é regulado por fatores de transcrição que desreprimem o promotor dos genes AOX na presença de metanol enquanto que transportadores de hexoses o mantém reprimido na presença de glicerol (WANG et al., 2017). O gene AOX1 regula aproximadamente 85% da atividade da enzima álcool oxidase, enquanto que o restante é regulado pelo AOX2 (VALERO, 2013). Essa característica é usada como ferramenta de construção de fenótipos com base na desativação de apenas um gene AOX ou de ambos.

Quando os dois genes são ativos, a cepa apresenta consumo e crescimento mais rápidos em metanol e recebe a denominação Mut⁺, este é o caso de linhagens selvagens, X-33 e GS115. Outra possibilidade é a deleção do gene AOX1, resultando em uma cepa com crescimento lento em metanol (Mut^s), como a linhagem KM71. Já quando os dois genes são deletados, a cepa não consome metanol (Mut⁻), como a linhagem MC100-3.

Ressalta-se que todas essas cepas possuem a capacidade de expressão recombinante induzida por metanol, mesmo que ele não seja usado como fonte de energia (CREGG et al., 1989; INVITROGEN, 2014).

Novas cepas também foram construídas a partir da deleção dos genes PEP4 e PRB1 que codificam as proteases A e B, respectivamente. Em cultivos com alta densidade celular, essas proteases vacuolares podem ser secretadas no meio, resultando na degradação da proteína recombinante, logo a deleção desses genes resulta em maior produtividade. No entanto, essas linhagens apresentam menor viabilidade e velocidade de crescimento e são mais difíceis de transformar, portanto, são recomendáveis apenas para situações em que outras estratégias de ação anti-proteolítica não são plausíveis (CEREGHINO; CREGG, 2000; JUTURU; WU, 2018).

Além da manipulação dos genes nativos, novas linhagens também foram obtidas pela recombinação gênica. Para tanto, foram desenvolvidos vetores de expressão, como plasmídeos, que contém três elementos principais: o cassete de expressão formado por um promotor induzível, o gene de interesse, a sequência sinal; a sequência de replicação; e um marcador de seleção. Além disso, os plasmídeos que são desenhados para propagação em bactérias, geralmente em *Escherichia coli*, antes da transformação na levedura também possuem origem de replicação e marcador de seleção para a bactéria (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A maioria dos plasmídeos apresenta o promotor do gene AOX (P_{AOX}) por ser um indutor forte da produção heteróloga na presença de metanol. No entanto, como em processos industriais, o uso de metanol em largas quantidades pode ser inviável por ser um produto inflamável, outros promotores foram desenvolvidos. O segundo promotor mais utilizado é P_{GAP} que regulada a produção da G3P-desidrogenase e é induzido com glicose e glicerol, apresentando força de indução similar ao P_{AOX} . Por outro lado, esse promotor tem a desvantagem de induzir a produção heteróloga junto com o crescimento celular, sobrecarregando o maquinário celular. O terceiro mais aplicado é o P_{FLD1} que codifica a formaldeído-desidrogenase e é um promotor forte e induzido por metanol ou metilamina. Quando é almejada a expressão moderada, podem ser usados os promotores P_{PEX8} que resulta na produção de enzimas do peroxissomo em glicose ou metanol, ou o promotor do gene YPT1 que leva codifica uma purina hidrolase em glicose, metanol ou

manitol (CEREGHINO; CREGG, 2000; DE et al., 2021; JUTURU; WU, 2018). Outros promotores alternativos foram extensivamente discutidos por Vogl & Glieder (2013).

Outro elemento essencial do plasmídeo é o marcador de seleção que, basicamente, apoia-se em dois mecanismos: resistência ao antibiótico ou supressão da auxotrofia. Em relação aos antibióticos, o plasmídeo contém geralmente um gene que confere resistência à zeocina (Zeocin[®]), blasticidina (Blastidicin[®]), canamicina (Kanamycin[®]) ou geneticina (G418[®]). Em relação à auxotrofia, o plasmídeo contém um gene alelo ao nativo que está ausente no hospedeiro que o torna deficiente na produção de determinado aminoácido, sendo mais comum as auxotrofias para histidina (gene HIS4), arginina (ARG4), uracila (URA3), entre outros (CEREGHINO; CREGG, 2000; JUTURU; WU, 2018). A estratégia do marcador para supressão de auxotrofia é especialmente interessante para aplicações em que o uso de antibióticos é indesejável.

Caso a produção extracelular seja almejada, é necessário a inserção de uma sequência sinal no vetor. O peptídeo sinal mais utilizado em *Pichia* é o sinal alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, seguido de alfa-amilase de *Aspergillus niger* ou de outras leveduras. A sequência sinal ajuda a proteína a entrar no retículo endoplasmático como passo inicial, em seguida, ela atravessa o complexo de Golgi até que ela seja exportada por uma vesícula para o meio extracelular. No retículo endoplasmático, a sequência sinal é clivada em diferentes fragmentos e, geralmente, proteínas que possuem o peptídeo alfa apresentam quatro aminoácidos adicionais no N-terminal. A adição e o aprimoramento da sequência sinal por meio de ferramentas de biologia molecular é uma das estratégias mais escolhidas para aumentar a produção extracelular (CEREGHINO; CREGG, 2000; DE et al., 2021; JUTURU; WU, 2018).

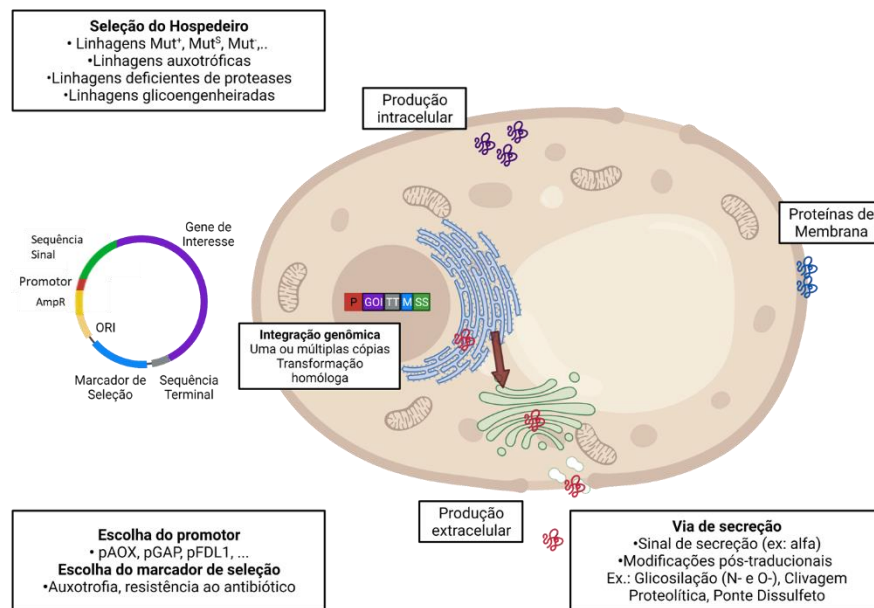
Para uma integração mais estável, procura-se realizar a integração do tipo homóloga, em que o DNA recombinante é integrado ao genoma do hospedeiro. A recombinação ocorre entre os terminais livre do plasmídeo e um local homólogo no cromossomo (CEREGHINO et al., 2001). Em *Pichia*, há duas técnicas mais utilizadas. A primeira se baseia em transformar uma cepa auxotrófica com um vetor contendo o gene sintético que ocupa o *locus* do gene nativo, por exemplo o HIS4 em cepas auxotróficas para histidina. Em seguida, as variantes transformadas são selecionadas em meio mínimo sem o aminoácido de interesse em placas de forma que as variantes auxotróficas não se desenvolvem. A segunda técnica se apoia em linearizar o vetor de forma a liberar o

cassete de expressão e o marcador de expressão resultando na integração no gene AOX1. Cerca de 20% das transformações ocorrem com deleção e substituição do gene AOX1 nativo, resultando em cepas com fenótipo Mut^S (CEREGHINO; CREGG, 2000). Essas variantes podem ser selecionadas por meio da velocidade de crescimento em meio mínimo contendo metanol em placas de Petri.

A obtenção de variantes com várias cópias do cassete de expressão pode resultar em maior expressão heteróloga, embora, a superexpressão possa sobrecarregar o maquinário celular e sua capacidade de secreção (YANG; ZHANG, 2018). Entre as técnicas mais comuns para obter a superexpressão estão: a criação de vetores com múltiplas cópias do cassete de expressão usando enzimas de restrição; ou a construção de um vetor contendo dois marcadores de seleção, um gene para conferir resistência ao antibiótico G418 e outro para suprimir uma auxotrofia (ex. HIS4), seguida de triagem em placas com concentração crescente do antibiótico, o que resulta na seleção de variantes com múltiplos eventos de integração; ou por meio de vetor com o gene de resistência à zeocina com seleção com meio contendo concentração crescente do antibiótico (J. L. Cereghino & Cregg, 2000).

Recentemente, há uma tendência pela engenharia metabólica e genéticas das cepas visando ao aumento da produtividade, entre as estratégias adotadas estão: otimização dos códons, ou seja, a substituição de códons raros por mais frequentes em *Pichia*; o aprimoramento do promotor e do peptídeo sinal; as modificações nas vias metabólicas para melhorar o rendimento de metanol em produtos ou a inserção de novas vias para a produção de subprodutos de interesse, como carotenoides, terpenos, ácido salicílico, e peptídeos antimicrobianos; e a modulação da glicosilação (AHMAD et al., 2014; DE et al., 2021; JUTURU; WU, 2018; PEÑA et al., 2018). Em especial, essa última modificação permitiu a aplicação da *Pichia* como plataforma de expressão de biofármacos mais sofisticados, como anticorpos monoclonais e eripoetina recombinante, e será detalhada na próxima seção (BERDICHEVSKY et al., 2011; LIU et al., 2018; SOYASLAN; ÇALIK, 2011). Os principais aspectos da recombinação gênica são resumidos na Figura 3.

Figura 3. Aspectos gerais da expressão heteróloga em *P. pastoris*. Primeiramente é feita a escolha do hospedeiro entre as diversas linhagens disponíveis. Em seguida, são selecionados os elementos do plasmídeo: o cassete de expressão (gene de interesse (GOI), o promotor (P) e a sequência final de transcrição (TT)), o marcador de seleção (M) (resistência ao antibiótico ou supressão da auxotrofia ou ambos) e a sequência sinal (SS) (produção extracelular). No caso de necessidade de replicação bacteriana antes da transformação em levedura, são incluídos o marcador de seleção (como o gene *Amp^r* de resistência ao antibiótico ampicilina) e a origem de replicação (*Ori*). Posteriormente é realizada a transformação da cepa, caso seja almejada a integração homóloga é feita a linearização do plasmídeo. O nível de expressão da proteína recombinante depende da integração, se ela ocorre de forma homóloga ou heteróloga, e da quantidade de cassetes de expressão integrados. A secreção é estimulada pela presença do peptídeo sinal que encaminha a proteína para o retículo endoplasmático (em azul), onde a proteína passa por modificações pós-traducionais, como glicosilação e processamento proteolítico e é encaminhada para o complexo de Golgi (em verde) antes da secreção extracelular. Alternativamente, a sequência sinal pode estar ausente e a produção é intracelular ou ainda as proteínas podem ser ancoradas na membrana.



Fonte: Figura adaptada de Ahmad et al. (2014) e feita pela autora no BioRender.com.

1.2.3.3. Linhagens Glycoswitch®: cepas com glicosilação humanizada

A glicosilação de proteínas é o processo pós-traducional de anexação de carboidratos à estrutura proteica. Quando os açúcares são ligados ao resíduo serina ou treonina, denomina-se O-glicosilação. Já quando se dá no resíduo asparagina na sequência consenso Asn-X-Ser/Thr, chama-se N-glicosilação. O processo de glicosilação se inicia no retículo endoplasmático e continua no complexo de Golgi e no citoplasma. A composição dos oligossacarídeos varia para cada espécie, além da estrutura base formada por moléculas de N-acetilglicosamina (GlcNAc), glicoses (Glc) e manoses (Man), eucariotos superiores são capazes de produzir glicanos contendo galactoses (Gal),

moléculas de ácido siálico, e fucoses (Fuc), já leveduras apenas produzem glicanos contendo alto teor de manoses (JUTURU; WU, 2018; VERVECKEN et al., 2007).

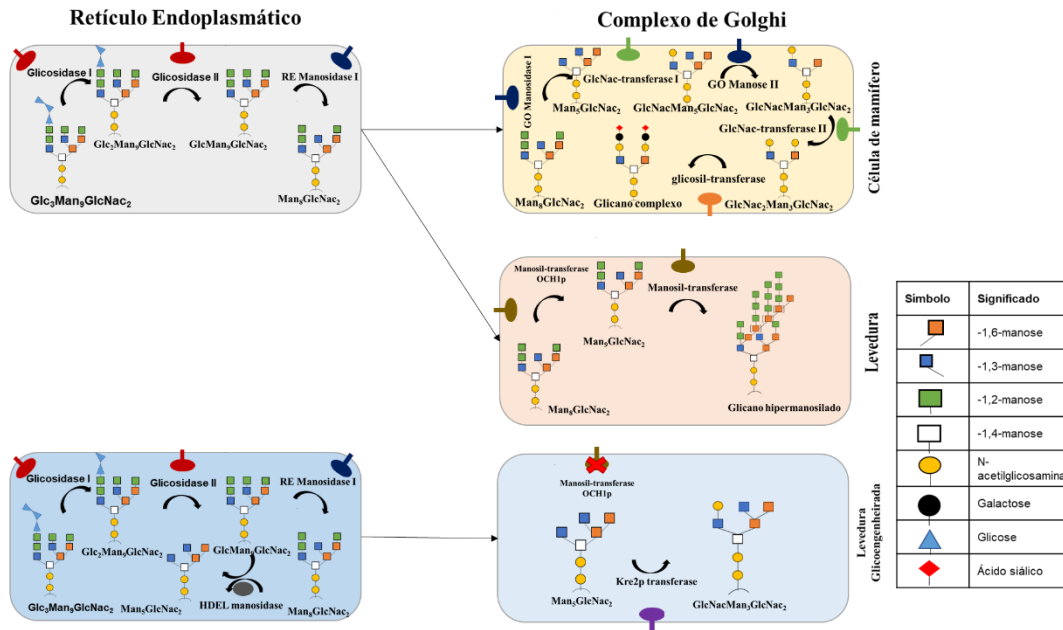
A N-glicosilação influencia fortemente a estrutura e o dobramento da proteína devido à sua atividade similar à de chaperonas, além de auxiliar a secreção da proteína, melhorar a sua solubilidade, diminuir a formação de agregados e sua imunogenicidade (JUTURU; WU, 2018; LANDUYT et al., 2019). A glicosilação da proteína pode reduzir sua imunogenicidade indiretamente ao “esconder” epítomos que são reconhecidos por células do sistema imune (COLE et al., 2004). Portanto, a glicosilação é altamente recomendada pela FDA para biofármacos (FDA; CDER; CBER, 2014). Atualmente, cerca de 70% dos biofármacos aprovados são glicosilados (NADEEM et al., 2018). No entanto, a N-glicosilação em leveduras ocorre com formação de longas cadeias de manoses, o que pode causar reações imunogênicas em humanos e reduzir a meia-vida da biomolécula (JACOBS et al., 2009).

Em todos os eucariontes, a N-glicosilação se inicia de forma semelhante no retículo endoplasmático com a ligação de um oligossacarídeo, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, ao resíduo asparagina do polipeptídeo, conforme mostra a Figura 4. Em seguida, esse oligossacarídeo é cortado em $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$ por glicosidases e manosidases e, quando a proteína atinge o complexo de Golgi, as modificações nos glicanos passam a se diferenciar entre as espécies eucariontes. Em eucariontes superiores, a ação de manosidases e transferases resultam em oligossacarídeos contendo $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNac}_2$ e/ou uma mistura de diferentes açúcares (Gal, ácido siálico). Já em leveduras, pela ação do gene OCH1 é iniciado um conjunto de reações que resultam em adição de longas cadeias de manoses de forma heterogênea, caracterizando uma hiperglicosilação. A estrutura típica do N-glicano de *P. pastoris* contém de 8 a 9 manoses (CEREHINO; CREGG, 2000; JACOBS et al., 2009).

Como forma de humanizar a glicosilação de linhagens de *Pichia*, Jacobs et al. (2009) propuseram deletar o gene OCH1, que resulta na alta manosilação, e adicionar genes heterólogos que codificam glicotransferases e glicosidases que modulem a glicosilação para um padrão do tipo mamífero. Por exemplo, a linhagem M5 (nome comercial Glycoswitch[®] SuperMan₅) foi construída com a inserção do gene HDEL do fungo *Trichoderma reesei* que codifica manosidases que levam à formação de glicanos compostos por $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$ de forma homogênea. A partir da linhagem M5, outras

foram construídas para também produzir glicanos com galactose e mais moléculas de GlcNac. Essas linhagens são comercializadas com o nome *Pichia Glycoswitch*[®] pela empresa Biogrammatics e já são aplicadas em inúmeras pesquisas. O esquema de glicosilação é representado na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática da rota de glicosilação em células de mamíferos, leveduras e leveduras glicoengenheiradas. A glicosilação é iniciada no retículo endoplasmático de maneira semelhante em células de mamíferos e em leveduras com a ligação de um oligossacarídeo, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, ao resíduo asparagina do polipeptídeo. Em seguida, esse oligossacarídeo é cortado em $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$ por glicosidases (I e II) e manosidases (I) e, quando a proteína atinge o complexo de Golgi, as modificações nos glicanos passam a se diferenciar entre as espécies eucariontes. Na célula de mamífero, a ação de manosidases (I e II) e transferases (GlcNac I e II) resultam em oligossacarídeos contendo $\text{Man}_{5-6}\text{GlcNac}_2$ e/ou uma mistura de diferentes açúcares (Gal, ácido siálico). Já em leveduras, pela ação do gene *OCH1* é iniciado um conjunto de reações que resultam em adição de longas cadeias de manoses pela ação de transferases de forma heterogênea, caracterizando uma hiperglicosilação. A estrutura típica do N-glicano de *P. pastoris* contém de 8 a 9 manoses. Na levedura glicoengenheirada, a deleção do gene *OCH1* resulta na desativação das transferases, o que termina com a hipermanosilação. Além disso, a inserção do gene *HDEL* produz manosidases que levam à formação de glicanos compostos por $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$ de forma homogênea e, por fim, pela ação da transferase *Kre2p* há formação de $\text{GlcNacMan}_5\text{GlcNac}_2$.



Fonte: Imagem produzida pela autora adaptada de Vervecken et al., 2007

Smith, Perry, Sears, & Johnson (2014) reportaram a expressão bem-sucedida de quimase humana recombinante na linhagem M5 com características comparáveis com a enzima nativa humana. Já Liu et al. (2018) utilizaram a M5 como base para uma nova linhagem capaz de expressar o anticorpo monoclonal (mAb) Trastuzumab, utilizado no tratamento de câncer de mama, com potencial de substituir as células CHO (*chinese hamster ovary*) comumente usadas na indústria farmacêutica. Utilizando uma tecnologia de glicoengenhieramento similar à *Glycoswitch*[®], Potgieter, Kersey, Mallem, Nylen, & D'Anjou (2010) conseguiram expressar um anticorpo monoclonal com glicosilação

uniforme do tipo Man₅GlcNac₂ em diferentes escalas com tamanho e afinidade similares ao mAb referência produzido por células CHO.

De fato, a aplicação de linhagens glicoengenheiradas de *Pichia* na produção de proteínas terapêuticas pode resultar em aumento de produtividade e redução significativa dos custos de produção, resultando em tratamentos para doenças graves, como câncer e artrite reumatoide, mais acessíveis. Em 2020, o primeiro mAb produzido em uma cepa glicoengenheirada de *Pichia* foi aprovado pela FDA, o Epitezimumab (VYEPTI[®], Lundbeck Seattle BioPharmaceuticals, Inc.) que é aplicado para prevenir ataques de enxaqueca, e o perfil de glicosilação da molécula recombinante foi similar ao mAb referência (FDA, 2020). Portanto, a utilização de cepas com capacidade de fazer glicosilações mais humanizadas possui alto potencial de desenvolvimento de biofármacos eficazes e seguros.

1.2.3.4. Aspectos metabólicos do cultivo de *Pichia pastoris*

a) Fluxo metabólico do carbono central durante o crescimento

Compreender o fluxo metabólico tanto facilita a previsão do comportamento celular sob diferentes pressões ambientais quanto permite a engenharia metabólica afim de se otimizar a produção da proteína desejada (HUANG; CHANG; HENDERSON, 2008; ISIDRO et al., 2016A; SAITUA et al., 2017; VANZ et al., 2012). A seguir são descritas as principais mudanças metabólicas que ocorrem no cultivo.

Durante a maioria dos cultivos, a levedura *P. pastoris* experimenta três condições ambientais distintas: fase com alimentação de fonte de carbono para crescimento (glicerol ou glicose); período de transição com ou sem alimentação de fontes de carbono; e alimentação com metanol para indução. Desta maneira, os fluxos metabólicos assumidos também mudam. Entretanto, os principais caminhos possíveis são os mesmos: glicólise e gliconeogênese pela via Embden – Meyerhof – Parnas (EMP); via das pentoses (VP); ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT); via fermentativa e fosforilação oxidativa. Destaca-se que a *P. pastoris* tem forte tendência pela respiração (ISIDRO et al., 2016A).

Na primeira fase, alimentação com glicose ou glicerol, há uma alta ativação das vias EMP e CAT. O carbono é destinado principalmente para três caminhos: produção de

carboidratos; glicólise; e ramo oxidativo da via das pentoses (SAITUA et al., 2017). Nesta fase, poder redutor NADPH é obtido, principalmente, no ramo oxidativo da via das pentoses e ATP através da fosforilação do substrato na glicólise e na produção de arabitol e de etanol, ou seja, apesar de ser classificada como Crabtree negativa, ter baixa propensão pela produção de etanol em meio sem limitação de oxigênio, ela pode produzir etanol (ISIDRO et al., 2016A; SAITUA et al., 2017; VANZ et al., 2012). Nessa primeira fase do cultivo, além do alto crescimento celular, também ocorre uma elevada produção de aminoácidos que servirão como suprimento para a produção da proteína recombinante na etapa de indução (CHUNG et al., 2010).

Caso haja limitação da fonte de carbono, todo carbono é destinado à formação de biomassa e energia para síntese e manutenção com alta ativação das vias EMP e CAT. Além disso, através da gliconeogênese a partir de glicerol, mais carbono supre a VP, gerando mais poder redutor. Por outro lado, as vias de formação de subprodutos (etanol e arabitol) são desativadas. No período de transição sem alimentação de substratos, os subprodutos (etanol e arabitol), se produzidos, são consumidos diretamente no CAT a fim de se manter a produção de ATP, que é destinada para manutenção celular (ISIDRO et al., 2016^a; SAITUA et al., 2017).

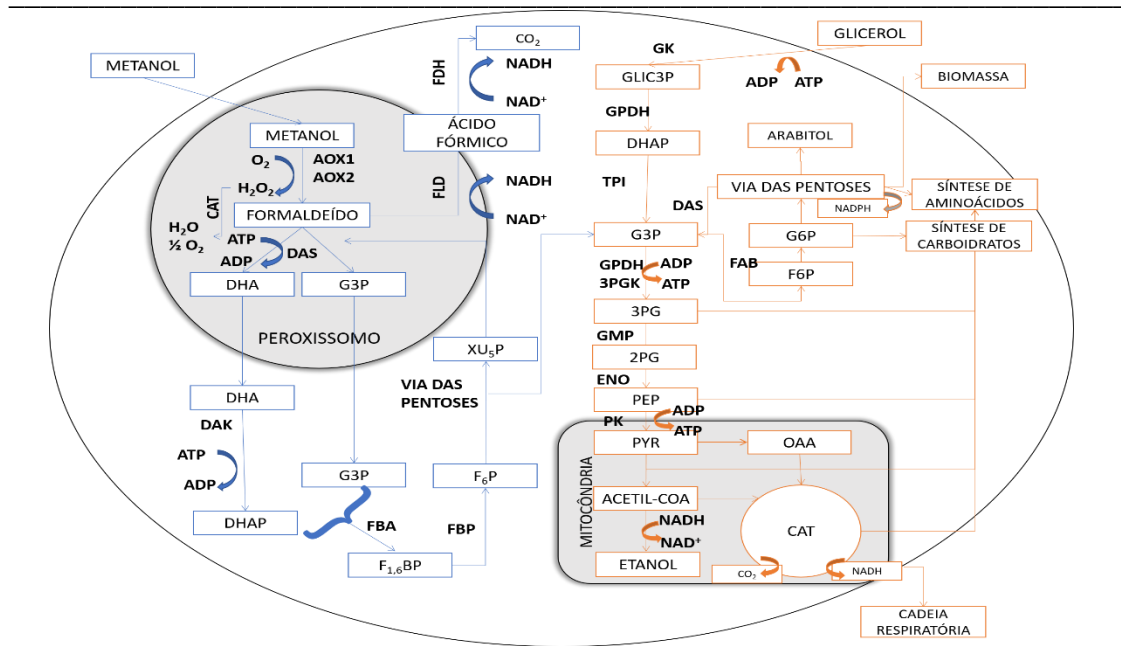
b) Vias de utilização do metanol

Na fase de alimentação com metanol, os fluxos do metabolismo de carbono central são mais elevados por causa das altas taxas de reciclagem de ATP e troca gasosa que demandam altos níveis de energia para consumo do metanol. O metanol é metabolizado em duas vias: via de disseminação e via de assimilação. Na via de disseminação, há um alto gasto energético, o metanol é oxidado para a geração de coenzima NADH, que é reoxidada na cadeia respiratória, resultando na produção de mais ATPs. O produto final dessa via é o CO₂, que representa até 80% do carbono consumido e é o único subproduto dessa fase. Na via de assimilação, que é apenas ativada em altas concentrações de metanol, o carbono é destinado para a biossíntese de biomassa e da proteína recombinante, mas há uma queda drástica no rendimento em biomassa em comparação ao crescimento com glicerol (CHUNG et al., 2010; UNREAN, 2014; VANZ et al., 2012a).

Ademais, há ativação de inúmeras enzimas que permitem o metabolismo do álcool. Já no início da adaptação do metabolismo ao metanol, há acúmulo de enzimas

álcool oxidases (AOX) que catalisam metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio, essa enzima chega a representar até 30% das proteínas solúveis totais da célula. O peróxido de hidrogênio é altamente citotóxico, por isso ele é metabolizado no peroxissomo por catalases a água e oxigênio. Já o formaldeído é dividido pelas vias metabólicas. Pela ação de desidrogenases, o formaldeído é oxidado a formato e CO₂ no citoplasma, essas reações são a fonte de energia para o crescimento celular pela formação de NADH (via de disseminação). O restante de formaldeído é condensado com xilose-5-monofosfato (XU5P) pela catálise da sintase dihidroxilacetona (DHAS) resultando em gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e dihidroxilacetona. Esses produtos são transferidos para o citoplasma, onde um ciclo de renovação de XU5P envolvendo reações da VPP resultam em mais moléculas de G3P. Em seguida, G3P é destinado para as vias de biossíntese e para o CAT (CEREGHINO; CREGG, 2000; JUTURU; WU, 2018; VANZ et al., 2012a). Na Figura 5 estão representadas as principais vias do metabolismo do carbono central de utilização do glicerol e do metanol.

Figura 5. Rede metabólica do carbono central da levedura *P. pastoris*. Em laranja, o metabolismo do glicerol: o glicerol é transportado para o citoplasma e por ação da enzima glicerol quinase (GK) é transformado a glicerol-3-fosfato (GLI3P). Este é convertido a di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP) pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH). DHAP é rearranjado em gliceraldeído-3-fosfato (G3P) pela triose fosfato isomerase (TPI) e segue pelas vias da glicólise e das pentoses. G3P é convertido a frutose-6-fosfato (F6P) por ação da frutose fosfoglicerato mutase (FBA) e por isomerização F6P se converte a glicose-6-fosfato (G6P) que segue pela via das pentoses. Ao fim dessa via, xilulose-5-fosfato (XU5P) é transformado a G3P pela ação da di-hidroxiacetona-fosfato sintase (DAS). Na glicólise, G3P é convertida a 3-fosfoglicerato (3PG) por ação da GPDH e da 3-fosfoglicerato quinase (3PGK), que, em seguida, é transformado a 2-fosfoglicerato (2PG) pela fosfoglicerato mutase (GMP). A enolase (ENO) converte 2PG a fosfoenolpiruvato (PEP) que por ação da piruvato quinase (PK) se transforma em piruvato (PYR). Este segue por dois caminhos: formação de etanol e formação de oxalacetato (OAA) que entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CAT), que fornece poder redutor para a cadeia respiratória por meio de moléculas de NADH. Em azul o metabolismo do metanol: o metanol é transportado para o peroxissomo, onde é transformado a formaldeído por ação das álcool oxidases (AOX1 e AOX2). Essa reação libera peróxido de hidrogênio que é transformado em água e oxigênio por catalases (CAT). O formaldeído segue para as vias de disseminação e assimilação. Na via de disseminação, por ação da formaldeído-desidrogenase (FLD) é produzido ácido fórmico que é convertido a CO₂ pela formato-desidrogenase (FDH). Essas reações liberam NADH que é utilizado na fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Na via de assimilação, formaldeído é convertido a di-hidroxiacetona (DHA) e G3P pela ação da DAS. Esses dois produtos são transportados para o citoplasma, onde DHA é convertida a DHAP pela di-hidroxiacetona quinase (DAK). Tanto G3P quanto DHAP são destinados para a via das pentoses e produção de biomassa, aminoácidos e carboidratos. Novamente, ao fim da via, o carbono é reciclado na transformação de XU5P a G3P pela ação da DAS.



Fonte: Figura produzida pela autora adaptada de (CHUNG et al., 2010; ISIDRO et al., 2016^a; JUTURU; WU, 2018; VANZ et al., 2012; SAITUA et al., 2017) e informações de <https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>.

c) Auxotrofia e impactos no metabolismo

A auxotrofia se caracteriza pela incapacidade de um organismo de produzir determinado composto essencial ao seu crescimento. Essa característica ocorre naturalmente em microrganismos, que dependem de um meio rico em nutrientes ou de populações prototróficas (capazes de sintetizar todos os compostos necessários) para sobreviverem na natureza (MÜLLER et al., 2018).

Em leveduras, a auxotrofia pode ocorrer naturalmente ou ser induzida como um marcador de seleção. O mecanismo de seleção se baseia na técnica de transformação de DNA homóloga, em que o plasmídeo para a expressão heteróloga é linearizado e incorporado ao DNA hospedeiro. Em auxotróficos, o plasmídeo pode conter o gene alelo ao gene selvagem ausente, assim ocupando seu *locus* após a transformação (CEREGHINO et al., 2001; CREGG et al., 1985). Dessa maneira, em um meio deficiente do composto requerido pela auxotrofia, apenas os microrganismos transformados são selecionados.

Entre as vantagens proporcionadas pelo uso da auxotrofia como marcador de seleção, pode-se citar: a estabilidade conferida à transformação (G. P. CEREGHINO et al., 2001; CREGG et al., 1985); a substituição do antibiótico como agente de seleção, já

que este pode prejudicar o metabolismo do microrganismo, além de reduzir custos do processo (PRONK, 2002); e a viabilização do uso de microrganismos recombinantes em processos industriais em que não é permitido o uso de antibióticos (HASHIMOTO et al., 2005).

Por outro lado, a auxotrofia quando não corrigida na transformação apresenta desvantagens ao processo, principalmente, se o composto que não é produzido influenciar o metabolismo do crescimento celular e da síntese de enzimas (PRONK, 2002). Dessa maneira, as vias de consumo de carbono e nitrogênio assim como de biossíntese de aminoácidos podem ser prejudicadas, causando desbalanço na produção líquida de NADH. Portanto, os rendimentos em biomassa e produto podem ser reduzidos. Além disso, é exigido um consumo maior de energia para assimilação do composto externo. Esses fenômenos causam o falseamento do fenótipo (PRONK, 2002).

O primeiro uso da auxotrofia como agente de seleção para *Pichia pastoris* foi para histidina pelos pesquisadores Cregg et al. (1985). Eles optaram por esse aminoácido porque a cepa GS115 já é naturalmente auxotrófica para ele. Para tanto, inseriram o gene HIS4 no plasmídeo para transformar a cepa em prototrófica. Além da auxotrofia para histidina, outras foram criadas como estratégia de manipulação genética, como a supressão dos genes ARG4 (codificante da argininosuccinato liase), ADE1 (aminoimidazol-succino carboxamida sintetase) e URA3 (orotidina-5'-fosfato descarboxilase) (CEREGHINO et al., 2001).

A auxotrofia para histidina influencia o crescimento da *Pichia pastoris*. A biossíntese deste aminoácido se inicia com o composto fosforibosilpirofosfato (PRPP) que provém da via das pentoses. Por meio de uma série de reações enzimáticas PRPP é transformado a histidinol e, finalmente, a histidina. As cepas auxotróficas têm uma deficiência do gene HIS4 que regula um conjunto de enzimas da biossíntese de histidina, portanto, essas reações não ocorrem (ALIFANO et al., 1996; SACCHAROMYCES GENOME DATABASE (SGD), [s.d.]).

A histidina participa de uma série de vias metabólicas, como a produção de ácidos orgânicos e de aminoácidos, como alanina, aspartato e do glutamato. O metabolismo desses três aminoácidos resulta na produção de compostos essenciais ao crescimento celular, destacando-se o piruvato (participa da glicólise e gliconeogênese) e o oxalacetato (ciclo de Krebs). Adicionalmente, eles influenciam a biossíntese de outros aminoácidos,

como arginina, prolina, pirimidina, alanina, entre outros metabólitos. Portanto, a deficiência na produção de histidina interfere no crescimento celular e em diversas outras vias metabólicas de produção de aminoácidos (KANEHISA LABORATORIES, 2017). Essas vias são apresentadas no Anexo A: Fluxos Metabólicos com Participação da Histidina.

Cultivos de cepas auxotróficas em meio sintético exigem a suplementação do composto não produzido para o crescimento da população (MÜLLER et al., 2018; PRONK, 2002). Para tanto é preciso estimar a quantidade mínima requerida com base na população esperada. Müller et al. (2018) propuseram um método com base em medidas *online* do consumo de oxigênio em cultivos com diferentes concentrações do composto requerido. Entretanto, este método exige um sensor de oxigênio e monitoramento por *software*. Já Pronk (2002) sugeriu um método com base em dados da literatura, em que basicamente a quantidade necessária do aminoácido pode ser estimada pela composição celular e rendimento de substrato em células, portanto de fácil aplicação prática e que será descrita em Materiais e Métodos.

d) *Gargalos metabólicos da expressão recombinante*

Durante a indução, o carbono para a produção da proteína recombinante é dividido com a biomassa, sendo que cerca de 80% já é destinado para o CO₂, portanto quanto maior o nível de expressão heteróloga menor o crescimento celular (VANZ et al., 2012a). De fato, a produção heteróloga é muito estressante para célula e pode levar à sobrecarga metabólica, pois drena energia, precursores e potencial redox do metabolismo do carbono central (PEÑA et al., 2018).

Muitos fatores aumentam o estresse celular durante a expressão recombinante, como dobramento incorreto da proteína, direcionamento ineficiente para o meio extracelular, sobrecarga da capacidade de dobramento no retículo endoplasmático, e a formação de agregados, formando gargalos na produção. Quando há acúmulo de proteínas ou agregados no retículo endoplasmático é iniciada uma resposta para proteína desdobrada, UPR (*unfolded protein response*), que induz genes relacionados à degradação do retículo endoplasmático, levando à produção de proteases que arrastam essas proteínas para fora da organela (AHMAD et al., 2014; PEÑA et al., 2018).

A manutenção do estado de estresse celular causado pela produção heteróloga somado ao acúmulo de intermediários tóxicos do metabolismo do metanol pode desencadear reações de autofagia por degradação do retículo endoplasmático e dos peroxissomos, levando à formação de corpúsculos de autofagia que resultam em lise celular e liberação de proteases para o meio extracelular (ROTH et al., 2018). Conseqüentemente, a queda da viabilidade celular e a liberação de proteases extracelulares podem levar à redução da proteína recombinante. Portanto, durante a indução deve haver uma faixa ótima de operação em que a produção ocorre em altas taxas e a viabilidade celular é mantida, e este é o grande desafio da produção em *Pichia*. A seguir, são apresentadas algumas estratégias presentes na literatura visando a esta faixa ótima de processo.

1.2.3.5. Aplicação de *Pichia pastoris* na produção de L-asparaginase

Devido às inúmeras vantagens da plataforma de expressão *Pichia pastoris*, ela também foi aplicada na pesquisa para desenvolvimento de moléculas inovadoras de L-asparaginase. O primeiro estudo foi publicado em 2006, Ferrara et al. (2006) utilizaram uma cepa de *P. pastoris* GS115 Mut^S para expressão do gene ASP3 que codifica ASNase II de *S. cerevisiae*, uma variante com menor potencial imunogênico do que as bacterianas. Os autores desempenharam cultivos em biorreator de 2L com essa linhagem de acordo com o protocolo de Invitrogen (2002), baseado em batelada seguida de batelada-alimentada de glicerol e indução com alimentação a taxa constante de metanol, e obtiveram 800 U/g_{biomassa} e 85600 U/L com produção intracelular no periplasma.

Após extração e purificação, o mesmo grupo alcançou recuperação de 51% da atividade e obteve uma proteína de 136 kDa com monômeros de diferentes tamanhos moleculares devido a diferentes graus de glicosilação. Como a cepa escolhida não possui glicosilação humanizada, esses glicanos podem ser potencialmente imunogênicos, mas estudos nesse sentido não foram conduzidos. Além disso, a nova variante apresentou atividade máxima a 46°C e pH 7,2, com retenção de 92% da atividade a 37 °C (FERRARA et al., 2010; GIRÃO et al., 2016).

Aplicando a mesma estratégia de expressão da ASNase II de *S. cerevisiae* em uma linhagem KM71 (Mut^s), Pillaca-Pullo et al., (2021) obtiveram, em biorreator de 3 L com indução através de pulsos, atividade volumétrica de 710 U/L. Em seguida, as condições de cultivo foram aprimoradas por D. Rodrigues et al. (2019) e os autores obtiveram 3315 U/L com atividade por biomassa de 37 U/g_{biomassa} aplicando batelada seguida de batelada-alimentada em glicerol e indução por alimentação constante de metanol. Apesar da melhoria nas condições de processo, não foram reportados estudos dos parâmetros cinéticos da enzima, atividade biológica ou imunogenicidade, portanto essa variante necessitaria de mais caracterizações para a sua aplicação como biofármaco.

Outros grupos optaram pela expressão das variantes bacterianas em *Pichia*. Sajitha et al. (2015) estudaram a produção de ASNase II de *E. coli* no sistema de expressão *Pichia* Pink[®], que possui deleção dos genes para proteases vacuolares, e obtiveram produção extracelular e atividade de 2500 U/L, porém não foram mencionados estudos em biorreator. Além disso, também não foram registrados estudos de função e segurança, e a capacidade de glicosilação foi mencionada, mas não caracterizada. Já T. C. Nguyen, T. Nguyen, & Quyen (2014) expressaram ASNase II de *D. chrysanthemi* em uma linhagem X33 (Mut⁺) e obtiveram atividade volumétrica extracelular de 3300 U/L, mas, como nos estudos anteriores, não há caracterização da glicosilação ou da farmacodinâmica ou farmacocinética dessa enzima.

Outra construção interessante foi reportada por Effer et al. (2017), os autores transformaram a linhagem M5 da Glycoswitch[®] para expressar ASNase II de *D. chrysanthemi* e conseguiram alcançar atividade volumétrica extracelular de 460 U/L em frascos com meio complexo. Em outro estudo, Effer, Lima, et al. (2019) identificaram por cromatografia de exclusão molecular que foram produzidas quatro variantes dessa EraII: dois tetrâmeros e dois monômeros, cuja principal diferença seria o grau de glicosilação. Em especial, a variante tetramérica de 160 kDa apresentou 68% da atividade de ASNase da EraII referência e atividade de GLNase reduzida, 7,5% e 12% da atividade de ASNase, respectivamente. Essa variante possui atividade ótima a 45 °C e pH 8. Além disso, a nova variante apresenta glicosilação com glicanos Man₇, Man₆ e Man₅ no resíduo Asn₁₇₀, um epítipo do sistema imune, e o encobrimento desse sítio reduziu efeitos imunogênicos como demonstrado em teste ELISA. Adicionalmente, foi evidenciado que a estabilidade dessa enzima em sêrum humano foi aumentada em relação à EraII referência. Ademais, KLEINGESINDS et al. (2019) desenvolveram um protocolo de

purificação dessa enzima baseado em ultrafiltração, cromatografia de troca catiônica e de exclusão molecular e obtiveram recuperação de 55% da atividade. No entanto, até o momento, não existem estudos para a melhoria da produção em biorreatores dessa variante com alto potencial de aplicação como biofármaco, portanto esse será o objetivo principal dessa tese visando ao futuro escalonamento dessa produção.

1.2.4. O cultivo de *Pichia pastoris* em biorreatores

Em função do esquema de recombinação gênica com o promotor P_{AOX} baseado na indução por metanol, o cultivo de *P. pastoris* é realizado basicamente em duas fases: na primeira, visa-se ao aumento da biomassa, para tanto as leveduras são cultivadas em meio contendo glicerol ou glicose em regime descontínuo ou descontínuo-alimentado; e na segunda, o objetivo é induzir a produção da proteína recombinante por meio da alimentação com metanol. Entre essas duas fases pode ocorrer um período de transição em que nenhuma fonte de carbono é alimentada para suprimir a repressão do AOX, ou ambas são adicionadas levando a desrepressão lenta do AOX, ou ainda metanol é adicionado junto com um repressor fraco do AOX mas que mantenha o crescimento, como o sorbitol (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012; VALERO, 2013). Como a segunda fase é mais crítica para a produção heteróloga, diversas estratégias de operação foram desenvolvidas focadas nela e nos seus gargalos.

A produção recombinante em *P. pastoris* apresenta diversos gargalos. Primeiramente, o metabolismo do metanol causa elevado estresse celular, seja pelo acúmulo de subprodutos tóxicos de espécies reativas de oxigênio seja pelo elevado gasto energético necessário para a manutenção celular. Em segundo lugar, a expressão recombinante também estressa a célula. O retículo endoplasmático, onde ocorrem a construção da proteína e a maioria das modificações pós-traducionais, possui uma capacidade limitada de processamento. Desse modo, em situação de hiperexpressão, sua capacidade de dobramento e secreção da proteína pode não ser suficiente, resultando no acúmulo de proteínas imaturas no seu interior, que levam a respostas de degradação da organela e autofagia celular (VANZ et al., 2012a; ZHONG et al., 2014). Esses estresses metabólicos somados a estresses ambientais (alta osmolaridade do meio de cultivo, limitação de

oxigênio, alta concentração de metanol etc.) resultam na lise celular e liberação de proteases para o meio de cultivo, conseqüentemente, prejudicando a produção.

Portanto, para se atingir alto desempenho na produção recombinante, alguns requisitos são necessários, como: elevada velocidade de consumo de metanol; aumento do fluxo metabólico para via de produção de proteínas; fornecimento suficiente de energia na forma de ATP; e redução da atividade proteolítica decorrente da lise celular (JIN et al., 2010). Para alcançar essas condições, os pesquisadores já propuseram diversas estratégias de indução e demonstraram que a escolha é dependente da combinação cepa-proteína recombinante, não havendo consenso para a maioria dos parâmetros de cultivo. Conseqüentemente, esses parâmetros também foram estudados no desenvolvimento dessa tese com base nas estratégias que foram mais bem-sucedidas, que são apresentadas a seguir.

1.2.4.1. O meio de cultivo

O meio de cultivo deve fornecer os compostos nutricionais necessários para o crescimento celular e a produção heteróloga, por isso sua otimização é uma das estratégias mais comumente adotadas para aumentar a produtividade dos cultivos de *Pichia pastoris*. O meio sintético ou definido é frequentemente utilizado para a produção de biofármacos por facilitar a consistência lote-a-lote, o processo de *downstream* e o atendimento dos requisitos das agências regulatórias.

Um dos meios mais empregados nos cultivos de *Pichia* é o meio definido BSM (*Basal Salt Medium*) enriquecido com a solução PTM1 (*Pichia trace metals*), ambos desenvolvidos pela Invitrogen (2002). Apesar da frequente aplicação, esse meio possui desvantagens, tais como ausência de compostos intermediários do metabolismo celular e alta concentração de sais para sustentar elevadas densidades celulares. Esse excesso de sais pode ser prejudicial, principalmente, no início do cultivo. Esses fatores resultam no maior gasto energético celular tanto para a produção de metabólitos tanto para suportar a alta osmolaridade. Por exemplo, já foi reportado que leveduras expostas ao estresse salino apresentam de 15 a 30% mais gasto energético (OLZ et al., 1993). Por isso, a velocidade de crescimento em BSM é geralmente mais baixa do que em meios complexos (como o

BMGY) e a taxa de lise celular é mais elevada (MATTHEWS et al., 2018; ZHU et al., 2021).

Não apenas o crescimento é prejudicado em soluções hipertônicas, mas também a produção heteróloga, que é ainda mais sensível à composição do meio (ISIDRO et al., 2016^a). Por isso, os pesquisadores já adotaram diversas estratégias para aprimorar meios definidos como suplementação com amino ácidos e ácidos graxos (CLARE et al., 1991; MATTHEWS et al., 2018; ZHANG et al., 2019) e redução da quantidade de sais (ISIDRO et al., 2016b, 2016^a; POTVIN; LI; ZHANG, 2015; ZHU et al., 2021). Consequentemente, hoje está disponível uma variedade de meios definidos para a *P. pastoris*, como o também muito usado meio FM22 (FRICKE et al., 2013; SINHA et al., 2003; STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998), outros mais específicos para cada processo (D'ANJOU; DAUGULIS, 2001; GURRAMKONDA et al., 2010) e variações do BSM.

Por exemplo, os autores Isidro, Ferreira, et al. (2016) e Isidro, Portela, et al. (2016) observaram que o maior rendimento em produto era obtido com o meio BSM diluído duas vezes, além disso, também constataram por meio de um modelo metabólico que os elementos traços possuem papel essencial, sendo que a concentração de íons de ferro e manganês na solução PTM1 foi capaz de inibir a atividade metabólica geral. Além disso, já foi demonstrado que a exposição a soluções hipertônicas causa a resposta de proteínas mal enoveladas (UPR), prejudicando a produtividade (DRAGOSITS; MATTANOVICH; GASSER, 2011). Portanto, é interessante a aplicação de meios com composição reduzida de sais para cultivos de *Pichia*.

1.2.4.2. Metanol

Entre todos os parâmetros de processo, certamente, a alimentação do metanol foi o mais estudado visando ao aumento da produtividade. A concentração de metanol deve estar em uma faixa que estimule a produção recombinante sem causar toxicidade e morte celular. Essa faixa é dependente da cepa e da proteína recombinante e já foram reportados valores na ordem de mg/L até acima de 20 g/L. Entre as principais estratégias de alimentação já adotadas, destacam-se quatro possibilidades principais de controle: com a alimentação a vazão constante ou pulsos (malha aberta) (estratégia I); ou baseada em um

modelo metabólico proveniente de balanços de massa para manter a velocidade específica de crescimento constante (malha aberta) (estratégia II); ou baseada em medidas da concentração dos gases no meio ou na saída do biorreator que alimentam um modelo que associe o consumo de substrato a O_2 ou CO_2 (malha fechada) (estratégia III); ou baseada em uma malha com controlador e sensor de medidas *online* da concentração do substrato no meio ou na saída de gases (malha fechada) (estratégia IV) (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

As estratégias I e II apresentam fácil implementação e apesar de apresentarem problemas de robustez, devido à incapacidade de responder a perturbações no sistema, elas foram bem-sucedidas em diferentes bioprocessos (BARRIGÓN; MONTESINOS; VALERO, 2013; JACOBS et al., 2010; REN; YUAN; BELLGARDT, 2003; SINHA et al., 2003; TRINH; PHUE; SHILOACH, 2003; VALERO, 2013). O modelo de alimentação da estratégia II visa manter a velocidade específica de crescimento (μ) constante, também conhecida como μ -stat, em condições limitantes de substrato, ou seja, quando não há acúmulo de substrato. Nessa situação, todo substrato alimentado é consumido pelas células. No entanto, em metanol, o valor ótimo de μ é de difícil determinação já que depende de um equilíbrio entre crescimento celular e a produção heteróloga (VALERO, 2013; YANG; ZHANG, 2018).

Já para a estratégia III é possível associar a alimentação de metanol com uma determinada concentração de oxigênio dissolvido, ela é chamada de *DO-stat*. O valor do oxigênio dissolvido é mantido em um valor de set-point com controle da alimentação de substrato. O oxigênio é altamente demandado no metabolismo do metanol tanto para a via de assimilação quanto de disseminação. Além disso, Unrean (2014) propôs que a concentração de oxigênio pode modular se o fluxo carbônico será destinado para a biomassa ou para proteína recombinante. Anane, Van Rensburg, & Görgens (2016) obtiveram um aumento de 17% na produção de β -frutofuranosidase associado por meio de *DO-stat*. Da mesma forma, Lim, Choi, Kim, & Jung (2003) aumentaram em 40% o título de guamerina recombinante com essa estratégia em relação à alimentação manual de metanol. Portanto, essa é uma estratégia eficiente para aumentar a produtividade do cultivo (YANG; ZHANG, 2018).

Quando se controla a concentração de oxigênio dissolvido a partir da alimentação de substrato, a bomba de alimentação é acionada quando o valor de oxigênio dissolvido é

superior ao *set-point* e desativada quando ele é inferior. Essa estratégia apresenta o risco quando a concentração de metanol se torna tóxica para células, fazendo com que elas parem de consumir metanol e, conseqüentemente, aumentando da concentração de oxigênio dissolvido, o que resulta em mais alimentação de metanol e morte celular (Valero, 2013). Portanto, apesar da simples implementação, ela pode ser de difícil execução.

A estratégia IV é a que garante o controle mais robusto do sistema ao permitir o monitoramento online, ela é conhecida como metanol-stat. Para tanto, o ideal é a inserção de um sensor de metanol acoplado a um *software* que permita o controle em malha fechada da bomba de alimentação próximo a um valor de *set-point*. Os sensores comerciais se baseiam no equilíbrio líquido-gasoso e foram utilizados com sucesso por diversos grupos (COS et al., 2006; DAMASCENO et al., 2004; GURRAMKONDA et al., 2009). No entanto, quando o sensor não está disponível, outras opções são mais adequadas.

Comparando a estratégia IV (metanol-stat) e II (alimentação exponencial) para metanol, Barrigón et al. (2013) observaram que manter o metanol em 3 g/L foi a melhor condição para a cepa X33 expressando lipase de *R. oryzae* e todos os cultivos com metanol não-limitado tiveram melhor desempenho do que com ele limitado. No entanto, acima de 3 g/L já foi possível notar a inibição do crescimento. Por outro lado, para a produção de endostatina por uma cepa GS115 Mut⁺, Trinh et al. (2003) atingiram maior produtividade com o cultivo limitado em metanol (II) do que em condições não-limitadas (metanol-stat) (IV). Segundo os autores, o crescimento em condições limitantes de metanol beneficiou a transcrição do AOX1, resultando em mais proteína com menor consumo de metanol e menor acúmulo de biomassa.

Apesar de não ser recomendado o nível de metanol acima de 4 g/L para cepas Mut^S (COS et al., 2006), Gurramkonda et al. (2009) aumentaram em sete vezes a produção de antígeno de superfície da Hepatite B recombinante expressado por uma cepa GS115 Mut^S mantendo o metanol em 6 g/L. Apesar do aumento significativo, após 90 – 100 horas de cultivo, a produção estagnou e declinou. Segundo Vanz et al. (2012) o elevado estresse causado pelo metanol exigiu maior direcionamento do carbono para a geração de energia (via de disseminação) para manutenção energética celular, reduzindo o fluxo para a biossíntese. Além disso, o acúmulo de formas imaturas da proteína no retículo

endoplasmático desencadeou respostas de degradação da organela e autofagia celular. Por isso, essas condições extremas de indução nem sempre são viáveis, como no caso da produção de um precursor de insulina em uma cepa X-33, em que a concentração de 6 g/L resultou na morte celular (GURRAMKONDA et al., 2010).

Além das estratégias limitadas e não-limitadas de alimentação de metanol, também foram extensivamente aplicadas as estratégias de coalimetanção. Elas são especialmente interessantes para cepas Mut^S a fim de se sustentar o crescimento celular durante a indução e reduzir o tempo de cultivo. Geralmente, glicerol é utilizado nesses casos, no entanto, a razão entre glicerol : metanol é um fator crítico, já que ele possui elevado efeito repressor sobre o AOX (COS et al., 2006). No entanto, quando a razão entre glicerol e metanol é otimizada, ela pode resultar em cultivos de alta densidade celular com elevada produtividade como obtido por d'Anjou & Daugulis (2001).

Alternativamente, sorbitol também foi alimentado com metanol por não ser um repressor do AOX. De acordo com Çelik, Çalik, & Oliver (2010), o uso de sorbitol é vantajoso para reduzir a demanda por metanol e oxigênio para a produção recombinante, consequentemente, reduzindo a toxicidade causada pelo álcool. Esses autores aumentaram em quatro vezes a produção de eritropoetina humana em uma cepa Mut⁺ com adição de sorbitol em comparação a mesma estratégia de alimentação de metanol sem adição do sorbitol. Além do maior crescimento, a introdução de outras fontes de carbono apresenta como vantagens a redução do consumo de oxigênio e da produção de calor (VALERO, 2013; YANG; ZHANG, 2018)

Outros estudos também reportam indução com temperatura controlada e reduzida em relação ao crescimento (DRAGOSITS et al., 2011), alimentação de metanol a taxas constantes e variáveis (INVITROGEN, 2002) ou por meio de pulsos (DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, 2011), além da combinação de várias estratégias resultando em um controle mais robusto da produção.

1.3.4.3 Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido tem papel fundamental no metabolismo do metanol, sendo altamente consumido para formação de formaldeído, que posteriormente é incorporado

na via de assimilação para biossíntese, assim como para a regeneração do NADPH na via de disseminação para manutenção energética celular. A limitação de oxigênio não afeta apenas o crescimento celular, mas também a expressão do gene recombinante (CEREGHINO; CREGG, 2000). De acordo com Unrean (2014), o fluxo de oxigênio é que determina se o carbono será destinado para a formação de biomassa ou de proteína recombinante, sendo que altas concentrações de oxigênio favorecem a biomassa em detrimento da proteína. Além disso, o excesso de oxigênio pode resultar em acúmulo de formaldeído, causando citotoxicidade.

Consequentemente, a melhor condição de oxigenação precisa ser avaliada para cada produção. Jazini, Cekici, & Herwig (2013) observaram que, para a produção de uma peroxidase recombinante com uma cepa Mut^S, o nível intermediário de oxigênio (25%) foi mais benéfico do que o nível mais alto (70%) e o mais baixo (5%) de oxigenação. Segundo os autores, esse resultado estaria relacionado com a atividade de chaperonas que auxiliam no dobramento e na secreção da proteína. Resultados semelhantes foram obtidos por Ponte et al. (2016) com uma linhagem Mut⁺, eles também obtiveram maior produtividade de uma lipase recombinante com a concentração intermediária de oxigênio (25%) em comparação com as extremas (5 e 50%). Para os autores, esse resultado estaria ligado ao aumento das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e produção. Ademais, confrontando as condições extremas, também observaram que o excesso de oxigênio foi mais favorável que a limitação. O excesso de oxigênio (entre 30 e 50%) também foi favorável para a produção recombinante de um peptídeo inibidor de elastase em uma cepa Mut⁺ estudada por Lee, Lee, Jung, Katoh, & Lee (2003) e eles atribuem esse resultado ao aumento da velocidade específica de consumo de metanol e do fluxo de carbono para a via de assimilação.

No entanto, para outras produções a limitação de oxigênio foi mais benéfica. Por exemplo, Trentmann, Khatri, & Hoffmann (2004) obtiveram a maior produtividade para a expressão de um fragmento de anticorpo em uma cepa GS115 por meio da redução do oxigênio, pois, apesar das velocidades específicas serem maiores sem limitação de oxigênio, o alto estresse metabólico causado pelo consumo mais rápido de metanol inviabilizou a produção. Similarmente, Berdichevsky et al. (2011) obtiveram cerca de 60% a mais de anticorpo monoclonal glicosilado em condição limitante de oxigênio e ainda observaram melhoria do padrão de N-glicosilação e galactosilação em comparação ao cultivo não limitado em oxigênio, mas restrito em metanol. Portanto, há uma relação

entre a concentração de oxigênio e a alimentação de metanol que dita o direcionamento do fluxo de carbono para cada produção.

Comumente, a estratégia de alimentação de oxigênio se baseia no controle da sua concentração em torno de um valor (*set-point*) ou faixa de operação (YANG; ZHANG, 2018). Para tanto, a agitação, a aeração e alimentação de oxigênio puro são colocadas em uma malha de controle fechada sob comando da concentração de oxigênio dissolvido medida por um eletrodo imerso no meio de cultivo. Alternativamente, a alimentação de substrato pode estar nessa malha (*DO-stat*), no entanto, essa estratégia pode ser arriscada nos casos em que o substrato causa toxicidade celular, pois o aumento na concentração de oxigênio pode ser resultante tanto da depleção do substrato quanto da morte celular, dificultando o controle, como apresentado no subitem anterior (VALERO, 2013).

1.3.4.4 Temperatura

Outra estratégia muito utilizada para o aumento da produtividade em cultivos de *P. pastoris* é a redução da temperatura na fase de indução, pois diminui a atividade proteolítica e o estresse causado pelo metabolismo do metanol e pela produção recombinante (YANG; ZHANG, 2018). Normalmente, cultivos de *Pichia* são operados a 30 °C e, de acordo com Jahic, Wallberg, Bollok, Garcia, & Enfors (2003), nessa temperatura, há aumento da lise celular e liberação de proteases para o meio extracelular, que também estão mais ativas pela termodinâmica da reação. Além disso, há redução da capacidade transcricional do AOX1 em temperaturas mais altas. Portanto, esses autores reduziram a temperatura de indução para 12 °C e conseguiram dobrar a produção recombinante de um complexo proteico em uma cepa Mut⁺.

O processamento da proteína também é beneficiado com a redução da temperatura. De acordo com Dragosits, Frascotti, et al. (2011) apesar do nível de transcrição de RNA não ter sido modificado com a temperatura, o dobramento e a secreção de proteínas foram favorecidos a 20 °C, resultando no triplo da produção de um fragmento de anticorpo recombinante em uma cepa com o promotor GAP (induzida por glicose). Adicionalmente, Zhong et al. (2014) demonstraram que nessa temperatura há redução do acúmulo de formas imaturas da proteína recombinante no

retículo endoplasmático (RE), o que reduz o estresse e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, a 30 °C, esse acúmulo interrompe a homeostase do RE e provoca resposta para eliminação das formas imaturas, que pode levar à degradação do retículo endoplasmático (ERAD) e até mesmo autofagia, reduzindo a viabilidade celular. Esse processamento mais lento a 20 °C pode ser especialmente benéfico para proteínas com modificações pós-traducionais.

Outros autores também notaram que há um efeito sinérgico entre temperatura, oxigênio e metanol. Jin et al. (2010) observaram queda do tempo de adaptação para metanol e aumento da atividade do AOX1 reduzindo a temperatura para 20 °C. No entanto, essa atividade não era sustentada por mais de 50 horas de indução. Portanto, para melhorar a produção, eles aumentaram o oxigênio dissolvido para acima de 50% da saturação do ar, resultando em prolongamento da atividade do AOX1. Eles justificaram essa melhoria pela alta ativação da reação de fosforilação oxidativa, que gera ATPs para a célula. Adicionalmente, Jin et al. (2011) conseguiram favorecer a via de assimilação para biossíntese reduzindo em quatro vezes a concentração de metanol mantida durante a indução. Essas modificações levaram a aumento de 100 vezes da produção de interferon-alfa recombinante em uma cepa KM71, demonstrando que é interessante alterar mais de um parâmetro do cultivo por vez.

1.3.4.5 pH

Além dos parâmetros já citados, muitos autores também estudaram do efeito do pH sobre o cultivo de *P. pastoris*. O controle do pH pode ser uma boa alternativa quando não há um sensor de metanol, pois supera alguns empecilhos das outras estratégias, por exemplo, a falta de robustez dos modelos de alimentação em malha aberta (modelo exponencial), a alta sensibilidade do *DO-stat* ao acúmulo de substrato e o alto gasto energético para manter os cultivos com temperatura limitada em grande escala (IRANI et al., 2015). No entanto, quando trabalhando com meio sintético, a faixa de variação de pH é restrita para não causar precipitação do meio e essa alternativa pode não ser viável.

Geralmente, o pH é reduzido para 3 a 5 durante a indução para prevenir a ação de proteases (CLARE et al., 1991). Além disso, já foi reportado que o controle do pH

também altera a estabilidade da proteína recombinante e o acúmulo de biomassa (LIU et al., 2019). Apesar de não notarem mudança na atividade proteolítica, Soyaslan & Çalik (2011) observaram redução na velocidade específica de crescimento de uma cepa Mut+ em pH abaixo de 5, mas aumento de 20% da produção de eritropoetina humana recombinante em pH 4,5. Já Irani et al. (2015) acoplaram o controle de pH à alimentação da fonte de nitrogênio, hidróxido de amônio, e em condições limitadas de nitrogênio conseguiram alcançar maior produtividade de albumina humana recombinante produzida em uma cepa Mut^S. Os autores observaram que, em condição limitante de nitrogênio, apesar da velocidade de crescimento ser reduzida, os fluxos metabólicos da glicólise, via das pentoses e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos foram elevados, favorecendo a produção. Portanto, quando viável, o controle de pH também é uma boa alternativa para o aumento da produtividade de cultivos de *P. pastoris*.

1.2.5. Ferramentas para avaliar diversos parâmetros ao mesmo tempo no cultivo de *Pichia pastoris*

Além da variação de um parâmetro por vez, também foram reportados muitos estudos utilizando ferramentas estatísticas para avaliação do efeito de vários parâmetros e suas interações sobre a produtividade de cultivos de *P. pastoris*. O delineamento estatístico de experimento é uma ferramenta muito útil para aumentar o entendimento do bioprocessamento sem necessitar de um número elevado de experimentos, resultando na redução do esforço para obtenção de dados que podem ser aplicados em modelos descritivos e preditivos do processo. Entre as abordagens mais comuns, destaca-se a combinação do delineamento com a metodologia da superfície de resposta, em que é apresentada graficamente a relação entre parâmetros críticos do processo e a resposta almejada, que pode ser a produtividade do produto-alvo ou um atributo de qualidade (glicosilação, pureza, etc.) (BAYER et al., 2020). Entre os delineamentos mais comuns, destacam-se:

- Fatorial Completo: baseia-se na análise de dois ou mais fatores discretos e de suas interações em todas as possíveis combinações de níveis entre os fatores. Graficamente, para o estudo de três fatores em dois níveis, seus pontos são representados pelos oito vértices de um cubo (FUKUDA et al., 2018).

-
- Fatorial Fracionário: é alcançado fracionando o delineamento completo em subconjuntos de experimentos de forma a explorar os efeitos mais importantes, no entanto, não sendo capaz de avaliar as interações entre eles. Por isso, é aplicado em estudos de triagem de múltiplas variáveis. Graficamente, para o estudo de três fatores em dois níveis, seus pontos são representados por quatro vértices de um cubo (FUKUDA et al., 2018).
 - Plackett-Burman: é um delineamento otimizado do fatorial fracionado para avaliar fatores independentes (sem interações), que consiste na minimização da variância com um número limitado de experimentos de forma que para N parâmetros, apenas N-1 experimentos são necessários ($N > 4$) (FUKUDA et al., 2018).
 - Compósito Central (CCD): o delineamento CCD é uma otimização do experimento fatorial completo e permite avaliar 5 níveis de cada fator com número reduzido de experimentos. Graficamente, para o estudo de três fatores em cinco níveis, seus pontos são representados por oito vértices, quatro pontos axiais e pontos centrais de um cubo (FUKUDA et al., 2018).
 - Box-Behken: é um delineamento otimizado do fatorial completo e permite avaliar 3 níveis de cada fator com número reduzido de experimentos. Graficamente, para o estudo de três fatores em três níveis, é representado por doze pontos centrais das arestas mais os pontos centrais de um cubo (FUKUDA et al., 2018).
 - Delineamentos otimizados: consistem na otimização de um critério estatístico, por exemplo, minimizar o determinante da matriz de covariâncias dos parâmetros inicialmente estimados (D-ótimo), resultando em modelos com variância mínima com menos experimentos do que em delineamentos não-otimizados (LIMA, 2009).

Isidro, Ferreira, et al. (2016) e Potvin et al. (2015) aplicaram delineamento estatístico para otimizar a composição do meio BSM. Isidro, Ferreira, et al. (2016) avaliaram onze fatores do meio BSM em dois níveis diferentes (+1 e -1) por meio de 24 cultivos aplicando um delineamento otimizado. Já Potvin et al. (2015) aplicaram um delineamento do tipo compósito central (CCD) para avaliar os efeitos da concentração de dois sais e da solução-traço (PTM1) em 5 níveis sobre a atividade de uma fitase recombinante, resultando em 20 experimentos.

Outros autores usaram delineamentos estatísticos para aumentar da produtividade da expressão recombinante em *P. pastoris*. Fricke et al. (2013) avaliaram os efeitos da concentração de metanol (entre 0,4 e 1,2 g/L), temperatura (de 25 a 35 °C) e pH (de 4,5 a 5,9) sobre o desenvolvimento de uma vacina para malária com uma cepa Mut^S, obtendo o dobro de proteína por meio de um CCD seguido de um delineamento fatorial completo, totalizando 38 experimentos para triagem e otimização dos parâmetros e para teste de robustez do modelo. Nesse estudo, pH e temperatura foram relevantes para o resultado. Em outro estudo, Holmes, Darby, Wilks, Smith, & Bill (2009) aplicaram um delineamento Box-Behnken com dois níveis e pontos centrais para avaliar os efeitos de pH (6-8), temperatura (19-29 °C) e concentração de oxigênio dissolvido (30-90%) sobre a expressão de GFP (*green fluorescent protein*) em uma cepa X33, obtendo o dobro de produto por meio de 25 experimentos e observando que o pH foi o fator mais relevante.

Além disso, delineamentos estatísticos também foram aplicados para avaliar a influência dos parâmetros do processo sobre atributos de qualidade. Berdichevsky et al. (2011) usaram um CCD para avaliar os efeitos de agitação (400-500 rpm) e vazão gasosa (0,1 a 0,5 vvm) sobre a glicosilação de um anticorpo produzido por uma cepa glicoengenheirada Mut⁺. Eles observaram por meio de 14 experimentos que a agitação foi relevante tanto para a quantidade de glicanos quanto para a composição deles (galactosilação). Já Gmeiner et al. (2015) analisaram os efeitos de pH (5-7), temperatura (20-30°C) e concentração de oxigênio dissolvido (10-30%) por meio de um delineamento fatorial completo com dois pontos centrais (10 experimentos) sobre a fisiologia e morfologia celular, lise, produtividade e pureza de uma peroxidase expressa por uma cepa Mut^S. Os autores observaram que apenas a temperatura reduzida beneficiou a produtividade e a pureza e que os demais parâmetros e respostas não foram relevantes.

Adicionalmente, delineamentos estatísticos também foram empregados no desenvolvimento de processos de produção de ASNases em outros hospedeiros. El-Naggar et al. (2019) aumentaram a produção de ASNase nativa por *Streptomyces brollosae* por meio de um delineamento de Plackett-Burman para selecionar os principais parâmetros entre 15 variáveis (composição do meio, temperatura, razão de inóculo, idade do inóculo, agitação, tempo de incubação e pH) e, em seguida, executaram um CCD com os três fatores mais relevantes para otimizar a produção, totalizando 40 experimentos. Já Costa-Silva et al. (2018) alcançaram 200% a mais de ASNase nativa produzida em *Aspergillus terreus* otimizando crescimento e produção separadamente. Para as condições

de crescimento, os autores analisaram os efeitos de pH e temperatura por meio de um delineamento fatorial completo e usaram um fatorial fracionado com pontos centrais para otimizar a produção variando concentração do inóculo, pH e temperatura.

Portanto, para processos em desenvolvimento em que as condições são pouco conhecidas, análises multifatoriais se mostraram úteis tanto para a triagem quanto para a otimização dos parâmetros. No entanto, mesmo com a redução de experimentos, dependendo do número de parâmetros de entrada, a quantidade de experimentos ainda é significativa e, por isso, essa abordagem é mais adequada em pequena escala e deve ser bem planejada para que os dados obtidos gerem informações relevantes ao bioprocessos.

1.2.6. Avaliação da consistência dos dados experimentais

Em bioprocessos, diversos fatores podem causar imprecisões nos cálculos dos parâmetros cinéticos (velocidades de transformação), como falhas nas medidas dos fluxos e das concentrações dos reagentes, composição inadequada de um dos componentes (ex. biomassa), existência de subprodutos desconhecidos, ou ainda limitação de amostras (HEIJDEN; HELLINGA, 1994). A falta de acurácia e precisão dos dados experimentais pode prejudicar a condução e o controle do processo. A acurácia de uma medida é influenciada pelo viés do método ou por erros sistemáticos (grosseiros), por exemplo, pelo mal funcionamento de um sensor ou pela presença de um reagente instável. Já a precisão de um dado é afetada por erros aleatórios, que causam uma distribuição de valores (média e desvio-padrão) como a falta de acurácia intrínseca de um sensor (HITZMANN, 2000).

Para diagnosticar esses erros podem ser adotadas as leis de conservação de massa e energia e a estequiometria metabólica, que indicam se os dados são consistentes ou não, em um processo de reconciliação de dados. Quando há redundância de medidas, ou seja, há mais dados medidos do que restrições das equações de balanço, é possível detectar as fontes de erro e melhorar acurácia dos parâmetros cinéticos calculados por meio de tratamento estatístico (HEIJDEN; HELLINGA, 1994). Essa abordagem já foi aplicada para validar modelos de sensores para medida *online* de biomassa (WECHSELBERGER; SEIFERT; HERWIG, 2010) e de substrato (SCHENK; MARISON; VON STOCKAR,

2007), para validar a consistência de modelos metabólicos (CARNICER et al., 2009; ISIDRO et al., 2016a), para corrigir o cálculo de parâmetros cinéticos (CÁMARA; ALBIOL; FERRER, 2016; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016), para estimar a biomassa em condição de baixo crescimento celular (KRAINER et al., 2012), entre outras aplicações.

Entre as metodologias mais adotadas para a reconciliação de dados, está a proposta por N. S. Wang & Stephanopoulos (1983), que consiste em um modelo de caixa preta considerando a célula como o volume de controle e apenas os fluxos de entrada (ex. substratos) e saída (ex. produtos), resumindo todas as equações metabólicas a uma reação geral dada por 1.

$$-q_S S - q_{O_2} - q_N N i + \mu_X X + q_{H_2O} H_2O + q_P P + q_{CO_2} CO_2 = 0 \quad 1$$

Nessa abordagem, as velocidades de transformação são normalizadas pela velocidade de crescimento da biomassa (μ_X) a fim de se facilitar os cálculos e, conseqüentemente, os coeficientes estequiométricos da reação são os próprios fatores de conversão, como mostra 2.

$$- \frac{Y_S S}{X} - \frac{Y_{O_2} O_2}{X} - \frac{Y_N N i}{X} + X + \frac{Y_{H_2O} H_2O}{X} + \frac{Y_P P}{X} + \frac{Y_{CO_2} CO_2}{X} = 0 \quad 2$$

Para cada macroelemento que compõe as espécies (C, H, O e N), o fluxo de entrada deve ser igual ao fluxo de saída mais o acúmulo dentro da célula, assumindo que a composição celular se mantém constante. De acordo com Bérangère, Laurent, Agnès, & Claude-Gilles (2012), assumir que a composição da biomassa é constante resulta em um erro da ordem de 10^{-3} , que é relativamente pequeno em relação aos erros experimentais. Portanto, o fluxo de entrada de cada macroelemento dos N substratos deve ser igual ao de saída de cada macroelemento nos M produtos mais o acúmulo em biomassa. O balanço para cada um é exemplificado pelo balanço de carbono na Equação 3, em que fC_i é a fração de carbono em cada componente i do sistema, P produto e S substrato.

$$X * fC_i + \sum_{i=1}^M Y_{i/X} * fC_i * P_i - \sum_{i=1}^N Y_{i/X} * fC_i * S_i = 0 \quad 3$$

Similar ao balanço de carbono, as restrições se aplicam aos demais elementos, assim é possível determinar a matriz E com as composições elementares de cada componente (biomassa, produtos, substratos, gases). Considerando a composição das espécies em função dos macroelementos, a equação geral de balanço é dada por 4, a matriz elementar

E é dada por 5, o vetor de fatores de conversão é dado por 6 e a forma matricial do balanço de massa é dada por 7.

$$-Y_{\frac{S}{X}}C_aH_bO_c - Y_{\frac{O_2}{X}}O_2 - Y_{\frac{N}{X}}N_dH_eO_f + 1C_gH_hN_iO_j + Y_{\frac{H_2O}{X}}H_2O + Y_{\frac{CO_2}{X}}CO_2 + Y_{\frac{P}{X}}C_kH_lN_mO_n = 0 \quad 4$$

$$E = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Substrato} & \text{Oxigênio} & \text{Fonte de Nitrogênio} & \text{Biomassa} & \text{Água} & \text{Gás Carbônico} & \text{Produto} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \dots C \\ \dots H \\ \dots O \\ \dots N \end{matrix} & \begin{bmatrix} -a & 0 & 0 & g & 0 & 1 & k \\ -b & 0 & -e & h & 2 & 0 & l \\ -c & -2 & -f & j & 1 & 2 & n \\ 0 & 0 & -d & i & 0 & 0 & m \end{bmatrix} \end{matrix} \quad 5$$

$$y = \begin{bmatrix} Y_{\frac{S}{X}} \\ Y_{\frac{O_2}{X}} \\ Y_{\frac{N}{X}} \\ 1 \\ Y_{\frac{H_2O}{X}} \\ Y_{\frac{CO_2}{X}} \\ Y_{\frac{P}{X}} \end{bmatrix} \quad 6$$

$$Ey = 0 \quad 7$$

Experimentalmente, nem todas as velocidades são possíveis de serem medidas, por exemplo, a velocidade de formação da água. Portanto, são realizadas operações matemáticas para eliminar esses fatores que não podem ser medidos, resultando em uma matriz de combinações lineares dos balanços elementares chamada de matriz reduzida do balanço generalizado R (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998). Por exemplo, para eliminar o fator de conversão da água, pode-se multiplicar a linha da matriz E referente ao oxigênio por -2 e, em seguida, somá-la à linha referente ao hidrogênio, resultando na matriz reduzida R da equação 8.

$$R = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Substrato} & \text{Oxigênio} & \text{Fonte de Nitrogênio} & \text{Biomassa} & \text{Água} & \text{Gás Carbônico} & \text{Produto} \end{matrix} \\ \begin{matrix} \dots C \\ \dots H \ \& \ O \\ \dots N \end{matrix} & \begin{bmatrix} -a & 0 & 0 & g & 1 & k \\ -b + 2c & 4 & -e + 2f & h - 2j & -4 & l - 2n \\ 0 & 0 & -d & i & 0 & m \end{bmatrix} \end{matrix} \quad 8$$

A reconciliação de dados e a identificação de erros nas medidas só pode ser realizada se o sistema estiver sobredeterminado, ou seja, se houver mais medidas do que o grau de liberdade. O grau de liberdade é calculado subtraindo o número de restrições (balanços elementares) do total de velocidades específicas (crescimento biomassa, consumo de

substrato, formação de CO₂, etc.). Neste caso, o grau de liberdade é o rank da matriz R, ou seja, o número de linhas linearmente independentes. Em um sistema sobredeterminado, as velocidades podem ser divididas em medidas (m) ou calculadas (c) (não medidas), portanto, o balanço de massa também é dividido em dois subgrupos como mostra a equação 9.

$$Ey = E_m \times y_m + E_c \times y_c \quad 9$$

Balanço de Massa Total = BM velocidades medidas + BM velocidades não medidas

Para o sistema sobredeterminado, as medidas dependentes devem ser calculadas pelo método dos mínimos quadrados a partir das medidas independentes de acordo com as restrições dos balanços. Depois que essas medidas são determinadas, as equações não utilizadas podem ser usadas para análise da consistência das velocidades medidas. Foi demonstrado que o produto da matriz reduzida R pelo vetor de velocidades medidas deve resultar em zero (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998), Equação 10.

$$R \times y_m = 0 \quad 10$$

As velocidades medidas podem conter erros (δ) que as fazem divergir do valor real \hat{y}_m (Equação 11), portanto seus resíduos podem ser diferentes de zero. Inserindo os resíduos na equação 10, o produto dos resíduos pela matriz reduzida R resulta na matriz ε , como mostra 12.

$$y_m = (\hat{y}_m + \delta) \quad 11$$

$$R \times y_m = R \times (\hat{y}_m + \delta) = R \times \hat{y}_m + R \times \delta = R \times \hat{y}_m + \varepsilon \quad 12$$

Assume-se que o balanço de massa teórico com os valores reais das velocidades (\hat{y}_m) é igual a zero. Se não há erros sistemáticos ou aleatórios, a matriz de resíduos é nula ($\varepsilon=0$) e o balanço com as velocidades medidas é igual ao teórico. No entanto, se há interferências nas medidas, essa matriz é diferente de zero e igual ao produto da matriz R pelo vetor y_m . Nesse caso, as velocidades precisam ser recalculadas objetivando a minimização da magnitude desse erro. Para determinar esse novo valor, assume-se que o vetor de erros δ é distribuído normalmente, com média 0 e desvio padrão para cada componente σ_i (Equação 13). A matriz de variância-covariância é determinada pelo quadrado do desvio padrão para cada componente σ_i , como mostra Equação 14.

$$\delta = \left[(0 + \sigma_i) \times Y_{i/x} \right] \quad 13$$

$$\psi = \delta \times \delta^T$$

$$= \begin{bmatrix} (\sigma_{substrato} \times Y_{S/X})^2 & 0 & 0 \dots & 0 \\ 0 & (\sigma_{oxigênio} \times Y_{O_2/X})^2 & 0 \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 \dots & (\sigma_{produto \times Y_{P/X}})^2 \end{bmatrix} \quad 14$$

A matriz de variância-covariância ψ é uma matriz diagonal, já que as medidas são consideradas independentes. Ressalta-se que, em cultivos, nem todas as variáveis são independentes, por exemplo, a vazão dos gases, no entanto, N. S. Wang & Stephanopoulos (1983) demonstraram que o efeito dessas correlações não-diagonais são menores que 10% e podem ser ignorados, portanto é aceitável assumir que ψ é uma matriz diagonal .

Da mesma forma, é determinada a matriz de variância-covariância φ da matriz de resíduos ε dada por 15.

$$\varphi = \varepsilon \times \varepsilon^T = R \times \delta \times R^T \times \delta^T = R\psi R^T \quad 15$$

A melhor estimativa da matriz de resíduos ε é obtida minimizando a soma dos erros ao quadrado multiplicados pela sua variância, esse produto h é apresentado na equação 16. Para avaliar se essa estimativa é significativamente diferente de zero, ou seja, não contém erros, é realizado um teste estatístico com a função h. N. S. Wang & Stephanopoulos (1983) demonstraram que ela possui distribuição do tipo χ^2 , já que é a soma dos quadrados de variáveis normalmente distribuídas. Portanto, ao comparar o valor de h com o da função χ^2 , com grau de liberdade igual ao rank da matriz R (número de restrições independentes) em certo nível de confiança, é possível detectar a probabilidade da presença de erros nos casos em que $h > \chi^2$.

$$h = (\varepsilon\varphi^{-1}\varepsilon^t) \quad 16$$

O valor de h maior que o de χ^2 não revela se há um erro em apenas uma variável ou em inúmeras, portanto, o teste precisa ser repetido eliminando uma variável por vez até encontrar aquela que resulte no menor valor de h e comparando com χ^2 com um grau de liberdade a menos. Para isso, é necessário que o sistema esteja sobredeterminado em, ao menos, duas medidas. Em seguida, com as relações de balanço, é possível calcular um novo valor mais próximo do real. No entanto, se apenas a exclusão de uma variável não é suficiente para se obter um h adequado, é possível continuar deletando mais variáveis até que o grau de liberdade permita.

Para cálculo do novo valor da variável que contém erro, é possível assumir que ela é uma variável não medida, portanto calculável. Voltando à Equação 9, em que o vetor de coeficientes era dividido entre calculados e medidos, também pode-se dividir esse vetor e as matrizes R e ψ entre os valores com erros grosseiros (c) e com erros aleatórios mínimos (u), como mostram as equações 17 a 19.

$$y = \begin{bmatrix} y_u \\ y_c \end{bmatrix} \quad 17$$

$$R = \begin{bmatrix} R_u & R_c \end{bmatrix} \quad 18$$

$$\psi = \begin{bmatrix} \psi_u & 0 \\ 0 & \psi_c \end{bmatrix} \quad 19$$

Quando não há informações suficientes sobre o processo para se estimar a grandeza do erro, os termos com erro (c) podem ser retirados e uma nova matriz de variância-covariância é calculada, Equação 20. Com essa nova matriz, o novo valor de h é determinado e é comparado com χ^2 com um grau de liberdade a menos, Equação 21. Em seguida, os valores corretos das medidas são calculados aplicando as Equações 22 e 23. O racional para esse cálculo é discutido em detalhes por N. S. Wang & Stephanopoulos (1983).

$$\varphi_u^{-1} = \varphi^{-1} \{ I - R_c [R_c^T \varphi^{-1} R_c]^{-1} R_c^T \varphi^{-1} \} \quad 20$$

$$h = (\varepsilon \varphi_u^{-1} \varepsilon^t) \quad 21$$

$$\delta_u = \psi_u R_u^T \varphi_u^{-1} \varepsilon \quad 22$$

$$\hat{y}_u = y_u + \delta_u \quad 23$$

Dessa forma, esses passos podem ser repetidos excluindo uma variável por vez até que o novo valor de h esteja abaixo de χ^2 no nível de confiança escolhido. Esse é um processo sistematizado com base estatística, no entanto, não considera características do processo, portanto, a experiência do operador é necessária para avaliação das fontes de erros encontradas. Em alguns casos, erros significativos ficam escondidos porque o algoritmo não consegue detectá-los nas primeiras fases. Por isso, pode ser necessário assumir que o erro está em uma determinada variável de acordo com os dados históricos para iniciar o algoritmo. Portanto, este é um algoritmo poderoso para análise de dados e identificação de erros grosseiros com baixo esforço computacional, que fornece valores mais confiáveis para as velocidades de transformação e que pode ser incorporado na coleta de dados para identificar problemas nos sensores ou perturbações no processo.

**CAPÍTULO 2. SELEÇÃO DE UMA CEPA DE
PICHIA PASTORIS PRODUTORA DE
ASNASE E DESENVOLVIMENTO DOS
CULTIVOS EM BATELADA-ALIMENTADA**

Capítulo 2. Seleção de uma cepa de *Pichia pastoris* produtora de ASNase e desenvolvimento dos cultivos em batelada-alimentada

Resumo

Atualmente, apenas o biofármaco L-asparaginase (ASNase), um agente quimioterápico, produzido em bactérias está aprovado para uso clínico. Embora as formas comercializadas sejam eficientes, elas causam graves efeitos colaterais devido à sua origem. Portanto, novas fontes são investigadas para reduzir a imunogenicidade deste medicamento. Além disso, é necessário aumentar a estabilidade, o enovelamento e a cinética das proteínas com modificações pós-traducionais, como a glicosilação. Visando a esses atributos, este capítulo teve como foco a produção de uma L-asparaginase glicosilada de *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*) expressa por *Pichia pastoris* Glycoswitch®. Primeiramente, foram construídas cepas produtoras de ASNase. Uma linhagem com auxotrofia para histidina foi transformada pelo doutor Brían Effer Roldan e outra prototrófica para histidina pela autora. Elas foram comparadas usando um meio complexo em frascos e um meio sintético em um biorreator. A cepa prototrófica apresentou produtividade superior à auxotrófica em ambos os sistemas. Por meio de análise de qPCR, constatou-se que o gene codificador da ASNase estava presente com frequência duas vezes superior na cepa prototrófica em relação à auxotrófica. Em seguida, duas estratégias de indução com a cepa prototrófica foram executadas em biorreator de 2 L: pulsos de metanol e um *DO-stat*. Este último resultou no dobro da atividade volumétrica e da concentração celular máximas. Por fim, a análise de glicosilação do produto final por espectrometria de massa mostrou que o sítio Asn₁₇₀, que está associado a alergias em pacientes, foi glicosilado, reduzindo assim os potenciais efeitos imunogênicos. Portanto, neste capítulo foi demonstrado que a cepa prototrófica foi a produtora de L-asparaginase mais adequada e que o controle de metanol e oxigênio em biorreator aumentou a produção da ASNase glicosilada.

2.1. Introdução

Desde 2006, quando a levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*) foi rotulada como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) pela FDA, ela tem sido amplamente aplicada à produção e pesquisa, sendo que há mais de 15 produtos aprovados para comercialização atualmente (VOGL; HARTNER; GLIEDER, 2013). Mais ainda, o desenvolvimento de ferramentas de glicoengenharia impulsionou sua aplicação para a produção de moléculas mais complexas, como eritropoietina e anticorpos monoclonais, criando oportunidades para produtos farmacêuticos inovadores, como para tratamentos oncológicos (JUTURU; WU, 2018; PEÑA et al., 2018).

Um dos fármacos oncológicos que poderia ser beneficiado pela glicosilação adequada é a enzima L-asparaginase (ASNase), aplicada principalmente no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Atualmente, apenas ASNases de origem bacteriana foram aprovadas para uso clínico: ASNase de *Escherichia coli*, nativa e recombinante; e de *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*), nativa e recombinante (EMA, 2016a; FDA, 1978, 1994, 2011, 2021). Embora esses fármacos sejam eficientes (a taxa de recuperação para LLA na infância é próxima a 90% (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013)), eles causam reações imunológicas devido à sua origem bacteriana e a maioria possui tempo de meia-vida de apenas algumas horas (BATOOL et al., 2016). Portanto, a glicosilação dessa enzima pode melhorar o enovelamento e a cinética das proteínas, ao mesmo tempo em que reduz sua imunogenicidade (MACIOŁA et al., 2017; NADEEM et al., 2018), o que facilita o cumprimento das exigências dos órgãos reguladores.

Embora as condições de cultivo de *P. pastoris* tenham sido amplamente estudadas, como a otimização dos parâmetros do processo (composição do meio, pH, temperatura, oxigênio dissolvido) e da estratégia de alimentação (alimentação exponencial, μ -stat, *DO*-stat, co-alimentação, etc), a otimização do processo é altamente dependente da combinação cepa-produto (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012; VALERO, 2013; YANG; ZHANG, 2018). O objetivo deste capítulo foi caracterizar a produção de L-

asparaginase (ASNase) de *Dickeya chrysanthemi* expressa por *Pichia pastoris* Glycoswitch® SuperMan₅ (Biogramatics Inc.) com glicosilação semelhante à humana.

Embora experimentos realizados em frascos já foram relatados (EFFER et al., 2019), não havia, até o início desta tese, experimentos em um ambiente controlado como em um biorreator. Portanto, os objetivos específicos deste capítulo foram identificar a cepa produtora mais adequada e estabelecer os parâmetros para o escalonamento do processo de cultivo por meio de diferentes estratégias de indução no biorreator. Primeiramente, duas cepas, uma com e outra sem auxotrofia para histidina, foram analisadas quanto à composição do meio de cultura e produtividade de ASNase. Em seguida, duas estratégias de indução aplicadas aos cultivos realizados em biorreator, por pulsos e controle de oxigênio dissolvido, foram comparadas como ponto de partida para posterior otimização do processo. Por fim, o padrão de glicosilação do produto final foi analisado com duas técnicas.

2.1.1. Objetivos Específicos

1. Definir e caracterizar a cepa de *Pichia pastoris* mais adequada para a produção de L-asparaginase inovadora;
2. Estudar o comportamento de crescimento e de produção da enzima em frascos agitados em meio complexo;
3. Estudar o comportamento de crescimento em frascos agitados em meio definido;
4. Analisar o crescimento e produção em biorreator de 2-L em meio definido com protocolo semelhante ao executado em frascos agitados (malha aberta);
5. Aprimorar o protocolo de produção em biorreator em meio definido por indução com metanol por meio de diferentes estratégias de controle em malha fechada;
6. Caracterizar a ErA, como estabilidade em meio de cultivo, massa molecular, mapeamento peptídico e perfil de glicosilação.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1 Procedimentos Experimentais

2.2.1.1 Construção das Linhagens e Sistema de Expressão

Foram estudadas quatro cepas de *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*): três delas foram transformadas da linhagem GS115 Glycoswitch[®] SuperMans₅ (och1- Δ 1, GAP-manosidaseHDEL) (Biogramatics Inc., EUA) e uma era da linhagem selvagem INCQS 40160 (ATCC 28485) (não é glicoengenheirada), gentilmente cedida pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS FIOCRUZ-INCQS (Rio de Janeiro, Brasil).

A diferença entre as linhagens Glycoswitch[®] é que uma é auxotrófica para histidina (His⁻) e as outras duas são prototróficas para histidina (His⁺). Duas cepas, uma His⁻ e outra His⁺, foram transformadas com o plasmídeo pJAG-s1 (Biogramatics Inc.) contendo o gene *ansB* de *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*) (GenScript, EUA) para expressão de ErAII (pJAG-s1_ansB), e uma cepa His⁺ foi transformada com o mesmo plasmídeo sem o gene *ansB* para controle (pJAG-s1_vazio). Além do gene de interesse, o plasmídeo contém o peptídeo sinal alfa de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção extracelular, o gene de resistência ao antibiótico G418 para seleção e a expressão está sob o controle do promotor AOX1, o esquema do plasmídeo está representado na Figura 6. Foi realizada transformação homóloga usando um vetor integrativo. A construção do plasmídeo assim como a transformação da cepa His⁻, auxotrófica para histidina, foi executada pelo doutor Brían Effer (EFFER et al., 2017, 2020). Já a transformação da cepa His⁺, utilizando o mesmo plasmídeo e seguindo o mesmo protocolo, foi realizada pela aluna.

Resumidamente, o gene sintético *ansB* (aminoácidos 22-348, UniprotKB - P06608) que codifica a ASNase madura foi clonado no sítio de restrição da enzima *BsaI* (New England BioLabs[®], EUA) do plasmídeo pJAG-s1 que permite que o gene de interesse seja inserido entre a sequência ATG do promotor P_{AOX1} e o códon de parada.

Tabela 4. Codificação das cepas adotada ao longo do texto.

Nome da Cepa	Código
<i>Pichia pastoris</i> GS115 Glycoswitch [®] SuperMan ₅ his ⁻ com pJAG-s1_ansB	His ⁻
<i>Pichia pastoris</i> GS115 Glycoswitch [®] SuperMan ₅ his ⁺ com pJAG-s1_ansB	His ⁺
<i>Pichia pastoris</i> GS115 Glycoswitch [®] SuperMan ₅ his ⁺ com pJAG-s1_vazio	His ⁺ vazio
<i>Pichia pastoris</i> INCQS 40160	Selvagem

2.2.1.2 Protocolo de Transformação de Cepas

O primeiro passo da transformação foi preparar amostras de *P. pastoris* GS115 Glycoswitch[®] SuperMan₅ eletrocompetentes, seguindo o protocolo de BioGrammatics (2013). A etapa se iniciou isolando uma colônia de uma placa de Petri com YPD (1%_{m/v} extrato de levedura, 2%_{m/v} peptona, 2%_{m/v} glicose) mais 2%_{m/v} ágar. Após, essa colônia foi cultivada em 25 mL de meio YPD até DO₆₀₀ de 1,5. Em seguida, a amostra foi colocada em gelo por 15 minutos e foi centrifugada por 5 minutos, 4 °C e 3220 *xg* (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemanha) e ressuspensa em meio YPD (1,6 mL) com 1 M HEPES (pH 6,8 e 0,4 mL). Posteriormente, 75 µL de DTT (Ditiotreitol) 1 M foram adicionados. Após 25 minutos de incubação a 30 °C e 250 rpm, foram adicionados 40 mL de água destilada gelada (aproximadamente 0 °C) e a amostra foi centrifugada com as mesmas condições anteriores e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensa em água novamente. A centrifugação foi repetida mais três vezes, uma com água e mais duas vezes com 20 mL de sorbitol 1 M. Posteriormente, as amostras com as cepas eletrocompetentes foram congeladas em alíquotas de 30 µL em sorbitol 1 M a -80 °C.

O segundo passo foi a obtenção do plasmídeo pJAG_s1 contendo o gene *ansB*, pois ele foi estocado em linhagem de *Escherichia coli* DH5α. Primeiramente, a bactéria foi cultivada em meio Luria-Bertani (1%_{m/v} Triptona, 0,5%_{m/v} extrato de levedura, 0,5%_{m/v} NaCl). Em seguida, o plasmídeo foi isolado usando o *kit* Miniprep QIAprep Spin. Esse *kit* fornece até 20 µg de plasmídeo puro em solução tampão de eluição. O terceiro passo foi a linearização do plasmídeo com enzima de restrição que atua na região do promotor AOX1 (*PmeI*, New England Biolabs[®]).

A quarta etapa foi a transformação da levedura. Após a linearização, 2,5 µL da solução contendo o plasmídeo foram adicionados a um tubo contendo 30 µL de solução com as células eletrocompetentes; para essa fase foi seguido o protocolo de BioGrammatics (2013a). Por esse protocolo, o DNA linear é integrado ao genoma da *Pichia* no *locus* do promotor AOX1. A solução contendo *P. pastoris* eletrocompetente e DNA foi transferida para uma cubeta de 1mm de eletroporação. A amostra foi submetida à eletroporação por 5 ms a 1150 V. Foi adicionado 1 mL de Solução de Recuperação de Eletroporação de *Pichia* (1 YDP: 1 Sorbitol 1 M) e a amostra foi incubada por 3 horas a 30 °C e 100 rpm. Uma alíquota de 100 µL de amostra foi espalhada em placa contendo meio mínimo (1,34% m/v YNB, 1% v/v glicerol, 4x10⁻⁵% m/v biotina) para seleção das cepas prototróficas e, em seguida, uma colônia foi espalhada em placa com YPD com 2% m/v de ágar e 1 mg/mL de antibiótico G418 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e incubada a 30 °C por 3 dias. A partir dessa placa, uma colônia foi selecionada e cultivada em uma segunda placa por mais um dia. Desta segunda placa foi originado o banco seguindo o protocolo descrito na seção seguinte, com código His⁺.

Adicionalmente, foram feitos dois controles da transformação: primeiro, foi construída uma cepa com o plasmídeo pJAG_s1 sem o gene *ansB*, com código His⁺ vazio; segundo, foi realizado o mesmo protocolo com água destilada no lugar da solução com DNA. A primeira transformação resultou em uma cepa capaz de crescer em meio com antibiótico G418, mas incapaz de produzir ASNase bacteriana, e a segunda em uma cepa incapaz de sobreviver em meio com antibiótico, confirmando que a transformação foi bem-sucedida nas cepas transformadas com o DNA heterólogo.

2.2.1.3 Quantificação de Cópias de Genes Integrados por qPCR

Primeiramente, as amostras foram tratadas para extração de DNA. O *pellet* celular foi centrifugado a 9000 *xg* a 4 °C por 10 minutos, lavado duas vezes com tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), e resuspenso em 499 µL de tampão PBS (tampão fosfato-salino) antes do tratamento com PMA (propídio monoazida) (Biotium, EUA). O tratamento com PMA impede que o DNA de células mortas seja amplificado.

As amostras foram incubadas no escuro para ativação do PMA por 5 minutos, em seguida, foram expostas a luz LED (*GloPlate™ Blue LED Illuminator*, Biotium) por 15 minutos para desativação do PMA. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada com o Kit *MagMAX™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation* (Thermo Fisher Scientific, EUA) com auxílio de esferas magnéticas e uma placa magnética *DynaMag™-2 Magnet* (Thermo Fisher Scientific). A concentração, pureza e qualidade dos ácidos nucleicos extraídos foram avaliadas no espectrofotômetro *NanoPhotometer® N60* (Implen, Alemanha), e sua integridade foi checada com gel de eletroforese de 1% agarose.

Foram desenhados *primers* para o gene alvo *ansB* e os de referência *arg4* (argininosuccinato liase) no cromossomo 1 e *actn1* (actina) no cromossomo 3. Os *primers* são apresentados na Tabela 5. Os genes *arg4* e *actn1* foram escolhidos por estarem presentes com uma cópia no genoma da *Pichia*, portanto funcionam como controle interno da expressão.

Tabela 5. Sequência dos *primers* para a análise de qPCR. Esses *primers* foram desenhados pelo Dr. Marcos Edgar Herkenhoff.

Gene	Primer	Forward/Reverse	Sequência (5'-3')	T _m (°C)
<i>ansB</i>	<i>ansBF</i>	F	TGTGGCAGGTGACAAACA	62
	<i>ansBR</i>	R	TATAGCGTGCTGAGCCAATAC	62
<i>arg4</i>	<i>arg4F</i>	F	GATGCCGAACGAATGAAGAATG	62
	<i>arg4R</i>	R	GTGGTGAGTTTCTCTGAATGGA	62
<i>act1</i>	<i>act1F</i>	F	TCTACATGATGACAGCCCATAAC	62
	<i>act1R</i>	R	TACGTTGCTCACTGGAGATTG	62

A detecção da presença e quantificação do gene *ansB* foi feita por qPCR usando o termociclador *ABI real - time system 7500™* (Thermo Fisher Scientific) com referência aos genes *arg4* e *actn1*. As reações de amplificação foram realizadas com adição de 12,5 µL de *2X Power Up SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 3 µL de amostra de DNA e água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. Para os ciclos foram usados 100 nM de *primer* nas seguintes condições: primeiro ciclo a 50 °C por 2 minutos, e 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 62 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

O cálculo da expressão relativa foi baseado na diferença nos valores de Ct, número do ciclo em que o sinal de fluorescência é superior ao limiar de fundo, entre o gene *ansB*

e o de manutenção (*arg4*) (ΔCT), e da diferença entre o ΔCT entre a amostra controle e a amostra testada ($\Delta\Delta CT$), e a quantidade relativa é dada por $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Essa análise foi realizada pelo Dr. Marcos Edgar Herkenhoff do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

2.2.1.4 Manutenção Celular

Para preservação das linhagens celulares foi seguido o protocolo modificado de estoque celular de Invitrogen® (2014). Primeiro, isolou-se uma colônia em placa de Petri com meio YPD e 2% m/v ágar. Em seguida, cultivou-se essa colônia, em 100 mL de meio YPD, a 30 °C e 250 rpm até 24 horas em um *Erlenmeyer* de 500mL. Por fim, as células foram centrifugadas (3220 xg, 10 minutos), ressuspensas em meio YPD novo contendo 15% de glicerol e congeladas em banho de gelo com etanol e armazenadas a -80 °C. As células foram armazenadas em micro tubos plásticos de 1mL.

2.2.1.5 Meios de Cultura

Nos cultivos em frascos, foi utilizado o meio complexo BMGY (*Buffered Complex Glycerol Medium*) cuja a composição é: 1% m/v extrato de levedura, 2% m/v peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% m/v YNB (base nitrogenada de levedura, *yeast nitrogen base*), 4×10^{-5} % m/v biotina, 1% v/v glicerol e água até volume final de 1 L (INVITROGEN, 2002).

Nos cultivos em frascos e biorreator, foi utilizado o meio sintético BSM (*Basal Salt Medium*, meio mínimo de sais) modificado, cuja composição está na Tabela 6, acrescido de 4,35 mL/L de solução traço de sais de metais (PTM₁), composição na Tabela 7 (INVITROGEN, 2002). A fim de se reduzir a precipitação do meio BSM, foram preparadas soluções com os sais separadamente de acordo com a Tabela 6 e a solução PTM1 apenas foi adicionada imediatamente antes do inóculo.

Tabela 6. Composição do meio mínimo de sais basais BSM modificado de Invitrogen Corporation (2002).

Componente	Por litro de meio	Marca	Preparo
K ₂ SO ₄ 0,5 M	209 mL	Dinâmica	Componentes da solução principal, esterilização por autoclave 20 minutos a 121°C
H ₃ PO ₄ (85%)	26,7 mL	Synth	
KOH	4,13 g	Synth	
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 g	Synth	Solução estoque 1 M autoclavada adicionada à solução principal após esterilização
MgSO ₄ .7H ₂ O	14,9 g	Synth	Solução estoque 1 M autoclavada adicionada à solução principal após esterilização
Glicerol 50%	80 mL	Dinâmica	Solução 50% _{v/v} autoclavada adicionada após esterilização
NH ₄ OH 25%	Ajuste pH a 5,0	Merck	Adicionado à solução principal antes da esterilização
Água Ultrapura	Até volume final de 1L	-	Adicionado à solução principal antes da esterilização
PTM1	4,35 mL	-	Adicionado esterilizado por filtração em membrana logo antes do inóculo

Tabela 7. Composição da solução PTM₁ (INVITROGEN, 2002).

Componente	Por litro de solução	Marca	Preparo
CuSO ₄ .5H ₂ O	6,0 g	Merck	
NaI	0,08 g	Dinâmica	
MnSO ₄ .H ₂ O	3,0 g	Êxodo científica	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g	Synth	
H ₃ BO ₃	0,02 g	Synth	Solução esterilizada
CoCl ₂	0,5 g	Synth	por filtração com
ZnCl ₂	20,0 g	Êxodo científica	membrana 0,2 µm
FeSO ₄ .7H ₂ O	65,0 g	Synth	
Biotina	0,3 g	Sigma	
H ₂ SO ₄ concentrada	5 mL	Synth	
Água Ultrapura	Até volume final de 1 L	-	

2.2.1.6 Cultivo em Frascos Agitados

Para preparo do pré-inóculo, uma amostra de 1 mL do banco de trabalho foi descongelada por 15 minutos a 30 °C e inoculada em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL de vidro Pyrex® (Sigma – Aldrich®) com defletores com as seguintes condições de cultivo: volume útil de 100 mL de meio BMGY, 30 °C, e 250 rpm em incubadora *shaker* (New Brunswick Scientific Excella® E24, Alemanha). Após 20 h, uma alíquota de 1 mL foi retirada e a concentração celular foi determinada de acordo com o método descrito em Análise da Biomassa. Calculou-se o volume desse pré-inóculo necessário para uma concentração inicial de 1 g/L para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL com 100 mL de meio

novo. Essa alíquota foi centrifugada por 5 minutos a 3320 xg a 4 °C (Centrifuge 5810R Eppendorf®), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado em meio de crescimento, BMGY ou BSM modificado dependendo do experimento.

As condições de crescimento em *Erlenmeyer* de 500 mL com defletores foram: 30 °C; 250 rpm; volume útil de 100 mL com meio mínimo de sais basais (BSM) acrescido de 4,35 mL/L de solução traço de sais de metais (PTM₁). Adicionalmente, foram executados experimentos em *shaker* com crescimento em BMGY, mantendo as demais condições, e acrescentando a fase de indução com pulsos com 1 mL de metanol filtrado a cada 24 horas até 96 horas de cultivo.

2.2.1.7 Determinação da Concentração de Histidina

Para cultivos em meio sintético de cepas auxotróficas é imprescindível suplementar o composto que a cepa é incapaz de produzir. Neste caso, foi adotada a metodologia proposta por Pronk (2002) para o cálculo da concentração teórica de histidina para cepa His⁻. A Equação 24 apresenta este cálculo, para tanto foram adotadas as seguintes hipóteses: a composição celular é semelhante a de *Saccharomyces cerevisiae* (PRONK, 2002) com 1% histidina em massa seca; o fator de conversão de substrato a células foi considerada a média de dados publicados na literatura (D'ANJOU; DAUGULIS, 2001; FERRARA et al., 2006; RODRIGUES, 2016); a concentração teórica de substrato de 4%_{m/v} em meio BSM (50,4 g_{glicérol}/L); e fator de segurança de 25%.

Concentração Teórica de Histidina =

$$10 \text{ mg} \left(\frac{\text{histidina}}{\text{g biomassa seca}} \right) \times 0,6 \left(\text{g} \frac{\text{biomassa seca}}{\text{g glicérol}} \right) \times 50,4 \left(\frac{\text{g glicérol}}{\text{L}} \right) \times 1,25 = \quad 24$$
$$363 \left(\frac{\text{mg histidina}}{\text{L}} \right)$$

Portanto, 363 mg_{histidina}/mL seriam suficientes para o crescimento da His⁻ em meio BSM. Para confirmar essa hipótese, a concentração de histidina foi testada em várias

concentrações, de 40 mg/L sugerida pelo protocolo da Invitrogen® (2014) até 600 mg/L em frascos com meio BSM antes do escalonamento para biorreator.

2.2.1.8 Configuração do Biorreator

O biorreator BIOSTAT B® 2 L (Sartorius®, Alemanha) foi operado com 1 L de meio de sais basais (BSM) mais 4,35 mL de PTM1 e o pH foi ajustado para 5,0 com solução de 25%_{v/v} NH₄OH, temperatura de 30 °C, vazão total gasosa de 1 vvm (ou seja, 1 L/min) e controle de oxigênio dissolvido acima de 20% da saturação com ar com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm. Antiespumante Y30 (Sigma-Aldrich) foi adicionado quando necessário automaticamente e o antibiótico G418 (Sigma-Aldrich) foi adicionado na concentração final de 400 µg/mL a fim de se evitarem contaminações. O inóculo foi de 1 g/L seguindo o protocolo de pré-inóculo da seção anterior com modificação do tempo de centrifugação para 10 minutos por causa do maior volume. Ademais, o biorreator possui o sensor BioPAT Xgas® (Sartorius) que fornece informação sobre a concentração do gás de exaustão (O₂ e CO₂), sensores de temperatura, pH e pO₂ (Hamilton, EUA) e as informações do cultivo foram coletadas *online* pelo *software* BioPAT MFCS® (Sartorius).

2.2.1.9 Cultivo em Duas Fases em Biorreator

Todos os experimentos iniciaram com batelada de 4%_{v/v} de glicerol até a exaustão caracterizada pelo pico da concentração de oxigênio, cerca de 19 horas de cultivo. Após, aproximadamente, 5 horas sem alimentação de substratos para consumir eventuais subprodutos (etanol, arabitol) e reduzir a repressão sobre os genes AOX, foi iniciada a fase de indução. Essa fase foi realizada usando duas estratégias: por pulsos e por controle da concentração de oxigênio dissolvido (*DO-stat*). A estratégia de pulsos se baseou na adição de 10 mL de solução indução (metanol mais 12 mL PTM₁/L) a cada 24 horas por 120 horas de cultivo. Essa estratégia foi estabelecida por estudos prévios no laboratório (PILLACA-PULLO et al., 2021) e é considerada uma maneira rápida de se estabelecer

parâmetros cinéticos (DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, 2011). Portanto, ela foi adotada para seleção da cepa produtora entre a His⁻ e a His⁺.

A segunda estratégia de controle, mantendo a concentração oxigênio dissolvido (pO₂) estática, foi realizada por meio de malha fechada de controle da alimentação de substrato. Quando o sensor de oxigênio dissolvido detectava concentração de oxigênio acima de 20% da saturação do ar, a bomba de solução de indução era acionada e a solução era alimentada na dorna. Nesse momento, as células consumiam o metanol com gasto de oxigênio dissolvido, resultando em queda da concentração de oxigênio abaixo de 20% e parada da alimentação do substrato. Após o consumo de metanol, a respiração celular cessava, e a concentração de oxigênio aumentava novamente e um novo ciclo era iniciado, resultando em pO₂ controlada em torno de 20% com oscilações. Ressalta-se que nessa modalidade, a agitação foi mantida em 1000 rpm e a aeração em 1 vvm, portanto, o controle do pO₂ foi exclusivo pela alimentação do substrato. Essa estratégia foi realizada apenas com a cepa selecionada para continuidade do projeto e permite manter as células em um estado fisiológico mais adequado do que em pulsos, já que metanol é alimentado de acordo com a necessidade celular sem limitação de oxigênio.

2.2.2 Métodos Analíticos

2.2.2.1 Análise de Biomassa

A biomassa foi avaliada por três métodos. O primeiro foi a filtração em membranas de 0,45 µm (Millipore[®], EUA) com secagem em micro-ondas seguindo o protocolo de Olsson e Nielsen (1997). Brevemente, cerca de 1 mL de meio foi filtrado em uma membrana previamente pesada, em seguida, foi feita a lavagem com água destilada e a membrana foi seca por 15 minutos com potência de 450W no micro-ondas. Após, a membrana seca foi resfriada em dessecador por 15 minutos e pesada, sendo a biomassa determinada pela diferença de massa entre a membrana com células e ela sozinha. O segundo método foi por espectrofotometria (Spectra Max[®], Molecular Devices, EUA), brevemente: 1 mL de amostra foi centrifugado a 6.711 xg por 5 minutos em

microcentrífuga (Kasvi, Brasil) e novamente suspenso em solução salina (0,9%_{m/v} NaCl), a absorbância da amostra foi lida no comprimento de onda de 600 nm (OD_{600}) na faixa de 0,1 a 0,9. O terceiro, para os cultivos em biorreator, foi por meio de centrifugação seguida de secagem em estufa a 60 °C. Por este método, uma alíquota entre 1 e 5 mL de amostra foi centrifugada duas vezes, a primeira com meio de cultura e a segunda com água destilada, em tubos Falcon de 15 mL ou tubos de 2 mL previamente pesados. Os tubos foram postos na estufa e a massa foi medida até estabilização. Os valores de absorbância foram relacionados com a concentração celular obtida por filtração (método 1) para se obter uma curva de calibração que é apresentada no Apêndice A.1 Curva de calibração de massa seca pela densidade óptica para espectrômetro Spectra Max®, e a função é dada pela Equação 25.

$$DO_{600} = 1,8 \times g_{biomassa\ seca}/L \quad 25$$

2.2.2.2 Análise da Atividade de L-Asparaginase em Microplaca

O protocolo de medida da atividade é baseado na hidrólise da asparagina pela enzima L-asparaginase em ácido aspártico e amônia modificado de Frohwein et al. (1971) e Drainas, Kinghorn, e Pateman (1977). O ácido aspártico reage com hidroxilamina por uma reação de hidroxilaminólise catalisada pela L-asparaginase, originando o ácido L-aspartil-β – hidroxâmico (AHA) (Grossowicz, Wainfan, Borek, & Waelsch, 1950). Com adição de solução de cloreto férrico ácida é formado um complexo colorido, o β – hidroxamato aspártico férrico, que possui coloração vermelha e pode ser quantificado pela absorbância com comprimento de onda λ 500 nm em microplaca de poliestireno em espectrofotômetro. O conjunto dessas reações é apresentado na

Figura 7. O protocolo detalhado é dado no Apêndice A.3 Protocolo de Medida de ASNase de amostra pelo método do L-aspartil-β– Hidroxâmico (AHA) adaptado de Drainas, Kinghorn e Pateman (1977).

Brevemente, primeiro foi realizada uma curva de calibração entre a concentração de AHA e absorvância a 500 nm. Diferentes soluções foram preparadas contendo de 0 a 3 μmols de AHA em triplicata e incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foi pipetada a alíquota de 200 μL em um poço de uma microplaca de 96 poços de poliestireno de fundo chato (Corning® Costar®). A relação entre a concentração de β -hidroxamato aspártico e absorvância é dada pela Equação 26 e unidade de ASNase (definida como 1 mol de L-aspartil- β – Hidroxâmico formado por minuto) pela Equação 27. A curva de AHA por absorvância tem linearidade até 3 μmols de AHA, caso a quantidade de moles seja superior, a amostra precisa ser diluída antes do ensaio.

Para a medida de atividades das amostras, primeiramente, elas foram centrifugadas por 5 min, a 4 °C e 3.220 xg , em seguida, 50 μL do sobrenadante foram adicionados a 750 μL de tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mM), 100 μL de asparagina (100 mM) e 100 μL de hidroxilamina pH 7,0 (1 M). Esta solução foi incubada por 10 min a 37 °C e a reação foi interrompida com a adição de 250 μL de ácido tricloroacético mais cloreto férrico (25 g/L de TCA, 50 g/L de FeCl_3 e 1,2%_{v/v} HCl). Esta solução foi centrifugada por 5 min a 6.711 xg , 200 μL foram pipetados no poço da microplaca, a absorvância do sobrenadante foi medida a 500 nm e correlacionada à formação de hidroxamato β -aspártico de acordo com uma curva de calibração dada pela Equação 26 e a atividade foi calculada pela Equação 27. O branco foi feito pela adição da amostra após a adição da solução de TCA / FeCl_3 / HCl.

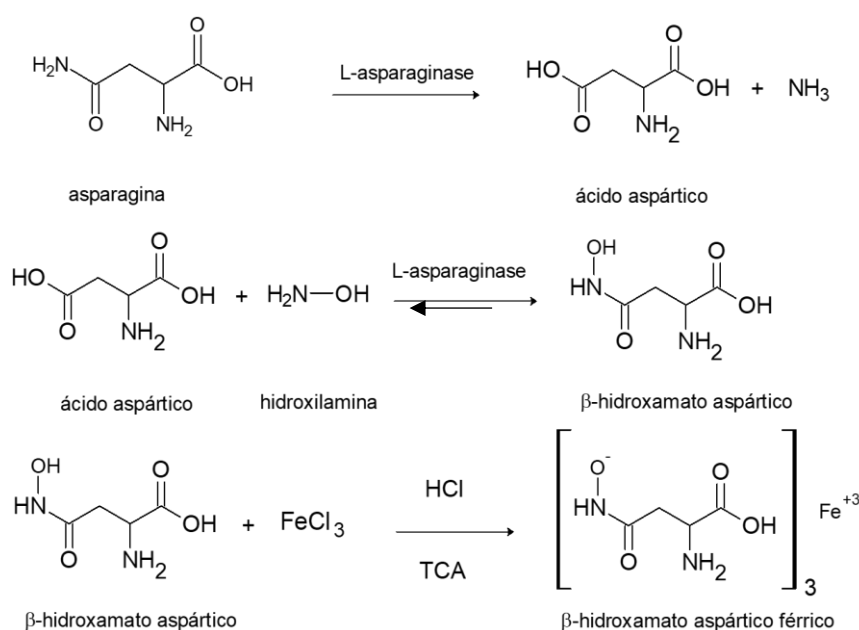
Uma das limitações desse método é que a reação de hidroxilaminólise é reversível, portanto uma alta concentração de AHA pode mudar o sentido da reação e falsear os resultados, por isso quando comparado a outros métodos, como Nessler para quantificar amônia e HPLC, os valores de atividade podem estar subquantificados (MAGRI et al., 2018). Por outro lado, é um método simples e rápido, sendo adequado para quantificar a atividade ao longo de cultivos celulares.

$$\mu\text{mol } \beta \text{ – hidroxamato aspártico} = 4,85 \text{ Abs} - 0,0036$$

26

$$A = 1 \text{ U/L ASNase} = \frac{\mu \text{ mol } \beta - \text{hidroxamato aspártico}}{\text{volume de amostra (L)} \times \text{tempo de reação (min)}} \quad 27$$

Figura 7. Conjunto de reações que embasam o método de quantificação de ASNase. Primeiramente, a asparagina é hidrolisada pela ASNase em ácido aspártico e amônia. Em seguida, a ASNase catalisa a reação de hidroxilaminólise entre hidroxilamina e ácido aspártico resultando no β – hidroxamato aspártico. Esse composto reage com cloreto férrico em meio ácido gerando o β – hidroxamato aspártico férrico de coloração avermelhada. A intensidade da coloração pode ser relacionada com a absorbância a 500 nm e, dessa forma, é medida a concentração de ASNase de forma indireta.



Fonte: Imagem produzida pela autora.

2.2.2.3 Análise das Proteínas Totais

O método adotado para medida de proteínas foi o do ácido bicinonínico (BCA) cujo mecanismo é similar ao de Lowry et al. (1951). As amostras foram analisadas utilizando o *kit Bichoninic Acid Protein Assay* (Sigma-Aldrich) com detecção entre 200 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A calibração foi realizada com albumina de soro bovino (BSA) usando solução com 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ em triplicata. Resumidamente, a mistura reacional foi preparada adicionando 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B, em seguida, 8 partes dessa mistura foram adicionadas em 1 parte da amostra. Essa solução foi incubada por 15 min a 60°C e após resfriamento, foi realizada a leitura da absorbância em

espectrofotômetro a 562 nm em microplaca com 225 µL por poço. A relação entre concentração total de proteínas e absorvância é dada pela Equação 28 e a curva é apresentada no Apêndice A.4 Curva de calibração de proteínas totais pela absorvância pelo método BCA

$$\text{Concentração Total de Proteínas} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 789 \text{ ABS} - 9 \quad 28$$

2.2.2.4 Análise de Proteases

O protocolo de análise de proteases foi adaptado da literatura (Charney; Tomarelli, 1947; Nascimento, 2017) e baseia-se na reação do extrato enzimático do sobrenadante com azocaseína. Foram adicionados 50 µL de sobrenadante com 50 µL de azocaseína 0,5% m/v e a solução foi incubada por 40 minutos a 37 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com adição de TCA (ácido tricloroacético) 10% m/v (50 µL) e a solução reacional foi centrifugada por 10 minutos a 3220 xg. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca e 100 µL de KOH 0,5M foram adicionados. A absorvância da solução foi lida a 430 nm e foi definido que 1 unidade representa a quantidade da enzima que aumenta a absorvância em 0,001 por minuto. O branco foi feito com adição de amostra apenas após a adição de TCA.

2.2.2.5 Análise da Concentração de Glicerol

Para medidas de glicerol foi utilizado o *kit* Triglicérides Liquiform (Labtest, Brasil). Foram adicionados 2,5 µL de amostra com 250 µL do reagente (mistura de lipase de lipoproteína, glicerolquinase, glicerolfosfato oxidase e peroxidase) e essa solução foi incubada a 37 °C por 10 minutos em microplaca de poliestireno. Se há glicerol na amostra, a solução se torna avermelhada e a absorvância pode ser medida em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda = 505\text{nm}$. A calibração é apresentada no Apêndice A.5 Curva de calibração de glicerol pela absorvância pelo *kit* Triglicérides Liquiform (Labtest).

2.2.2.6 Eletroforese SDS-PAGE

A produção extracelular foi avaliada por gel de poliacrilamida (SDS_PAGE) 13,5% (0,75 mm) realizado de acordo com Laemmli (1970). Antes de correr o gel, foi realizada a precipitação da amostra, em que a 150 μ L do sobrenadante foram adicionados a 600 μ L de metanol, 150 μ L de clorofórmio e 400 μ L de água. Após cada adição, a amostra foi agitada por 10 s em um vórtice (MS2 Minishaker, IKA, Alemanha). Ao final, a amostra foi centrifugada por 5 min a 25 °C e 17.000 xg (MicroStar 17R, VWR, Alemanha), e o líquido descartado. O pellet de proteína foi tratado com tampão Laemmli com TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) e aquecido por 7 min a 95 °C. Em seguida, 8 μ L de amostra e 4 μ L de padrão Pierce TM Unstained Protein Marker (ThermoFisher Scientific, Alemanha) foram carregadas por poço. As bandas foram coradas com corante Coomassie G-250 coloidal. O protocolo detalhado é apresentado no Anexo B: Protocolo de gel de poliacrilamida para Eletroforese SDS-PAGE.

2.2.2.7 Análise de Espectrometria de Massa por MALDI-TOF

Para a caracterização da ASNase extracelular, foi realizada uma análise de MALDI-TOF MS com impressão digital do mapa de peptídeos. Bandas relevantes do gel-SDS foram cortadas e lavadas algumas vezes com 200 μ L de água destilada, desidratadas com 200 μ L de acetonitrila e depois secadas no concentrador de vácuo RVC 2-18 CD plus (Martin Christ GmbH, Alemanha). Em seguida, as amostras foram carboxamidometiladas com iodoacetamida e digeridas com tripsina durante a noite a 37 °C. Os peptídeos resultantes foram extraídos e submetidos à análise NanoESI-MS em um espectrômetro de massa Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, Alemanha). O espectro de massa, $(M+3H)^{+3}$ e $(M+2H)^{+2}$, de 25 componentes do peptídeo foi analisado e comparado com a ASNase de *D. chrysanthemi* no banco de dados ExpASY (web.expasy.org). O sobrenadante do cultivo da cepa prototrófica em frasco agitado com meio complexo às 144 horas foi

selecionado para este estudo. Esta análise foi realizada gentilmente pelo Dr. Manfred Nimtz do *Helmholtz Center for Infection Research*. Os resultados são apresentados no Anexo C: Análise MALDI-TOF da ASNase glicosilada.

2.2.2.8 Desglicosilação da ASNase

Amostras do sobrenadante reagiram com PNGase F e O-Glicosidase, ambas da New England Biolabs® Inc., para remover oligossacarídeos N-ligados e O-ligados, respectivamente. A remoção de N-glicanos foi realizada pela adição de 15 µg de proteína do sobrenadante com tampão desnaturante *Glycoprotein Denaturing Buffer 10x* (1 µL) e água (9 µL) e aquecimento a 100 °C por 10 minutos, em seguida, após resfriamento, foram adicionados 2 µL *GlycoBuffer 10x*, 2 µL 10% NP-40, 6 µL de água destilada e 1 µL de PNGase F. A solução foi incubada a 37 °C por 1 hora e analisada por SDS-PAGE. A remoção de O-glicanos foi realizada de forma semelhante, mas com adição de 2 µL Neuraminidase e 3 µL O-Glicosidase, tempo de incubação de 4 horas a 37 °C e foi analisada por SDS-PAGE. O sobrenadante do cultivo da cepa prototrófica em frasco agitado com meio complexo às 144 horas foi selecionado para este estudo.

2.2.3 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos e de Transferência de Oxigênio

2.2.3.1 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Alguns parâmetros cinéticos foram usados para comparar o desempenho dos cultivos. Sendo eles: a velocidade específica de crescimento (μ_x ; h^{-1}), Equação 29; a velocidade específica de consumo de substrato (q_s ; $g_{\text{substrato}}/g_{\text{biomassa seca}}/h^{-1}$), Equação 30; a velocidade específica de formação de produto (q_p ; $g_{\text{produto}}/g_{\text{biomassa seca}}/h^{-1}$), Equação 31; e o fator de conversão de substrato a biomassa ($Y_{x/s}$; $g_{\text{biomassa seca}}/g_{\text{substrato}}$), Equação 32.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X - \frac{dV}{Vdt} \times X \quad 29$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} \times S_{alim} - \frac{dV}{Vdt} \times S - q_s X \quad 30$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p X - \frac{dV}{Vdt} \times P \quad 31$$

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{dX}{dS} = \frac{X(t_2) - X(t_1)}{S(t_1) - S(t_2)} = \frac{\mu_X}{q_S} \quad 32$$

Nos regimes de batelada, a variação do volume pode ser desconsiderada e, portanto, as velocidades específicas são calculadas pelas Equações 33 a 35.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X \quad 33$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_s X \quad 34$$

$$\frac{dP}{dt} = q_p X \quad 35$$

A variação de volume é proveniente da alimentação de substrato e/ou soluções para correção de pH (ácido, base) e retiradas por amostras e/ou evaporação e é representada pela Equação 36. Apesar de na batelada alguns desses fenômenos estarem presentes, analisando os dados experimentais foi constatado que a variação é de cerca de 10% do volume total, por isso foi desconsiderada.

A função de taxa de evaporação é dependente do sistema e das condições de cultivo e os cálculos para sua determinação são apresentados no Apêndice B. Calculando o valor instantâneo do volume, é possível obter as grandezas (concentração de células, substratos, produtos, gases) em função da massa ao invés da concentração. Dessa forma, os parâmetros podem ser obtidos pelas variações instantâneas dessas grandezas mássicas, como mostram as Equações 36 a 39.

$$V_i = V_{i-1} - \text{evap}_{H_2O} dt - \text{evap}_S dt + V_S + V_{BASE} + V_{ÁCIDO} - V_{AMOSTRA} \quad 36$$

$$\frac{\Delta m_X}{\Delta t} = \mu_X m_X \quad 37$$

$$\frac{\Delta m_S}{\Delta t} = -q_s m_X \quad 38$$

$$\frac{\Delta m_P}{\Delta t} = -q_p m_X \quad 39$$

Para a determinação dos parâmetros, a equação 36 foi resolvida em intervalos de tempo de 1 minuto.

Durante a fase exponencial, a velocidade específica de crescimento é máxima e pode ser estimada por diferentes métodos: graficamente como o coeficiente angular de $f(t)=\ln(X(t))$ ou $f(t)=\ln(m_X(t))$ ($\mu_{\text{máx}}$; h^{-1}); graficamente pelo consumo de base como coeficiente angular de $f(t)=\ln(V_{\text{base}}(t))$ ($\mu_{\text{máxbase}}$; h^{-1}); e por meio do balanço de massa de CO_2 ($\mu_{\text{máxCO}_2}$; h^{-1}), Equação 40. Esse cálculo deriva da velocidade de produção de CO_2 (CPR) ($\text{molCO}_2/\text{L/h}$) que é dada pela Equação 41. Para isso, quatro hipóteses foram assumidas de que, durante a fase exponencial, a velocidade de formação específica de CO_2 é constante (q_{CO_2} ; $\text{molCO}_2/\text{g}_{\text{biomassa seca}}/\text{h}$), as vazões de fluxo de gás de entrada e saída são constantes e iguais (φ_i e φ_o ; $\text{mol}_{\text{gás}}/\text{h}$), os gases se comportam como um gás ideal e o volume do caldo de cultura (V , L) é constante. Assim, a taxa de crescimento específica máxima ($\mu_{\text{máxCO}_2}$) pode ser calculada como o coeficiente angular de $f(t) = \ln\text{CPR}_{\text{exp}}(t)$.

$$\mu_{\text{CO}_2} = \frac{d \ln}{dt} \left[\frac{\varphi}{V q_{\text{CO}_2 \text{exp}}} \times (y_{\text{CO}_2 o} - y_{\text{CO}_2 i}) \right] \quad 40$$

$$\text{CPR}_{\text{exp}}(t) = \frac{\varphi_o y_{\text{CO}_2, o}(t) - \varphi_i y_{\text{CO}_2, i}(t)}{V(t)} = X(t) \times q_{\text{CO}_2 \text{exp}} \quad 41$$

Já as velocidades de consumo de substrato e de formação de produto médias foram obtidas por regressão linear com 95% de confiança como sendo o coeficiente angular de $dS(t)=f(Xdt)$ e $dP(t)=f(Xdt)$ para batelada e $\Delta m_S(t)=f(m_X \Delta t)$ e $\Delta m_P(t)=f(m_X \Delta t)$ para batelada-alimentada, respectivamente. Finalmente, as velocidades instantâneas foram calculadas por método geométrico (HISS, 2001).

No caso de enzimas, a concentração do produto é dada por sua atividade volumétrica A (U/L) dada pela Equação 27, ou por sua atividade em relação à biomassa A_X (U/ $\text{g}_{\text{biomassa seca}}$) pela Equação 42 ou ainda a atividade específica A_p (U/ $\text{mg}_{\text{proteína}}$) pela Equação 43. Já a velocidade específica média de formação de ASNase em função da atividade foi calculada como sendo coeficiente angular de $dA(U/L)(t)=f(Xdt)$ para batelada e $\Delta A(U)(t)=f(m_X \Delta t)$ para batelada-alimentada.

$$A_X = \frac{A}{X} \quad 42$$

$$A_p = \frac{A}{Prot}$$

43

2.2.3.2 Concentração de Oxigênio Dissolvido no Meio de Cultura

Por se tratar de um cultivo em aerobiose, o oxigênio exerce papel primordial para o consumo da fonte de carbono e, conseqüentemente, o crescimento celular e a formação de produto (BADINO JR; SCHMIDELL, 2001). Entretanto, em comparação às fontes de carbono, o oxigênio é muito pouco solúvel em água, aproximadamente 7 mgO₂/L a 1 atm e 35 °C, tornando-se frequentemente o limitante do crescimento celular (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). A solubilidade do oxigênio é influenciada tanto pela temperatura quanto pela concentração de sais no meio, o aumento de ambos causa a redução da solubilidade. A concentração de oxigênio dissolvido no equilíbrio (saturação) pode ser calculada a partir da pressão parcial pela lei de Henry, Equação 44. A pressão parcial é o produto da fração molar do gás pela pressão total, Equação 45.

$$C_s = H \times \rho_g \quad 44$$

$$\rho_g = y_{O_2} \times P_{atm} \quad 45$$

Portanto, quando se varia a composição do meio, o que é modificado é a constante de Henry (H). Uma das metodologias para correção dessa constante foi proposta por Schumpe (1985), segundo o autor a constante de Henry do meio é obtida somando à constante da água na temperatura de processo os coeficientes dos compostos do meio, resultando em uma constante de Henry para o meio de cultura a uma determinada temperatura. Seguindo essa metodologia, foi calculada a constante de Henry para o meio BSM a 30 °C de 7,02 mgO₂/L. Os cálculos são apresentados no Apêndice A.6 Cálculo da Constante de Henry para Meios de Cultura.

2.2.4 Determinação Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio

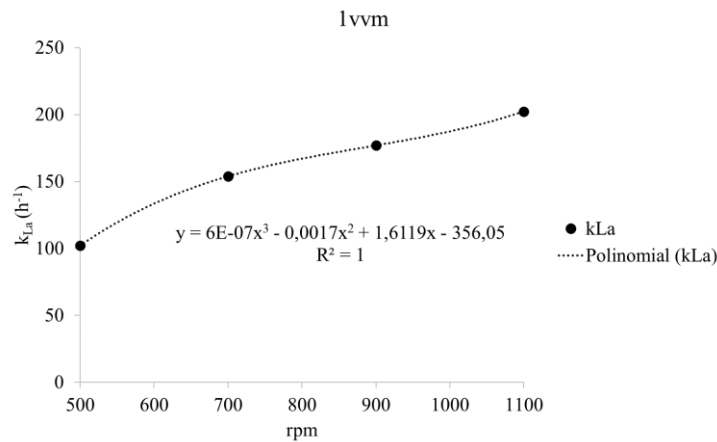
Para que o oxigênio do ar chegue às células, uma série de resistências precisam ser superadas: na difusão dentro da bolha de ar, na interface líquido-gasosa, na difusão no líquido, na interface líquido – membrana celular, na difusão no citoplasma e no consumo do oxigênio pelas células. A superação dessas resistências tem como força-motriz a diferença de concentração de oxigênio entre o gás e o líquido ($C_s - C$, gO₂/L) e, na presença de células, a velocidade de consumo de oxigênio (OUR, molO₂/L/h). A soma global dessas resistências é representada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) que é calculado pela Equação 46 na ausência de células e Equação 47 na presença de células (SCHMIDELL, 2001).

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C_s - C) \quad 46$$

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C_s - C) - OUR \times \frac{32 \text{ gO}_2}{\text{molO}_2} \quad 47$$

Para cálculo do k_{La} nas condições de processo foi realizada a metodologia proposta por Bartholomew et al. (1950). Primeiramente, a dorna foi preenchida com água com o volume de trabalho (1 L), colocada na temperatura de operação (30 °C) e o sensor de pO₂ previamente calibrado foi imerso na solução. Em seguida, foi feito o borbulhamento de nitrogênio até que a concentração fosse zerada e foram iniciadas a aeração e agitação, os valores de pO₂ foram anotados até se atingir 100% da saturação. Nessas condições, integrando a Equação 46, foi possível obter graficamente o valor do k_{La} como sendo o coeficiente angular da função $f(t) = \ln(1 - (C(t)/C_s))$. Foram realizadas diferentes combinações de aeração e agitação e atrasos no sinal do eletrodo foram desconsiderados. A relação de do k_{La} com a frequência de agitação mantendo 1 vvm e 30°C é apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 1. Relação entre $k_{L,a}$ (h^{-1}) e agitação (rpm) quando a aeração é mantida a 1 vvm e a temperatura em 30°C para o BIOSTAT B® 2-L com 1 L de meio.



2.2.4.1 Método Dinâmico de Determinação de Consumo de O_2

Após determinados o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e a concentração de saturação do oxigênio, é possível calcular o consumo de oxigênio pelas células por meio do método dinâmico proposto por Taguchi e Humphrey (1966). Por este método é possível estimar o consumo específico de oxigênio (q_{O_2} , $g_{O_2}/g_{\text{biomassa seca}}/h$) após a parada no fornecimento de oxigênio por certo período. Desse modo, a transferência de ar para as células reduz gradativamente e o coeficiente volumétrico de transferência tem seu valor próximo a zero. Nessa nova situação, o balanço de oxigênio fica determinado pela Equação 48.

$$\frac{dC}{dt} = \frac{C - C_0}{t - t_0} = -OUR \times \frac{32 g_{O_2}}{mol_{O_2}} = -q_{O_2}X \quad 48$$

Por meio do método gráfico é possível determinar a velocidade específica de respiração como sendo o coeficiente angular de $f(t) = (C_0 - C)/(t - t_0)/X$, considerando que a concentração celular e a velocidade de consumo se mantêm constantes no intervalo de tempo (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; SCHMIDELL, 2001).

2.2.4.2 Balanço Gasoso

Outra maneira de se calcular o consumo de oxigênio sem a necessidade de interrupção do fornecimento é por meio do balanço gasoso, que só possível na presença de um analisador da composição do gás de saída. Primeiramente, foram realizadas correções para a vazão de entrada de ar (1 L/m, 60 L/h) de acordo com a pressão local em São Paulo (1016 hPa, 59,1 L/h), em seguida, assumindo que o ar se comporta como gás ideal foi calculada a vazão molar de entrada (2,2 mol/h) e a composição do gás de entrada foi adotada como sendo a medida pelo analisador de saída de gás antes do inóculo. Em seguida, foi feito o balanço de massa da fração de inertes dado pela Equação 49.

$$\varphi_o = \frac{\varphi_i \times (1 - y_{O_2,i} - y_{CO_2,i})}{1 - y_{O_2,o} - y_{CO_2,o}} \quad 49$$

Portanto, a partir da composição e vazão de gás de entrada e de saída e assumindo que a variação de oxigênio dissolvido é desprezível em cada instante de tempo, o balanço de oxigênio é dado pela Equação 50 e o de dióxido de carbono pela Equação 51. Nos casos em que há variação de volume (batelada-alimentada), as velocidades específicas de consumo de oxigênio (q_{O_2} , gO₂/g_{biomassa seca}/h) e de formação de gás carbônico (q_{CO_2} , gCO₂/g_{biomassa seca}/h) podem ser calculadas de forma análoga usando a massa ao invés da concentração celular.

$$OUR(t) = \frac{\varphi_i x_{O_2,i}(t) - \varphi_o x_{O_2,o}(t)}{V(t)} = X(t) \times q_{O_2} \quad 50$$

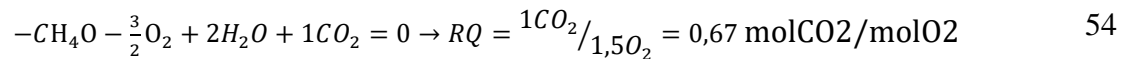
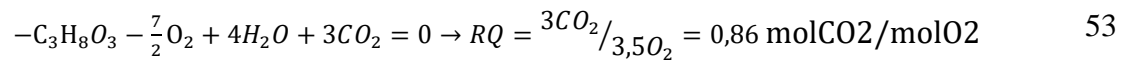
$$CPR(t) = \frac{\varphi_o x_{CO_2,o}(t) - \varphi_i x_{CO_2,i}(t)}{V(t)} = X(t) \times q_{CO_2} \quad 51$$

De acordo com Dietzsch et al. (2011), os valores de CPR podem ser usados para avaliar a adaptação da *P. pastoris* à mudança de substrato de glicerol para metanol, sendo que o tempo para alcançar o valor máximo de CPR após a alimentação de metanol por pulso é considerado o tempo de adaptação e pode ser utilizado para comparar o metabolismo de diferentes cepas. Portanto, esse critério também será adotado nesse estudo.

Ademais, como os valores de OUR e CPR podem sofrer grandes oscilações devido à proximidade das frações de entrada e de saída foi adotada uma função de suavização para eliminar esses ruídos. O código em Matlab (MathWorks®, R2015a) do racional dessa função é apresentado no Apêndice C.

Da relação do consumo de oxigênio e formação de dióxido de carbono é possível calcular o coeficiente respiratório (RQ), dado pela Equação 52. Teoricamente, o RQ fornece a razão entre mols de CO₂:O₂ resultante da oxidação do substrato. Assumindo, a estequiometria da reação de oxidação do glicerol, o valor de RQ teórico é de 0,86 molCO₂/molO₂ (Equação 53), e para a oxidação do metanol, é de 0,67 molCO₂/molO₂ (Equação 54), portanto o cálculo do RQ experimental durante o cultivo dá indícios do metabolismo celular, quanto mais próximo do valor teórico, mais eficiente está o metabolismo.

$$RQ(t) = \frac{CPR(t)}{OUR(t)} \quad 52$$



O RQ experimental foi calculado de três maneiras, nos cultivos com indução por pulsos, ele foi obtido por regressão linear com 95% de confiança como sendo o coeficiente angular da função CPR(t) = f(OUR(t)) nos intervalos dos pulsos, e nos experimentos com alimentação constante de metanol foi calculado como a média (RQ_{MÉDIO}) a cada 60 minutos dos valores pontuais de RQ calculados a cada minuto e como a razão entre os valores médios das velocidade específicas de formação de CO₂ e consumo de CO₂ (\overline{RQ}).

2.2.5 Análise Estatística Monovariada

Os estudos em *shaker* foram avaliados com análise de variância (ANOVA, teste t de Student e Tukey), com nível de significância α 0,05, em relação à concentração celular máxima no *software* Minitab® 20 (MINITAB, 2010).

2.2.6 Conjunto de Experimentos

Tabela 8. Quadro resumo dos experimentos realizados.

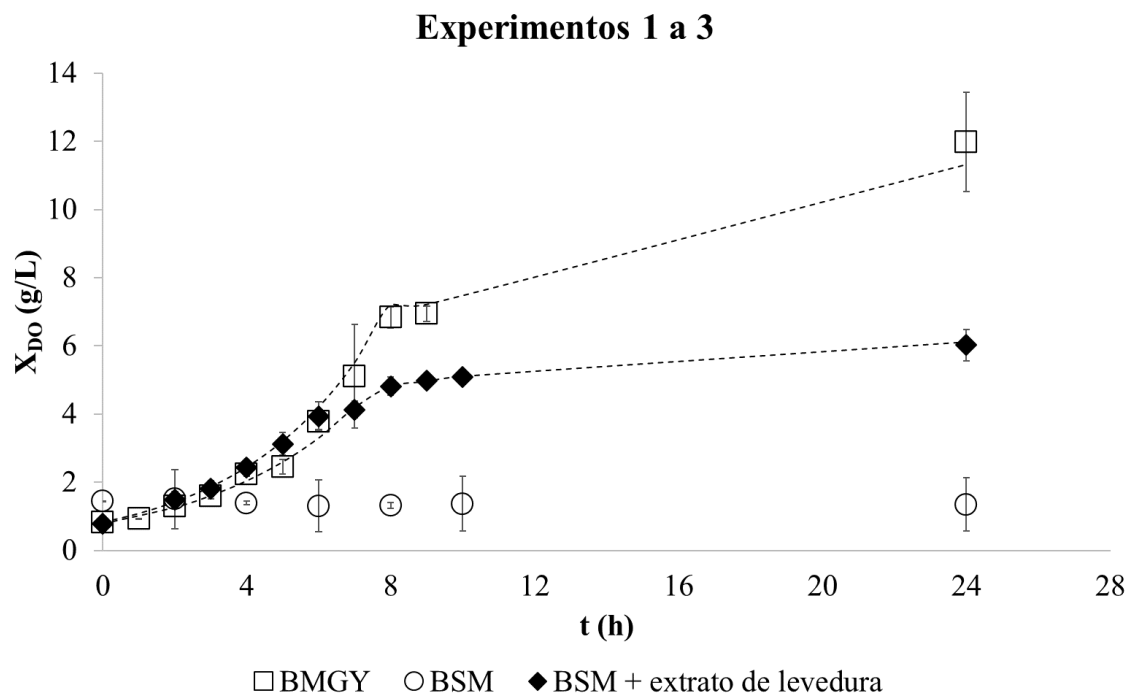
Experimento	Cepa	Meio	Sistema	Indução	Objetivo
1	His ⁻	BMGY	<i>Shaker</i>	Não realizada	Caracterizar crescimento da cepa em meio complexo
2		BSM			Caracterizar crescimento da cepa em meio sintético
3		BSM + 10g/L extrato de levedura			Investigar comportamento da cepa em meio sintético
4		BSM + histidina			Selecionar a concentração de histidina que resulte na maior população
5		BSM + 480mg/L de Histidina BSM_480	Biorreator BIOSTAT B® com 1 L	10 mL metanol a cada 24h	Caracterizar crescimento e produção em biorreator em meio sintético com diferentes concentrações de histidina
6		BSM + 600mg/L de Histidina BSM_600			
7	His ⁺	-----			Transformação da cepa não auxotrófica
8	His ⁻ His ⁺ His ⁺ vazio Selvagem	BMGY	<i>Shaker</i>	1 mL metanol a cada 24h	Comparar crescimento e produção das diferentes cepas
9	His ⁺	BSM BSM_0	Biorreator BIOSTAT B® com 1 L	10 mL metanol a cada 24h	Caracterizar crescimento e produção em meio sintético
10		BSM		<i>DO-stat</i>	Aprimorar a produção de ASNase por meio da estratégia de indução <i>DO-stat</i>
11		-----			

2.3 Resultados

2.3.1 Experimentos de 1 a 4: cepa His⁻ em frascos agitados

O primeiro conjunto de experimentos objetivou a familiarização com a cepa de *Pichia pastoris* His⁻ em frascos agitados para caracterizar seus parâmetros cinéticos de crescimento e necessidades nutricionais. Em meio complexo BMGY, a cepa apresentou velocidade específica de crescimento máxima igual a $0,26 \text{ h}^{-1}$ e coeficiente de conversão de $0,58 \text{ g}_{\text{biomassa seca}}/\text{g}_{\text{glicero}}l$. Em seguida, verificou-se que em meio mínimo BSM a cepa não se desenvolveu, portanto, ela provavelmente possuía alguma deficiência nutricional. Um terceiro experimento com adição de extrato de levedura (10 g/L), uma fonte rica em aminoácidos, permitiu confirmar a deficiência nutricional dessa célula, pois ela cresceu lentamente, mas não atingiu a mesma concentração celular máxima que em BMGY. As curvas de crescimento são apresentadas no Gráfico 2.

Gráfico 2. Perfil de crescimento da cepa His⁻ apresentado em concentração celular calculada a partir de densidade óptica (X_{DO} , g/L) em função do tempo (t, h) em três meios de cultivo diferentes: BMGY, BSM e BSM + 10 g/L de extrato de levedura. Cultivos realizados em duplicatas experimentais.



Esse experimento foi essencial para confirmar que deficiência nutricional se devia à auxotrofia para histidina, até esse momento desconhecida, demonstrando que ela não foi corrigida durante a transformação da cepa com a inserção do gene HIS4. Consequentemente,

foi necessário suplementar o meio BSM com histidina, para tanto, realizaram-se experimentos em duplicata com diferentes concentrações de histidina de 40 mg/L (sugerida por Invitrogen® (2014)), 120 mg/L, 360 mg/L (valor teórico) , 480 mg/L e 600mg/L para se determinar a quantidade que leve à maior concentração celular em meio BSM. O desempenho dos cultivos foi avaliado pelo teste ANOVA com único fator e agrupamento por Tukey ($\alpha = 5\%$) e resultou em 480 mg/L como o nível que permitiu a maior concentração celular. Os valores de concentração celular máxima são apresentados no Gráfico 3 e o resultado do teste de Tukey é dado na Tabela 9.

Gráfico 3. Concentração celular máxima (X_{D0max} (g_{biomassa seca}/L) em função de diferentes concentrações de histidina adicionadas ao meio BSM, sendo elas: 40, 120, 360, 480 e 600 mg/L, e em meio BMGY. Dados providos de duplicatas experimentais.

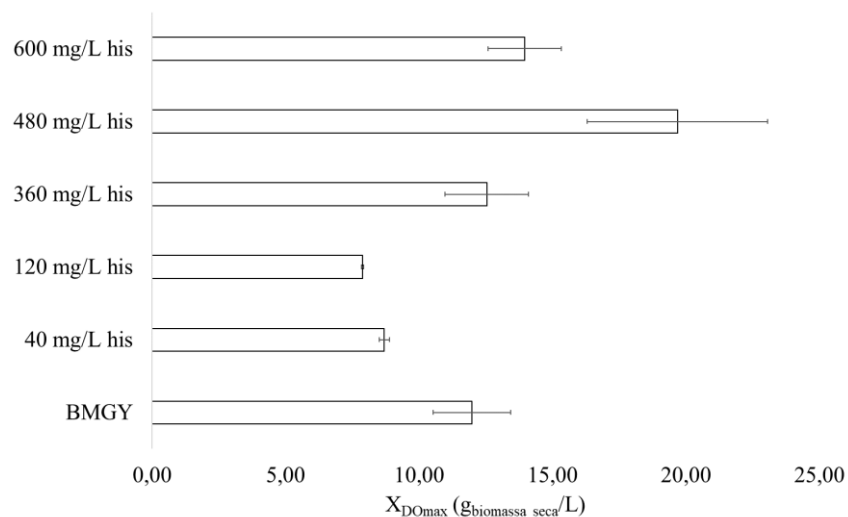


Tabela 9. Resultado da análise de variância (ANOVA) com agrupamento por Tukey para os valores de concentração máxima obtidos em BSM suplementado com diferentes níveis de histidina.

Teste de Tukey - $\alpha = 0,05$			
Fator	N	Média X_{D0} (g/L)	Agrupamento
480mg/L	2	22,23	A
600mg/L	2	12,99	B
360mg/L	2	12,54	B
BMGY	2	11,98	B
40mg/L	2	8,70	B
120mg/L	2	7,90	B

Grupo	Média X_{D0} (g/L)	Desvio padrão
A	22,23	
B	10,82	2,35

Portanto, a concentração de 480 mg/L de histidina foi selecionada para o escalonamento do processo para biorreator. Como as demais concentrações apresentaram concentrações estatisticamente iguais ($10,8 \pm 2,3$ g_{biomassa seca}/L), a concentração de 600 mg/L de histidina também foi selecionada para o escalonamento, pois, adotou-se a hipótese de que, em meio aerado, a população celular seria maior e, conseqüentemente, sua necessidade nutricional também.

2.3.2 Experimentos 5 e 6: cepa His⁻ cultivada em meio BSM em biorreator

Após estabelecidas as condições de crescimento em frasco em para a cepa His⁻ em BSM, o passo seguinte foi o escalonamento para o biorreator com volume útil de 1L operando a 30°C, 1 vvm, controle de pO₂ > 20% da saturação com ar agitação entre 700 e 1000 rpm e controle de pH em 5,0 com alimentação de NH₄OH 25%_{v/v} e HCl 1M. Foram executadas duas condições de cultivo, de acordo com a Tabela 8. Brevemente, os cultivos se iniciaram com batelada de glicerol 4%_{v/v}, até a exaustão, em seguida, houve um período sem alimentação de substratos, cerca de 5 horas, e a indução se iniciou às 24 h com pulsos de 1%_{v/v} de solução de indução (metanol + 12 mL_{PTMI}/L) a cada 24 h até 120 h de cultivo. Além disso, foram testadas duas concentrações de histidina no meio BSM, 480 e 600 mg/L (Experimentos 5 e 6, respectivamente).

Durante a batelada de glicerol, os dois cultivos tiveram comportamentos similares, entre 12 e 20 horas foi ativado controle da agitação para manter pO₂ > 20%, indicando a alta atividade metabólica e a CPR teve o máximo às 21 h, 1,8 gCO₂/L/h, e às 19 h, 2,8 gCO₂/L/h, para os cultivos BSM_480 (experimento 5) e BSM_600 (experimento 6), respectivamente. O valor de RQ médio também foi maior para BSM_600, 0,83 molCO₂/molO₂, do que para BSM_480, 0,71 molCO₂/molO₂, e mais próximo do teórico para a oxidação do glicerol, 0,86 molCO₂/molO₂. Apesar da respiração estar mais próxima ao máximo teórico, o cultivo com BSM_600 não resultou em mais células ou proteínas ao fim da fase exponencial do que no BSM_480. Os perfis dos cultivos são apresentados nos gráficos 4 e 5.

Gráfico 4. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (X_{DO}, g/L) e secagem (X_{MS}, g/L), de consumo de glicerol (S_{gli}, g/L) e de formação de asparaginase (A, U/L) no experimento 5 com a cepa His⁻ meio BSM adicionado de 480 mg/L de histidina iniciado com batelada de glicerol e indução com 10 mL de solução de metanol + 12 mL_{PTMI}/L a cada 24 horas a partir de 24 horas de cultivo. Os desvios são de duplicatas analíticas.

Demais condições de cultivo: 30°C, pH 5,0 e pO₂ > 20% com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm.

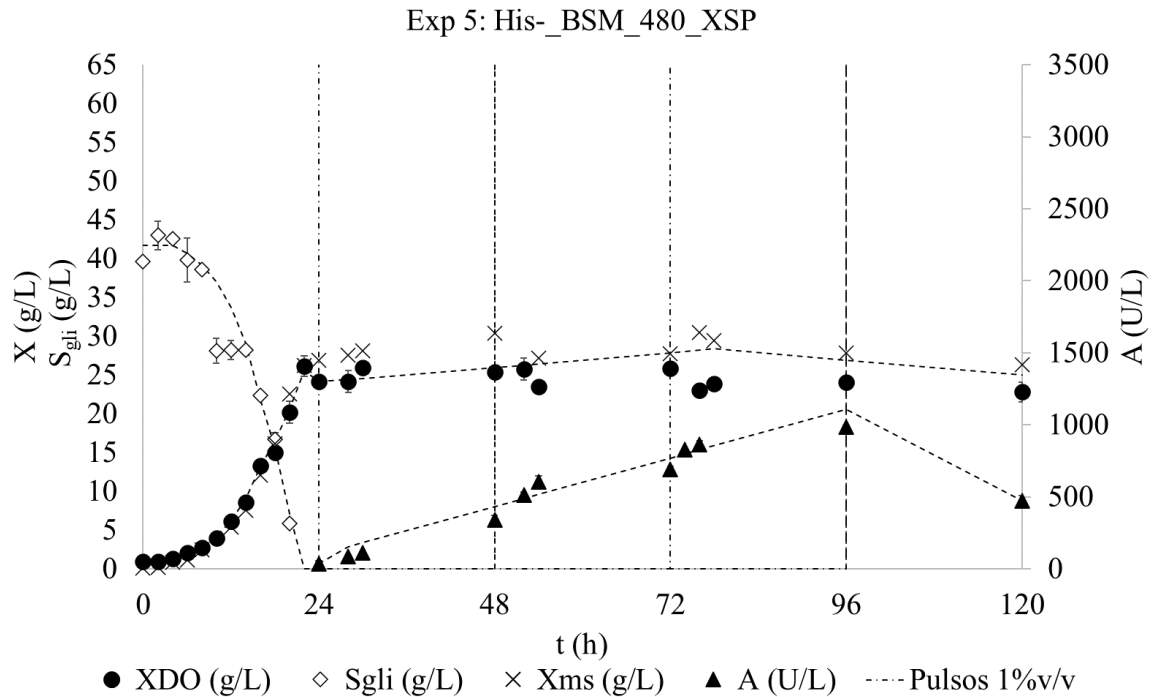
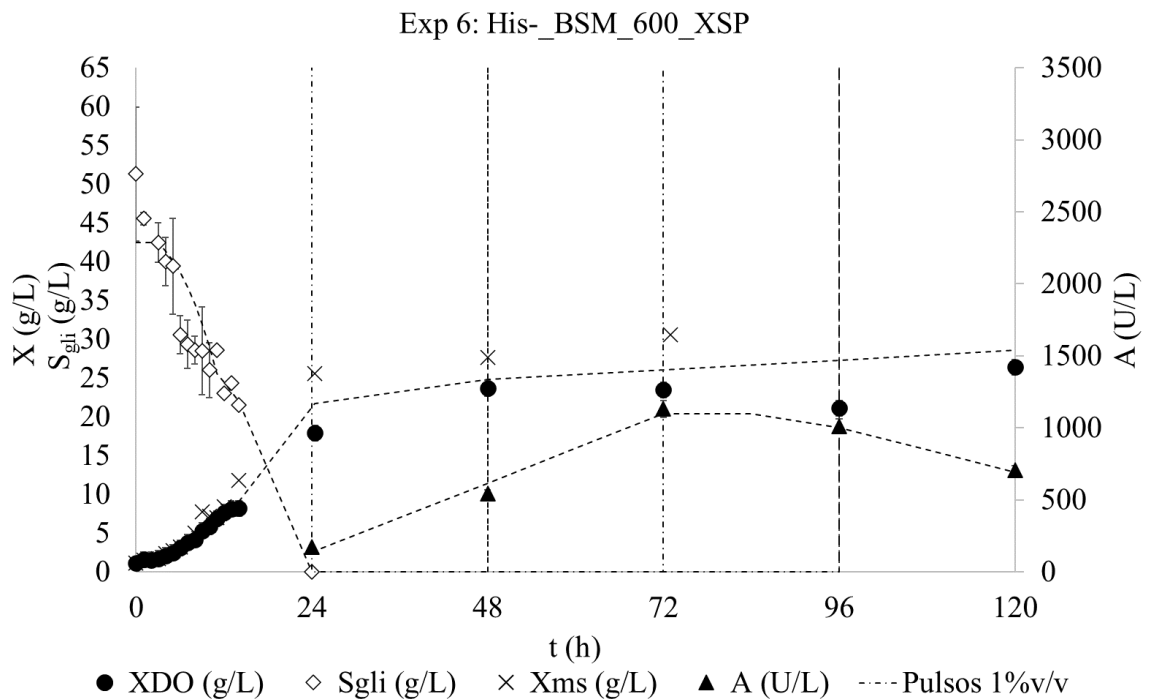


Gráfico 5. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (XDO, g/L) e secagem (XMS, g/L), de consumo de glicerol (Sglic, g/L) e de formação de asparaginase (A, U/L) no experimento 6 com a cepa His- meio BSM adicionado de 600 mg/L de histidina iniciado com batelada de glicerol e indução com 10 mL de solução de metanol + 12 mLPTM1/L a cada 24 horas a partir de 24 horas de cultivo. Os desvios são de duplicatas analíticas. Demais condições de cultivo: 30oC, pH 5,0 e pO₂ > 20% com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm.



Os valores de velocidade específica de crescimento máxima e conversão de glicerol a células, apresentados na Tabela 10, estão de acordo com a literatura, de 0,17 a 0,26 h⁻¹ e 0,27 a 0,77 g_{biomassa seca}/g_{glicerol}, respectivamente (COS et al., 2005a; GURRAMKONDA et al., 2009; MAURER et al., 2006; RODRIGUES et al., 2019; VALERO, 2013). Adicionalmente, nota-se que o cálculo da velocidade específica pelo consumo de CO₂ é um método acurado e pode ser utilizado para obter esse parâmetro de forma *online* sem necessidade de amostragem e que as velocidades específicas de consumo de oxigênio obtidas pelo método dinâmico são parecidas nas duas condições.

Tabela 10. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada com 4%_{v/v} glicerol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His⁻. Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} máx (g/L)	μ _{máx} (1/h)	μ _{máx} CO ₂ (1/h)	Y _{X/S} (g _{biomassa seca} /g _{glicerol})	Prot _{final} (g/L)	qO ₂ exp (mgO ₂ /g _{biomassa seca} /h)
5 His ⁻ BSM_480	24,1±0,4	0,19	0,19	0,56±0,00	1,50±0,05	28,3
6 His ⁻ BSM_600	21,7±5,4*	0,18	0,17	0,42±0,11	1,50±0,03	27,3

*Considerando a média entre X_{DO} e X_{MS}

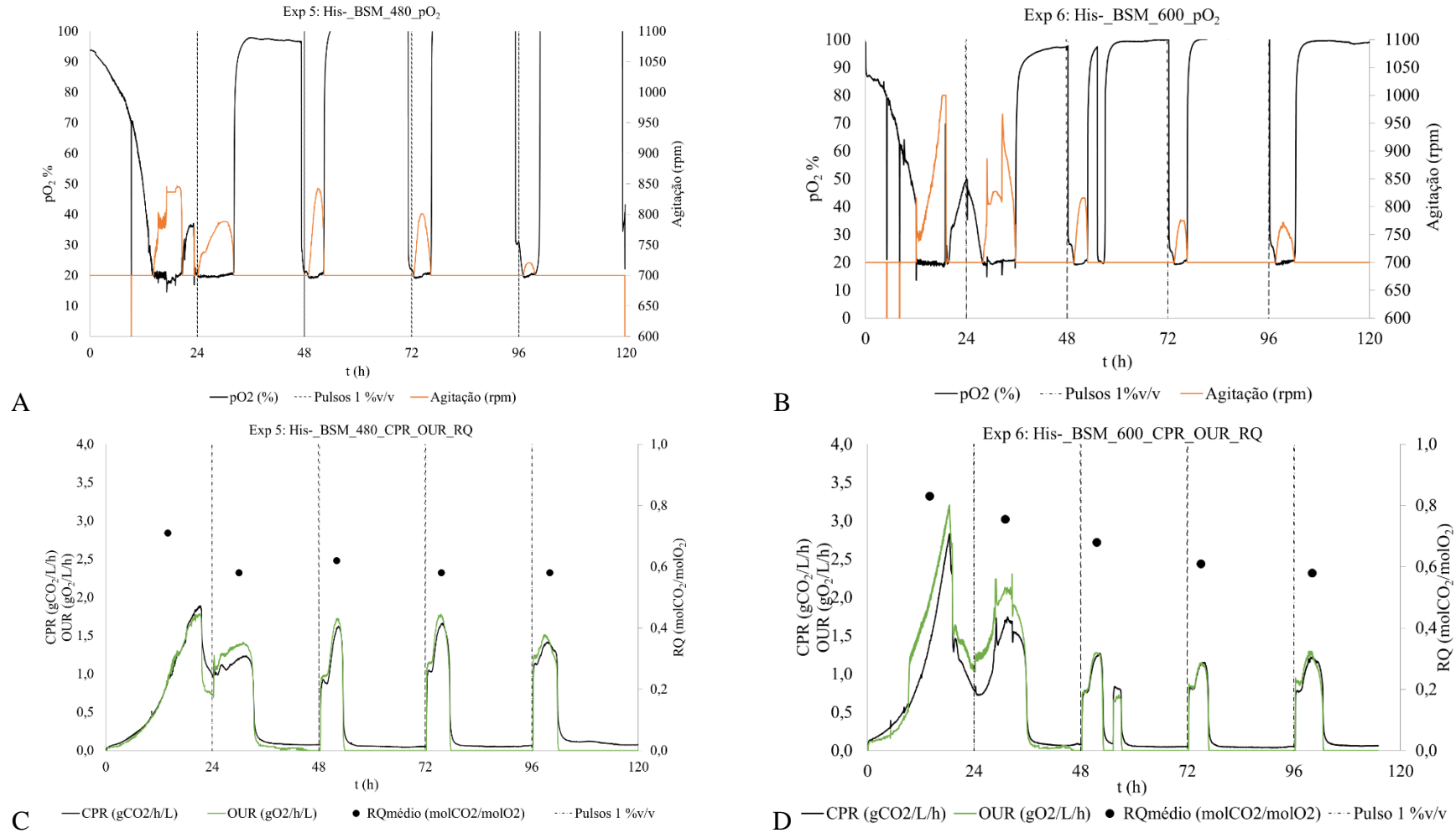
Na fase indução, observou-se no início uma redução da população e praticamente não há crescimento. A velocidade específica de crescimento foi calculada pelo método de ln(V_{base}) e o valor está de acordo com cepas Mut^S, abaixo de 0,02 h⁻¹ (COS et al., 2005a), portanto confirmando que a transformação ocorreu no gene AOX1 como previsto. O crescimento muito inferior em metanol do que em glicerol está relacionado a dois fenômenos: uso da fonte de carbono para a produção da proteína recombinante, e direcionamento do metanol principalmente para o fluxo de dissipação de energia como sugerido por Vanz *et al.* (2012). Os principais parâmetros cinéticos da fase de indução são apresentados na Tabela 11.

Para cálculo da velocidade específica de consumo de metanol foi considerada a concentração teórica de 8 g_{metanol}/L por pulso (10 mL), e a concentração celular média durante o período de consumo de cada pulso demarcado pelo perfil de CPR, assumindo que ao fim do consumo de metanol a velocidade de produção de CO₂ é próxima de zero. Os valores de q_S também estão de acordo com cepas Mut^S reportados na literatura, entre 0,02 e 0,07 g_{MetOH}/g_{biomassa seca}/h (COS et al., 2005a; DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, 2011). Os valores de q_S máximo para cada condição de cultivos são apresentados na Tabela 11. Observa-se que

após cada pulso o consumo é imediato, com aumento da velocidade de agitação para manter $pO_2 > 20\%$ e aumento tanto da CPR quanto da OUR, como mostram o Gráfico 6 de A-D.

No primeiro pulso, a CPR máxima é atingida com 7 horas para o cultivo BSM_480, $1,2 \text{ g}_{CO_2}/\text{L}/\text{h}$, e com 5 horas para o BSM_600, $1,7 \text{ g}_{CO_2}/\text{L}/\text{h}$. De acordo com Dietzsch et al. (2011), esse pode ser considerado o período necessário para adaptação das células ao novo substrato. Além disso, os valores estão de acordo com os de cepas Mut^S recombinantes, e os autores justificam que o longo período de adaptação é um indício da sobrecarga metabólica que as cepas apresentam. Sobretudo, o cultivo com menor concentração de histidina, que apresentou maior tempo de adaptação, também estava com sua biossíntese prejudicada, como pode ser observado pelo crescimento baixo e menor produção de proteínas, além de maiores CPR do que no BSM_600, indicando que o carbono foi direcionado para a via disseminação como forma de se obter mais energia para a manutenção celular. Já os valores de RQ para os pulsos variaram entre 0,58 e 0,78 $\text{molCO}_2/\text{molO}_2$ próximo ao valor teórico para metanol de $0,66 \text{ molCO}_2/\text{molO}_2$.

Gráfico 6. Demais parâmetros para os cultivos com cepa His⁻: controle do oxigênio dissolvido (pO₂,%) com cascata da agitação (rpm) para o cultivo BSM_480 (A) e BSM_600 (B); perfis da velocidade de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h) e de formação de dióxido de carbono (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ, molCO₂/molO₂) para o cultivo BSM_480 (C) e BSM_600 (D).



Para cálculo da velocidade de formação de ASNase foi considerada uma regressão linear de 24 a 96 h para BSM_480 e de 24 a 72 h para BSM_600 e foi adotada a concentração celular média nesse período, resultando em q_p de $0,57 \pm 0,02$ U/g_{biomassa seca}/h e $0,87 \pm 0,15$ U/g_{biomassa seca}/h, respectivamente. Após esses períodos, foi observada a redução da atividade. Em relação à atividade volumétrica máxima, atividade em relação à biomassa e concentração final de proteínas, como mostrado na Tabela 11, elas foram maiores no cultivo BSM_600 do que no BSM_480. Portanto, a maior quantidade de histidina pode ter beneficiado a produção recombinante, já que a histidina é precursora de outros amino ácidos importantes para a formação de ASNase.

Tabela 11. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a fase de indução com metanol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His- realizada com pulsos de 10 mL de solução indutora a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo. Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	$X_{Dofinal}$ (g/L)	$\mu_{máxbase}$ (1/h)	$Q_{Smáx}$ (g _{MetOH} / g _{biomassa seca} /h)	$Q_{pmédio}$ (U/g _{biomassa} seca/h)	$Prot_{final}$ (g/L)	$A_{máx}$ (U/L)	$A_{Xmáx}$ (U/ g _{biomassa sec})
5 His- BSM_480	22,8±1,3	0,003	0,05	0,57±0,07	1,94±0,04	990±10	41±1
6 His- BSM_600	26,4	0,003	0,06	0,87±0,15	2,30±0,05	1130±60	48±2

A queda na atividade em produção de *P. pastoris* já foi reportada na literatura, principalmente, devido à atividade proteolítica. Portanto, a fim de se investigar a causa da redução da atividade foram feitas as quantificações de proteínas totais e de proteases.

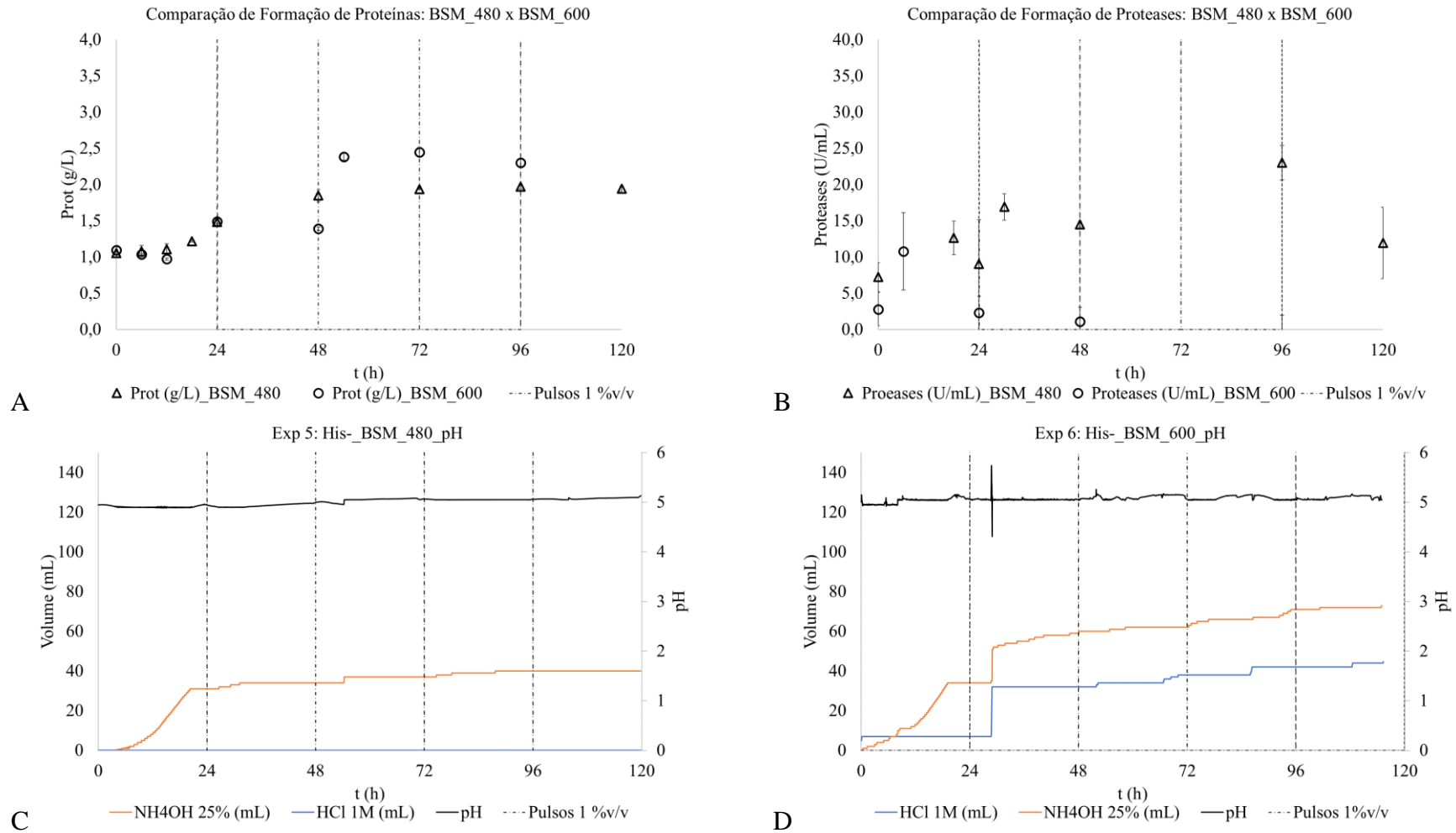
A concentração de proteínas, mostrada no Gráfico 7 A, apresentou perfil semelhante nos dois cultivos que foi acúmulo seguido de estabilização. Logo, a ausência de aumento significativo de biomassa e proteínas revelou que o fluxo metabólico que destina o carbono do metanol à disseminação de energia e produção de CO₂ deve ser o principal, resultado que está de acordo com a literatura (VANZ et al., 2012a). Em relação a proteases, o método da caseína sugere que há produção de proteases, apesar de que em alguns pontos não foi possível detectá-la, como mostra o Gráfico 7 B. Entretanto, este método não é inteiramente adequado, pois Kobayashi *et al.* (2000) observaram também em seu cultivo de *P. pastoris* que a atividade proteolítica era inexistente de acordo este método, mas, ao reduzirem o pH, a proteína recombinante foi degradada, confirmando que as proteases ainda estavam presentes.

Em especial no cultivo BSM_600 não foi detectada atividade proteolítica após 72 horas, mas a queda da atividade dá indícios que o método da caseína falhou. A queda antecipada em relação ao BSM_480 pode estar associada, por hipótese, à maior agitação no BSM_600 no início da indução e às oscilações do pH que resultaram em mais adição de ácido e base nesse cultivo, como mostra o

Gráfico 7 C e D. Já para o cultivo BSM_480 foi possível notar que o aumento da atividade proteolítica com 96 horas está relacionado com a queda acentuada da atividade da ASNase e redução da concentração celular.

Portanto, comparando os parâmetros cinéticos, concluiu-se que a concentração superior de histidina (600 mg/L) favoreceu a produção recombinante, mas não interveio no crescimento. No entanto, como a histidina pode se tornar um substrato limitante quando adotadas outras estratégias de controle, assim como pode interferir na biossíntese de outros compostos (PRONK, 2002) e manter a auxotrofia pode ser um empecilho à otimização do processo, nós decidimos por transformar uma nova cepa sem a auxotrofia para dar continuidade à pesquisa.

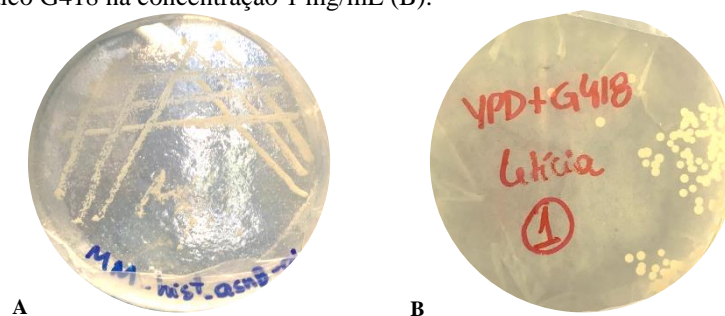
Gráfico 7. Demais dados dos cultivos com a cepa His: perfis de formação de proteínas (Prot, g/L) (A) e proteases (U/mL) (B) nos cultivos BSM_480 e BSM_600; controle do pH com adição de NH₄OH 25% (mL) e HCl 1 M (mL) para o cultivo BSM_480 (C) e BSM_600 (D). Os desvios são de duplicatas analíticas.



2.3.3. Experimento 7: Transformação da cepa His⁺

Seguindo o protocolo descrito na seção 2.2, obteve-se um novo clone sem auxotrofia. Primeiramente, foram conferidos o crescimento em meio mínimo sem adição de histidina, as placas com as cepas His⁺ e His⁺ vazio apresentaram crescimento, provando que elas eram prototróficas. Em seguida, uma colônia de cada linhagem foi transferida para uma placa com meio YPD contendo o antibiótico G418 e, após dois dias, foram selecionadas colônias resistentes para formação dos bancos de trabalho. Por outro lado, a cepa “transformada” com água não formou colônias nesse meio. As placas da cepa His⁺ são representadas na Figura 8. Posteriormente, foi realizada a análise de qPCR que revelou que o gene *ansB* estava presente na His⁺ e com frequência duas vezes superior à cepa His⁻.

Figura 8. Placas com a cepa His⁺ após a transformação para confirmar ausência de auxotrofia para histidina (A) e resistência ao antibiótico G418 na concentração 1 mg/mL (B).



Fonte: Foto tirada pela autora.

2.3.4. Experimento 8: comparação de cepas em frascos com meio complexo

Com o objetivo de avaliar os efeitos da transformação entre as cepas recombinantes produtoras e a controle em comparação com a cepa selvagem foram realizados cultivos em frascos em meio complexo com indução a cada 24h com 1 mL de metanol. As formações de biomassa e de produto são apresentadas nos gráficos 8 e 9.

Gráfico 8. Comparação da concentração celular estimada por densidade óptica (X_{DO} , g/L) ao longo do tempo (t) em frascos com meio complexo de cultivos de quatro cepas: His⁺, His⁻, His⁺ vazio e Selvagem. Foram realizadas triplicatas biológicas.

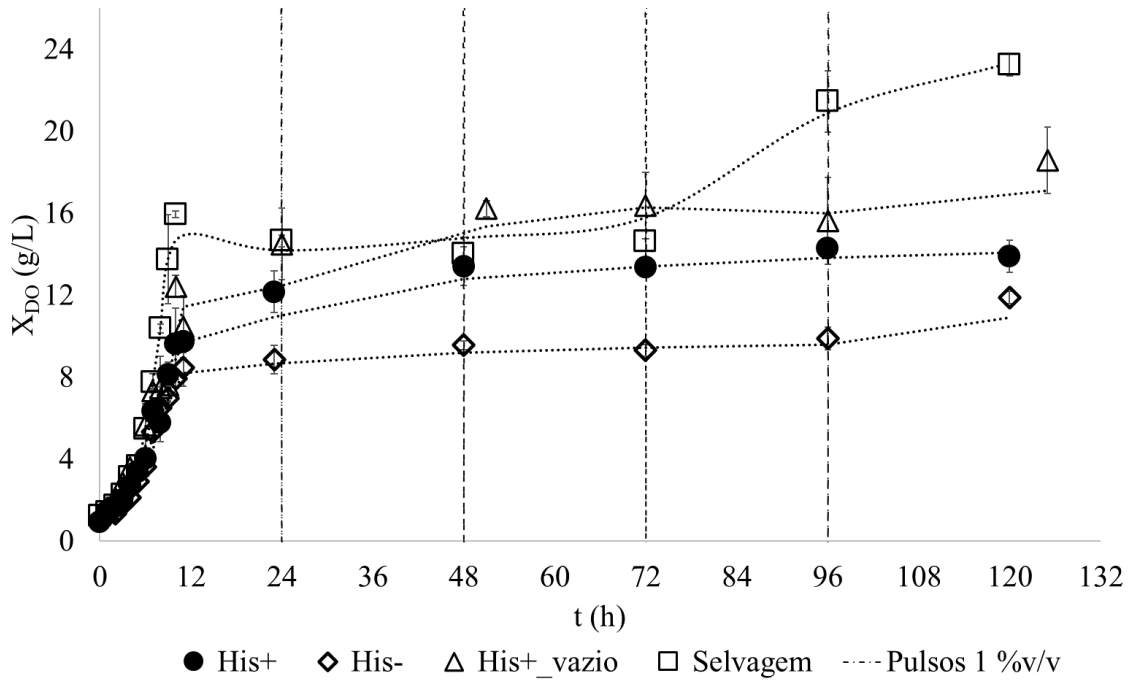
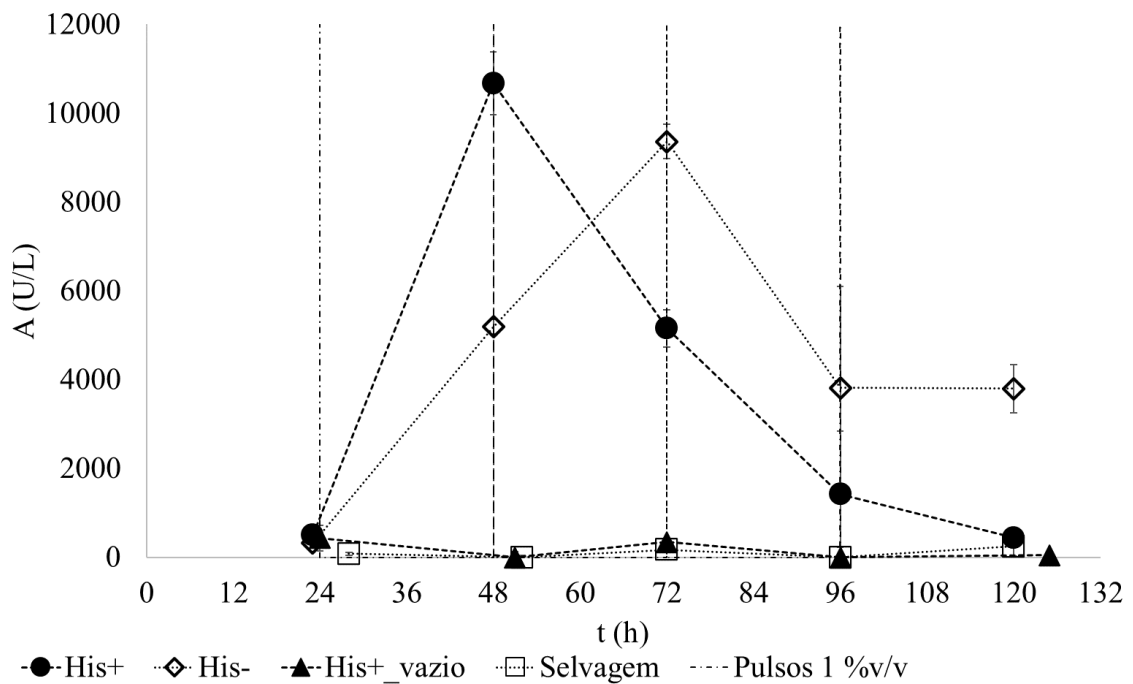


Gráfico 9. Comparação da atividade de ASNase (U/L) ao longo do tempo (t) em frascos com meio complexo de cultivos de quatro cepas: His⁺, His⁻, His⁺ vazio e Selvagem. Foram realizadas triplicatas biológicas.



Em relação à biomassa, observou-se que a cepa Selvagem apresentou concentração celular máxima significativamente maior que as demais (teste de Tukey, α 0,05) seguida da cepa His⁺_vazio (controle). Portanto, concluiu-se que a transformação resultou em sobrecarga metabólica para as cepas produtoras. A cepa His⁻ cresceu ligeiramente menos que a His⁺ principalmente durante a indução, já que as velocidades de crescimento em glicerol foram iguais. Essa diferença foi causada provavelmente pelo maior gasto metabólico devido à auxotrofia já que a suplementação do meio não substitui a complementação genética como já reportado na literatura (PRONK, 2002). O crescimento celular reduzido das cepas prototróficas em relação à selvagem confirmou que elas também possuem fenótipo Mut^S. As concentrações celulares máximas são apresentadas na Tabela 12.

Quanto à atividade, a His⁺ forneceu a maior atividade em menor tempo de cultivo (48h), enquanto a atividade máxima da His⁻ foi 12% menor e foi atingida com 72h de cultivo, apresentadas na Tabela 12. Os valores mais altos obtidos em meio complexo do que nos experimentos anteriores reforçam as hipóteses que o meio sintético apresenta uma limitação de fontes de carbono e nitrogênio para a expressão recombinante assim como a proteína-alvo está mais sujeita à atividade proteolítica. Resultados similares foram observados por Kobayashi et al. (2000) que obtiveram cerca de 10 vezes mais albumina humana recombinante produzida por *P. pastoris* em meio complexo do que em sintético. Mesmo assim, notou-se a queda da atividade, portanto as condições de indução precisam ser aprimoradas para reduzir o efeito de proteases. Apesar disso, as atividades obtidas foram superiores às já publicadas na literatura, T. C. Nguyen et al. (2014) obtiveram 1800 U/L com uma linhagem X33 expressando ErAII e Sajitha et al. (2015) alcançaram 2500 U/L com *Pichia pink*[®] expressando EcAII. Logo, essas cepas, em especial a His⁺, são promissoras como plataforma de produção de ErAII.

Tabela 12. Comparação das quatro cepas em relação à velocidade específica de crescimento máximo em glicerol ($\mu_{\text{máx}}$, h⁻¹), concentração celular estimada por densidade óptica ao fim do ensaio (X_{DOfinal} , g/L) e atividade volumétrica máxima ($A_{\text{máx}}$, U/L) em frascos com meio complexo e indução feita por pulsos com 1 mL de metanol a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo. Foram realizadas triplicatas biológicas.

Cepa	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	X_{DOfinal} (g/L)	$A_{\text{máx}}$ (U/L)
His ⁻	0,27±0,01	11,9±0,3	9400±400
His ⁺	0,25±0,02	13,9±0,8	10700±700
His ⁺ _vazio	0,24±0,02	18,6±1,6	430±290
Selvagem	0,30±0,02	23,2±0,5	240±220

2.3.5. Experimento 9: cepa His⁺ cultivada em meio BSM em biorreator

Após a familiarização com a nova cepa, com a realização de cultivo em frascos, foi executado um cultivo em biorreator nas condições apresentadas na Tabela 8. Brevemente, o cultivo se iniciou com batelada de glicerol 4%_{v/v}, até a exaustão, em seguida, houve um período sem alimentação de substratos, cerca de 5 horas, e a indução se iniciou às 24 h com pulsos de 10 mL de solução de indução (metanol + 12 mL_{PTM1}/L) a cada 24 h até 120 h de cultivo. As demais condições foram meio BSM sem adição de histidina, volume útil de 1L, 30 °C, 1 vvm, controle de pO₂ > 20% da saturação do ar com agitação entre 700 e 1000 rpm e controle de pH em 5,0 com alimentação de NH₄OH 25%_{v/v} e HCl 1M.

Analisando os parâmetros cinéticos durante o crescimento em glicerol, como apresenta a Tabela 13, concluiu-se que a nova cepa se comportou de forma semelhante à cepa auxotrófica e de acordo com dados da literatura. Já na fase de indução foram observadas algumas mudanças, no primeiro dia, a cepa prototrófica apresentou velocidades de crescimento e de formação de produto superiores às demais condições, no entanto, nos demais dias foi inferior como mostra a Tabela 14. Mesmo assim, as atividades máximas volumétricas e específicas para a biomassa foram significativamente maiores do que no experimento BSM_600, melhor condição para a produção na cepa His⁻. Os perfis de crescimento, consumo de substratos e formação de ASNase estão no Gráfico 10.

Tabela 13. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada com 4%_{v/v} glicerol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His⁻ e em meio BSM sem adição de histidina (BSM_0) com a cepa His⁺. Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} máx (g/L)	μ _{máx} (1/h)	μ _{máxCO2} (1/h)	Y _{X/S} (g _{biomassa seca} /g _{glicerol})	Prof _{final} (g/L)	q _{O2exp} (mgO ₂ /g _{biomassa seca} /h)
5 His ⁻ BSM_480	24,1±0,4	0,19	0,19	0,56±0,00	1,50±0,05	28,3
6 His ⁻ BSM_600	21,7±5,4*	0,18	0,17	0,42±0,11	1,50±0,03	27,3
9 His ⁺ BSM_0	23,8±1,6	0,19	0,15	0,62±0,04	1,50±0,01	30,16

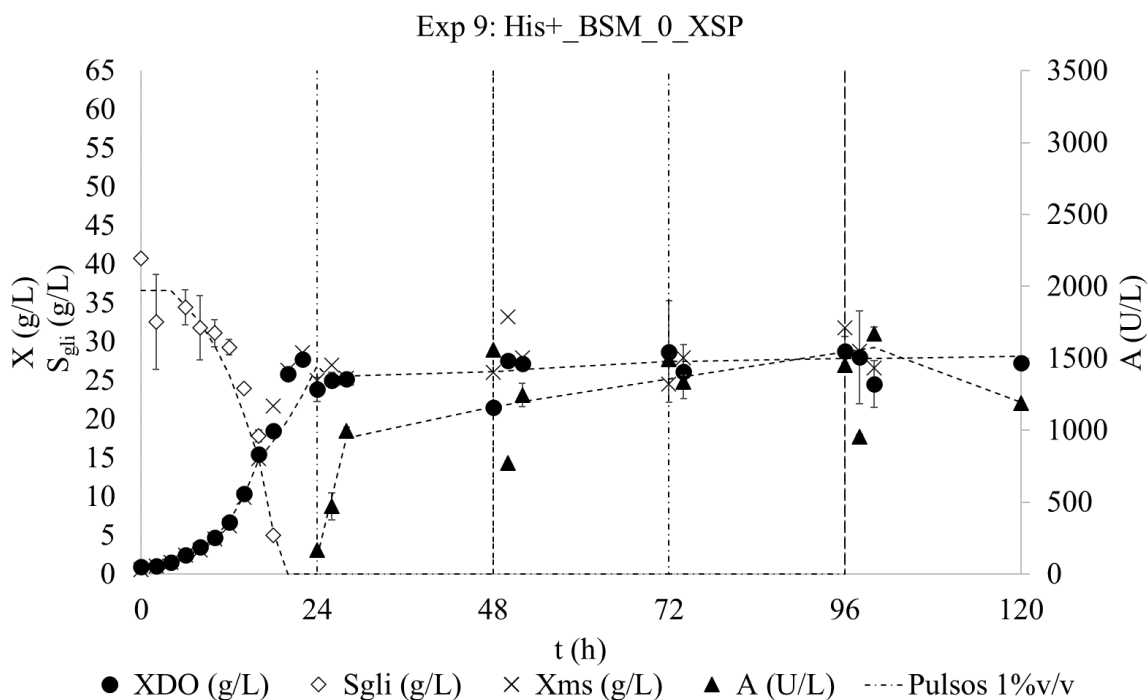
*Considerando a média entre X_{DO} e X_{MS}

Tabela 14. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a fase de indução com metanol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His⁻ e em meio BSM sem adição de histidina (BSM_0) com a cepa His⁺ realizada com pulsos de 10 mL de solução indutora a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo. Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} final (g/L)	μ _{máx} base (1/h)	q _S máx (g _{MetOH} /g _{biomassa seca} /h)	q _P médio (U/g _{biomassa seca} /h)	Prot _{final} (g/L)	A _{máx} (U/L)	A _x máx (U/g _{biomassa sec})
5 His ⁻ BSM_480	22,8±1,3	0,003	0,05	0,57±0,07	1,94±0,04	990±10	41±1
6 His ⁻ BSM_600	26,4	0,003	0,06	0,87±0,15	2,30±0,05	1130±60	48±2
9 His ⁺ BSM_0	27,3±0,85	0,007* 0,001**	0,07	8,38±1,50* 0,30±0,08**	1,85±0,06	1600±45	57±8

* De 24 a 30 horas; ** De 30 a 100 horas.

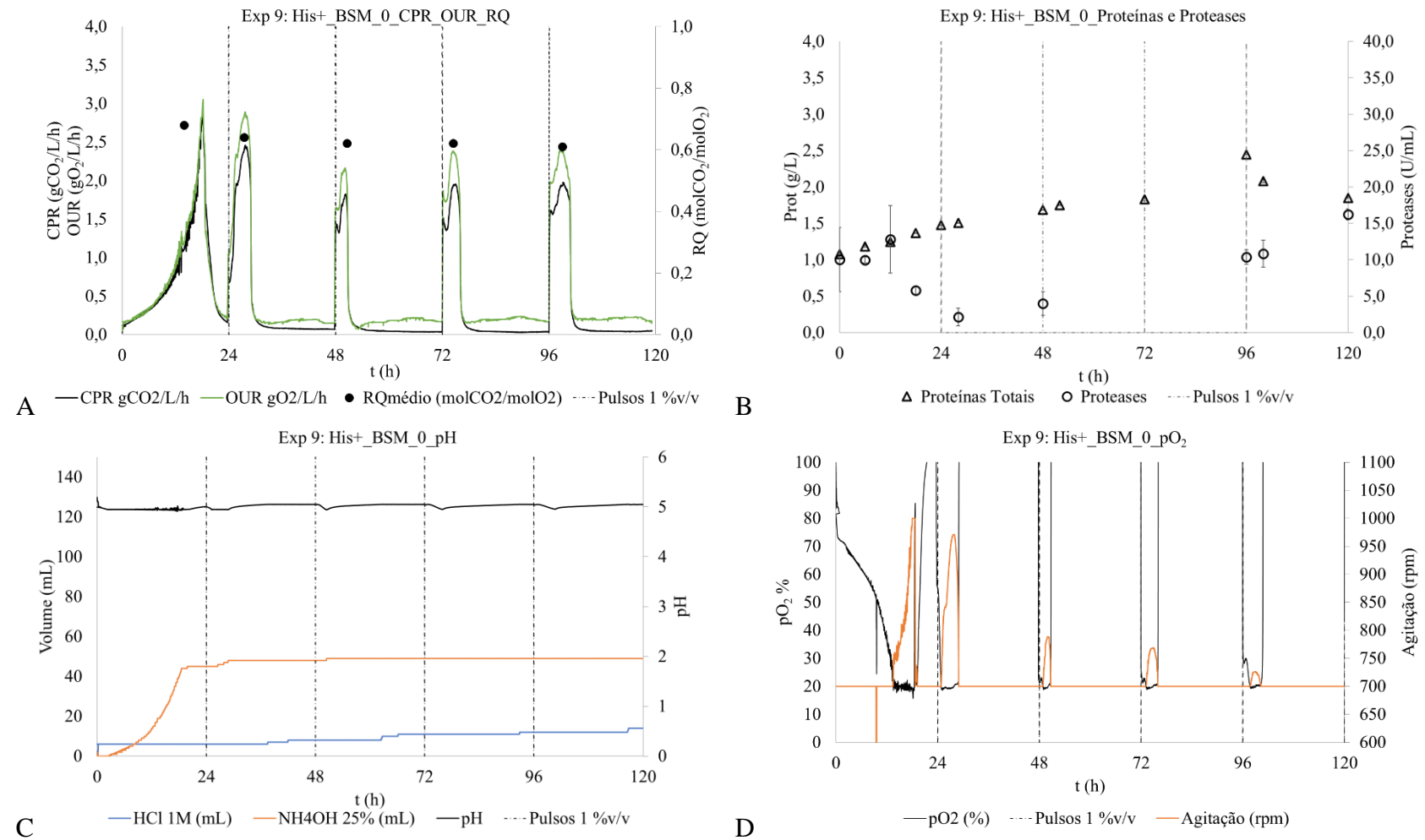
Gráfico 10. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (X_{DO}, g/L) e secagem (X_{MS}, g/L), de consumo de glicerol (S_{gli}, g/L) e de formação de asparaginase (A, U/L) no experimento 9 com a cepa His⁺ em meio BSM sem histidina iniciado com batelada de glicerol e indução com 10 mL de solução de metanol + 12 mL LPTM1/L a cada 24 horas a partir de 24 horas de cultivo. Os desvios são de duplicatas analíticas. Demais condições de cultivo: 30°C, pH 5,0 e pO₂ > 20% com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm.



No primeiro pulso, a CPR máxima foi atingida com 3 horas, 2,45 gCO₂/L/h, portanto essa cepa teve adaptação mais rápida ao metanol do que a His⁻, e o coeficiente respiratório médio em cada pulso, entre 0,61 e 0,64 molCO₂/molO₂, próximo ao teórico (0,67 molCO₂/molO₂, conforme item 2.2.4.2) indica que o metabolismo oxidativo do metanol estava próximo ao máximo, como mostra o Gráfico 11 A. Novamente, o CO₂ foi a principal via de destino do

carbono, já que há baixo crescimento celular e produção de proteínas. Em relação à produção de ASNase, observou-se que o aumento da atividade proteolítica a partir de 96 h de cultivo está relacionado com a queda tanto na atividade quanto na concentração de proteínas totais, como mostra o Gráfico 11 B. Portanto, apesar das melhorias na formação de ASNase, a fase de indução precisava ser aprimorada já que cultivos semelhantes reportados na literatura alcançaram atividades maiores, por exemplo, D. Rodrigues et al. (2019) obtiveram 3300 U/L de ASNase de *S. cerevisiae* produzida por *P. pastoris* com indução com alimentação constante de metanol.

Gráfico 11. Demais dados para os cultivos com cepa His+ em meio BSM sem adição de histidina (BSM_0): perfis da velocidade de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h) e de formação de dióxido de carbono (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ, molCO₂/molO₂) (A); perfis de formação de proteínas (Prot, g/L) e proteases (U/mL) (B); controle do pH com adição de NH₄OH 25% (mL) e HCl 1 M (mL) (C); controle do oxigênio dissolvido (pO₂,%) com cascata da agitação (rpm) (D). Os desvios são de duplicatas analíticas.



2.3.6. Experimento 10: cepa His⁺ cultivada em meio BSM com indução por meio de *DO-stat* em biorreator

Com o objetivo de aprimorar a indução da cepa prototrófica, foi realizada indução por meio de *DO-stat*. Nessa técnica, a concentração de oxigênio dissolvido é mantida próxima de um *set-point* controlando a vazão de alimentação de substrato de modo que, quando há substrato no meio, as células consomem oxigênio para sua oxidação, reduzindo a concentração de oxigênio dissolvido e assim que ela atinge o valor mínimo definido, a alimentação do substrato é interrompida. Dessa forma, o consumo de oxigênio é reduzido, aumentando sua concentração acima do limite superior estabelecido e, conseqüentemente, reativando a alimentação do substrato em um novo ciclo. Neste caso, como o indutor também funciona como fonte de carbono, a alimentação de metanol foi posta em cascata com a concentração de oxigênio dissolvido.

Brevemente, o cultivo foi iniciado com batelada de glicerol 4%_{v/v} até exaustão, após cerca de 5 horas sem alimentação de qualquer fonte de carbono, a indução se iniciou às 24 h com um pulso de 10 mL de solução de indução (metanol + 12 mL_{PTMI}/L) para adaptação celular ao novo substrato. Por volta de 30 horas de cultivo, a estratégia de indução foi iniciada com controle da alimentação da solução de indução para manter pO₂ em 20% da saturação com ar. O pH foi mantido em 5, temperatura em 30 °C, aeração em 1 vvm, velocidade de agitação entre 700 e 1000 rpm para manter pO₂ > 20% durante o crescimento em glicerol e mantida em 1000 rpm durante a indução.

Durante a fase de crescimento em glicerol, foram observados parâmetros cinéticos compatíveis com os cultivos anteriores e com a literatura, como mostra a Tabela 15. Os perfis de crescimento, consumo de substrato e formação de produto são apresentados no Gráfico 12. Já na indução, foi observado comportamento bem distinto das demais condições, com aumento significativo da biomassa, da formação de proteínas e de atividade máxima volumétrica de aproximadamente o dobro em relação à estratégia em pulsos (experimento 9, BSM_0). Os principais parâmetros cinéticos para a fase de indução são apresentados na Tabela 16.

Tabela 15. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada com 4%_{v/v} glicerol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His⁻ e em meio BSM sem adição de histidina (BSM_0) com a cepa His⁺ com indução por pulsos (BSM_0) e por *DO-stat* (BSM_0_*DO-stat*). Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} máx (g/L)	μ _{máx} (1/h)	μ _{máxCO2} (1/h)	Y _{X/S} (g _{biomassa seca} /g _{glicerol})	Prot _{final} (g/L)	q _{O2exp} (mg _{O2} /g _{biomassa seca} /h)
5 His ⁻ BSM_480	24,1±0,4	0,19	0,19	0,56±0,00	1,50±0,05	28,3
6 His ⁻ BSM_600	21,7±5,4*	0,18	0,17	0,42±0,11	1,50±0,03	27,3
9 His ⁺ BSM_0	23,8±1,6	0,19	0,15	0,62±0,04	1,50±0,01	30,2
10 His ⁺ BSM_0_ <i>DO-stat</i>	30,3±1,6	0,19	0,19	0,74±0,04	1,59±0,18	-

*Considerando a média entre X_{DO} e X_{MS}

Gráfico 12. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (X_{DO}, g/L) e secagem (X_{MS}, g/L), de consumo de glicerol (S_{gli}, g/L), de alimentação de metanol medido por balança (M_{met}, g), e de formação de asparaginase (A, U/L) no experimento 10 com a cepa His⁺ em meio BSM sem histidina iniciado com batelada de glicerol e indução com um pulso de 10 mL de solução de metanol + 12 mL_{PTM1}/L seguido de *DO-stat* com pO₂ em 20% da saturação com ar. Os desvios são de duplicatas analíticas. Demais condições de cultivo: 30°C, pH 5,0, agitação entre 700 e 1000 rpm.

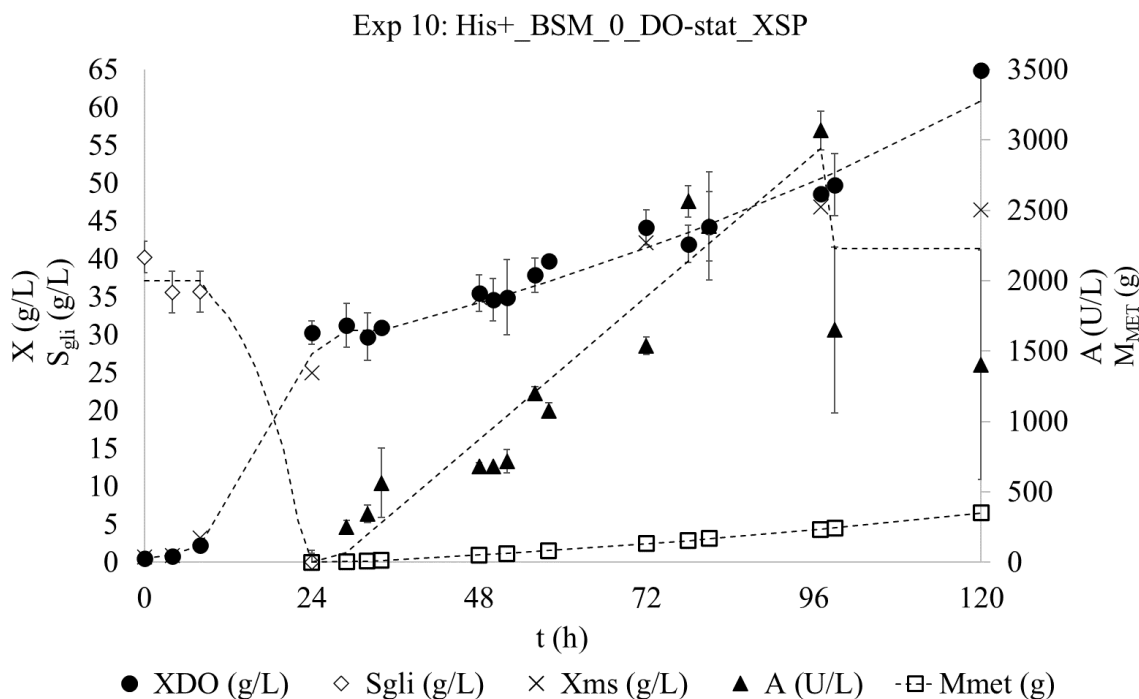


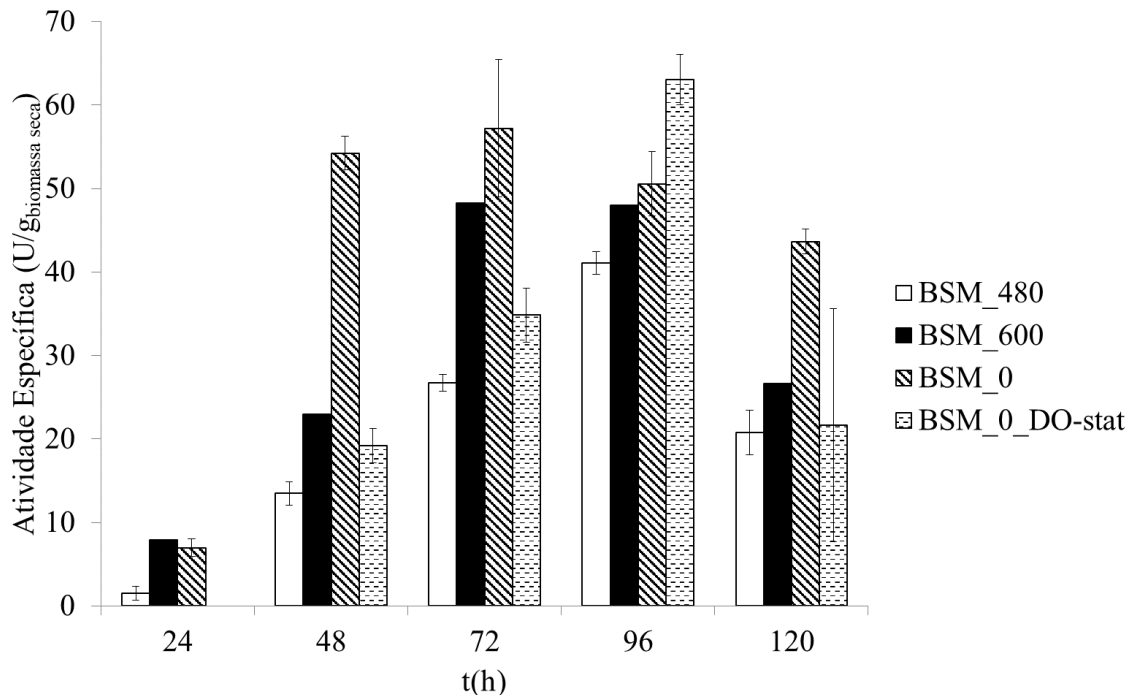
Tabela 16. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a fase de indução com metanol em meio BSM contendo 480 mg/L (BSM_480) e 600 mg/L de histidina (BSM_600) com a cepa His⁻ e em meio BSM sem adição de histidina com a cepa His⁺ realizada com pulsos de 10 mL de solução indutora a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo (BSM_0) e com indução por *DO-stat* (BSM_0_*DO-stat*). Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} final (g/L)	μ _{máx} base (1/h)	μ _{máx} (1/h)	Q _S máx (g _{MetOH} /g _{biomassa seca} /h)	Q _p médio (U/g _{biomassa seca} /h)	Prot _{final} (g/L)	A _{máx} (U/L)	A _X máx (U/g _{biomassa seca})
5 His ⁻ BSM_480	22,8±1,3	0,003	-	0,05	0,57±0,07	1,94±0,04	990±10	41±1
6 His ⁻ BSM_600	26,4	0,003	-	0,06	0,87±0,15	2,30±0,05	1130±60	48±2
9 His ⁺ BSM_0	27,3±0,85	0,007* 0,001**	-	0,07	8,38±1,50* 0,30±0,08 **	1,85±0,06	1600±45	57±8
10 His ⁺ BSM_0_ <i>DO-stat</i>	64,9±4,1	0,012	0,008	0,05 ***	0,82±0,03 ***	4,50±0,11	3000±140	63±3

* De 24 a 30 horas; ** De 30 a 100 horas; *** Valores médios.

Resultados semelhantes foram observados por Lim et al. (2003), que alcançaram 40% de aumento na atividade volumétrica de r-Guamerina por *P. pastoris* cultivadas em *DO-stat* quando comparada com alimentação de metanol manual. Assim como Ponte et al. (2016) obtiveram incremento de 30% na atividade final de lipase de *Rhizopus oryzae* produzida por *P. pastoris* usando *DO-stat* em comparação com o mesmo perfil de alimentação de metanol sem o controle do oxigênio. Os autores notaram que, em um ambiente totalmente oxigenado, o metanol pode ser completamente oxidado a formaldeído, prevenindo seu acúmulo e de outros subprodutos tóxicos para a célula. Da mesma forma nesse experimento, o aumento de biomassa e de produto indicou que o controle mútuo de oxigênio e metanol foi benéfico para a produção de ASNase também, já que apesar de 7x mais metanol ter sido alimentado em relação aos pulsos, não foi observada inibição ao crescimento celular. Apesar dessas melhorias, a atividade da ASNase reduziu após 96 horas de cultivo, provavelmente por ação de proteases, que não foi medida nesse cultivo, e a atividade por biomassa não aumentou, como mostra o Gráfico 13. Portanto, ainda são necessários avanços nas condições de indução.

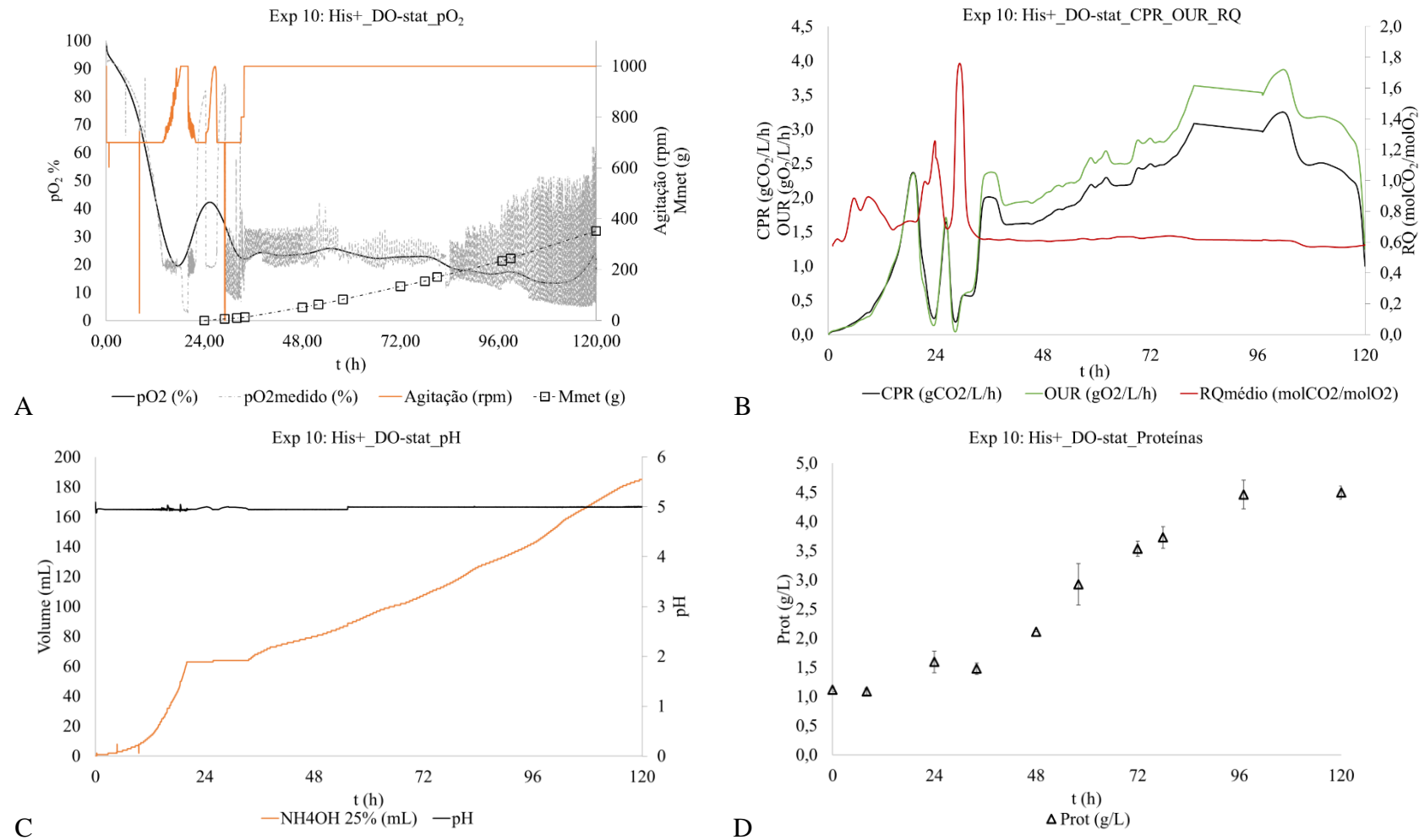
Gráfico 13. Comparação da atividade em relação à biomassa ($U/g_{\text{biomassa seca}}$) nos diferentes experimentos. Foi observada diferença estatística entre as cepas, sendo que a His⁺ apresentou mais atividade por biomassa do que a His⁻, no entanto, não foi observada diferença significativa entre as estratégias de indução por pulsos (BSM_0, experimento 9) e por *DO-stat* (BSM_0_*DO-stat*, experimento 10) com cepa His⁺. Os desvios são de duplicatas analíticas.



Nesse cultivo, o tempo de adaptação foi cerca de 2 horas com CPR máxima de 1,63 $g_{CO_2}/L/h$, novamente a adaptação foi mais rápida do que da célula His⁻. Além disso, o coeficiente respiratório (RQ) foi mantido em $0,61 \pm 0,03 \text{ mol}_{CO_2}/\text{mol}_{O_2}$, esse valor próximo ao teórico para metanol (0,67) confirmou que o metabolismo oxidativo do metanol ocorreu em altas taxas, o que resultou nas melhorias do processo. Os parâmetros respiratórios e as demais condições de cultivo são apresentadas no Gráfico 14 A-D.

Apesar das melhorias, a estratégia de indução por *DO-stat* não é de simples execução, outros dois experimentos (dados não mostrados) foram realizados sem sucesso, em ambos não foi possível controlar o pO_2 e metanol foi alimentado até uma concentração tóxica, inibindo as células. Essa é uma das principais falhas desse método de indução, pois quando o metanol atinge um nível tóxico, as células param de o consumir e a concentração de oxigênio dissolvido aumenta. Consequentemente, a bomba de alimentação é acionada para manter o pO_2 em 20%, resultando em mais metanol no meio e morte celular. Por isso, é recomendável desacoplar a malha do metanol do oxigênio para controle mais robusto da produção e isso será explorado no próximo capítulo.

Gráfico 14. Demais parâmetros para os cultivos com cepa His+ em meio BSM sem adição de histidina com indução por *DO-stat* (BSM_0_*DO-stat*, experimento 10): controle do oxigênio dissolvido (pO_2 ,%) com cascata da agitação (rpm) e da alimentação de substrato (M_{met} , g) (A); perfis da velocidade de consumo de oxigênio (OUR, $gO_2/L/h$) e de formação de dióxido de carbono (CPR, $gCO_2/L/h$) e do coeficiente respiratório médio (RQ, $molCO_2/molO_2$) (B); controle do pH com adição de NH_4OH 25% (mL) (C); perfil de formação de proteínas (Prot, g/L) (D). Os desvios são de duplicatas analíticas.

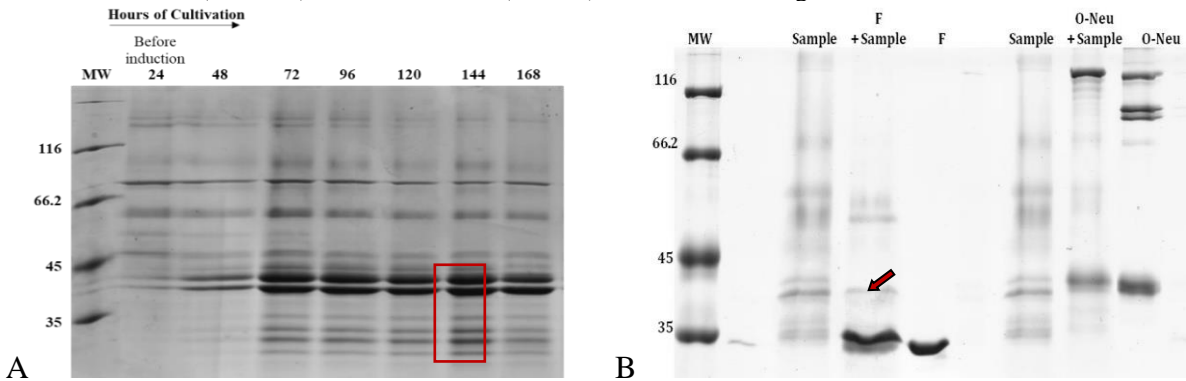


2.3.7. Experimento 11: Caracterização da ASNase extracelular

Várias bandas do gel SDS do cultivo His⁺ em frasco com meio complexo e indução por pulsos, mostrado na Figura 9 A, foram analisadas e o espectro de massa revelou que a erwinase completa estava presente nas duas bandas fortes entre 35 e 45 kDa. As bandas inferiores apresentaram a proteína truncada no N-terminal. Uma sequência (EAEA) não compatível com a erwinase foi identificada no N-terminal, isso provavelmente foi o resultado da clivagem imperfeita da sequência sinal do fator α que aconteceu no retículo endoplasmático (CEREGHINO; CREGG, 2000). Além disso, foram investigados dois potenciais locais de glicosilação, nas posições 49-72 (sequência peptídica LANVKGEQFSNMASENMTGD VVLK) e 169-178 (TNASTLDTFK), das duas bandas mais fortes. Foi possível identificar peptídeos em ambas as posições com os glicanos GlcNAc₂Man₅ e GlcNAc₂Man₆ e na forma não glicosilada. Assim, os diferentes graus de glicosilação justificam os diferentes tamanhos entre as bandas. Os resultados completos dessa análise são apresentados no Anexo C: Análise MALDI-TOF da ASNase glicosilada.

Este fato foi confirmado pelo teste de desglicosilação com PNGase F, como mostrado na Figura 9 B, que resultou em uma banda inferior única após o tratamento. Por outro lado, o teste de O-desglicosilação não provou a presença de O-glicanos. Portanto, foi demonstrado que as unidades da ASNase produzida apresentavam diferentes graus de N-glicosilação. Esses resultados estão de acordo com o padrão de glicosilação da ASNase produzida pela cepa auxotrófica publicada por Effer et al. (2020). Eles descobriram que Asn₆₄ e Asn₁₇₀ eram locais de N-glicosilação e detectaram GlcNAc₂Man₅, GlcNAc₂Man₆ e GlcNAc₂Man₇ nesses locais. Além disso, eles mostraram que o resíduo Asn₁₇₀ faz parte de um epítipo imunogênico de células-T relacionado à alergia a ASNase e que a glicosilação neste local reduziu significativamente o reconhecimento da ASNase por anticorpos em teste ELISA, formando uma espécie de escudo. Portanto, essa ASNase inovadora tem potencial de prover um tratamento menos imunogênico.

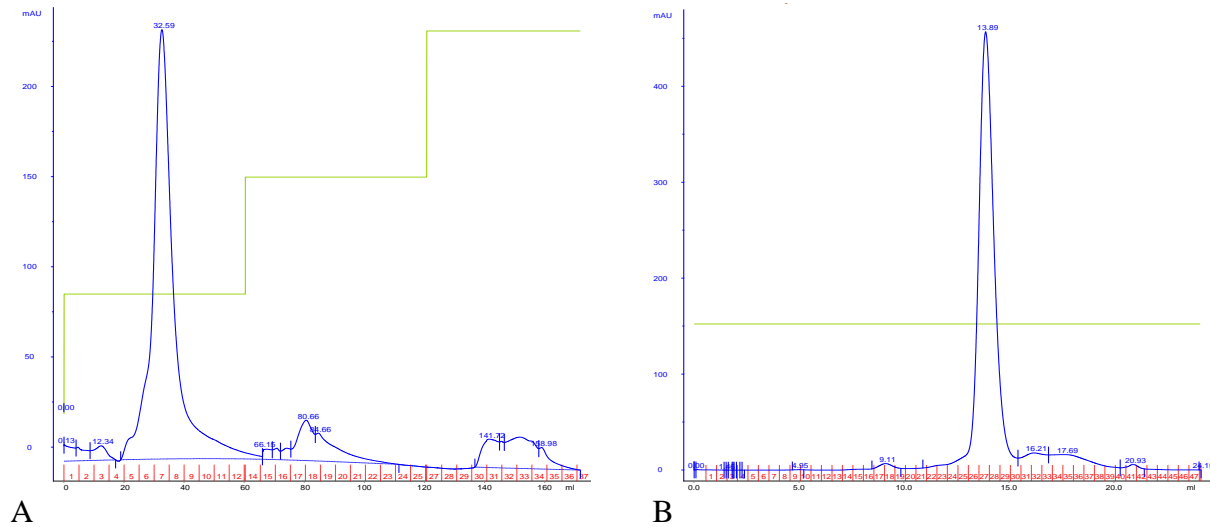
Figura 9. A) SDS-gel que foi usado para a análise MALDI-TOF MS (bandas destacadas em vermelho) de um cultivo em frasco da cepa prototrófica com meio complexo, a proteína completa é apresentada nas duas bandas mais fortes entre 35 e 45 kDa com diferentes níveis de glicosilação entre elas. B) SDS-gel do teste de desglicosilação, o tratamento com PNGase F (36 kDa) revelou a presença de N-glicanos, destacados com a seta vermelha; por outro lado, o teste com O-Glicosidase (147 kDa) e Neuraminidase (43 kDa) não confirmou O-glicanos.



Fonte: foto tirada pela autora.

O processo de *downstream* dessa ASNase foi desenvolvido pelo doutor Eduardo Krebs Kleingsinds. Foi realizada uma filtração tangencial com membrana de poliétersulfona (PES) de 10 kDa após centrifugação do meio de cultivo e, em seguida, uma diafiltração para retirada dos sais (KLEINGESINDS et al., 2019). O retentado contendo a ASNase foi carregado em uma coluna de troca catiônica, coluna SP HP (GE Healthcare, EUA), sendo possível obter um pico com alta resolução, como mostra a Figura 10 A. Posteriormente, a solução foi destinada à gel-filtração, SuperdexTM 200 (GE Healthcare), e o tempo de eluição revelou que a ASNase possui 160 kDa, portanto é sugerido que a formação tetramérica foi mantida, Figura 10 B. Em seguida, o doutor realizou análise em cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS/MS) e concluiu que os únicos contaminantes são provindos da preparação da amostra (tripsina e actina), portanto foi obtida uma proteína extremamente pura, que é um requisito para um biofármaco ser aprovado. Detalhes sobre o método podem ser obtidos em Kleingesinds et al. (2019).

Figura 10. Cromatogramas da ASNase recombinante: cromatografia de troca catiônica (A); cromatografia de exclusão de tamanho (gel filtração) (B). Figura retirada de Kleingesinds et al. (2021) com autorização do autor.



2.4. Discussão

Esse segundo capítulo foi dedicado a selecionar a linhagem produtora de ASNase mais adequada e estabelecer as primeiras condições de cultivo em biorreator de bancada. Primeiramente, duas cepas de *P. pastoris* Glycoswitch[®] SuperMan₅, uma auxotrófica (His^-) e outra prototrófica (His^+) para histidina foram transformadas com o plasmídeo pJAG-s1 contendo o gene *ansB* da bactéria *D. chrysanthemi* para expressão de L-asparaginase II (ErA II) extracelular. Sabe-se que a supressão da auxotrofia é utilizada como um biomarcador para a seleção de clones transformados, no entanto, esse mecanismo não foi utilizado e os clones foram mantidos auxotróficos. Ambas as linhagens foram selecionadas a partir da resistência ao antibiótico G418 em alta concentração (1 mg/mL). Em seguida, foi realizada análise qPCR que confirmou a integração do gene recombinante no genoma de ambas as cepas e expressão relativa da His^+ duas vezes maior que da His^- .

As cepas produtoras foram cultivadas em frascos com meio complexo em incubadora orbital e comparando seu comportamento cinético com dados da literatura foi possível confirmar que apresentam fenótipo Mut^S . Esse fato era esperado já que a integração do plasmídeo pJAG-s1 ocorre

com probabilidade de 90% no gene AOX1 (dados do fabricante), responsável pela codificação da maior parte das álcool oxidases que metabolizam o metanol. Além disso, comparando as produtoras com uma linhagem controle (His⁺_vazio) e a selvagem, foi observado menor crescimento revelando sobrecarga metabólica gerada pela produção recombinante. Em relação à produção de ASNase, a atividade volumétrica foi 10700±700 U/L com a cepa His⁺ e 9400±400 U/L com a cepa His⁻, com produtividade máxima duas vezes maior no cultivo da prototrófica. Portanto, esses resultados estão de acordo com o grau de expressão dado pela análise qPCR.

Para a viabilização do cultivo da His⁻ em meio sintético, foi analisada a adição de diferentes concentrações de histidina em cultivos em frasco. De acordo com a metodologia de Pronk (2002), baseada na composição teórica da *P. pastoris*, o valor mínimo seria de 290 mg_{histidina}/L, portanto foram estudados valores superiores para garantir o suprimento de todas as células. Os cultivos em frascos com análise estatística monovariada (teste t de Student, 95%) demonstraram que 480 mg_{histidina}/L resultou na maior concentração celular, por isso ela foi selecionada para o escalonamento. Além disso, como os demais níveis alcançaram populações finais estatisticamente iguais, a concentração de 600 mg_{histidina}/L também foi escolhida para o escalonamento sob a hipótese que o requerimento nutricional em biorreator seria maior.

Os cultivos para triagem da linhagem produtora em biorreator foram executados em três fases. Primeiramente, foi realizada uma batelada de glicerol visando ao crescimento celular por cerca de 19 horas (fim do período marcado pelo pico na concentração de oxigênio) e, em seguida, foi aguardado um período de transição, aproximadamente por 5 horas, sem alimentação de substratos. Apesar da *P. pastoris* ser considerada uma levedura Crabtree negativa, ela pode produzir pequenas quantidades de etanol mesmo em condições não limitantes de oxigênio, como já foi reportado na literatura (CHIRUVOLU et al., 1998; SAITUA et al., 2017; VANZ et al., 2012a). Nesse estudo, embora o oxigênio dissolvido tenha sido mantido acima de 20% da saturação com ar durante toda a fase de crescimento, foi padronizado o tempo de transição sem alimentação a fim de evitar repressão dos genes AOX causada pelo etanol.

Posteriormente, às 24 horas de cultivo, foi iniciada a indução com pulsos com a solução de indução (metanol com PTM1). A estratégia por pulsos é uma maneira rápida e fácil de se obter os

principais parâmetros cinéticos em metanol, como velocidade específica de consumo e tempo de adaptação ao novo substrato, que podem ser usados para o planejamento de experimentos mais complexos (DIETZSCH; SPADIUT; HERWIG, 2011). De fato, foi observado que esses parâmetros foram similares na estratégia de pulsos e no *DO-stat*. No entanto, em especial para células Mut^S, essa estratégia resulta em crescimento muito lento (KRAINER et al., 2012), como foi observado. Ademais, como o metabolismo do metanol é muito estressante e a maioria do carbono é destinada para via de disseminação a fim de se obter energia, pouco carbono é assimilado para biomassa e proteínas (GURRAMKONDA et al., 2010; VANZ et al., 2012a). Portanto, ela é útil para a triagem, mas não para otimização da produção.

Foram realizados três cultivos, dois com a cepa His⁻ com adição de 480 mg_{histidina}/L (BSM_480) e de 600 mg_{histidina}/L (BSM_600) ao meio sintético BSM; e um com a cepa His⁺ sem adição de histidina. Durante o crescimento em glicerol, as duas linhagens se comportaram de forma semelhante, os valores de velocidade específica de crescimento máxima e conversão de glicerol a células foram de acordo com a literatura, de 0,17 a 0,26 h⁻¹ e 0,27 a 0,77 g_{biomassa seca}/g_{glicerol}, respectivamente (COS et al., 2005a; GURRAMKONDA et al., 2009; MAURER et al., 2006; RODRIGUES et al., 2019; VALERO, 2013). Durante a fase de indução, o crescimento foi desprezível, já atividade volumétrica no cultivo BSM_600 foi ligeiramente maior do que no BSM_480, portanto a maior concentração de histidina pode ter beneficiado a produção recombinante. No entanto, com a cepa His⁺ foi 40% maior a atividade volumétrica e 20% maior a atividade por biomassa do que no BSM_600.

Muitos fatores podem colaborar para a maior produção da cepa His⁺, como o número de cópias do gene *ansB* integradas no genoma, a maneira como os eventos de integração ocorreram (SCHWARZHANS et al., 2016) e mesmo a supressão da auxotrofia. Apesar da adição de histidina no meio, o gasto energético para obtenção desse aminoácido prejudica todo o metabolismo celular, por isso a suplementação nutricional não equivale à a complementação genética (PRONK, 2002). Além disso, já foi reportado que a adição de histidina modifica o metabolismo celular, não sendo recomendável para a produção de proteínas recombinantes (COS et al., 2005b) e ainda seria mais um parâmetro a ser controlado para a otimização do processo. Por isso, a cepa His⁺ foi escolhida para prosseguimento da pesquisa.

Em seguida, a cepa His⁺ foi cultivada nas mesmas condições de crescimento, mas com indução por *DO-stat*. Essa estratégia foi escolhida a fim de alimentar uma concentração maior de metanol, que estimularia o metabolismo, sem a limitação de oxigênio. Após algumas tentativas, a estratégia foi executada com sucesso e a concentração de oxigênio em 20% da saturação com ar foi mantida controlando a alimentação da solução de indução. Consequentemente, a concentração celular final, a atividade volumétrica e a produção de proteínas praticamente dobraram em relação ao cultivo induzido por pulsos. Resultados similares já foram reportados e indicam que o ambiente oxigenado evita o acúmulo de subprodutos tóxicos que levam à morte celular (LIM et al., 2003; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016). Portanto, uma estratégia que vise o controle do metanol e do oxigênio mutuamente é benéfica à produção de ASNase.

Ressalta-se que a maior atividade volumétrica final não foi resultado do aumento da atividade por biomassa, mas sim da maior concentração celular. Portanto, não é possível afirmar que o fluxo metabólico para a produção recombinante foi aprimorado, mas foi visível que a via oxidativa do metanol foi mantida próximo da capacidade máxima de acordo com os valores de RQ próximo ao teórico. Como foi adotado que o critério para escolher a melhor condição de cultivo seria a atividade volumétrica máxima, conclui-se que, nessa fase, a estratégia de indução por *DO-stat* foi a melhor para o processo. Mas, pensando em um futuro processo industrial, também deveria ser considerado o custo-benefício do processo por meio de análise econômica, além das dificuldades e riscos de intoxicação por metanol desta estratégia.

Embora a atividade volumétrica tenha sido aprimorada, cerca de 3000 U/L, ela ainda é menor que a encontrada em frascos com meio complexo e apresentou queda após 96 horas de cultivo. Entre as principais causas dessa produção relativamente baixa são apontadas a atividade proteolítica, o cisalhamento e a composição do meio.

O meio sintético fornece menos carboidratos e nitrogênio do que o meio complexo, portanto há um gasto energético celular maior para a biossíntese e a falta de amino ácidos podem prejudicar a transcrição de proteínas (KOBAYASHI et al., 2000). Além disso, o meio sintético oferece menos substrato para as proteases que passam a atacar a proteína de interesse, por isso muitos estudos sugerem a adição de amino ácidos para reduzir a atividade proteolítica sobre ela (CLARE et al.,

1991; ROMANOS, 1995; SINHA et al., 2005). Ademais, para evitar precipitação de seus compostos é necessário manter o pH 5,0, valor que beneficia a atividade de proteases vacuolares de *Pichia*, principalmente, as proteases A e B (CLARE et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2000).

Adicionalmente, a atividade proteolítica é aumentada pelo cisalhamento causado pelas altas velocidades de agitação que resulta tanto em lise celular quanto em inativação da proteína no sobrenadante (EL-NAGGAR et al., 2019; ROMANOS, 1995; SILVA-SANTISTEBAN; FILHO, 2005). O próprio metabolismo do metanol também contribui para a lise celular, pois o acúmulo de subprodutos tóxicos resulta em um processo autofágico por meio da formação de vacúolos repletos de proteases para eliminação deles (SINHA et al., 2005; VANZ et al., 2012a). Como foi detectada atividade proteolítica em alguns cultivos, as condições de indução ainda precisam ser aprimoradas para se atingir uma maior produtividade.

Apesar dessas limitações, os resultados dessa fase já representam um grande avanço na produção de ASNases inovadoras provindas de produção recombinante. Não apenas pela atividade alcançada, como mostra a Tabela 17, mas também pelos atributos dessa variante. Pois, foi obtida, tanto no cultivo da His⁻ quanto da His⁺, uma ASNase extracelular com N-glicanos com padrão mais similar ao de mamíferos, com cadeias de manose reduzidas (de 5 a 7 manoses na His⁻ e de 5 a 6 manoses na His⁺), e, em especial, a glicosilação de um epítipo reconhecido por células-T resultou na redução da resposta imune causada por essa variante, portanto demonstrando ter potencial como biofármaco. Os resultados dessa primeira fase foram publicados em congressos e na revista *Biochemical Engineering Journal*, e são apresentados na LISTA DE PUBLICAÇÕES.

Tabela 17. Comparação da atividade volumétrica de novas ASNases recombinantes publicadas nos últimos anos.

Fonte	Gene da L-asparaginase	Sistema de Expressão	Meio de cultivo / Escala	Principais características	Atividade
(SAJITHA et al., 2015)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pink</i> [®]	Meio Complexo --	Extracelular Glicosilada*	2.500 U/L**
(NGUYEN et al., 2014)	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilada*	1.800 U/L**
(GIRÃO et al., 2016)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Meio sintético Biorreator bancada	Intracelular Glicosilada	800 U/g _{biomassa} **
(RODRIGUES et al., 2019)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Meio sintético Biorreator bancada	Intracelular Glicosilada*	3.315 U/L 37 U/g _{biomassa}
(EFFER et al., 2019)	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia Glycoswitch</i> [®]	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilação Humanizada*	457 U/L
Este estudo	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia Glycoswitch</i> [®]	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilação Humanizada	10.700 U/L 760 U/g _{biomassa}
			Meio sintético Biorreator bancada		3.100 U/L 60 U/g _{biomassa}

*Provavelmente glicosilada devido ao tamanho molecular, mas o teste de glicosilação não foi apresentado. ** Medida pelo método da hidrólise da asparagina (método de Nessler), que superestimada a atividade quando comparado com o método da hidroxilaminólise usado nesse estudo como demonstrado por (MAGRI et al., 2018)

Outra contribuição dessa primeira fase de estudos foi para a metodologia do uso dos parâmetros respiratórios. Os dados *online* de CPR e OUR permitiram a obtenção de informação durante o cultivo de acordo com o conceito das ferramentas analíticas de processo (*PAT tools*). A CPR foi utilizada para estimar a velocidade específica de crescimento de forma acurada sem a necessidade de amostragens durante todo o processo como já reportado por Wechselberger, Sagmeister, & Herwig (2013). Ademais, foi utilizada para monitorar o consumo de metanol na indução por pulsos e para indicar a intoxicação das células pelo metanol nos cultivos em *DO-stat* (especialmente naqueles que não foram bem-sucedidos). Por fim, a relação entre o CPR e OUR, o coeficiente respiratório RQ, foi utilizado para monitorar a taxa metabólica, sendo possível utilizá-lo para prever qual substrato está sendo consumido de acordo com o valor teórico da reação estequiométrica de oxidação. Exemplos da aplicação desses parâmetros foram publicados no Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ) em 2018 apresentado na lista de publicações.

2.5. Conclusões Parciais

Deste capítulo, conclui-se que:

- a. A cepa His⁺ é a produtora mais adequada ao processo, tanto por sua maior eficiência de produção de ASNase quanto pela facilidade das condições de cultivo;
- b. O controle de metanol – oxigênio beneficiou a produção de ASNase;
- c. Foi produzida uma ASNase com glicosilação humanizada;
- d. As condições de indução precisam ser aprimoradas para reduzir os efeitos da atividade proteolítica.

**CAPÍTULO 3. AUMENTO DA PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE COM CONTROLE DAS
CONDIÇÕES DE INDUÇÃO**

Capítulo 3. Aumento da produção de L-Asparaginase com controle das condições de indução

Resumo

A L-asparaginase é uma enzima com uso consolidado no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda com altas taxas de recuperação dos pacientes. Adicionalmente, muitos estudos apontam que ela tem potencial de aplicação em outros tratamentos oncológicos, tais como para outros linfomas (linfoma nasal, linfoma não Hodgkin, e leucemia mieloide aguda) e tumores sólidos (mama, ovário e pâncreas). No entanto, as variantes aprovadas para uso clínico causam reações imunológicas nos pacientes e possuem tempo de meia-vida de apenas algumas horas. Portanto, aprimorar seus atributos de qualidade e suas características farmacodinâmicas é essencial para o aumento da efetividade do tratamento assim como da qualidade de vida do paciente. Para isso, foi desenvolvida uma variante inovadora de ASNase de *Dickeya chrysanthemi* expressa em uma linhagem de *Pichia pastoris* capaz de realizar glicosilações humanizadas (Glycoswitch[®]). Anteriormente, foi realizada a seleção da cepa produtora e foram testadas duas estratégias de indução em biorreatores: por pulsos e por *DO-stat*. A segunda abordagem resultou na maior concentração celular final, 65 g_{biomassa seca}/L, e atividade volumétrica, 3100 U/L. No entanto, o resultado ainda foi inferior ao obtido em frascos com meio complexo, 10700 U/L. Para aprimorar as condições de indução em biorreator de 2 L, foi executado um planejamento experimental analisando os efeitos de temperatura, concentração de metanol e de oxigênio dissolvido sobre a atividade volumétrica de acordo com os princípios de *Quality by Design*. Na melhor condição experimental executada, com metanol mantido a 5 g/L, temperatura a 35 °C e oxigênio a 50% da saturação com ar, foram alcançadas concentração celular de 61 g_{biomassa seca}/L e atividade de 12300 U/L, ou seja, a atividade por biomassa foi quadruplicada comparado ao *DO-stat*. Além disso, o modelo estatístico indicou que a redução de metanol e aumento da temperatura resultariam em atividade volumétrica maior do que a obtida experimentalmente. Finalmente, a análise do fluxo de carbono apontou que manter velocidades específicas de crescimento e de formação de produto elevadas durante a indução foi essencial para esse resultado. Portanto, a aplicação de sensores e de modelos matemáticos como sugere a abordagem de *QbD* foram essenciais para o desenvolvimento deste bioprocesso e para obtenção de um conjunto relevante de dados para um futuro escalonamento.

3.1.Introdução

No capítulo 2, foram realizados estudos visando à seleção da cepa de *Pichia* mais adequada à produção de ASNase e, a partir da escolha da linhagem His⁺, o cultivo em biorreator foi aprimorado usando a estratégia de *DO-stat* durante a indução. Conseqüentemente, a concentração de ASNase ativa dobrou em relação à estratégia de pulsos, sendo que a atividade volumétrica máxima atingida foi cerca de 3100 U/L, valor compatível com dados da literatura (RODRIGUES et al., 2019), mas abaixo da atividade obtida em frascos com meio complexo. Portanto, ainda era necessário melhorar as condições de indução para se atingir atividades maiores que viabilizem a produção em larga escala.

Neste capítulo, as condições de indução foram estudadas considerando os principais parâmetros já apontados pela literatura. Primeiramente, foi avaliado um segundo meio sintético para os cultivos em biorreatores. O meio de cultura adequado deve fornecer os nutrientes suficientes para o crescimento celular e a produção heteróloga. O meio BSM foi desenvolvido considerando esses requisitos, no entanto, para sustentar elevadas concentrações celulares, ele possui uma grande concentração de sais, o que causa estresse metabólico, prejudicando o crescimento e até mesmo levando à lise celular (MATTHEWS et al., 2018; OLZ et al., 1993; ZHU et al., 2021). Por isso, foi avaliado outro meio sintético com menor concentração de sais e já validado por outros autores.

Em seguida, foram avaliados diversos parâmetros concomitantemente. Desde 2000, quando os princípios do *Quality by Design* foram estabelecidos, o desenvolvimento de bioprocessos têm se beneficiado da aplicação de sensores *online* e de ferramentas estatísticas para gerar muitas informações em escala de bancada para ampliação para escala piloto mais rapidamente (RATHORE; BHAMBURE; GHARE, 2010). Seguindo a essa tendência, foram utilizados sensores para monitoramento e controle *online* de metanol, oxigênio dissolvido e temperatura e foi aplicado um planejamento experimental fatorial fracionado para analisar os efeitos primários e de interação destes parâmetros sobre a atividade volumétrica da ASNase.

A escolha do metanol foi feita com base na importância deste parâmetro para a produção heteróloga. A concentração ideal de metanol deve ser suficiente para estimular a produção de proteínas, mas abaixo de níveis citotóxicos. Da literatura, sabe-se que a concentração ideal pode variar de mg/L até g/L de acordo com a combinação cepa-produto. Adicionalmente, foi observado que manter a concentração (MetOH-stat) foi benéfico a diversas produções (YANG; ZHANG, 2018). Portanto, foi utilizado um sensor de medida de metanol *online* com base no equilíbrio líquido-gasoso inserido no meio de cultura para avaliar três concentrações de metanol.

A seleção do oxigênio dissolvido foi baseada no importante papel desta molécula no metabolismo do metanol, tanto para sua assimilação em biomassa e proteínas quanto para a regeneração do NADPH na via de disseminação para manutenção energética celular. De acordo com Unrean (2014), o fluxo de oxigênio é que determina se o carbono será destinado para a formação de biomassa ou de proteína recombinante, sendo que altas concentrações de oxigênio favorecem a biomassa em detrimento da proteína. Além disso, o excesso de oxigênio pode resultar em acúmulo de formaldeído, causando citotoxicidade. Na literatura, foram encontrados estudos em que alta concentração de oxigênio foi benéfica e em que a limitação de oxigênio aumentou a produção (BERDICHEVSKY et al., 2011; JAZINI; CEKICI; HERWIG, 2013; LEE et al., 2003; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016; TRENTMANN; KHATRI; HOFFMANN, 2004). Por isso, foram escolhidas três concentrações de oxigênio para estudo da formação de ASNase.

O terceiro parâmetro escolhido foi a temperatura por seu efeito sinérgico com o metanol e oxigênio (JIN et al., 2010). Por um lado, temperaturas mais altas podem aumentar as velocidades de transformação e acelerar o metabolismo do metanol. Mas, por outro, temperaturas mais baixas reduzem a lise celular e atividade proteolítica e ainda beneficiam o processamento das proteínas no retículo endoplasmático (DRAGOSITS et al., 2009). Portanto, foram selecionadas três temperaturas para este estudo.

Outros parâmetros poderiam ter sido escolhidos, como o pH e a coalimentação com outras fontes de carbono. No entanto, mesmo se utilizando um planejamento experimental fatorial fracionado, o aumento de entradas incrementa significativamente a quantidade de

experimentos, portanto, por uma limitação física, foram escolhidos apenas os três parâmetros julgados mais relevantes. Com esse desenho experimental, foi possível correlacionar por meio de análise de regressão linear múltipla os efeitos de metanol, oxigênio dissolvido e temperatura sobre a atividade volumétrica máxima de ASNase e obter a condição de indução que resultou na atividade máxima dentro da região estudada.

Com os dados destes cultivos, foi aplicado o balanço de carbono e foi constatado que havia erros nas medidas experimentais, o que implicou em erros nas velocidades de transformação. Portanto, os valores corretos dessas velocidades foram calculados utilizando uma metodologia de identificação de erros sistemáticos amplamente validada para estimar medidas imprecisas e inconsistências de modelos metabólicos (CÁMARA; ALBIOL; FERRER, 2016; HEIJDEN; HELLINGA, 1994; KRAINER et al., 2012; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016; WANG; STEPHANOPOULOS, 1983). Assim, foi possível compreender as mudanças metabólicas que resultaram na maior produção de ASNase ativa.

Por fim, foram feitos testes para identificar a atividade proteolítica no meio de cultivo e a formação de agregados no armazenamento da proteína. Esses testes forneceram dados importantes para o planejamento da melhoria do processo de *upstream* assim como indicaram desafios do *downstream* que precisam ser superados para obtenção de uma ASNase pura e estável.

Ressalta-se que os experimentos 12 a 14 F foram realizados no Instituto Técnico de Química da Universidade de Hanôver (TCI, Alemanha) sob a orientação da Profa. Dra. Ursula Rinas durante estágio no exterior (bolsa BEPE-FAPESP), pois neste laboratório estava disponível a sonda de metanol necessária para o planejamento experimental. Conseqüentemente, foram necessários experimentos para comparar os bancos de trabalho da instituição-sede com o novo laboratório.

3.1.1. Objetivos Específicos

1. Aprimorar o protocolo de produção em biorreator em meio definido por indução com metanol por meio de diferentes estratégias de controle em malha fechada;
2. Estudar os efeitos da temperatura, oxigênio dissolvido e metanol sobre a atividade volumétrica final com base em delineamento estatístico;
3. Elaborar modelo de regressão da atividade volumétrica com base no resultado do planejamento experimental;
4. Calcular os parâmetros cinéticos por balanço de carbono e análise sistemática de erros.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Procedimentos Experimentais

3.2.1.1. Linhagens celulares

Para os experimentos deste capítulo foram apenas utilizadas a linhagens *Pichia pastoris* GS115 Glycoswitch[®] SuperMan₅ his⁺ transformada com o plasmídeo pJAG-s1_ *ansB* e com o plasmídeo pJAG-s1_ como controle.

3.2.1.2. Cultivos para comparar os bancos de trabalho

A fim de se comparar os bancos de células usados no laboratório-sede no Brasil e no laboratório usado durante o estágio no exterior na Alemanha, foram executados cultivos em frascos agitados e em biorreator com as mesmas condições de operação.

Os cultivos em frascos agitados foram realizados com inóculo de 1 g_{biomassa seca}/L, obtido de acordo com o protocolo do capítulo anterior, em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL com defletores com 100 mL de meio BMGY tamponado a pH 6,0 por 24 horas e, em seguida, foi realizada a indução da expressão recombinante com pulsos de 1 mL de metanol filtrado a cada 24 horas até 120 horas de cultivo. Os frascos foram acondicionados na incubadora orbital Multitron Standard (Infors HT, Suíça) a 30°C e 250 rpm. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Este cultivo em biorreator foi realizado no biorreator BIOSTAT A[®] 2 L (Sartorius, Alemanha) com volume útil de 1 L do meio modificado BSM+PTM1, inóculo com DO₆₀₀ ~ 2 (1,11 g_{biomassa seca}/L), temperatura de 30 °C, pH controlado com adição de NH₄OH 25%_{v/v} e oxigênio dissolvido mantido acima de 20% da saturação do ar com 1 vvm de ar e com controle de cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm. Antiespumante TEGO[®] KS911 (Evonik, Alemanha) foi adicionado manualmente no início do cultivo, 300 µL, e da indução, 3 mL. O experimento foi iniciado com batelada de aproximadamente 4%_{v/v} de glicerol até a exaustão. marcada por um pico na concentração de oxigênio dissolvido. Em seguida, foi realizada uma fase de transição sem alimentação de fontes de carbono por 4 horas e, por fim, a indução foi feita por meio de pulsos de 10 mL metanol com solução-traço PTM1 (12 mL/L) a cada 24 horas até 120 horas. Os gases de exaustão foram monitorados pelo sensor BlueInOne Ferm (BlueSens, Alemanha) e os dados foram coletados pelo software ProfiSignal (Delphin Technology, Alemanha).

3.2.1.3. Avaliação do Meio de Cultivo

Para seleção do meio de cultivo mais adequado, foram realizados dois cultivos, um com o meio BSM+PTM1 e um com o meio já utilizado pelo grupo do TCI, portanto denominado TCI nesta tese, e publicado por Gurrnkonda et al. (2010), cujas composições são dadas na Tabela 18 e Tabela 19, respectivamente. A escolha do meio de TCI foi baseada na experiência da Profa. Dra. Ursula Rinas, que supervisionou a aluna durante o estágio no exterior. A partir dos resultados de crescimento e expressão, foi escolhido o meio para prosseguir a tese. Os cultivos foram realizados em biorreatores BIOSTAT A[®] 2 L (Sartorius, Alemanha) com volume de trabalho de 1 L, inóculo com DO₆₀₀ ~ 2, temperatura de 30 °C, pH controlado com adição de NH₄OH 25%_{v/v} e oxigênio

dissolvido mantido acima de 20% da saturação do ar com 1 vvm de ar e com controle de cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm. Antiespumante TEGO® KS911 (Evonik, Alemanha) foi adicionado manualmente no início do cultivo, 300 µL, e da indução, 3 mL. Os experimentos se iniciaram com batelada de aproximadamente 4%_{v/v} de glicerol até a exaustão, marcada por um pico na concentração de oxigênio dissolvido. Em seguida, foi realizada uma fase de transição sem alimentação de fontes de carbono por 4 horas e, por fim, a indução foi feita por meio de pulsos de 10 mL metanol com solução-traço (PTM1 ou YTM) (12 mL/L) a cada 24 horas até 120 horas. Os gases de exaustão foram monitorados pelo sensor BlueInOne Ferm (BlueSens, Alemanha) e os dados foram coletados pelo software ProfiSignal (Delphin Technology, Alemanha).

Tabela 18. Composição do meio mínimo de sais basais BSM modificado e da solução PTM1 de Invitrogen Corporation (2002).

Componente do meio BSM	Por litro de meio	Marca	Componente do PTM1	Por litro de solução	Marca
K ₂ SO ₄ 0,5 M	209 mL	Merck	CuSO ₄ .5H ₂ O	6,0 g	Roth
H ₃ PO ₄ (85%)	26,7 mL	AppliChem	NaI	0,08 g	Fluka
KOH	4,13 g	Roth	MnSO ₄ .H ₂ O	3,0 g	Sigma
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 g	Roth	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g	Fluka
MgSO ₄ .7H ₂ O	14,9 g	Merck	O		
Glicerol 50%	80 mL	Roth	H ₃ BO ₃	0,02 g	Roth
NH ₄ OH 25%	Ajuste pH a 5,0	Merck	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g	Fluka
Água Ultrapura	Até volume final de 1L	-	ZnCl ₂	20,0 g	Sigma
PTM1	4,35 mL	-	FeSO ₄ .7H ₂ O	65,0 g	Sigma
			Biotina	0,3 g	Sigma
			H ₂ SO ₄	5 mL	AppliChem
			concentrada		
			Água	Até volume	-
			Ultrapura	final de 1 L	

Tabela 19. Composição do meio mínimo TCI e da solução YTM (Yeast Trace Metals) de Gurrankonda et al. (2010). A forma de preparo desse meio é similar ao BSM+PTM1 como explicado na Tabela 6 e Tabela 7.

Componente do meio TCI	Por litro de meio	Marca	Componente do YTM	Por litro de solução	Marca
KH ₂ PO ₄	9,40 g	AppliChem	KI	0,21 g	Fluka
(NH ₄) ₂ SO ₄	15,70 g	Sigma	MnSO ₄ .H ₂ O	0,76 g	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	9,40 g	Merck	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,48 g	Fluka
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,30 g	Roth	H ₃ BO ₃	0,05 g	Roth
Glicerol 50%	80 mL	Roth	ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,03 g	Sigma
NH ₄ OH 25%	Ajuste pH a 5,6	Merck	FeCl ₃ .6H ₂ O	12,00 g	Sigma
Água Ultrapura	Até volume final de 1L	-	H ₂ SO ₄ concentrada	9,2 mL	AppliChem
YTM	4,56 mL	-	Água Ultrapura	Até volume	-
Biotina	0,0004 g	Sigma		final de 1 L	

3.2.1.4. *Planejamento Estatístico: oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de metanol durante a indução em cultivos descontínuos alimentados*

Um planejamento estatístico do tipo fatorial fracionário com três parâmetros e dois níveis (2^{3-1}) foi planejado a fim de se estudar os efeitos da temperatura, concentração de oxigênio e da concentração de metanol sobre a atividade volumétrica da ASNase no sobrenadante. Além das 4 combinações estabelecidas pelo delineamento, foram realizados dois pontos centrais. O desenho experimental é apresentado na Tabela 20. Nota-se que os níveis de temperatura e oxigênio dissolvido foram escolhidos variando em progressão aritmética e da concentração de metanol na forma de progressão geométrica.

O modelo final é baseado em regressão linear múltipla pelo método *stepwise* com seleção bidirecional das variáveis de entrada. Por este método, todas as variáveis independentes são avaliadas e são selecionadas para o modelo aquelas que mais contribuem para a variância da variável dependente. No método bidirecional, os modelos são construídos tanto adicionando as variáveis (seleção avançada) quanto as retirando (eliminação regressiva) por meio de comparação entre os p-valores delas com o valor de alfa. Por padrão, o valor de alfa adotado é de 0,15. O critério de seleção do modelo mais adequado foi baseado nos coeficientes de determinação R^2 e o R^2 ajustado e nos resíduos. O coeficiente R^2 significa a proporção da variância da resposta que é explicada pelos parâmetros de entrada selecionados. No entanto, esse coeficiente sempre aumenta com o aumento das entradas, por isso é recomendável a análise do R^2 ajustado, pois ele apenas aumentará se a nova variável de entrada for significativa para a variância da resposta (DEPARTAMENTO DE GEOGRAFIA - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, N.D.; EFROYMSON, 1960; FUKUDA ET AL., 2018; MINITAB INC., N.D.). Esta análise foi realizada com o software Minitab (versão 18.1, Minitab Inc., EUA). Além disso, utilizando a ferramenta de otimização deste software, também foram identificadas as condições ótimas dentro da região estudada.

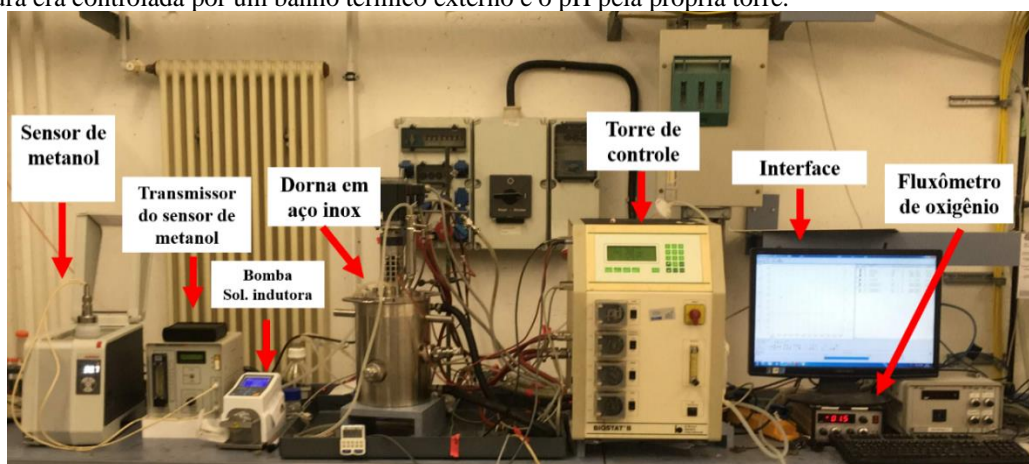
Tabela 20. Entradas do planejamento fatorial para avaliar os efeitos de oxigênio dissolvido (pO₂), log da concentração de metanol e temperatura sobre a atividade da ASNase.

Experimento	pO ₂ (%)	Metanol (g/L)	Log Metanol	Temperatura (°C)
14A	5	0,8	-0,1	35
14B	5	5	0,7	25
14C	50	0,8	-0,1	25
14D	50	5	0,7	35
14E	27,5	2	0,3	30
14F	27,5	2	0,3	30

3.2.1.5. Execução do Planejamento Estatístico: Cultivos em biorreatores

Para execução do planejamento estatístico foi utilizado um biorreator projetado no próprio laboratório do Instituto Técnico (TCI) de Química da Universidade de Hanôver. Esse biorreator feito em aço inox era do tipo tanque agitado com dois impelidores do tipo *Rushton* e estava conectado à torre do biorreator BIOSTAT B[®] (Sartorius, Alemanha), o sistema é apresentado na Figura 11.

Figura 11. Esquema de montagem do biorreator projetado no TCI: a dorna de aço inox estava conectada à torre de controle do biorreator BIOSTAT B e os dados eram coletados pelo software ProfiSignal e apresentados na interface. A entrada de oxigênio puro era controlada manualmente por um fluxômetro conectado à torre de controle. A alimentação de metanol era controlada pelo software Caro que, de acordo com a leitura do sensor de metanol (nessa foto, ele estava sendo acondicionado em banho térmico para calibração), ativava a bomba de solução indutora. A temperatura era controlada por um banho térmico externo e o pH pela própria torre.



Fonte: Foto tirada pela autora.

Os cultivos foram realizados com volume de trabalho de 1 L do meio TCI, inóculo com $DO_{600} \sim 2$, temperatura de 30 °C, pH controlado em 5,6 com adição de NH_4OH 25%_{v/v} e oxigênio dissolvido mantido acima de 20% da saturação do ar com 1 vvm de ar e com controle de cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm durante o crescimento. Antiespumante TEGO® KS911 (Evonik, Alemanha) foi adicionado manualmente no início do cultivo, 300 μL , e da indução, 3 mL. Os experimentos se iniciaram com batelada de aproximadamente 4%_{v/v} de glicerol até a exaustão, marcada por um pico na concentração de oxigênio dissolvido. Em seguida, foi realizada uma fase de transição sem alimentação de fontes de carbono por 4 horas e, por fim, a indução foi iniciada por um pulso de 10 mL metanol com solução-traço (YTM, 12 mL/L). Em seguida, a estratégia de indução foi executada de acordo com o planejamento da Tabela 20, em que a temperatura foi mantida com controle da jaqueta, o oxigênio dissolvido com controle em cascata da agitação (10 a 1000 rpm) e alimentação de oxigênio puro ajustada manualmente em um fluxômetro (1 a 7,1 L/min), e o metanol com a malha fechada entre o sensor de metanol (Raven Bioech, Canada) imerso no meio e a bomba peristáltica (Ismaltec, Alemanha) de alimentação da solução indutora (metanol com 12 mL/L de YTM) sob controle do software Caro Control (Alemanha). A concentração *online* de metanol foi relacionada com a voltagem lida no sensor de acordo com as equações 55 e 56, sendo que a curva de calibração é apresentada no Apêndice A.8. Calibração do sensor de metanol da Raven Biotech. O sensor possui uma membrana em sua ponta que permite a passagem de gases voláteis que são carregados por uma corrente de ar seco até o detector, um chip semiconductor com um filme de óxido de estanho sinterizado. Quando um vapor combustível é adsorvido pela superfície do detector, há um aumento na condutividade elétrica o que gera uma medida em milivolts, ou seja, ele não é específico apenas para metanol, podendo detectar etanol também. Os dados gerados podem ser coletados em um computador e inseridos no software de controle, o que permite o controle da bomba peristáltica de alimentação do metanol.

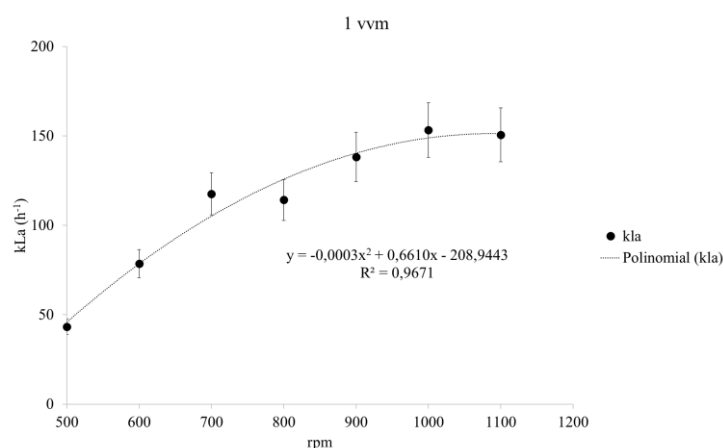
$$\text{Até } 1,3 \frac{g}{L}: \text{MetOH} = 5 \times 10^{-4}(\text{mV}) - 0,42 \quad 55$$

$$\text{Acima de } 1,6 \frac{g}{L}: \text{MetOH} = 2 \times 10^{-6}(\text{mV})^2 - 0,02 (\text{mV}) + 31,01 \quad 56$$

Além disso, os gases de exaustão foram monitorados pelo sensor BlueInOne Fern (BlueSens, Alemanha) e os dados foram coletados pelo software ProfiSignal (Delphin Technology, Alemanha).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA} , h^{-1}) foi calculado usando a mesma metodologia aplicada em 2.2.4 e a relação com a agitação a 1 vvm é apresentada no Gráfico 15.

Gráfico 15. Relação entre k_{LA} (h^{-1}) e agitação (rpm) quando a aeração é mantida a 1 vvm e a temperatura em 30°C para o biorreator projetado no TCI.



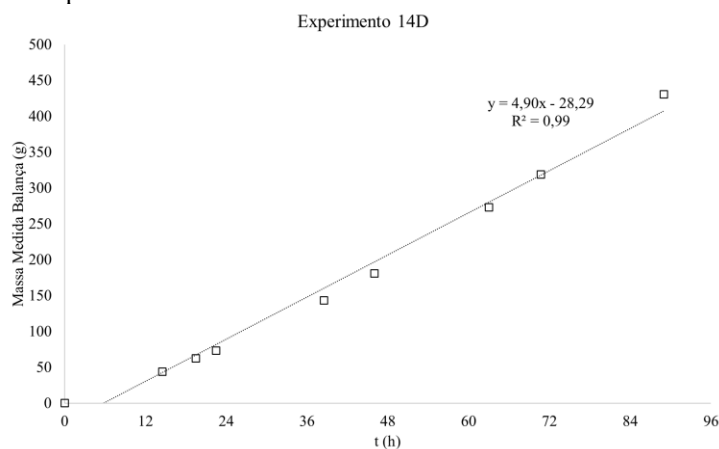
3.2.1.6. Validação da Melhor Condição de Cultivo ou do Modelo

No experimento 15, no laboratório-sede no Brasil, foi necessário produzir um novo banco de trabalho a partir do mesmo banco mestre por problemas de armazenamento do anterior. O biorreator BIOSTAT B[®] 2 L (Sartorius[®], Alemanha) foi operado com 1 L de meio sintético TCI e o pH foi ajustado para 5,6 com solução de 25%_{v/v} de NH₄OH, temperatura de 30 °C, vazão total gasosa de 1 vvm (ou seja, 1 L/min) e controle de oxigênio dissolvido acima de 20% da saturação com ar com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm. Antiespumante Y30 (Sigma-Aldrich) foi adicionado quando necessário. O inóculo foi de 1 g_{biomassa seca}/L. O biorreator possui o sensor BioPAT Xgas[®] (Sartorius) que fornece informação sobre a concentração do gás de exaustão (O₂ e CO₂), sensores de temperatura, pH e pO₂ (Hamilton, EUA) e as informações do

cultivo foram coletadas *online* pelo *software* BioPAT MFCS® (Sartorius). O experimento se iniciou com batelada de 4%_{v/v} de glicerol até a exaustão caracterizada pelo pico da concentração de oxigênio. Após, aproximadamente, 4 horas sem alimentação de substratos para consumir eventuais subprodutos (etanol, arabitol) e reduzir a repressão sobre os genes AOX, foi iniciada a fase de indução com um pulso de adaptação com 10 mL de solução indutora (metanol + 12 mL/L YTM). Em seguida, iniciou-se a alimentação da solução de indução de acordo com o modelo obtido no experimento 14D e essa fase foi realizada mantendo a temperatura a 35 °C e o oxigênio dissolvido em 50% da saturação do ar com agitação em 1200 rpm e com controle em cascata da alimentação de oxigênio puro.

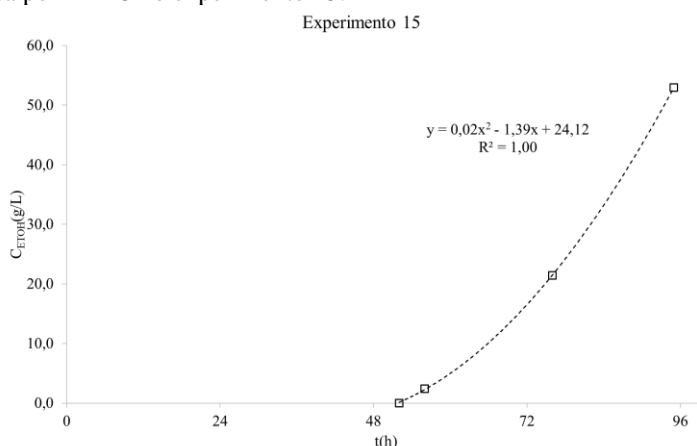
Para repetir a melhor condição de indução obtida no planejamento experimental, foi usada uma função de alimentação da solução indutora obtida a partir da regressão linear dos valores de massa medidos por uma balança no experimento 14D. Neste ensaio, havia um sensor de metanol que possibilitava manter a concentração de metanol entre 4 e 5 g/L, como esse sensor não estava disponível na instituição-sede, assumiu-se no experimento 15 que a mesma função de alimentação resultaria na manutenção dessas concentrações. Para tanto, foi medida a vazão da bomba de alimentação e foram calculados valores de *set-point* de vazão para períodos de aproximadamente 10 horas e a massa alimentada foi controlada por uma balança. A função de alimentação obtida no experimento 14D é apresentada no Gráfico 16.

Gráfico 16. Modelo de alimentação da solução de indução obtido por regressão linear dos dados de massa alimentada medida por uma balança no experimento 14D.



Para cálculo dos parâmetros cinéticos, foram usadas as equações para batelada-alimentada com base mássica considerando o valor do volume em cada instante de tempo provindo do balanço de massa com evaporação estimada com base nos cálculos do Apêndice B. Além disso, foi necessário considerar o acúmulo de metanol no meio. Para isso, foram retiradas amostras ao longo da fase de indução e analisadas em HPLC para relacionar a concentração de metanol no meio com o tempo por meio de regressão polinomial. Dessa forma, foi possível prever o acúmulo de metanol em diferentes instantes de tempo e a função encontrada é apresentada no Gráfico 17.

Gráfico 17. Modelo de concentração de metanol no meio ao longo do tempo obtido por regressão polinomial dos dados de concentração medida por HPLC no experimento 15.



3.2.1.7. Avaliação da Atividade Proteolítica e da Formação de Agregados

Para avaliação da atividade proteolítica e de formação de agregados, amostras foram coletadas do experimento 14E em tubos de 1 mL e centrifugadas a 18255 $\times g$ por 5 minutos na centrífuga Heraeus Fresco 21[®] (ThermoFisher Scientific, Alemanha) e o sobrenadante foi separado do *pellet* celular. Para o teste de protease, o sobrenadante foi incubado a 30 e 35 °C por, pelo menos, 8 dias e a atividade volumétrica foi frequentemente medida. Para o teste de formação de agregados, as amostras foram armazenadas a 4 e -20 °C com e sem 5%_{v/v} de glicerol, e a presença de agregados foi avaliada visualmente e a atividade volumétrica também foi medida.

3.2.2. Métodos Analíticos

3.2.2.1. Análise da Biomassa

A biomassa foi avaliada por dois métodos. O primeiro foi por espectrofotometria (Biochrom Libra S50[®], Biochrom, Alemanha), em que brevemente: 1 mL de amostra foi centrifugado a 18255 *xg* por 5 minutos na centrífuga Heraeus Fresco 21[®] (ThermoFisher Scientific, Alemanha) e novamente suspenso em solução salina (0,9%_{m/v} NaCl), a absorbância da amostra foi lida no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) na faixa de 0,1 a 0,9. O segundo método foi por meio de centrifugação seguida de secagem em estufa (Mettler, Alemanha) a 60°C. Por este método, uma alíquota de 1 mL de amostra foi centrifugada duas vezes, a primeira com meio de cultura e a segunda com água destilada, em tubos de 1 mL previamente pesados. Os tubos foram postos na estufa e a massa foi medida até estabilização. Os valores de absorbância foram relacionados com a concentração celular obtida por secagem) para se obter as curvas de calibração que são apresentadas no Apêndice A.2. Curvas de calibração de massa seca pela densidade óptica para espectrômetro Biochrom Libra S50[®], e as funções são dadas pelas Equações 57 a 60.

$$\text{Meio BMGY: } DO_{600} = 3,5 \text{ } g_{\text{biomassa seca}}/L \quad 57$$

$$\text{Meio Sintético e } DO_{600} < 20 : DO_{600} = 1,8 \text{ } g_{\text{biomassa seca}}/L \quad 58$$

$$\text{Meio Sintético e } 20 < DO_{600} < 40 : DO_{600} = 2,3 \text{ } g_{\text{biomassa seca}}/L \quad 59$$

$$\text{Meio Sintético e } DO_{600} > 40 : DO_{600} = 3,0 \text{ } g_{\text{biomassa seca}}/L \quad 60$$

3.2.2.2. Análise dos Metabólitos

Para análise dos metabólitos no sobrenadante, 1 mL de amostra foi centrifugado a 18255 *xg* por 5 minutos na centrífuga Heraeus Fresco 21[®] e as concentrações de glicerol, etanol e metanol do sobrenadante foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a coluna

Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, EUA) a 60 °C usando H₂SO₄ 20 mmol/L como fase móvel com uma vazão de 0,5 mL/L.

3.2.2.3. Análise da Atividade de L-asparaginase

Realizada de acordo com o protocolo do Apêndice A.3 Protocolo de Medida de ASNase de amostra pelo método do L-aspartil-β-Hidroxâmico (AHA) adaptado de Drainas, Kinghorn e Pateman (1977).

3.2.2.4. Análise das Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi estimada no sobrenadante utilizando o kit Pierce[®] BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific, Alemanha) com detecção entre 20 e 2000 µg/mL e cujo mecanismo é baseado no método de Lowry et al. (1951). A calibração foi realizada com albumina de soro bovino (BSA) usando solução com 0 a 2000 µg/mL em triplicata. Resumidamente, a mistura reacional foi preparada adicionando 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B, em seguida, 8 partes dessa mistura foram adicionadas em 1 parte da amostra. Essa solução foi incubada por 30 min a 37 °C e após resfriamento, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 562 nm em microplaca com 225 µL por poço. A relação entre concentração total de proteínas e absorbância é dada pela Equação 61 e a curva é apresentada no Apêndice A.4 Curva de calibração de proteínas totais pela absorbância pelo método BCA.

$$\text{Concentração Total de Proteínas } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 840 \text{ ABS} - 56 \quad 61$$

3.2.3. Cálculos

3.3.1.1 Cálculo da Osmolaridade do Meio Definido

A osmolaridade de uma solução é uma medida da concentração de solutos e é definida pelo número de osmoles (osmol) de soluto por litro de solução (osmol/L). Esse valor permite medir a pressão osmótica da solução e determinar como ela se comporta em uma separação por osmose. A pressão osmótica é proporcional ao número de partículas e independe da massa molecular ou da carga iônica. Por exemplo, 1 mol de uma substância não ionizável, como glicerol, tem uma unidade osmol e um sal como NaCl que se dissocia em dois íons, possui 2 unidades. Portanto, a osmolaridade de uma solução é dada pela soma dos osmoles por litro e é dada pela Equação 62 (RASOULI, 2016).

$$\text{Osmolaridade de solução} = \sum \frac{C(\text{g/L}) \times n \text{ partículas}}{\text{Peso Molecular (mol/g)}} \quad 62$$

3.3.1.1. Balanço de Massa de Carbono

Pelas leis de conservação de massa e energia, considerando a célula como uma caixa preta, todo o carbono que entra nas células nos substratos deve ser igual ao carbono que sai nos produtos e na biomassa. Nos casos em que essa conservação não é respeitada, é possível que haja erros de medidas ou que algum componente não foi contabilizado. Ademais, a distribuição dos fluxos de carbono é capaz de indicar o estado metabólico da população.

Considerando as grandezas medidas em massa (biomassa, substratos, produtos, gases) e resolvendo as equações para obtenção das velocidades específicas de acordo com o regime de operação (item Determinação dos Parâmetros Cinéticos) com as devidas correções de volume, a vazão de carbono pode ser obtido multiplicando a velocidade específica pela fração mássica de carbono na biomassa, nos substratos, nos produtos e no CO₂, representado pela Equação 63.

Portanto, o balanço de massa de carbono é dado pela razão da soma das vazões nas saídas pela soma das vazões na entrada, Equação 64.

$$\dot{C}_i = r_i \times fC_i \quad 63$$

$$BM_C = \frac{fC_{m_x} \cdot \mu + fC_{m_p} \cdot q_p + fC_{m_{CO_2}} \cdot q_{CO_2}}{fC_{m_S} \cdot q_S} \quad 64$$

Em que \dot{C}_i é a vazão de carbono (gC/h); r_i , velocidade de transformação (g/h); fC_i , fração de carbono no composto i (gC/g). Para os cálculos foram usadas as seguintes frações de carbono: $fC_{m_{glicerol}} 0,39$ gcarbono/gglicerol, $fC_{m_{metanol}} 0,37$ gcarbono/gmetanol, $fC_{m_x} 0,44$ gcarbono/gbiomassa (CARNICER et al., 2009), $fC_{m_p} 0,50$ gcarbono/gproteína (BÉRANGÈRE et al., 2012) e $fC_{m_{CO_2}} 0,27$ gcarbono/gCO₂.

De forma análoga, o balanço pode ser feito em base molar transformando as velocidades com base mássica em molares (r_{M_i} , velocidade de transformação molar (mol/h)), como mostra a Equação 65.

$$r_{M_i} = r_i \times \frac{MM_x}{MM_i} \times \frac{1}{(1-f_{cinzas})} \quad 65$$

Em que, a massa molecular da biomassa (MM_x) e a fração de cinzas são de 25,81 g/mol e 0,07 g/g (CARNICER et al., 2009), respectivamente, e a massa molecular (MM_i) depende do composto i, sendo: 92 g/mol, glicerol; 32 g/mol, metanol; 44 g/mol, CO₂; 32 g/mol O₂; 31732 g/mol, ASNase.

3.2.6. Identificação de erros sistemáticos

Similar ao balanço de carbono, o balanço de massa pode ser realizado para cada elemento do sistema (exemplo, C, H, N e O) e a partir deste conjunto de equações / restrições é possível usar a metodologia de N. S. Wang & Stephanopoulos (1983) para reconciliar os dados e identificar a presença de erros sistemáticos nas medidas das velocidades de transformação, como explicado no item Avaliação da consistência dos dados experimentais.

Considerando a composição macroelementar de biomassa da *P. pastoris* determinada por Carnicer et al. (2009) de $CH_{1,76}N_{0,14}O_{0,636}$, a equação geral de balanço para cada substrato é dada pelas equações 66a e 66b. Nessas equações, foi assumido um modelo de caixa preta para a célula em que as velocidades de transformação são constantes e somam zero e que a população é homogênea. Assim sendo, foram considerados os valores médios das velocidades específicas durante a fase exponencial em glicerol e assumida uma fase exponencial em metanol entre o início da indução com alimentação constante de metanol até o terceiro dia de cultivo (estado pseudo-estacionário). Dessa forma, foi possível afirmar que os coeficientes da equação estequiométrica do balanço geral eram constantes.

$$\begin{aligned}
 \text{a) Glicerol: } & -Y_{\frac{S_{gli}}{X}}C_1H_{8/3}O_1 - Y_{\frac{O_2}{X}}O_2 - Y_{\frac{N}{X}}NH_4OH + 1CH_{1,76}N_{0,14}O_{0,636} + Y_{\frac{H_2O}{X}}H_2O + Y_{\frac{CO_2}{X}}CO_2 = 0 \\
 \text{b) Metanol: } & -Y_{\frac{S_{met}}{X}}CH_4O - Y_{\frac{O_2}{X}}O_2 - Y_{\frac{N}{X}}NH_4OH + 1CH_{1,76}N_{0,14}O_{0,636} + Y_{\frac{H_2O}{X}}H_2O + Y_{\frac{CO_2}{X}}CO_2 = 0
 \end{aligned} \tag{66}$$

Essas equações podem ser escritas na forma matricial, sendo que a matriz elementar E para cada substrato é dada pelas equações 67a e 67b, o vetor de coeficientes de conversão é dado por 68 e a forma matricial do balanço de massa é dada por 69. Para os balanços de massa, adotou-se que as únicas saídas são biomassa, água e CO_2 , pois a produção de proteínas tem vazão significativamente menor do que os demais e não foram detectados outros subprodutos nos cultivos.

$$\text{a) Glicerol: } E_{\text{glicerol}} = \begin{bmatrix} \text{Glicerol} & \text{Oxigênio} & \text{NH}_4\text{OH} & \text{Biomassa} & \text{Água} & \text{CO}_2 \\ -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ -8/3 & 0 & -5 & 1,76 & 2 & 0 \\ -1 & -2 & -1 & 0,64 & 1 & 2 \\ 0 & 0 & -1 & 0,14 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{matrix} \dots C \\ \dots H \\ \dots O \\ \dots N \end{matrix}$$

67

$$\text{b) Metanol: } E_{\text{metanol}} = \begin{bmatrix} \text{Metanol} & \text{Oxigênio} & \text{NH}_4\text{OH} & \text{Biomassa} & \text{Água} & \text{CO}_2 \\ -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ -4 & 0 & -5 & 1,76 & 2 & 0 \\ -1 & -2 & -1 & 0,64 & 1 & 2 \\ 0 & 0 & -1 & 0,14 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{matrix} \dots C \\ \dots H \\ \dots O \\ \dots N \end{matrix}$$

$$y = \begin{bmatrix} Y_S \\ \bar{X} \\ Y_{O_2} \\ \bar{X} \\ Y_N \\ \bar{X} \\ 1 \\ Y_{H_2O} \\ \bar{X} \\ Y_{CO_2} \\ \bar{X} \end{bmatrix} \quad 68$$

$$Ey = 0 \quad 69$$

Como as velocidades de consumo de hidróxido de amônio e de produção de água não são possíveis de serem medidas, as colunas referentes a esses compostos foram eliminadas, multiplicando a linha três (oxigênio) por -2 e a linha quatro (nitrogênio) por -3 e somando as linhas de três a cinco, as matrizes reduzidas para cada substrato são mostradas nas Equações 70a e 70b. A matriz reduzida R possui duas linhas linearmente independentes (rank), portanto, o sistema possui grau de liberdade 2. Em outras palavras, subtraem-se das seis velocidades (r_x , r_s , r_{O_2} , r_{CO_2} , r_N , r_{H_2O}) as quatro restrições (balanço de C, H, O e N), resultando no grau de liberdade 2.

$$\begin{aligned} \text{a) Glicerol: } R_{\text{glicerol}} &= \begin{bmatrix} \text{Glicerol} & \text{Oxigênio} & \text{Biomassa} & \text{CO}_2 \\ -1 & 0 & 1 & 1 \\ -2/3 & 4 & 0,07 & -4 \end{bmatrix} \dots C \\ & \dots O\&H\&N \end{bmatrix} \quad 70 \\ \text{b) Metanol: } R_{\text{metanol}} &= \begin{bmatrix} \text{Metanol} & \text{Oxigênio} & \text{Biomassa} & \text{CO}_2 \\ -1 & 0 & 1 & 1 \\ -2 & 4 & 0,07 & -4 \end{bmatrix} \dots C \\ & \dots O\&H\&N \end{bmatrix} \end{aligned}$$

As medidas possuem erros que as deslocam dos valores reais (teóricos). Assume-se que esses erros, representados pelo vetor de erros δ , possuem distribuição normal com média zero e desvio-padrão dependente do método de mensuração. Para determinar a matriz de variância-covariância ψ , que representa a variância do vetor de erros δ , foram considerados os seguintes desvios-padrão para cada composto: 5% para a biomassa (média dos desvios das medidas reais); 10% para o substrato (estimativa); e 3% para os gases (fabricante), resultando na matriz ψ que é representada pela Equação 71.

$$\psi = \begin{bmatrix} (Y_S \times 0,10)^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & (Y_{O_2} \times 0,03)^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & (Y_X \times 0,05)^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & (Y_{CO_2} \times 0,03)^2 \end{bmatrix} \quad 71$$

Aplicando a equação 12, assume-se que o balanço com os valores reais (teóricos) é nulo e que se ele difere de zero é devido aos resíduos representados na matriz ε , como mostra a Equação 72.

$$R \times y_m = R \times (\hat{y}_m + \delta) = R \times \hat{y}_m + R \times \delta = \varepsilon \quad 72$$

A matriz de covariância-variância φ da matriz de resíduos ε foi calculada de acordo com a Equação 15 ($R \times \psi \times R^t$) e desse modo a função h foi determinada usando a Equação 16 ($\varepsilon \varphi^{-1} \varepsilon^t$). Calculados os valores de h , foi realizada a comparação com o valor de χ^2 com grau de liberdade 2 e 90% de confiança (χ^2 de 4,61). Para aqueles pontos em que $h < \chi^2$, foi confirmado que não há erros nas variáveis com 90% de confiança. Já para $h > \chi^2$, foi confirmado que há alguma variável com erro. Para determinar qual variável possui o erro, foi realizada a análise de exclusão sequencial, em que uma variável foi retirada por vez do balanço de massa, um novo h foi calculado e comparado com o valor de χ^2 com um grau de liberdade a menos.

Por exemplo, na fase exponencial de crescimento em glicerol no cultivo 14A, o primeiro valor de h foi de 209, muito superior ao χ^2 de 4,61, portanto era necessário identificar qual variável possuía erros grosseiros. Para analisar se o oxigênio possuía erros grosseiros, ele foi retirado do balanço de massa e foi assumido que as demais grandezas possuem apenas erros aleatórios não significativos. Assim, as matrizes foram recalculadas como apresentam as Equações 73-76, e o novo valor de h , Equação 77, foi calculado apenas com essas velocidades e comparado ao de χ^2 com grau de liberdade 1 (2,71), pois há uma velocidade a menos (velocidade de consumo de oxigênio).

$$R_{uglicerol} = \begin{matrix} & \begin{matrix} \text{Glicerol} & \text{Biomassa} & \text{CO}_2 & \dots & C \end{matrix} \\ \begin{bmatrix} -1 & 1 & 1 \\ -2/3 & 0,07 & -4 \end{bmatrix} & \dots & O\&H\&N \end{matrix} \quad 73$$

$$y_u = \begin{bmatrix} \frac{Y_S}{\bar{X}} \\ 1 \\ \frac{Y_{CO_2}}{\bar{X}} \end{bmatrix} \quad 74$$

$$\varepsilon = y_u \times R_{uglicerol} \quad 75$$

$$\psi_u = \begin{bmatrix} (Y_S \times 0,10)^2 & 0 & 0 \\ 0 & (Y_X \times 0,05)^2 & 0 \\ 0 & 0 & (Y_{CO_2} \times 0,03)^2 \end{bmatrix} \quad 76$$

$$h = (\varepsilon \varphi_u^{-1} \varepsilon^t) \quad 77$$

O valor calculado de h sem oxigênio foi de 8 e muito menor do que retirando o substrato (181), biomassa (77) ou gás carbônico (13), ou seja, o oxigênio continha a maior parte da variância. Usando as equações de balanço foi possível recalculer o coeficiente de conversão de biomassa a oxigênio. Mas, apesar do ajuste de h para 8, ele ainda era superior ao χ^2 de 2,71. Portanto, o procedimento foi repetido como o novo $Y_{O/X}$ e foi identificado que o substrato possuía erros grosseiros. Por fim, um novo coeficiente de conversão de biomassa a substrato foi obtido e o valor final de h ($0,2 < 2,71$) indicou que não havia mais variáveis com erros grosseiros.

Esse procedimento foi aplicado a cada cultivo na fase de crescimento em glicerol e em metanol utilizando o algoritmo em Matlab do Apêndice C. Com os novos valores dos coeficientes de conversão, foram calculadas novas velocidades específicas médias e o balanço de carbono foi aplicado para verificar a consistência dos novos dados.

3.2.4. Conjunto de Experimentos

Tabela 21. Quadro resumo dos experimentos realizados.

Experimento	Cepa	Meio	Sistema	Laboratório	Indução	Objetivo
12	His ⁺ His ⁺ vazio	BMGY	<i>Shaker</i>	TCI	1 mL metanol a cada 24h	Comparar os bancos de trabalho usados no Brasil e na Alemanha
		BSM	Biorreator BIOSTAT A® com 1L		10 mL metanol a cada 24h	
13	His ⁺	BSM	Biorreator BIOSTAT A® com 1L			Comparar os meios sintéticos
14A		TCI	Biorreator projetado no TCI (dorna inox + controlador BIOSTAT B®) com 1L		Metanol 0,8 g/L + 25°C + pO ₂ 5%	
14B					Metanol 5,0 g/L + 25°C + pO ₂ 5%	
14C					Metanol 0,8 g/L + 25°C + pO ₂ 50%	
14D					Metanol 5,0 g/L + 35°C + pO ₂ 50%	
14E					Metanol 2,0 g/L + 30°C + pO ₂ 27,5%	
14F					Metanol 2,0 g/L + 30°C + pO ₂ 27,5%	
15					Biorreator BIOSTAT B® com 1L	USP
16	Tubos	TCI	-	Analisar a atividade proteolítica no sobrenadante e a formação de agregados		

3.3. Resultados

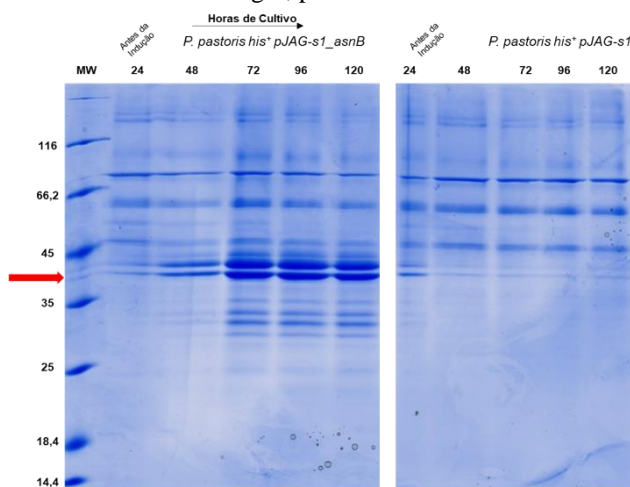
3.3.1. Experimento 12: comparação das condições de cultivo no Brasil e na Alemanha

Cultivos em frascos agitados foram conduzidos com ambas as linhagens, a produtora e a controle, usando o meio complexo BMGY e com indução por pulsos igualmente ao que foi realizado no laboratório-sede no Brasil (experimento 8) com o intuito de comparar os bancos de trabalho usados em cada laboratório. Como mostra a Tabela 22, as concentrações celulares atingidas ao fim do ensaio foram iguais para a cepa produtora e ligeiramente diferente para a cepa controle, mas dadas as mudanças nas marcas dos componentes do meio, essa diferença foi considerada aceitável. Por outro lado, as velocidades específicas máximas de crescimento foram similares entre as linhagens. Além disso, houve uma diferença significativa na atividade máxima atingida pelos diferentes bancos de trabalho da cepa produtora, que pode ter sido também influenciada pelos diferentes reagentes e pela variabilidade do ensaio enzimático. Também foi possível observar que houve medida de absorbância para atividade da cepa controle na Alemanha, no entanto como mostra a Figura 12, não há produção de ASNase por essa cepa, portanto esse método não é extremamente acurado.

Tabela 22. Comparação das duas cepas em relação à velocidade específica de crescimento máximo em glicerol ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}), concentração celular estimada por densidade óptica ao fim do ensaio (X_{DOfinal} , g/L) e atividade volumétrica máxima ($A_{\text{máx}}$, U/L) em frascos com meio complexo e indução feita por pulsos com 1 mL de metanol a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo. Foram realizadas triplicatas biológicas no laboratório do Brasil e no da Alemanha.

Laboratório	Exp.	Cepa	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	X_{DOfinal} (g/L)	$A_{\text{máx}}$ (U/L)	$t_{A_{\text{máx}}}$ (h)
USP	8	His ⁺	0,25± 0,02	13,9±0,8	10700±700	48
		His ⁺ _vazio	0,24±0,02	18,6±1,6	240± 220	120
TCI	12	His ⁺	0,24± 0,02	13,8±0,2	4500±40	96
		His ⁺ _vazio	0,24±0,01	11,2±0,2	360± 70	96

Figura 12. SDS-gel dos cultivos em meio BMGY com a cepa His⁺ e a His⁺ vazio realizados na Alemanha, a proteína completa é apresentada nas duas bandas mais fortes entre 35 e 45 kDa com diferentes níveis de glicosilação entre os monômeros. MW: molecular weight, padrão Pierce™ Unstained Protein Marker.



Fonte: Foto tirada pela autora.

Um cultivo em biorreator com o meio BSM+PTM1 foi realizado nas mesmas condições do laboratório-sede (experimento 9) com a cepa produtora e operação com batelada de glicerol, seguida de transição sem alimentação de substrato e indução por pulsos. Em relação à fase de crescimento, como mostra a Tabela 23, o banco de trabalho da Alemanha apresentou velocidade de crescimento ligeiramente menor do que o do Brasil, resultando em concentração celular final também menor, e não foi observado crescimento significativo durante a indução em ambos os cultivos. Já em relação à produção de ASNase, as atividades máximas atingidas foram próximas e no mesmo intervalo de tempo. Portanto, conclui-se que o comportamento em biorreator dos bancos foi similar e que os resultados são comparáveis.

Tabela 23. Comparação dos diferentes bancos de trabalho da cepa His⁺ em relação à velocidade específica de crescimento máximo em glicerol ($\mu_{\text{máx}}$, h⁻¹), concentração celular estimada por densidade óptica ao fim do ensaio (X_{DOfinal} , g/L) e atividade volumétrica máxima ($A_{\text{máx}}$, U/L) em biorreatores com o meio BSM+PTM1 e indução feita por pulsos com 10 mL de metanol a cada 24 horas de 24 a 120 horas de cultivo. Foram realizadas triplicatas biológicas no laboratório do Brasil e da Alemanha.

Laboratório	Exp.	Cepa	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	X_{DOfinal} (g/L)	$A_{\text{máx}}$ (U/L)	$t_{\text{Amáx}}$ (h)
USP	9	His ⁺	0,19	27,3±0,9	1600±45	100
TCI	12	His ⁺	0,16	23,2±2,4	1200±100	100

3.3.2. Experimento 13: comparação dos meios de cultivo

O experimento 13 teve o objetivo de comparar dois meios sintéticos, BSM+PTM1 e TCI+YTM, para o cultivo da cepa His⁺ em biorreator de 2L com crescimento em glicerol, seguido de fase de transição sem alimentação de substratos e, por fim, indução com pulsos de 10 mL de solução indutora a cada 24 horas por até 144 horas. Foram avaliados os parâmetros cinéticos na fase de crescimento e a atividade volumétrica na fase de indução. Os cultivos deste experimento foram realizados no laboratório TCI no Biorreator BIOSTAT A[®].

Durante a fase de crescimento, o cultivo em meio BSM+PTM1 não apresentou fase lag e teve crescimento com velocidade específica máxima de 0,16 h⁻¹, que foi ligeiramente menor do que o obtido no experimento 9 (0,19 h⁻¹), conforme se observa no Gráfico 18. Já no meio TCI, a fase lag teve duração de cerca de 8 horas e a velocidade específica máxima foi de 0,14 h⁻¹. Na fase de indução, a população deste meio prosseguiu crescendo até que as concentrações médias em ambos os cultivos atingiram o valor de 29,4±0,5 g_{biomassa}/L e não foi observado crescimento após 48 horas de cultivo. Em relação à atividade de ASNase, o meio TCI proporcionou atividade volumétrica máxima aproximadamente 4 vezes maior do que meio BSM, como mostra o Gráfico 19. Além disso, como mostra o gel de eletroforese na Figura 13, nota-se que a produção de proteínas foi significativamente menor em meio BSM. Ressalta-se que essa atividade no meio TCI é ainda mais alta do que a obtida no experimento 10 com controle de oxigênio (*DO-stat*), sendo os valores máximos de 5000±100 e 3000±140, respectivamente. Por isso, este meio foi selecionado para dar prosseguimento aos experimentos. Adicionalmente, de acordo com o método de Rasouli (2016), a osmolaridade do meio BSM é de 3,4 Osmol/L e a do TCI é de 1,9 Osmol/L (cálculo no Apêndice B7) e essa redução de osmolaridade pode estar relacionada ao aumento significativo da secreção de proteínas ativas.

Gráfico 18. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (X_{DO} , g/L) no experimento 13 com a cepa His⁺ em meio BSM e meio TCI com batelada de 4%_{v/v} de glicerol e indução com 10 mL de solução de metanol + 12 mLPTM1/L ou YTM/L, respectivamente, a cada 24 horas a partir de 24 horas de cultivo. Os desvios são de duplicatas analíticas. Demais condições de cultivo: 30°C, pH 5,0 e 5,6 (respectivamente) e pO₂ > 20% com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm.

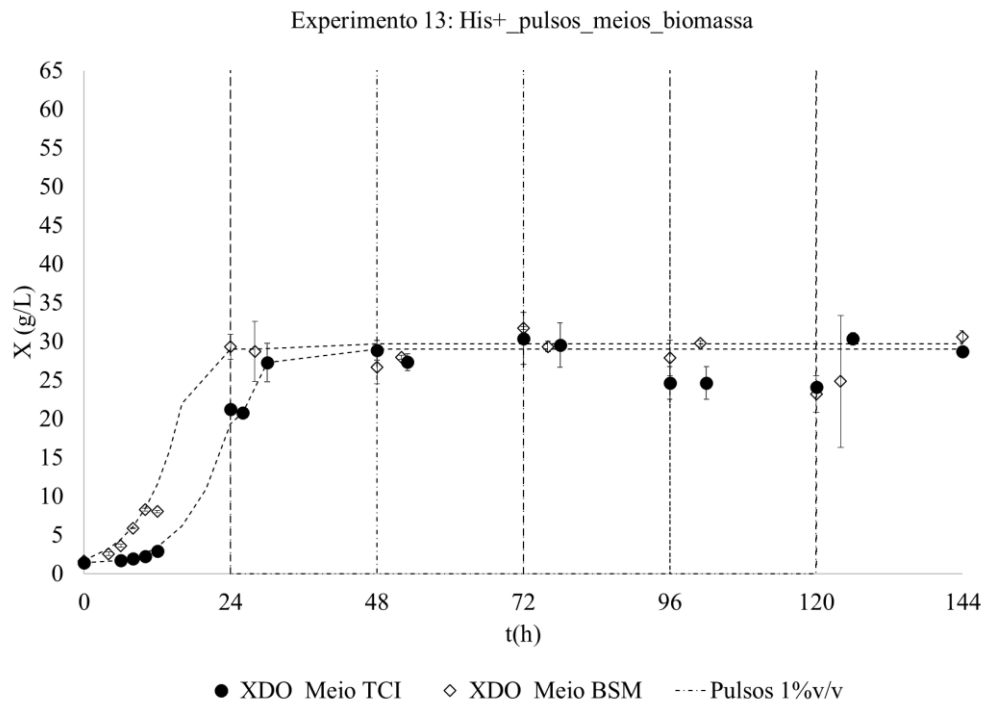


Gráfico 19. Perfis de atividade de ASNase calculada pelo método AHA no experimento 10 com a cepa His⁺ em meio BSM e TCI com batelada de 4%_{v/v} de glicerol e indução com 10 mL de solução de metanol + 12 mLPTM1/L ou YTM/L, respectivamente, a cada 24 horas a partir de 24 horas de cultivo. Os desvios são de duplicatas analíticas. Demais condições de cultivo: 30°C, pH 5,0 e 5,6 (respectivamente) e pO₂ > 20% com controle em cascata da agitação entre 700 e 1000 rpm.

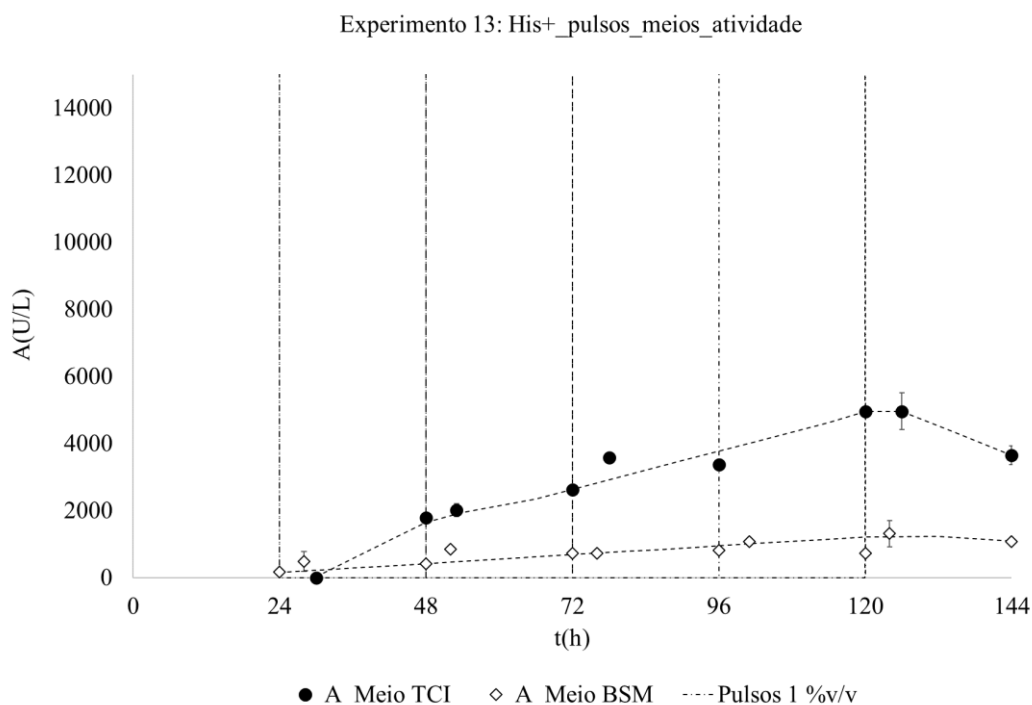
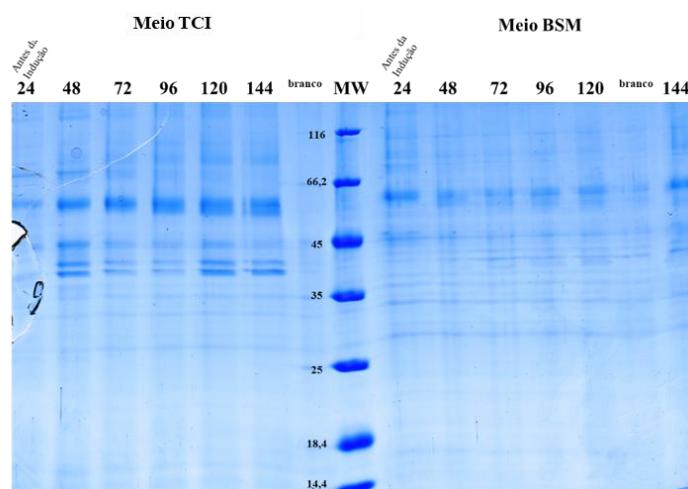


Figura 13. SDS-gel dos cultivos em meio BSM e TCI, a proteína completa é apresentada nas duas bandas mais fortes entre 35 e 45 kDa com diferentes níveis de glicosilação entre elas. MW: molecular weight, padrão Pierce™ Unstained Protein Marker.



Fonte: Foto tirada pela autora.

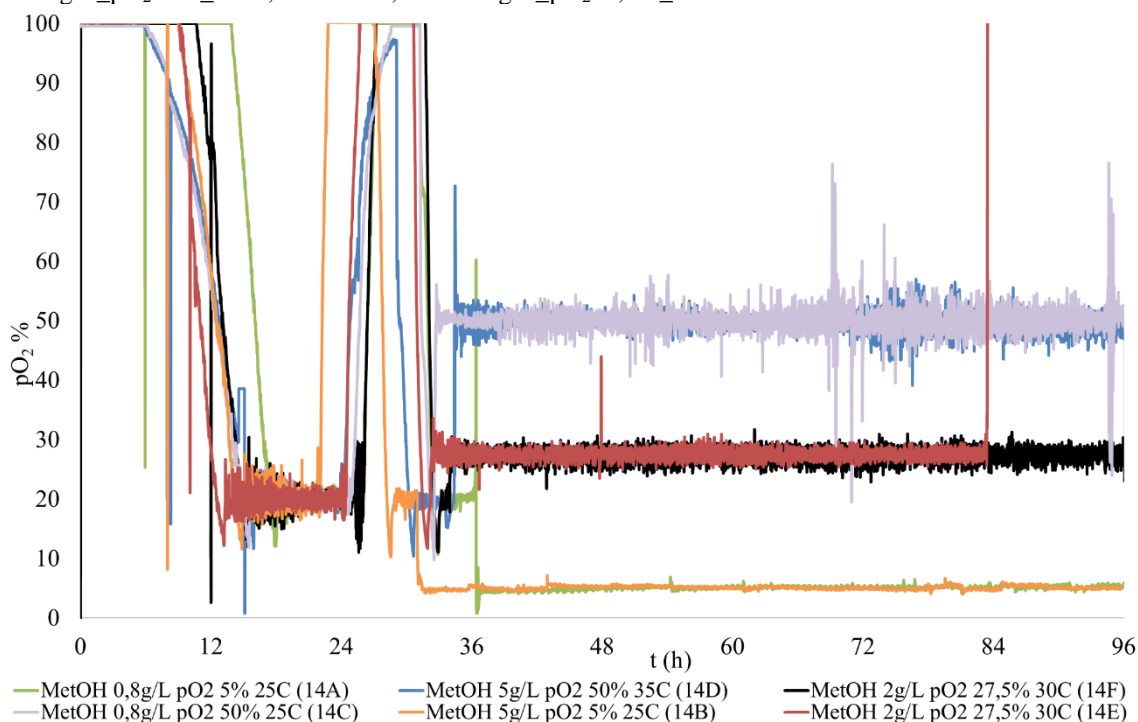
3.3.3. Experimentos 14A a 14F: execução do planejamento experimental com controle de metanol, oxigênio dissolvido e temperatura

O objetivo dos experimentos 14A a 14F foi obter a condição de indução que resultasse na maior atividade volumétrica em determinado tempo de cultivo de acordo com um planejamento experimental. As entradas avaliadas foram concentração de metanol e de oxigênio dissolvido e temperatura. Os cultivos foram realizados com 1 L de volume útil no biorreator do TCI com operação começando com batelada de glicerol, seguida de fase de transição sem alimentação de substratos e, por fim, indução iniciada com pulso de 10mL de solução indutora e posterior alimentação dela para manter o *set-point* da concentração de metanol em malha fechada com o sensor de metanol.

A maioria dos cultivos foi executada conforme o planejamento experimental. Entre as intercorrências que desviaram o processo do planejado, pode se citar: execução da fase de indução do experimento 14A a 25 °C ao invés de 35 °C; falhas na alimentação de metanol por conta de bolhas na mangueira por períodos limitados, como no experimento 14C (MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C) por volta de 70 horas de cultivo e no 14E (MetOH2g/L_pO₂37,5%_30°C) a partir das 84 horas de cultivo; e queda de energia no experimento 14B (MetOH5g/L_pO₂5%_25°C) por volta das 80 horas de cultivo. Os principais parâmetros são apresentados nos gráficos 22 a 25.

Em relação ao oxigênio dissolvido, como mostra o Gráfico 20, o pO_2 foi mantido acima de 20% da saturação do ar com controle em cascata com a agitação entre 700 e 1000 rpm até cerca de 24 ± 2 h durante o crescimento. Na fase de transição sem alimentação de fonte de carbono, a agitação caiu para 700 rpm e o pO_2 ficou próximo a 100% por cerca de 5 horas exceto no cultivo 14D (1 hora). Já na fase de produção, a partir de 31 ± 3 h, nos cultivos com indução a pO_2 5%, o controle foi realizado em cascata com a agitação entre 10 e 1000 rpm; nos cultivos com pO_2 27,5%, com agitação entre 10 e 1000 rpm e alimentação de oxigênio puro de 1 a 3,1 lpm; e nos cultivos com pO_2 50%, com agitação entre 10 e 1000 rpm e alimentação de oxigênio puro de 1 a 7,1 lpm. O controle da vazão de alimentação de oxigênio puro foi realizado manualmente de acordo com a necessidade das células. Conclui-se que o controle foi acionado de acordo com o planejamento de forma bem-sucedida.

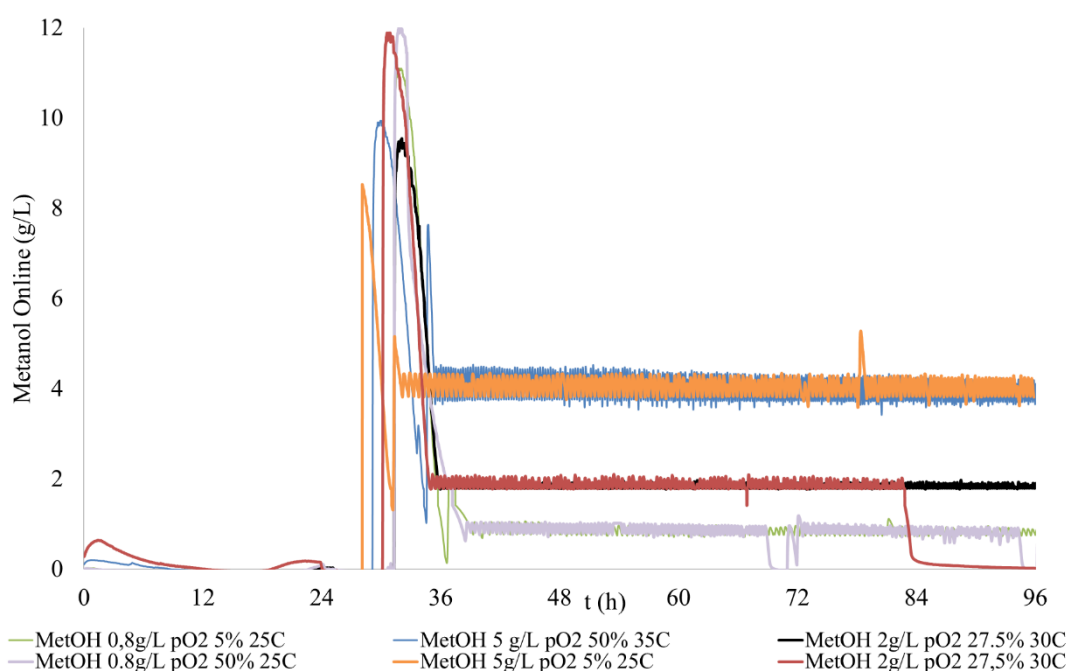
Gráfico 20. Controle do oxigênio dissolvido (pO_2 ,%) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_ pO_2 5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_ pO_2 5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_ pO_2 50%_25°C; 14D, MetOH5g/L_ pO_2 50%_35°C; 14E e 14F, MetOH2g/L_ pO_2 27,5%_30°C.



No Gráfico 21, são mostradas as concentrações de metanol medidas pelo sensor imerso no meio. Apesar do pulso de indução ser realizado com 10 mL de solução indutora (cerca de 8 g/L de metanol), observa-se que a concentração variou de 8 a 12 g/L de metanol, o que pode ser explicado por diferenças no volume e imprecisão da seringa utilizada. Na maioria das condições, a concentração de metanol foi mantida de acordo com o planejamento com uma

pequena variação em relação ao valor teórico, provavelmente, por diferenças nas condições de calibração com as de operação e com algumas falhas já citadas devido a bolhas na mangueira. Mas, de forma geral, o controle de metanol foi bem-sucedido. Ademais, nos gráficos dos experimentos no fim deste subitem, Gráfico 28 a Gráfico 33, nota-se que a concentração de metanol medida por HPLC é discrepante em relação ao valor *online* em alguns pontos, o que pode ser atribuído a falhas no preparo da amostra e também à própria volatilidade do metanol.

Gráfico 21. Controle da concentração de metanol (g/L) medida *online* pelo sensor ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30°C.



Em relação à temperatura, Gráfico 22, foi possível manter o controle no *set-point* selecionado pelo planejamento e apenas o experimento 14B apresentou uma oscilação às 80 horas por uma pane elétrica, mas sem prejuízo ao cultivo. Já em relação ao pH, Gráfico 23, observa-se que foi mantido igual em todas as condições com adição de 50 a 80 mL de HCl 1 M e de 250 a 400 mL de NH₄OH 25%_{v/v}, conforme Gráfico 28 a Gráfico 33 no fim deste subitem. A adição de ácido ocorreu após o fim da fase exponencial em glicerol, provavelmente, houve aumento do pH do meio devido ao consumo de algum ácido orgânico gerado durante o crescimento em glicerol, no entanto, este subproduto não foi identificado. A adição de NH₄OH ocorreu durante as fases de crescimento em glicerol e metanol, como a base utilizada também

era fonte de nitrogênio, para sustentar o crescimento, os íons NH_4^+ foram consumidos pelas células, liberando H^+ no meio, o que causou a sua acidificação.

Gráfico 22. Controle da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35 $^{\circ}\text{C}$; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30 $^{\circ}\text{C}$.

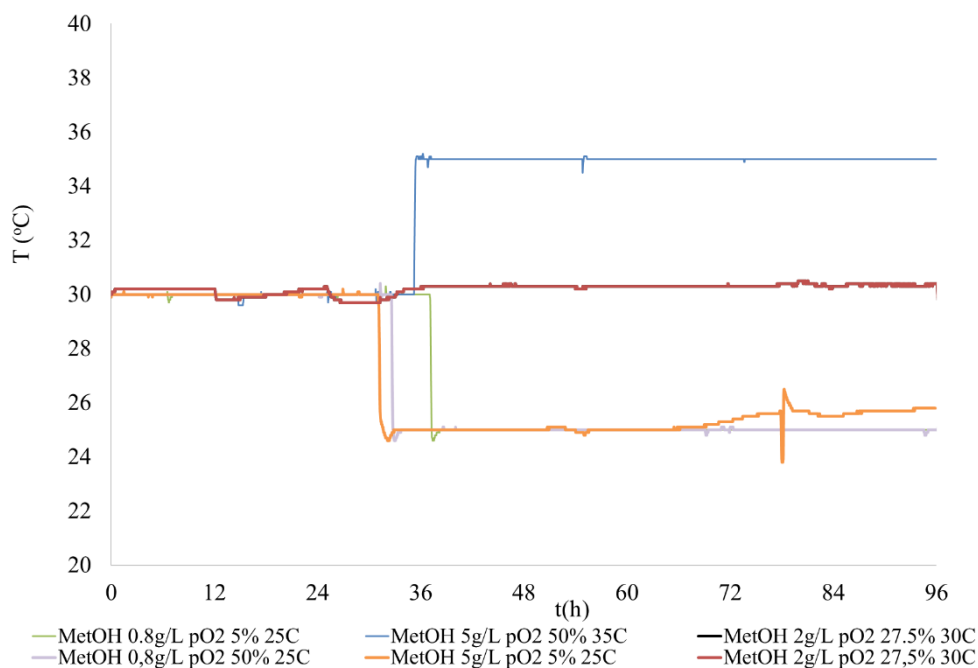
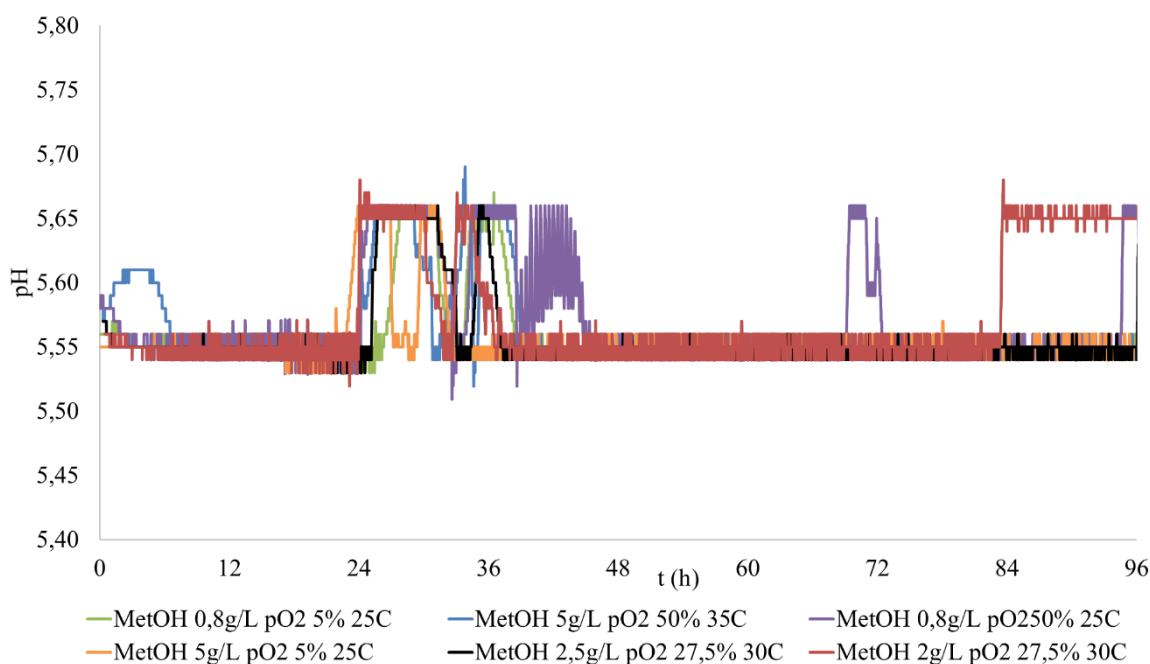


Gráfico 23. Controle do pH ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25 $^{\circ}\text{C}$; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35 $^{\circ}\text{C}$; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30 $^{\circ}\text{C}$.



Todos os cultivos apresentaram fases de crescimento similares em glicerol, como mostra o Gráfico 24, com cerca de 2 horas de fase lag, fase exponencial de até 24 horas e concentração celular final de $30,7 \pm 1,5$ g_{biomassa seca}/L em glicerol. A velocidade específica máxima média em glicerol calculada graficamente foi de $\mu_{\text{máx}}$ $0,15 \pm 0,02$ h⁻¹ e o coeficiente médio de conversão de glicerol em biomassa foi de $0,51 \pm 0,05$ g_{biomassa seca}/g_{glicerol}, compatíveis com os resultados anteriores obtidos com meio BSM e com a literatura (COS et al., 2006; GURRAMKONDA et al., 2009). Ressalta-se que a velocidade específica máxima média em glicerol calculada pelo balanço de CO₂ foi ligeiramente maior, $\mu_{\text{máxCO}_2}$ $0,20 \pm 0,03$ h⁻¹, sendo que essa diferença pode ser justificada pela falta de amostras de biomassa que resultou na inclusão de pontos na fase lag ou estacionária, reduzindo a velocidade de crescimento. Adicionalmente, observou-se que o consumo específico de O₂ foi maior neste meio do que em BSM (Tabela 15). Os principais parâmetros cinéticos do crescimento em glicerol são apresentados na Tabela 24.

Gráfico 24. Perfis de crescimento celular calculados por densidade óptica (X_{DO} , g_{biomassa seca}/L) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH 0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH 5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH 0,8g/L_pO₂50%_25°C; 14D, MetOH 5g/L_pO₂50%_35°C; 14E e 14F, MetOH 2g/L_pO₂27,5%_30°C. As linhas tracejadas indicam as tendências e os desvios provêm de duplicatas analíticas com exceção do ponto central, que é uma duplicada experimental (14E e F).

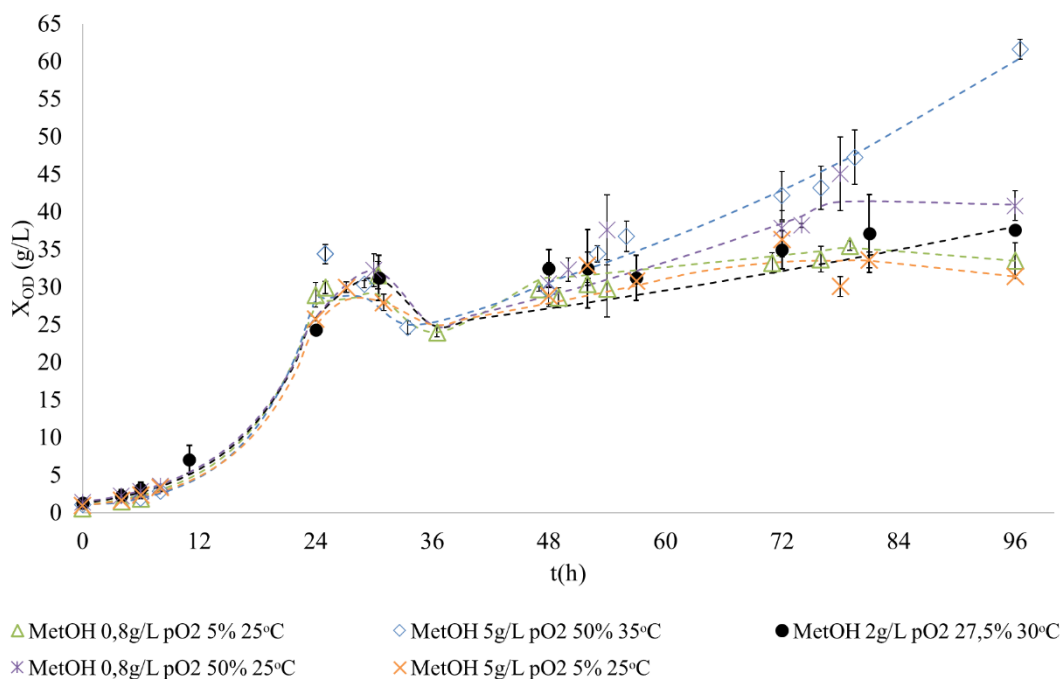


Tabela 24. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada com 4%_{v/v} glicerol em meio de Gurrnkonda et al. (2010) com a cepa His⁺ nos experimentos 14A a 14F. Os desvios de cada experimento são provindos de duplicatas analíticas e para cálculo do desvio da média foi considerado que os 6 cultivos foram replicatas experimentais.

Exp. / Ref	X _{D0} ^{máx} (g/L)	μ ^{máx} (1/h)	μ ^{máx} CO ₂ (1/h)	Y _{X/S} (g _{biomassa} seca/g _{glicerol})	Prot ^{fexp} * (g/L)	qO ₂ ^{exp**} (mgO ₂ /g biomassa seca/h)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	31,6±1,8	0,15	0,21	0,50	0,5±0,0	
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	30,0±0,7	0,18	0,22	0,49	0,7±0,0	57
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	32,2±2,2	0,12	0,19	0,48	0,6±0,0	52
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	30,3±0,5	0,14	0,22	0,57	0,7±0,0	54
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	32,0±0,8	0,18	0,15	0,55	0,8±0,0	
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	28,3±3,3	0,15	0,18	0,56	0,6±0,0	
Média	30,7±1,5	0,15±0,02	0,20±0,03	0,53±0,04	0,7±0,1	54±3

* Medida ao final da fase exponencial em glicerol; **medido pelo Método Dinâmico às 8h de cultivo

Logo após o pulso de metanol, foi observada ligeira diminuição da população, Gráfico 24, como já foi reportado na literatura e estaria relacionada com o gasto energético necessário para reconstrução do proteoma antes da incorporação do metanol na biomassa e em produto e a um processo autofágico que geralmente ocorre na fase estacionária do crescimento em glicerol (COS et al., 2006; GURRAMKONDA et al., 2009; ROTH et al., 2018; VANZ; NIMTZ; RINAS, 2014). Em seguida, as diferentes condições de indução resultaram em comportamentos distintos. Ao fim do terceiro dia de cultivo, os experimentos com maior concentração de oxigênio (pO₂ 50%) apresentaram concentração celular significativamente maior que as demais condições. De acordo com Ponte et al. (2016), a oxigenação não-limitante permite a oxidação completa do metanol, evitando tanto seu acúmulo quanto de subprodutos tóxicos para células, favorecendo o crescimento populacional. Em especial, o experimento 14D (MetOH5g/L_pO₂50%_35°C) teve fase exponencial mais longa, com população final de 61,6±1,3 g_{biomassa} seca/L. Já os demais cultivos apresentaram população final abaixo de 40,0 g_{biomassa} seca/L.

Em relação à produção de ASNase, Gráfico 25, é possível observar que há um aumento linear até aproximadamente 60 horas e, em seguida, há uma redução ou estabilização na atividade volumétrica. Comparando com a produção de proteínas totais, Gráfico 26, há um aumento até o fim do ensaio na maioria das condições, o que significa que após um período de tempo a proteína produzida apresentou atividade reduzida, o que pode indicar perda de qualidade do produto ou a presença de proteases capazes de catalisar a hidrólise da ASNase.

Gráfico 25. Perfis de atividade de ASNase calculada pelo método do AHA (A, U/L) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30°C. As linhas tracejadas indicam as tendências e os desvios provêm de duplicatas analíticas com exceção do ponto central, que é uma duplicada experimental (14E e F). Obs: após 80 horas de cultivo, o experimento 14E ficou sem alimentação de metanol, por isso foi assumido que a tendência de atividade seria a do experimento 14F.

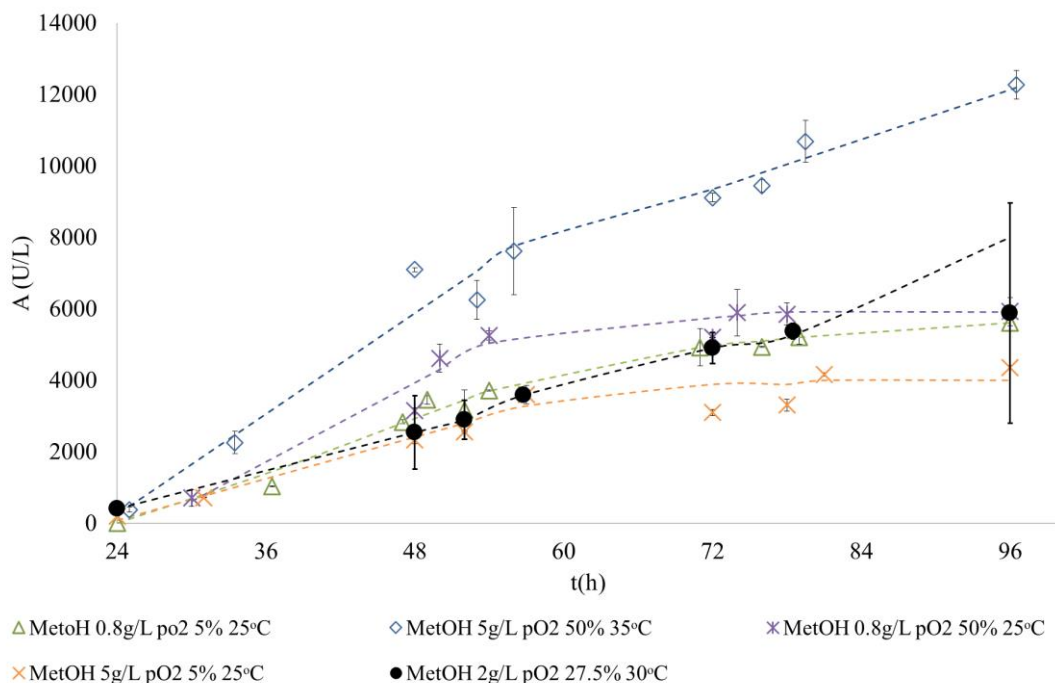
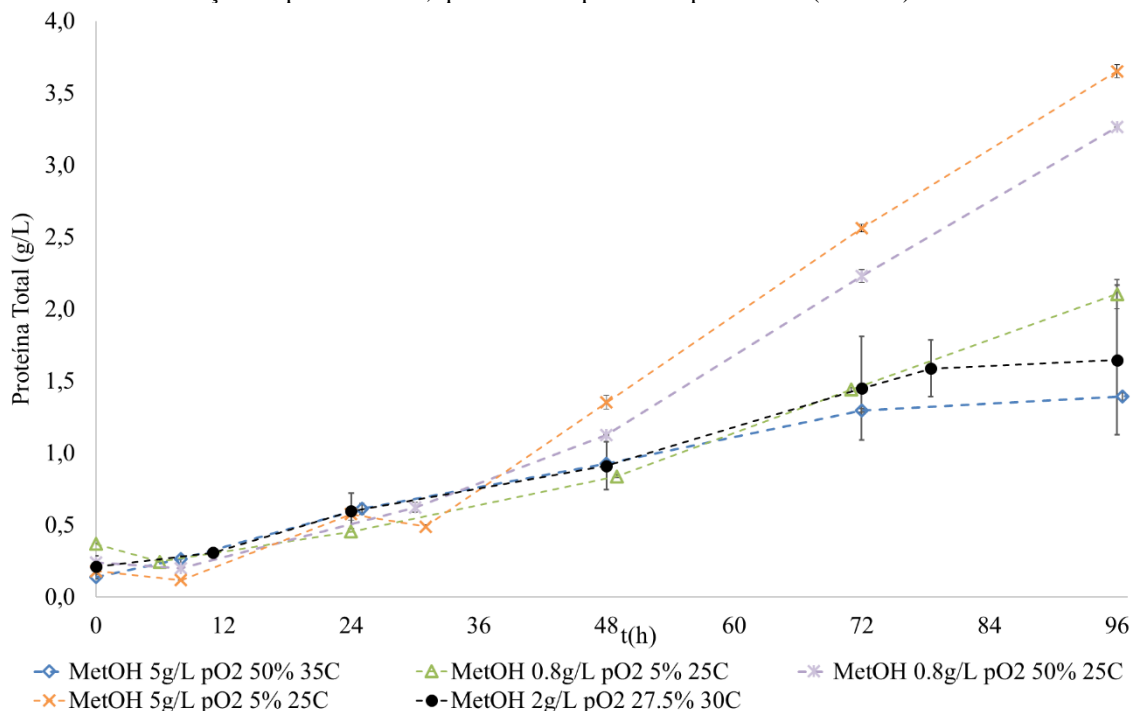
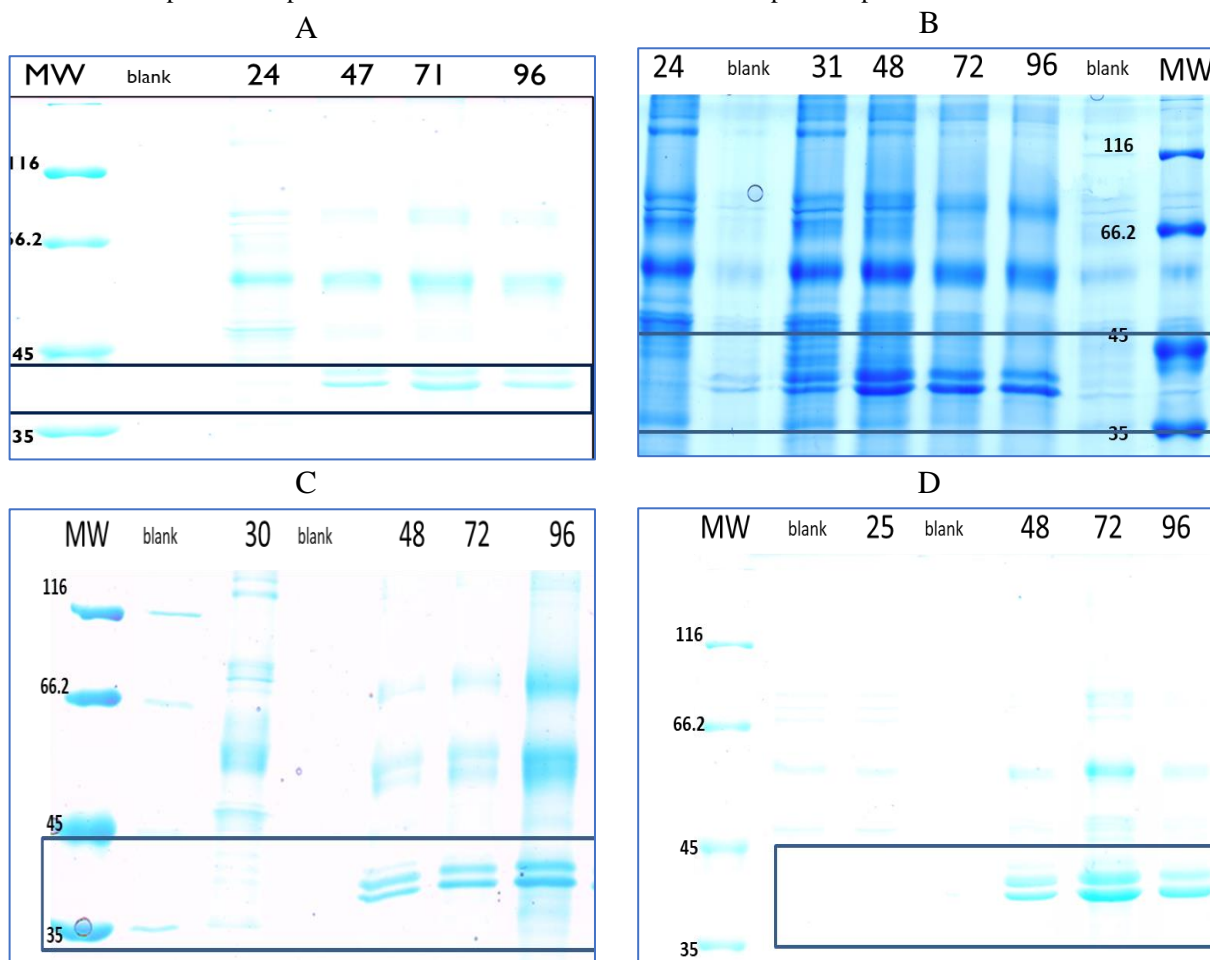


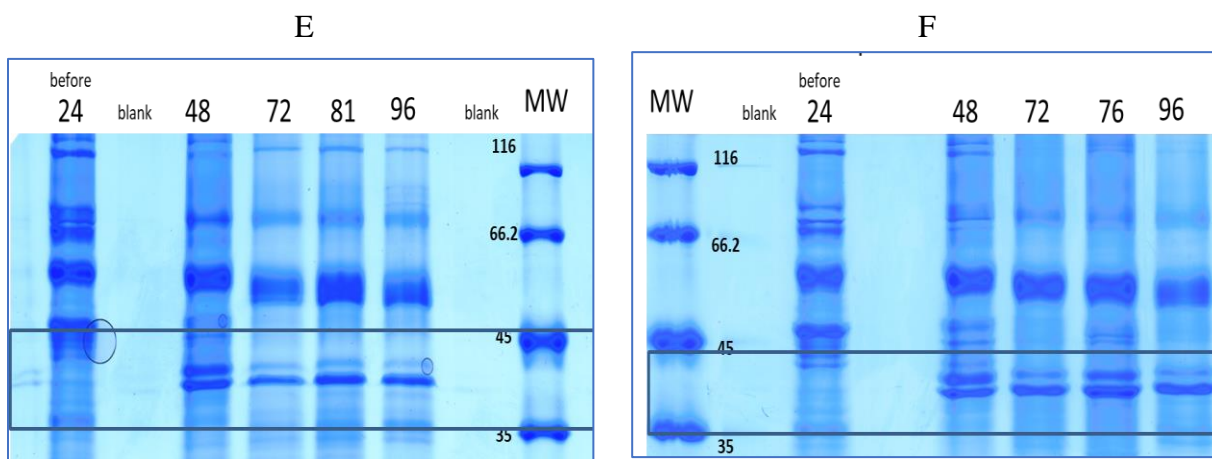
Gráfico 26. Perfis de produção de proteína calculada pelo método do BCA (Proteínas Totais, g/L) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30°C. As linhas tracejadas indicam as tendências e os desvios provêm de duplicatas analíticas com exceção do ponto central, que é uma duplicada experimental (14E e F).



Analisando a Figura 14, não é possível identificar um rastro de proteínas menores que poderiam indicar atividade proteolítica ou a produção de proteínas truncadas. Uma hipótese seria que, a partir de certo momento, a célula só é capaz de secretar o monômero da ASNase como observado por Effer et al. (2020) e como este possui atividade específica menor (50 U/mg_{proteína} contra 300 U/mg_{proteína} do tetrâmero), o acúmulo de atividade total é desacelerado. No entanto, como não foi feita a purificação dessas moléculas não é possível afirmar que este fenômeno ocorreu e, por isso, deverá ser futuramente investigado, mas está fora do escopo desta tese.

Figura 14. Géis de SDS-PAGE dos experimentos 14A a 14F: após a indução, é possível identificar duas bandas com aproximadamente 37 kDa correspondentes aos monômeros da ASNase com diferentes graus de glicosilação. Sendo que: A, experimento 14A MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; B, 14B MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; C, 14C MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; D, 14D MetOH5g/L_pO₂50%_35°C; E e F, experimentos 14E e 14F MetOH2g/L_pO₂27,5%_30°C. MW: *molecular weight* (padrão de proteínas); *blank*: branco (sem amostra). Os números no topo de cada pista são as horas de cultivo e os números da pista do padrão estão em kDa.





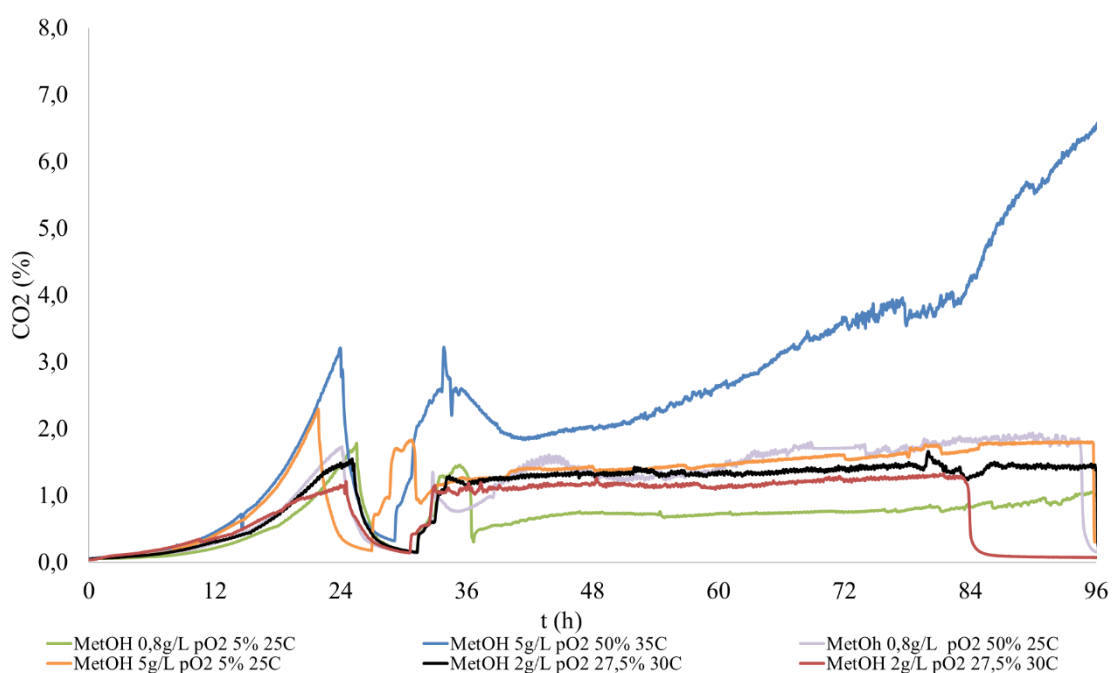
Para cálculo dos principais parâmetros cinéticos durante a indução foi considerado: fase exponencial em metanol até o fim o do terceiro dia de experimento (estado pseudo-estacionário); que a população era homogênea; e que, portanto, as Equações 36 a 39 puderam ser resolvidas com discretização do volume com os valores pontuais calculados de acordo com o Apêndice B, ou seja, os parâmetros foram calculados por meio da variação mássica. Os principais parâmetros cinéticos são apresentados na Tabela 25.

As velocidades específicas de crescimento calculadas pela concentração celular e pelo consumo de CO₂ foram consistentes, no entanto, pelo consumo de base, os valores foram maiores. Em relação ao consumo de metanol, as velocidades específicas de consumo médias estão de acordo com a literatura, entre 0,05 e 0,57 g_{metoh}/ g_{biomassa seca}/ h (LEE et al., 2003; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016), e são similares entre os ensaios. Já em relação à velocidade específica de formação de produto, ela foi maior nos experimentos do ponto central, 14E e 14F, do que nas demais condições. Além disso, comparando as concentrações finais de proteína, o experimento 14D apresentou o menor valor, portanto, pode-se concluir que a maior atividade final do experimento 14D (10700 U/L) se deve tanto à maior população quanto a qualidade da proteína produzida, ou seja, sua maior atividade específica (7643 U/g_{proteína}).

Sobre os parâmetros respiratórios, no Gráfico 27 são apresentados os perfis de formação de CO₂ e, em especial no experimento 14D, é possível observar que o fluxo de carbono é majoritariamente destinado para via de disseminação de energia e formação de CO₂, como reportado na literatura (VANZ et al., 2012a). Os demais parâmetros são apresentados na Tabela 26. Em relação ao coeficiente respiratório (RQ), os valores são distintos do valor teórico esperado, 0,6 mol_{CO2}/mol_{O2} em algumas condições. Além disso, os valores de Y_{CO2}/S_{metoh} e

$Y_{O_2/S_{metoh}}$ também são diferentes dos teóricos esperados para a oxidação completa do metanol, $0,031 \text{ mol}_{CO_2}/g_{metoh}$ e $0,047 \text{ mol}_{O_2}/g_{metoh}$, respectivamente. Portanto, existem evidências que há erros nas medidas dos gases, o que é factível já que a alimentação de oxigênio foi feita por um fluxômetro antigo e provavelmente descalibrado e a concentração dos gases na saída estava acima da faixa de operação do sensor (entre 0,1 e 25% v/v para O_2 e entre 0 e 10% v/v para CO_2) em alguns casos. Principalmente para o experimento 14D, é possível observar que a velocidade de consumo de oxigênio é inconsistente. Para confirmar a hipótese de erro nas medidas dos gases, foi realizado o balanço de carbono com cálculo de erros sistemáticos e os resultados são apresentados no item Análise dos Fluxos de Carbono e Identificação de Erros Sistemáticos.

Gráfico 27. Perfis da concentração de CO_2 na saída dos gases medida pelo sensor BlueInOne Ferm (%) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14F. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C; 14E e 14F, MetOH2g/L_pO₂27,5%_30°C.



A seguir, são apresentados os perfis de crescimento celular, consumo de substratos e formação de produto, as estratégias de controle de pH, pO₂ e metanol para os seis cultivos no Gráfico 28 a Gráfico 33. Adicionalmente, no Gráfico 34 a Gráfico 36, são exibidas as velocidades de consumo de oxigênio, formação de gás carbônico e o coeficiente respiratório para os seis ensaios.

Aumento da produção de L-Asparaginase com controle das condições de indução
CAPÍTULO 3

Tabela 25. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a indução com metanol em meio TCI com a cepa His⁺ até o fim do terceiro dia de cultivo nos experimentos 14A a 14F. Os desvios de cada experimento são providos de duplicatas analíticas e para cálculo do desvio do ponto central foram considerados os experimentos 14E e 14F, que são replicatas experimentais.

Exp. / Ref	X _D final (g/L)	μ _{máx} (1/h)	μ _{máx} CO ₂ (1/h)	μ _{máx} base (1/h)	Q _S médio (g _{MetOH} /g _{biomassa seca} /h)	Q _p médio (U/g _{biomassa seca} /h)	Prot _{final} (g/L)	A _{máx} (U/L)	A _X máx (U/g _{biomassa seca})	A _P máx (U/g _{proteína})	A _{máx} (U)	Δt (h)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	35,5±0,6	0,005	0,007	0,017	0,05	1,6	1,5±0,1	5200	130	3467	3950	36,5 - 79
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	33,6±1,0	0,005	0,005	0,017	0,07	1,3	2,9±0,1	4200	120	1448	4100	31 - 81
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	45,1±4,9	0,006	0,011	0,017	0,06	1,2	2,5±0,1	5900	150	2360	4900	30 - 78
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	47,3±3,6	0,015	0,017	0,022	0,06	1,7	1,4±0,1	10700	200	7643	10700	33,5 - 79,5
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	33,5±0,2	0,003	0,003	0,016	0,08	2,4	1,6±0,1	5200	130	3250	4800	32 - 81
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	37,5±0,5	0,002	0,003	0,019	0,08	2,8	2,0±0,0	5500	170	2750	3700	31,4 - 76
Média Ponto Central	35,5±2,8	0,003±0,001	0,003±0,000	0,018±0,002	0,08±0,00	2,6±0,3	1,8±0,3	5350±210	150±30	3000±353	-	31,4 - 81

Tabela 26. Principais parâmetros respiratórios obtidos durante a indução com metanol em meio de Gurramkonda et al. (2010) com a cepa His⁺ até o fim do terceiro dia de cultivo nos experimentos 14A a 14F. Para cálculo dos desvios do ponto central foram considerados os experimentos 14E e 14F, que são replicatas experimentais.

Exp. / Ref	q _{CO2} médio (g _{CO2} /g _{biomassa seca} /h)	q _{O2} médio (g _{CO2} /g _{biomassa seca} /h)	R \bar{Q} (molCO ₂ /molO ₂)	Y _{CO2} /S _{metoh} (molCO ₂ /g _{metoh})	Y _{O2} /S _{metoh} (molO ₂ /g _{metoh})
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,04	0,02	1,1	0,018	0,013
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,03	0,04	0,5	0,010	0,018
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,03	0,06	0,4	0,011	0,031
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,03	0,01	2,7	0,011	0,005
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,03	0,05	0,5	0,009	0,020
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,05	0,05	0,7	0,014	0,020
Média Ponto Central	0,04±0,01	0,05±0,01	0,6±0,1	0,011±0,004	0,020±0,000

Gráfico 28. Principais parâmetros do experimento 14A com cepa His⁺ no meio de Gurramkonda et al. (2010) com batelada de 4%_{v/v} de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO₂ 5%, metanol 0,8 g/L e temperatura de 25 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (g_{biomassa seca}/L), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor *online* (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH₄OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO₂ (%) com agitação (rpm); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor *online* (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios provindos de duplicatas analíticas.

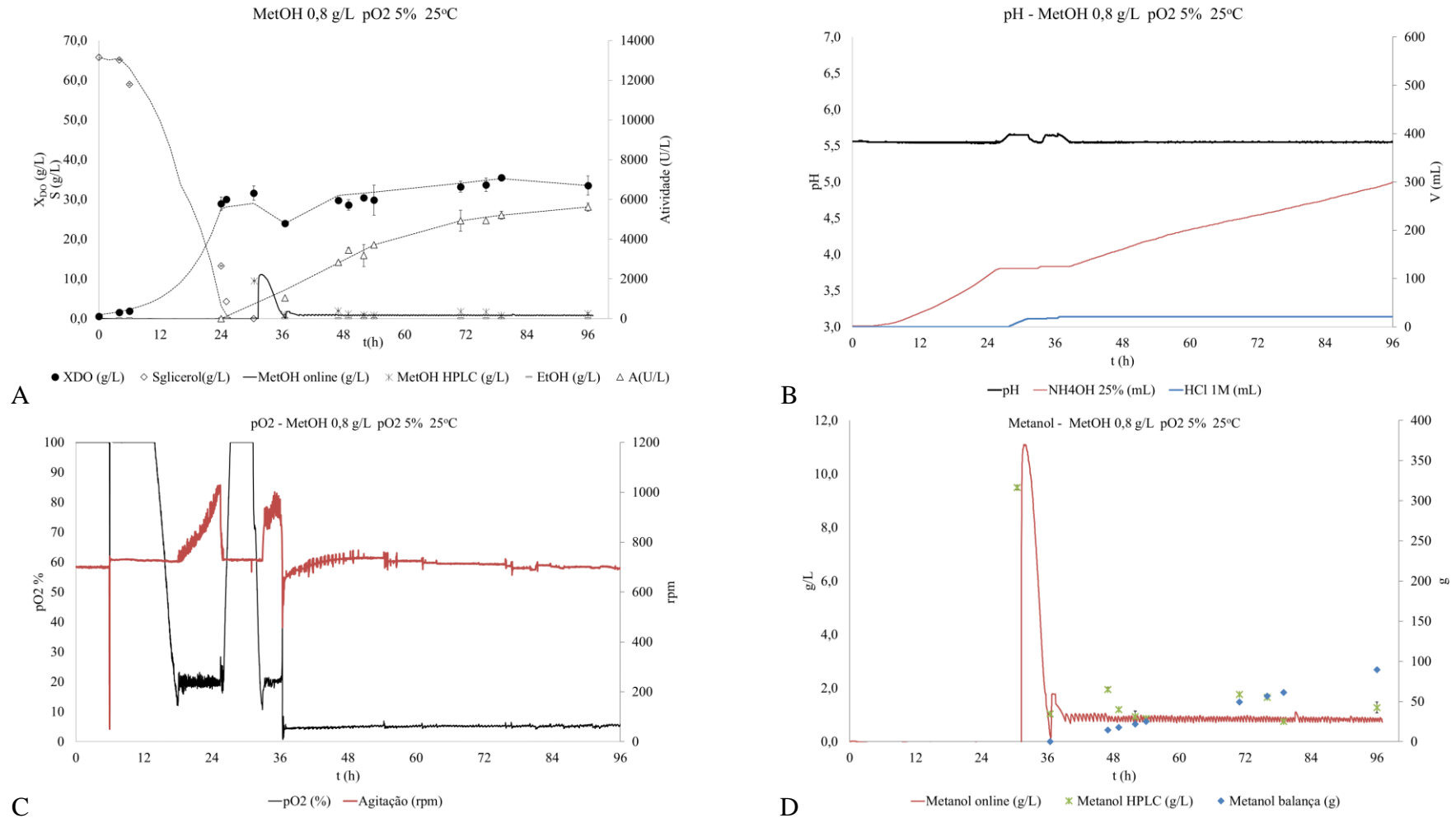


Gráfico 29. Principais parâmetros do experimento 14B com cepa His⁺ no meio de Gurramkonda et al. (2010) com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO2 5%, metanol 5,0 g/L e temperatura de 25 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (g_{biomassa seca}/L), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor *online* (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH₄OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO₂ (%) com agitação (rpm); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor *online* (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios providos de duplicatas analíticas.

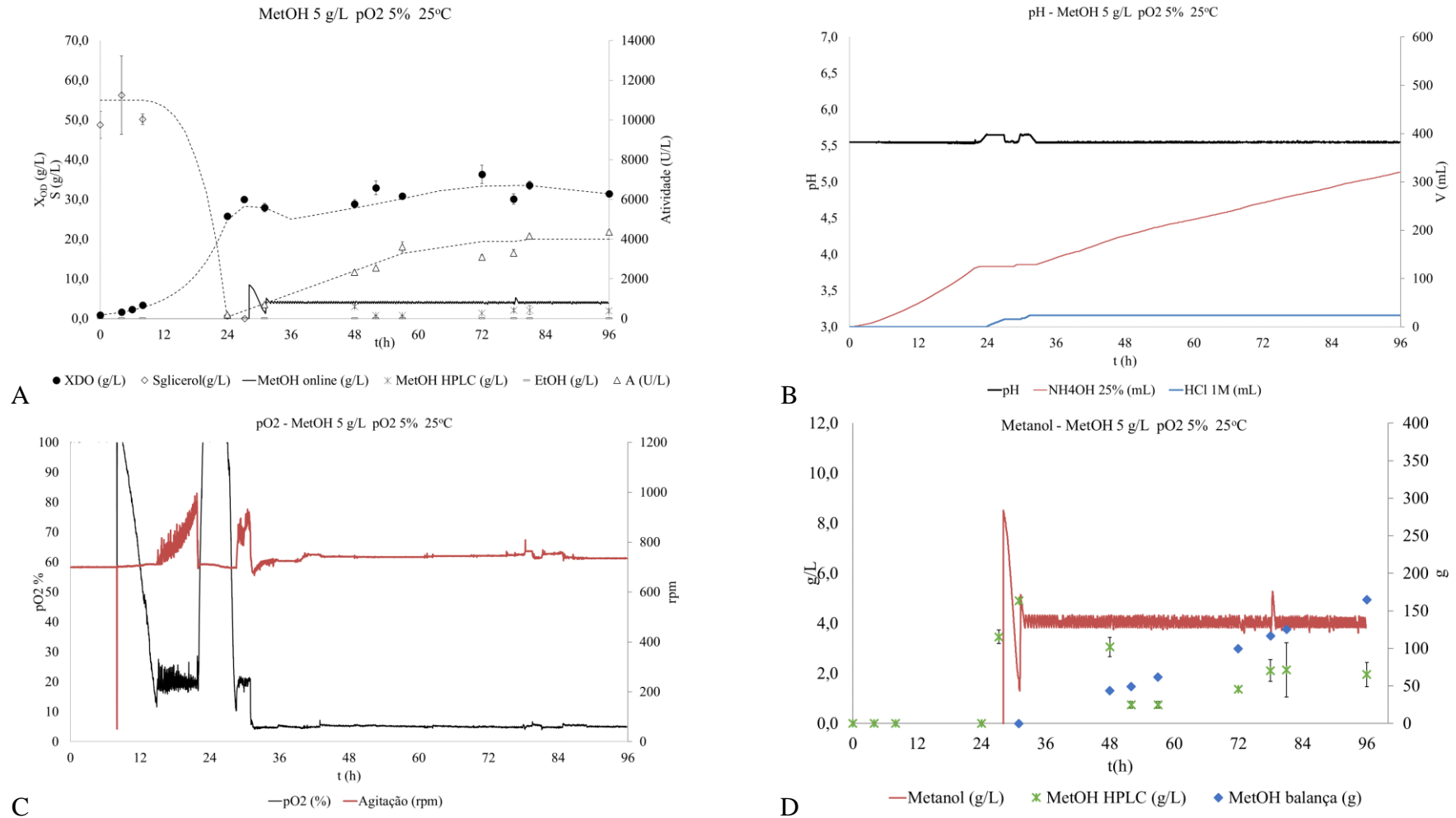


Gráfico 30. Principais parâmetros do experimento 14C com cepa His⁺ no meio de Gurramkonda et al. (2010) com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO₂ 50%, metanol 0,8 g/L e temperatura de 25 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (g_{biomassa seca}/L), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor *online* (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH₄OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO₂ (%) com agitação (rpm) e oxigênio puro (L); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor *online* (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios providos de duplicatas analíticas.

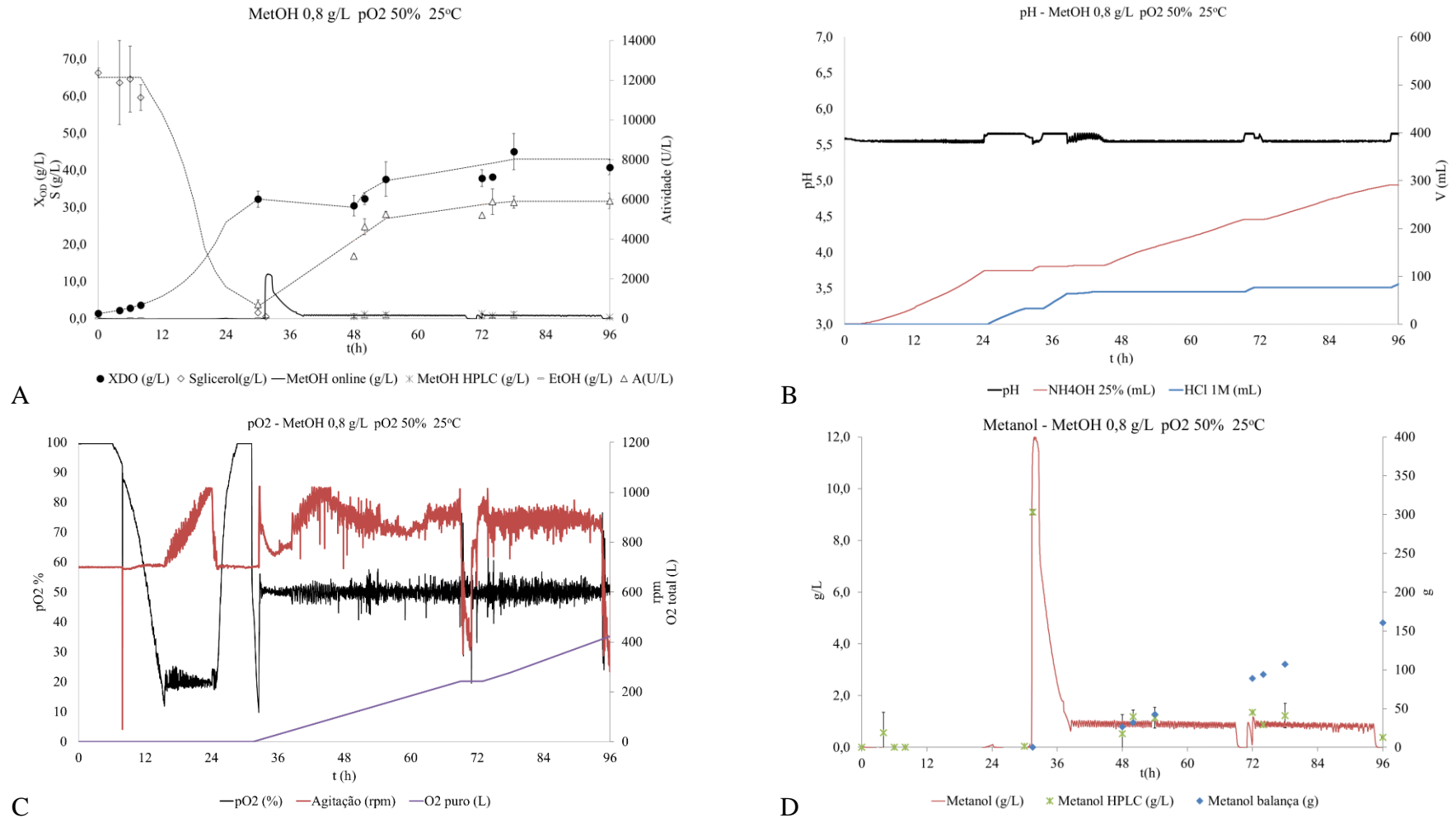


Gráfico 31. Principais parâmetros do experimento 14D com cepa His⁺ no meio de Gurramkonda et al. (2010) com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO₂ 50%, metanol 5,0 g/L e temperatura de 35 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (g_{biomassa seca}/L), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor *online* (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH₄OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO₂ (%) com agitação (rpm) e oxigênio puro (L); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor *online* (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios providos de duplicatas analíticas.

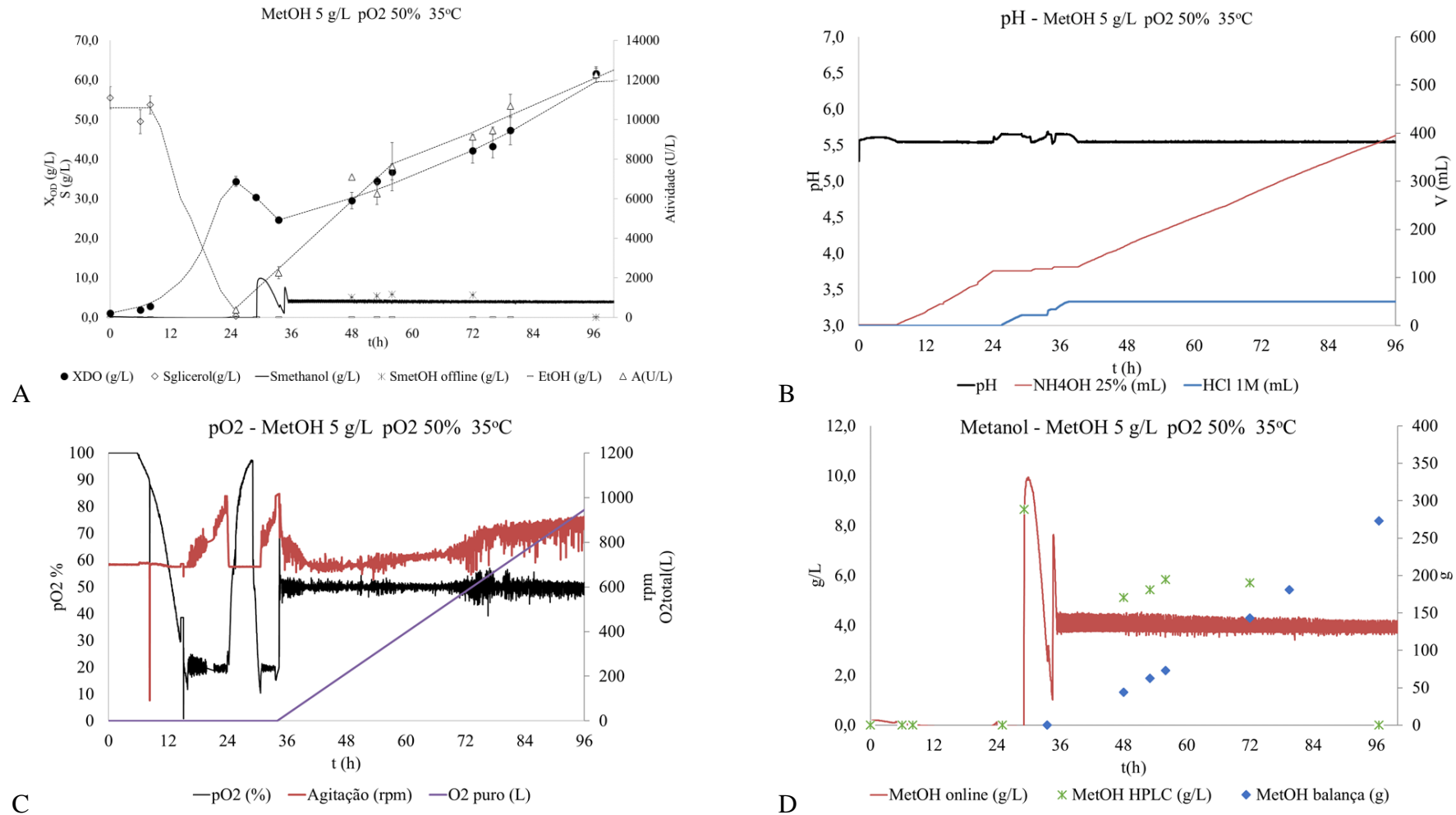


Gráfico 32. Principais parâmetros do experimento 14E com cepa His+ no meio de Gurrankonda et al. (2010) com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO2 27,5%, metanol 2,0 g/L e temperatura de 30 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (X_{OD} (g/L) e S (g/L)), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor online (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH4OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO2 (%) com agitação (rpm) e oxigênio puro (L); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor online (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios providos de duplicatas analíticas.

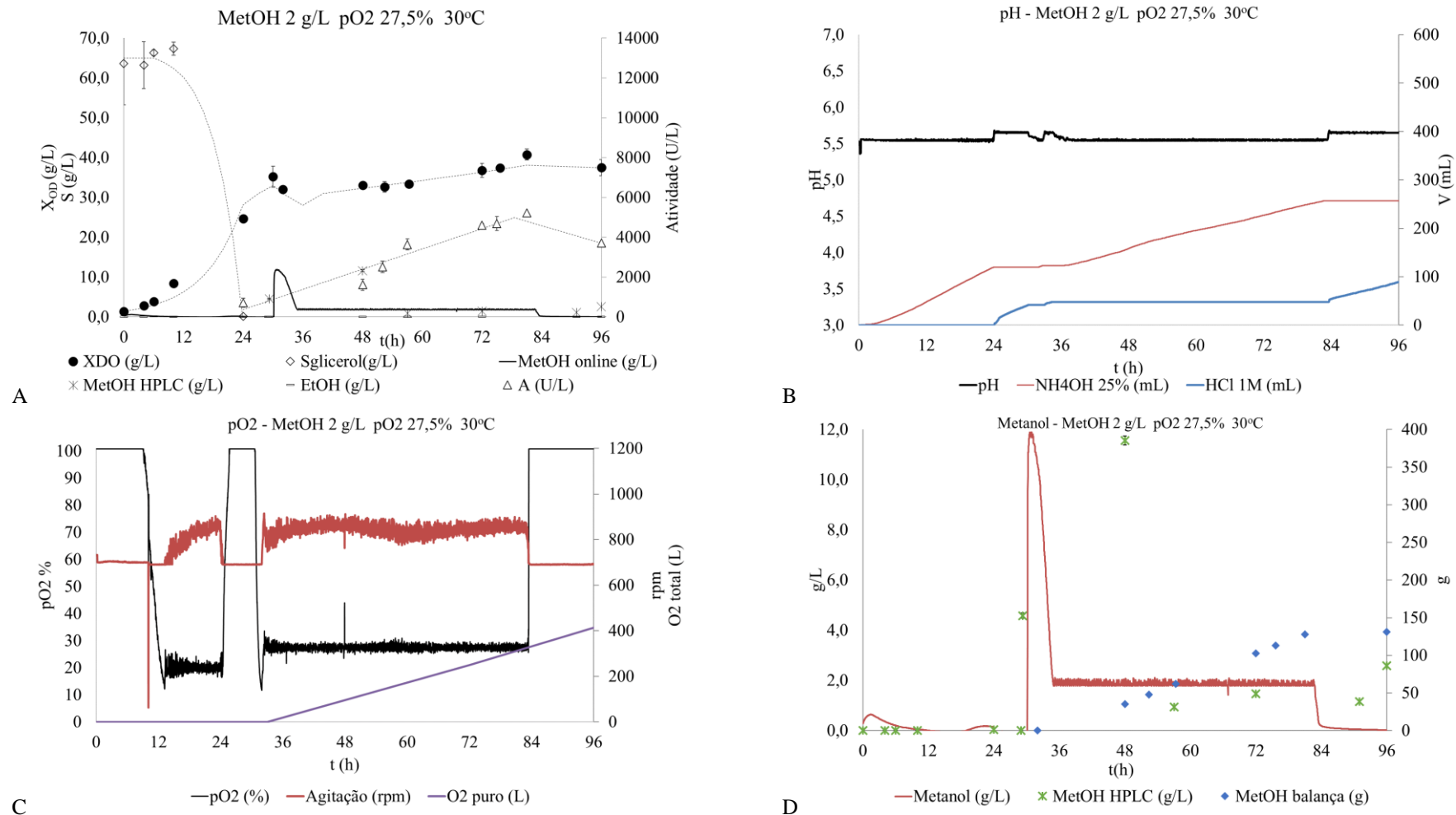


Gráfico 33. Principais parâmetros do experimento 14F com cepa His+ no meio de Gurramkonda et al. (2010) com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 24 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 30 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO2 27,5%, metanol 2,0 g/L e temperatura de 30 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica ($g_{\text{biomassa seca}}/L$), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L), metanol pelo sensor online (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH4OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO2 (%) com agitação (rpm) e oxigênio puro (L); D) Concentração de metanol medida por HPLC e pelo sensor online (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios provindos de duplicatas analíticas.

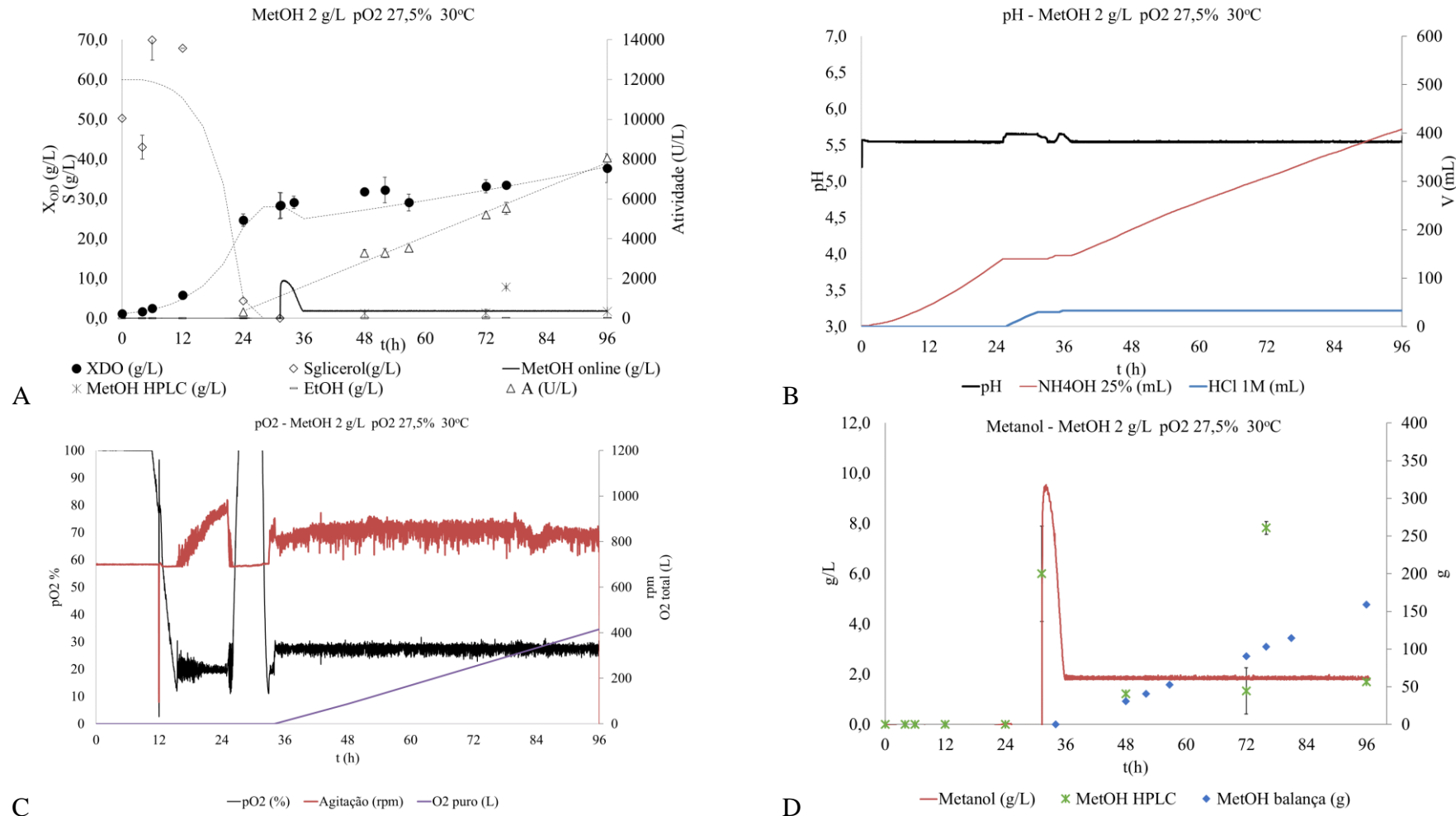


Gráfico 34. Perfis das velocidades específicas de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h), de produção de gás carbônico (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ_{médio}, molCO₂/molO₂) ao longo do tempo nos experimentos 14A a 14D. Sendo que: 14A, MetOH0,8g/L_pO₂5%_25°C; 14B, MetOH5g/L_pO₂5%_25°C; 14C, MetOH0,8g/L_pO₂50%_25°C; e 14D, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C.

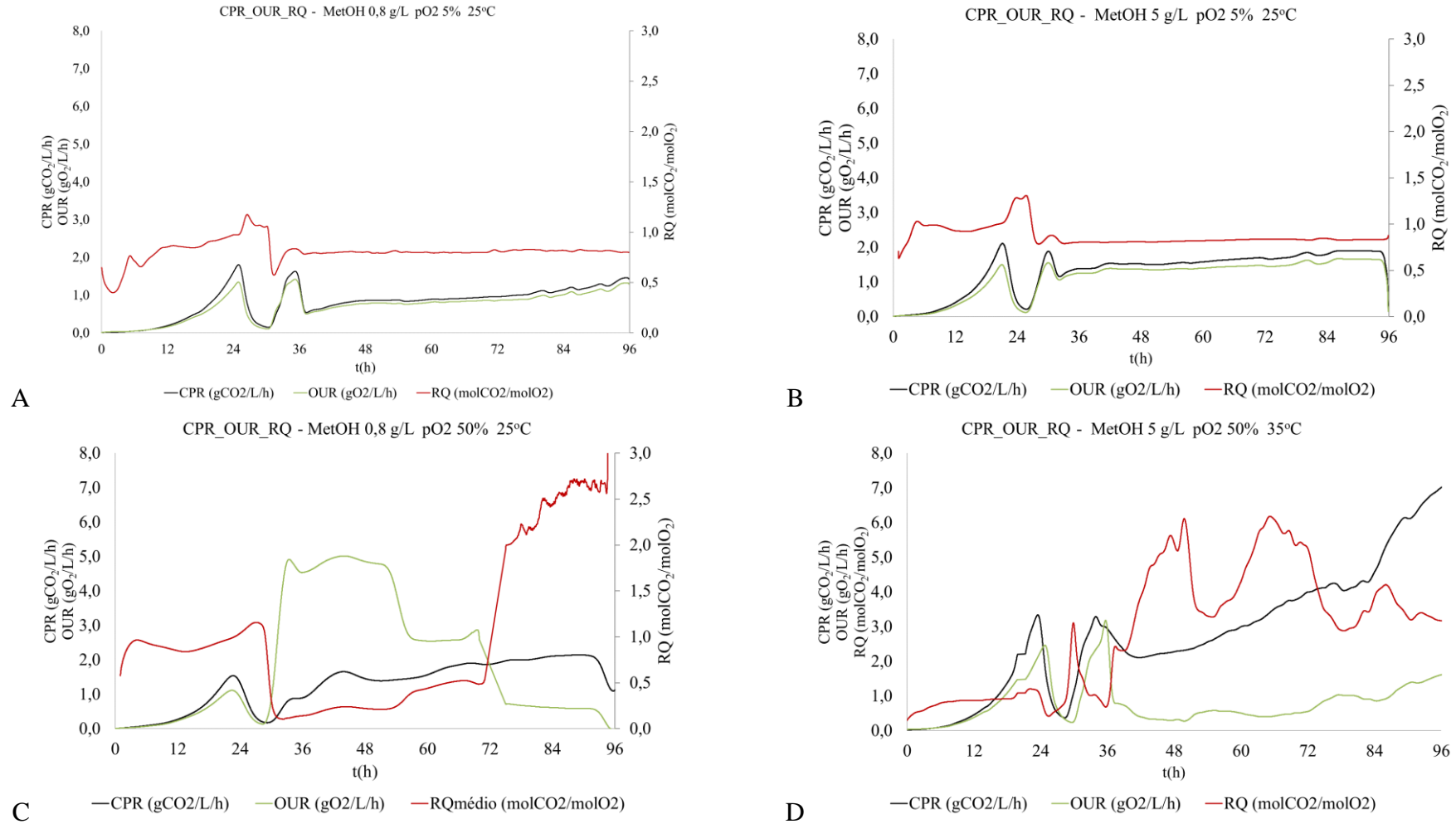


Gráfico 35. Perfis das velocidades específicas de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h), de produção de gás carbônico (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ, molCO₂/molO₂) ao longo do tempo no experimento 14E., MetOH 2g/L pO₂ 27,5% 30°C. Obs: após de 84 h houve falha na alimentação de metanol.

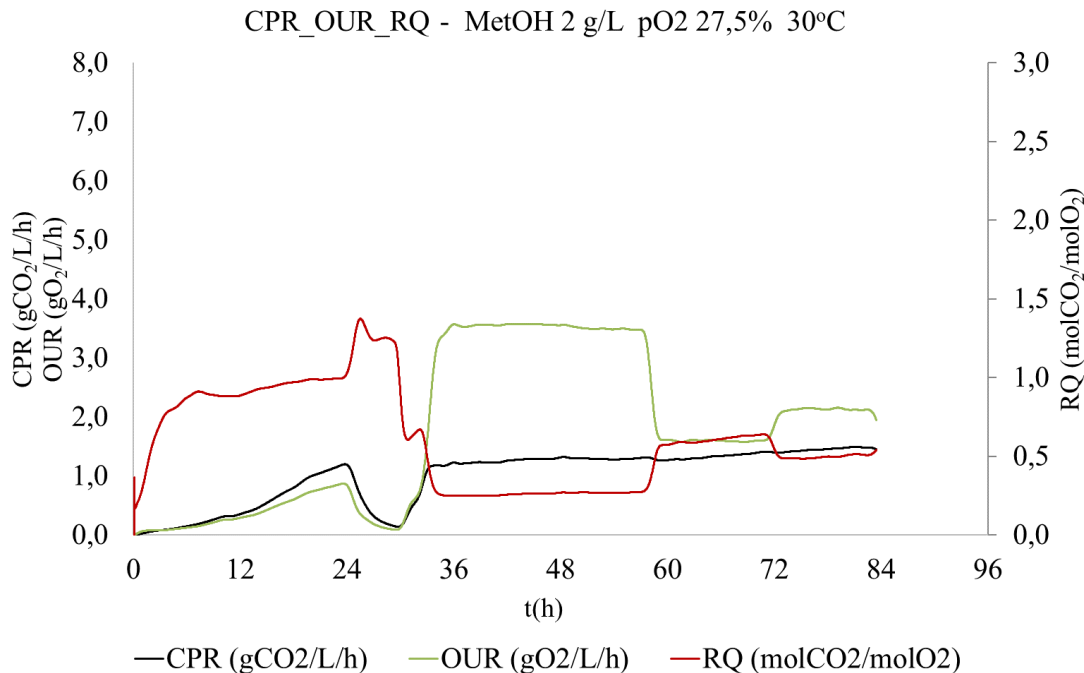
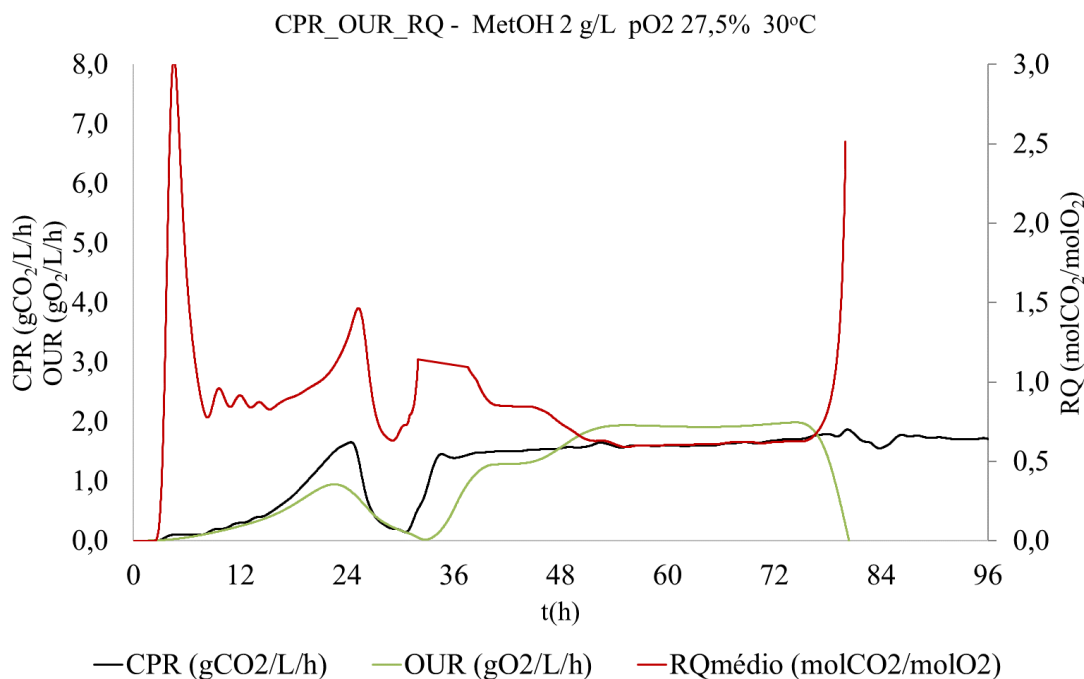


Gráfico 36. Perfis das velocidades específicas de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h), de produção de gás carbônico (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ, molCO₂/molO₂) ao longo do tempo no experimento 14F., MetOH 2g/L pO₂ 27,5% 30°C. Obs: Após 80 h, a concentração de O₂ na saída medida foi maior do que de entrada, possivelmente por erros na medida do equipamento sendo operado fora da faixa recomendada.



3.3.4. *Experimentos 14A a 14F: obtenção de um modelo preditivo da atividade de L-asparaginase a partir do planejamento experimental*

A partir dos resultados obtidos com os cultivos da seção anterior, foi realizada uma análise estatística para o estabelecimento de um modelo de regressão linear múltipla para prever o valor da atividade volumétrica com diferentes combinações de concentração de metanol e oxigênio dissolvido e temperatura dentro da região estudada.

Durante a execução do planejamento experimental, por falha humana, o experimento 14A foi realizado na temperatura de 25 °C ao invés de 35 °C, isso implica que o desenho perdeu sua simetria e, portanto, não pôde ser analisado como um planejamento fatorial fracionário, mas ainda é possível analisar a influência das variáveis independentes sobre a atividade usando um modelo de regressão linear múltipla do tipo *stepwise*. Além disso, os valores reais da concentração de metanol medidos pelo sensor foram ligeiramente diferentes dos teóricos e foram considerados para a construção do modelo final. Como resposta (saída) para o modelo foi escolhida a atividade no fim do segundo dia de indução, pois, para a maioria das condições de cultivo, a atividade se estabilizou ou mesmo diminuiu no terceiro dia de indução e houve uma falha na alimentação de metanol em um dos pontos centrais na noite do terceiro para o quarto dia, como foi apresentado na seção anterior. Os valores reais das variáveis de entrada e de saída são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Entradas reais do planejamento fatorial para avaliar os efeitos de oxigênio dissolvido (pO₂), concentração de metanol e temperatura sobre a atividade da ASNase (saída).

Experimento	pO ₂ (%)	Metanol (g/L)	Temperatura (°C)	Metanol real (g/L)	Atividade (U/L)	Tags
14A	5	0,8	25*	0,86±0,07	5208	MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C
14B	5	5	25	4,06±0,18	4165	MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C
14C	50	0,8	25	0,90±0,08	5858	MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C
14D	50	5	35	3,99±0,22	10687	MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C
14E	27,5	2	30	1,89±0,09	5222	MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C
14F	27,5	2	30	1,80±0,03	5528	MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C

* Deveria ser 35°C, mas, por falha humana, foi executado a 25°C

De acordo com o critério de seleção alfa 0,15 e usando o método *stepwise* bidirecional, obteve-se um modelo em que a concentração de metanol, a temperatura e o quadrado da temperatura foram relevantes para prever a atividade de ASNase. O modelo apresenta R² (98,98%) e R² ajustado (97,45%) elevados e resíduos com homoscedasticidade e independência (Gráfico 37B), o que confirma que o modelo é robusto e confiável. No Gráfico 37 são apresentados os gráficos de Pareto, de resíduos, de efeitos principais e de superfície de resposta. O modelo final é dado pela Equação 78 e a análise de variância está na Tabela 28.

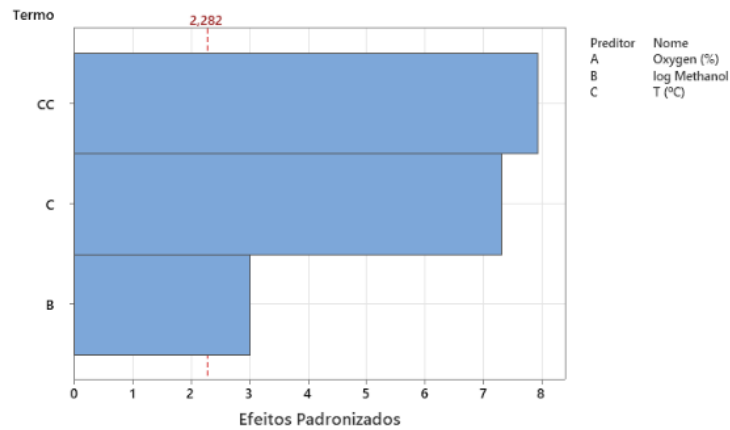
$$A\left(\frac{U}{L}\right) = 85324 - 2046 \times \log \text{Metanol} \left(\frac{g}{L}\right) - 5944 \times T(^{\circ}C) + 109,9 \times T(^{\circ}C) \times T(^{\circ}C) \quad 78$$

Tabela 28. Análise de variância para o modelo preditivo mais adequado.

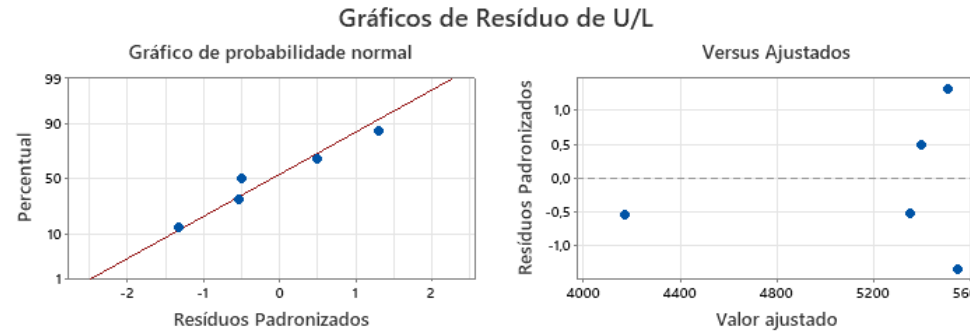
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	3	26463448	8821149	64,65	0,015
log Methanol	1	1232813	1232813	9,04	0,095
T (°C)	1	7289436	7289436	53,43	0,018
T (°C)*T (°C)	1	8575456	8575456	62,85	0,016
Erro	2	272871	136435		
Total	5	26736319			

Gráfico 37. A) Gráfico de Pareto, indica quais são as variáveis mais relevantes para o modelo; B) Gráficos de resíduos, demonstra que há homoscedasticidade e independência dos dados; C) Gráfico de Efeitos Principais e D) Gráfico de Superfície demonstram o efeito da concentração de metanol (g/L) e da temperatura (°C) sobre a atividade (U/L). Gráficos A a C gerados no software Minitab e D em Matlab pela autora.

Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados
 (a resposta é U/L; $\alpha = 0,15$)

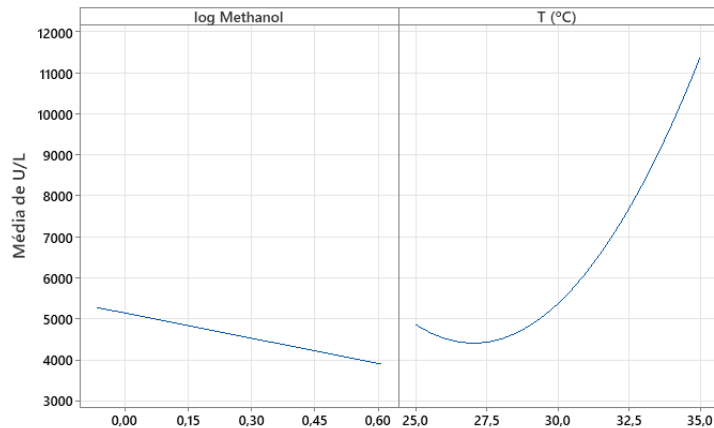


A

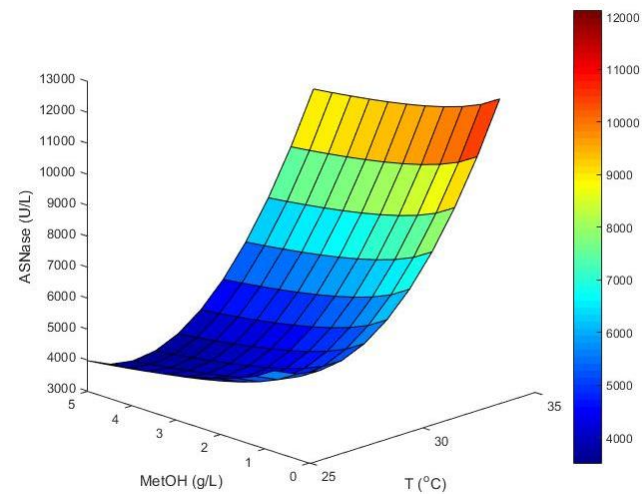


B

Gráfico de Efeitos Principais para U/L
 Médias Ajustadas



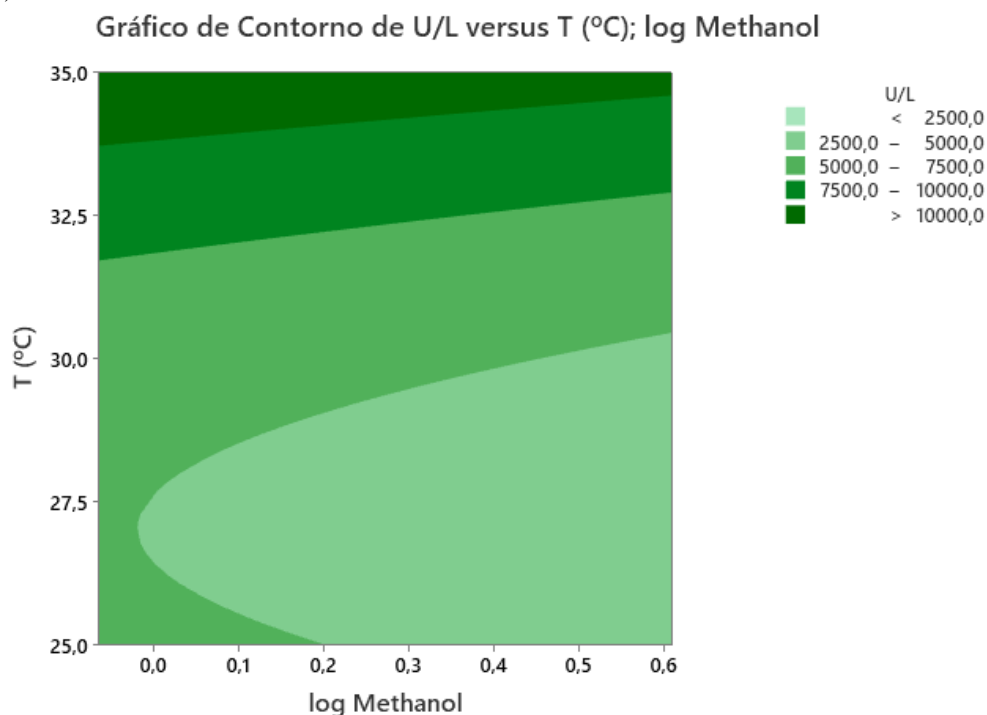
C



D

Utilizando a ferramenta de otimização do Minitab na região estudada, encontrou-se um valor máximo de atividade de 12050 U/L a 35 °C e 0,86 g/L de metanol e, analisando o Gráfico 38, observa-se que já é possível atingir atividade acima de 10000 U/L com baixas concentrações de metanol e temperatura entre 33,5 e 35 °C.

Gráfico 38. Gráfico de contorno da relação entre concentração de metanol (g/L) e da temperatura (°C) sobre a atividade (U/L).



3.3.5. Experimento 15: validação da melhor condição de cultivo

De volta à instituição-sede (USP), este experimento objetivou a validação das condições de cultivo que resultaram na maior atividade no planejamento experimental, ou seja, o ensaio 14D, no entanto, sem a presença do sensor de metanol. Portanto, foi feita a indução em malha aberta seguindo o modelo obtido por regressão linear da alimentação de metanol no experimento 14D.

Da mesma forma, o cultivo se iniciou com batelada de glicerol com, aproximadamente, 4%_{v/v} e o fim da fase de crescimento foi demarcado pelo pico na concentração de oxigênio, que resulta da exaustão do substrato. Os parâmetros cinéticos do crescimento são apresentados na Tabela 29 e foram similares aos do ensaio 14D. No entanto, o experimento 15 apresentou uma fase lag mais longa, de 8 horas, comparado ao cultivo referência. A hipótese é que os inóculos estariam em fases metabólicas diferentes já que provêm de bancos distintos.

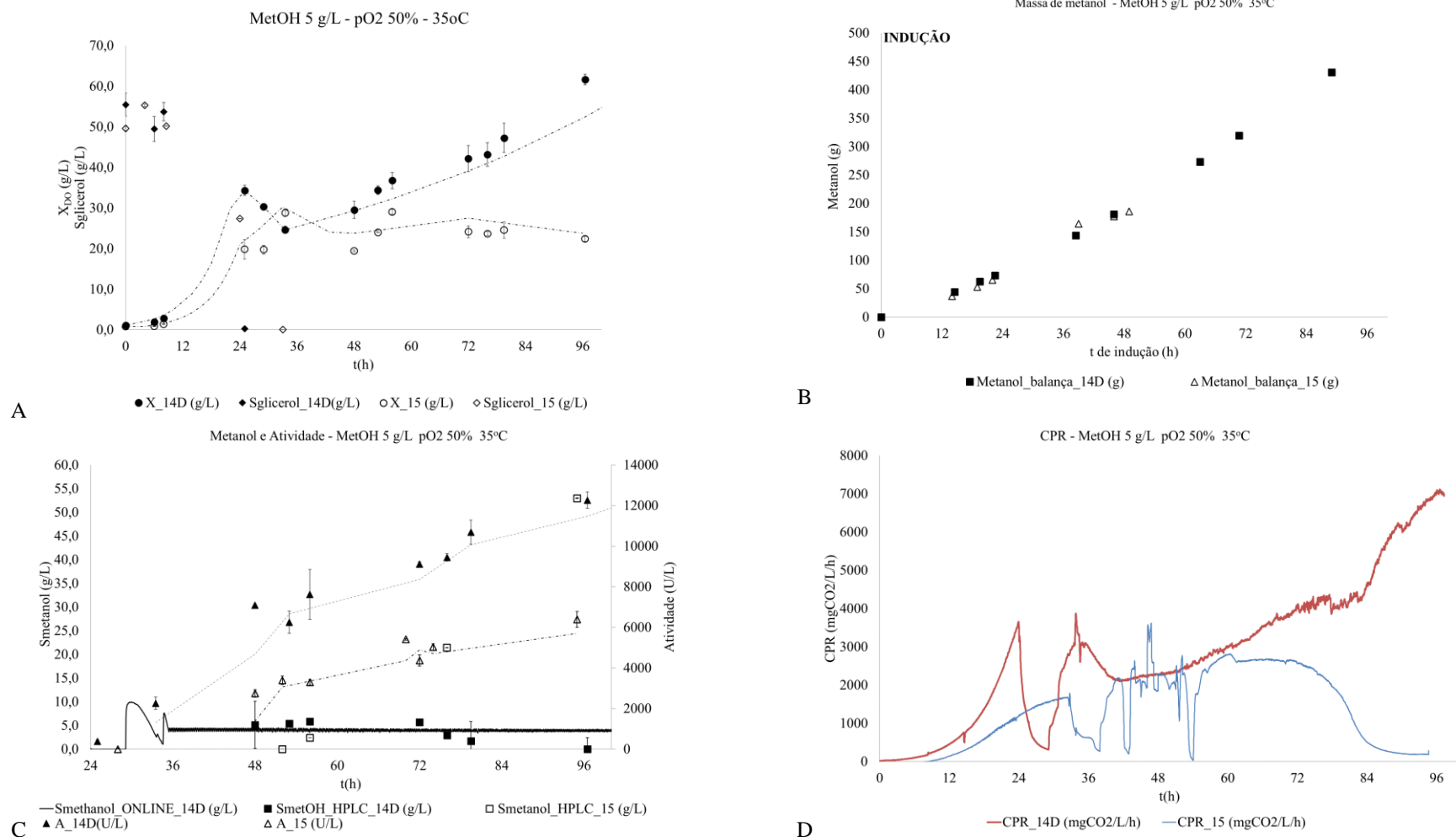
Consequentemente, a fase de crescimento também foi mais longa. Os perfis de crescimento de biomassa e de consumo de glicerol são apresentados no Gráfico 39A.

Tabela 29. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a batelada com 4%_{v/v} glicerol no meio TCI com a cepa His⁺ nos experimentos 14D e 15. Os desvios de cada experimento são provindos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X_{DO}máx (g/L)	μ_{máx} (1/h)	μ_{máxCO2} (1/h)	Y_{x/s} (g_{biomassa} seca/g_{glicerol})	Prot_{fexp} (g/L)
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	30,3±0,5	0,14	0,22	0,57	0,7±0,0
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	28,2±1,0	0,16	0,22	0,57	0,6±0,0

Após o pico de oxigênio dissolvido, foi feita uma fase de transição (sem alimentação de substratos) de 4 horas para início da fase de indução e, enfim, foi iniciada a indução seguindo o modelo de alimentação. Apesar da alimentação de solução indutora ter sido realizada de forma bem-sucedida de acordo com o modelo, como mostra o Gráfico 39B, houve acúmulo de metanol acima de níveis tolerados pela cepa a partir de 52 horas, Gráfico 39C. A partir desse momento, cerca de 60 horas, notou-se início da fase estacionária do crescimento e redução do CPR, Gráfico 39D, indicando redução da atividade metabólica.

Gráfico 39. Comparação entre os experimentos 14D e 15: A) Perfis de crescimento da biomassa X_{DO} (g/L) e do consumo de glicerol $S_{glicerol}$ (g/L); B) Perfis de massa de metanol medida pela balança (g); C) Perfis de atividade (A, U/L) e de concentração medida por HPLC e por sensor *online* (g/L); D) Perfis do CPR ($mg_{CO_2}/L/h$) ao longo do tempo. Os desvios são provindos de duplicatas analíticas.



Os parâmetros cinéticos da fase de indução são apresentados na Tabela 30. Comparando as velocidades específicas de crescimento pelos diferentes métodos, é notável que a população cresceu mais lentamente no experimento 15 do que no 14D desde o início da indução. No entanto, analisando a velocidade média de formação de produto, a atividade volumétrica final do experimento 14D poderia ter sido alcançada com a prolongação da fase de indução no 15. Em relação aos parâmetros respiratórios, Tabela 31, novamente o consumo de oxigênio ficou abaixo das demais condições e distante do valor teórico para a oxidação do metanol ($0,047 \text{ mol}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{metoh}}$), resultando em um RQ muito maior do que o teórico esperado. Por hipótese, pode haver um erro na medida do oxigênio pelas concentrações vigentes estarem acima da faixa de operação do sensor, o que será avaliado com análise sistemática de erros no item 3.3.6.

Em relação às estratégias de controle, nas primeiras horas de indução, uma falha na alimentação do oxigênio dissolvido resultou mudanças na vazão gasosa e na agitação para compensar a oxigenação necessária resultando em oscilações até 48 horas. Em seguida, com a normalização do oxigênio, foi possível manter o *set-point* em 50% da saturação com ar, como mostra o Gráfico 40C. Também é possível observar no mesmo gráfico que o controle da temperatura foi bem-sucedido. Já em relação ao controle da alimentação do metanol, apesar do modelo de alimentação ter sido executado como previsto, houve acúmulo de metanol acima de níveis tolerados principalmente após 60 horas de cultivo, como mostra o Gráfico 40D. Adicionalmente, o controle de pH também foi bem-sucedido, Gráfico 40B, mas com adição de base significativamente menor do que nas demais condições, corroborando o menor crescimento.

No Gráfico 41 são apresentados os parâmetros respiratórios. Por este gráfico, é possível observar a fase exponencial de crescimento até cerca de 34 horas, fase de transição até 38 horas e indução até cerca de 72 horas, sendo que após esse período a atividade metabólica cai drasticamente provavelmente por intoxicação pelo metanol.

Portanto, esse experimento demonstrou a dificuldade de se replicar a indução na ausência de um sensor de metanol, já que mudanças no metabolismo celular podem alterar a capacidade de consumo do metanol, desviando do modelo previsto de alimentação, e resultando na intoxicação celular. Apesar dessas limitações, foi alcançada a maior atividade volumétrica em cultivos na instituição-sede, portanto, os experimentos do planejamento experimental indicaram o caminho para a otimização do processo.

Tabela 30. Principais parâmetros cinéticos obtidos durante a indução com metanol em meio TCI com a cepa His⁺ até o fim do terceiro dia de cultivo nos experimentos 14D e 15. Os desvios de cada experimento são providos de duplicatas analíticas.

Exp. / Ref	X _{DO} final (g/L)	μ _{máx} (1/h)	μ _{máxCO2} (1/h)	μ _{máxbase} (1/h)	Q _S médio (gMetOH/ gbiomassa seca/h)	Q _p médio (U/g biomassa seca/h)	Prot _{final} (g/L)	A _{máx} (U/L)	A _X máx (U/gbiomassa seca)	A _P máx (U/gproteína)	Δt (h)
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	47,3±3,6	0,015	0,017	0,022	0,06	1,7	1,4±0,1	10700	200	7643	33,5 -
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	24,5±2,0	0,006	-	0,005	0,14	2,9	0,8±0,0	5000	150	5651	79,5 37,9 - 74

Tabela 31. Principais parâmetros respiratórios obtidos durante a indução com metanol em meio de Gurramkonda et al. (2010) com a cepa His⁺ até o fim do terceiro dia de cultivo nos experimentos 14D e 15.

Exp. / Ref	q _{CO2} médio (gCO ₂ /g biomassa seca/h)	q _{O2} médio (gCO ₂ /g biomassa seca/h)	R _Q (molCO ₂ /molO ₂)	Y _{CO2} /S _{metoh} (molCO ₂ /g _{metoh})	Y _{O2} /S _{metoh} (molO ₂ /g _{metoh})
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,03	0,01	2,7	0,011	0,005
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,08	0,02	2,3	0,022	0,010

Gráfico 40. Principais parâmetros do experimento 15 com cepa His+ no meio TCI com batelada de 4% v/v de glicerol até aproximadamente 34 horas, seguida de transição sem alimentação de substrato até 38 h e indução iniciada com 10 mL de solução de metanol + 12 mL YTM/L e mantida a pO2 50%, metanol almejando 5,0 g/L e temperatura de 35 °C. A) Perfis de crescimento medido por densidade óptica (X_{600} (g/L), de glicerol, etanol e metanol medidos por HPLC (g/L) e atividade pelo método AHA (U/L); B) Controle do pH com adição de NH_4OH 25% v/v e HCl 1 M (mL); C) Controle do pO2 (%) com agitação (rpm), oxigênio puro (L) e aeração (vvm) e controle da temperatura (°C); D) Concentração de metanol medida por HPLC (g/L) e massa total de metanol alimentada (g). Desvios providos de duplicatas analíticas.

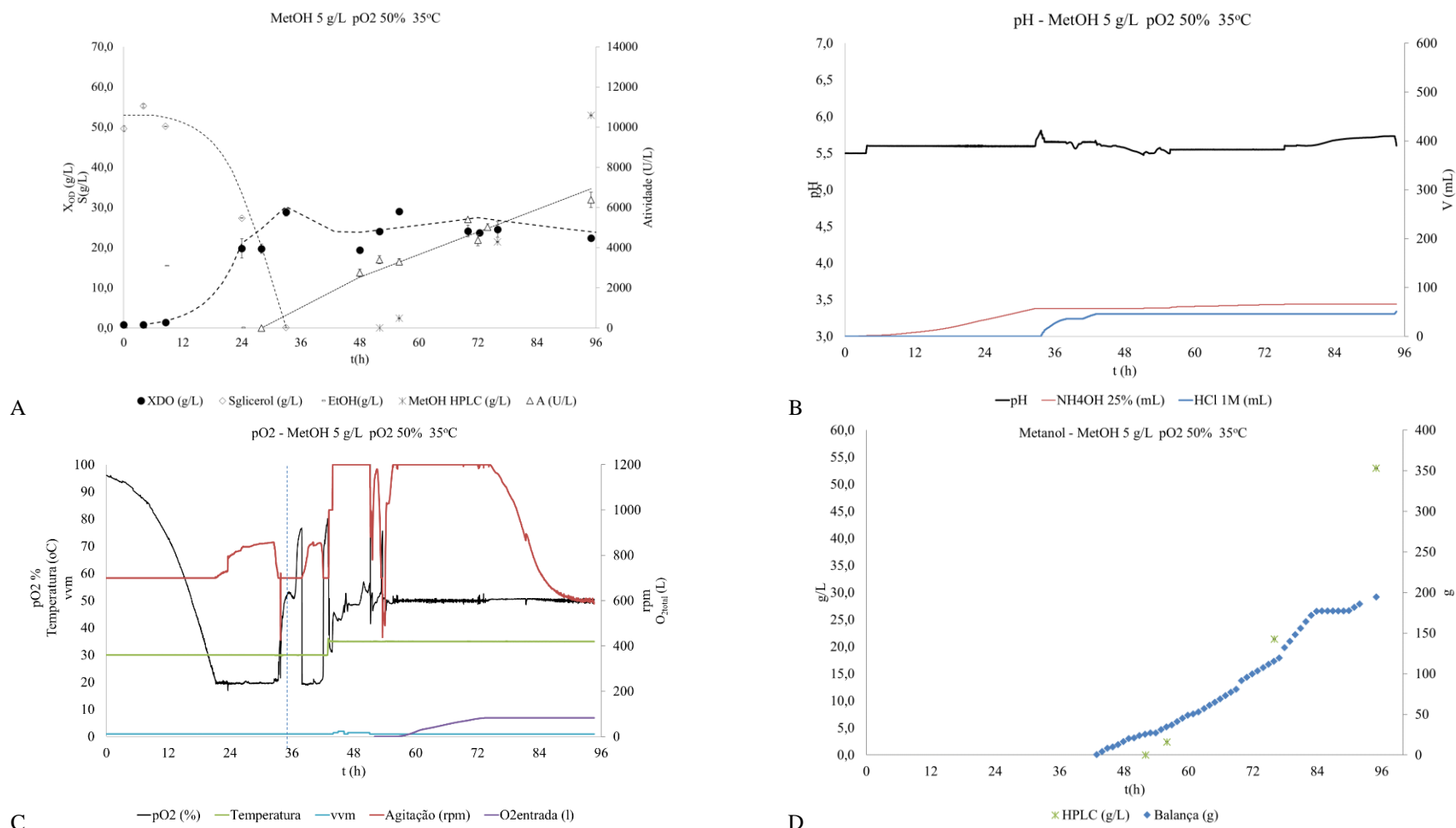
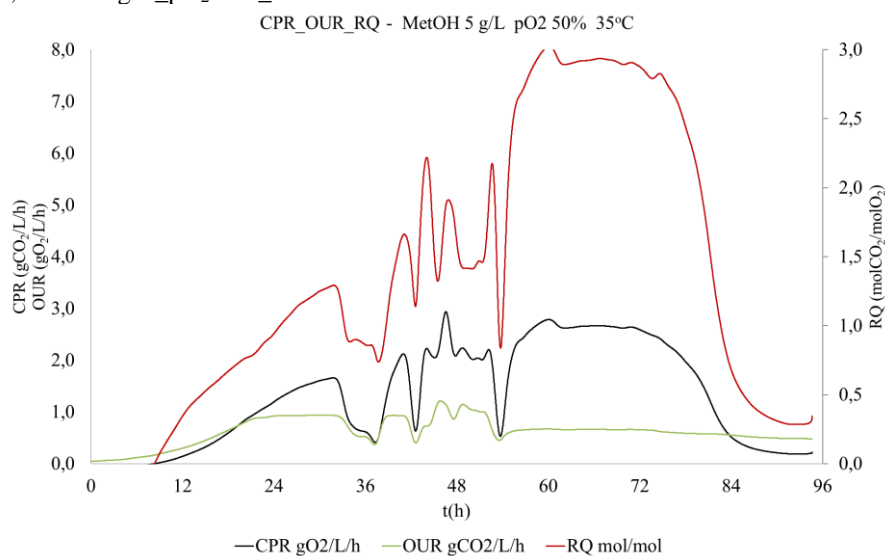


Gráfico 41. Perfis das velocidades específicas de consumo de oxigênio (OUR, gO₂/L/h), de produção de gás carbônico (CPR, gCO₂/L/h) e do coeficiente respiratório médio (RQ, molCO₂/molO₂) ao longo do tempo no experimento 15, MetOH5g/L_pO₂50%_35°C.



3.3.6. Análise dos Fluxos de Carbono e Identificação de Erros Sistemáticos

Analisando o crescimento dos sete cultivos, 14A-F e 15, durante a fase exponencial em glicerol, Tabela 32, foi obtido um RQ médio de $0,88 \pm 0,08$ molCO₂/molO₂, compatível com o valor teórico esperado para a oxidação do glicerol de 0,86 molCO₂/molO₂, e um balanço de carbono com erro médio de 24%. Entre as prováveis causas do erro no balanço, pode-se citar: erros na composição da biomassa, erros de medida, ou presença de compostos desconhecidos. Para a composição da massa foi adotado o valor obtido por Carnicer et al. (2009) para uma cepa de *Pichia* selvagem crescendo em glicerol sem limitação de oxigênio e, comparando com outras condições testadas pelos autores, a diferença na composição é mínima diante do erro obtido, portanto essa hipótese se mostra improvável.

Tabela 32. Principais velocidades específicas, coeficiente respiratório e balanço de carbono médios calculados durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15. O desvio padrão da média foi calculado considerando os sete cultivos como replicatas experimentais.

Exp. / Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	qS (g glicerol/ g biomassa seca/h)	qCO ₂ médio (gCO ₂ / g biomassa seca/h)	qO ₂ médio (gCO ₂ / g biomassa seca/h)	\bar{RQ} (molCO ₂ / molO ₂)	BC _{médio} (g/g)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,15	0,30	0,05	0,04	0,94	0,68
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,18	0,37	0,12	0,11	0,78	0,78
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,12	0,25	0,07	0,05	0,96	0,74
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,14	0,25	0,08	0,07	0,91	0,87
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,18	0,33	0,05	0,04	0,83	0,73
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,15	0,27	0,07	0,05	0,96	0,81
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,16	0,28	0,02	0,02	0,81	0,69
Média	0,15±0,02	0,29±0,04	0,07±0,03	0,05±0,03	0,88±0,08	0,76±0,07

Para testar a hipótese de erros nas medidas, foi realizada a metodologia de N. S. Wang & Stephanopoulos (1983) para identificação de erros sistemáticos com teste estatístico do tipo χ^2 com grau de liberdade 2 (6 velocidades – 4 balanços de massa) e intervalo de confiança de 90% usando o algoritmo do Apêndice C.2. Primeiro, a matriz h foi construída com todas as velocidades da Tabela 32. Como mostra a Tabela 33, o valor de h foi superior ao de χ^2 (4,61) em todos os cultivos (coluna h com todos), portanto há indício de erros nas medidas. Em seguida, foi feita a análise de exclusão sequencial, em que uma variável por vez foi excluída, o valor de h recalculado sem ela e testado em relação a χ^2 (2,71) com apenas um grau de liberdade.

Por exemplo para o cultivo 14A, ao retirar o coeficiente de conversão do substrato, o valor de h ficou em 181 ainda muito próximo do valor original (209), portanto ele não possui a maior participação na variância. Posteriormente, o coeficiente de conversão de oxigênio foi retirado e h foi recalculado usando todos os outros coeficientes originais, resultando em h de 7,7, ou seja, houve uma redução significativa de variância. Em seguida, o coeficiente de crescimento foi excluído e h recalculado com os valores originais das demais variáveis, resultando em h 77. Por fim, o mesmo procedimento foi realizado retirando o coeficiente de conversão do dióxido de carbono, resultando em h 13. Como a maior redução de h ocorreu retirando o coeficiente do oxigênio, conclui-se que o erro estava contido no oxigênio e um novo coeficiente de conversão foi calculado usando o balanço de massa.

Como nos demais cultivos, os coeficientes possuíam valores similares aos do 14A, foram apenas testadas as exclusões do coeficiente de oxigênio (maior redução de h) e de dióxido de carbono (segunda maior redução). Conforme mostra a Tabela 33, o erro estava contido no oxigênio em todos os casos. Em 14B, D e E, o valor de h sem oxigênio já era menor que χ^2 (2,71), portanto não havia indícios de erros nos demais parâmetros. Já nos outros cultivos, havia indício de erro e foi realizada uma nova iteração.

Tabela 33. Valor da função h durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15 na primeira etapa do método com comparação com χ^2 (4,61). Em amarelo, as grandezas cujos os coeficientes precisam ser recalculados por possuírem o maior erro (menor h) e em verde, as grandezas cuja a exclusão do coeficiente resultou em $h < \chi^2$ (4,61).

Exp/ Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (C- mol _{biomassa} / C- mol _{biomassa} /h)	q _S (C- mol _{gli} /C- mol _{biomassa} /h)	q _{CO2médio} (C-mol _{CO2} / C- mol _{biomassa} /h)	q _{O2médio} (mol _{O2} / C-mol biomassa/h)	Y _{XX} (C-mol biomassa/ C-mol biomassa)	Y _{SX} (C-mol _{gli} / C- mol _{biomassa})	Y _{CO2X} (C-mol CO ₂ / C-mol biomassa)	Y _{OX} (mol _{O2} / Cmol _{biomassa})	h				
									com todos	sem X	sem S	sem CO ₂	sem O ₂
14A_MetOH0,8g/L_ pO ₂ 5%_25°C	0,16	0,27	0,03	0,03	1,0	1,7	0,2	0,2	209	77,0	181,0	13,0	7,7
14B_MetOH5g/L_ pO ₂ 5%_25°C	0,19	0,34	0,08	0,10	1,0	1,7	0,4	0,5	30			6,0	3,7
14C_MetOH0,8g/L_ pO ₂ 50%_25°C	0,13	0,23	0,04	0,04	1,0	1,8	0,3	0,3	159			10,8	5,2
14D_MetOH5g/L_ pO ₂ 50%_35°C	0,15	0,23	0,05	0,06	1,0	1,5	0,3	0,4	59			3,3	1,1
14E_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,19	0,30	0,03	0,03	1,0	1,6	0,2	0,2	244			10,0	5,7
14F_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,16	0,25	0,04	0,04	1,0	1,5	0,3	0,3	214			6,9	2,2
15_MetOH5g/L_ pO ₂ 50%_35°C	0,17	0,25	0,01	0,02	1,0	1,5	0,1	0,1	298			61,0	6,9

Para os cultivos em que uma nova iteração foi necessária (14A, C e E e 15), os novos coeficientes para o oxigênio foram calculados usando os balanços de massa (destacados em amarelo) e a matriz h foi recalculada, como mostra a Tabela 34. Analisando o cultivo 14A, o coeficiente de substrato foi identificado como o que contém maior erro (menor h com sua exclusão) e, portanto, a exclusão do substrato foi testada nas demais condições, resultando em $h < \chi^2(2,71)$ em todos os casos. Logo, novos coeficientes para o substrato foram calculados para os experimentos 14A, C e E e 15 e os valores finais são apresentados na Tabela 35.

Com essas modificações, novas velocidades específicas foram obtidas resultando na redução de 11% no erro médio do balanço de carbono e na diminuição do coeficiente respiratório para $0,54 \pm 0,11 \text{ mol}_{\text{CO}_2}/\text{mol}_{\text{O}_2}$, como mostra a Tabela 36. Essa redução no RQ pode ser interpretada como a parte do carbono do substrato que foi assimilada em biomassa e que, portanto, o glicerol não foi totalmente oxidado. Essa hipótese é sustentada pelo fluxo de carbono, que é majoritariamente, acima de 60%, direcionado para a biomassa nessa etapa, como mostra o Gráfico 42.

Aumento da produção de L-Asparaginase com controle das condições de indução
CAPÍTULO 3

Tabela 34. Novos coeficientes e novo valor da função h durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15 na segunda etapa do método com comparação com χ^2 (2,71). Em amarelo, os coeficientes recalculados na primeira iteração por possuírem o maior erro (menor h) e, em verde, as grandezas cuja a exclusão do coeficiente resultou em $h < \chi^2$ (2,71).

Exp/ Ref	Y_{XX}	Y_{SX}	Y_{CO_2X}	Y_{OX}	Novo h				
	(C-mol biomassa/ C-mol biomassa)	(C-mol _{gli} / C-mol _{biomassa})	(C-mol CO ₂ / C-mol biomassa)	(molO ₂ / C-mol _{biomassa})	com todos	sem X	sem S	sem CO 2	sem O ₂
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	1,0	1,7	0,2	0,4	7,7	91,0	0,2	7,7	
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	1,0	1,7	0,4	0,6					
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	1,0	1,8	0,3	0,6	5,2		0,0		
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	1,0	1,5	0,3	0,6					
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	1,0	1,6	0,2	0,3	5,7		0,0		
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	1,0	1,5	0,3	0,5					
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	1,0	1,5	0,1	0,2	361,0		0,0		

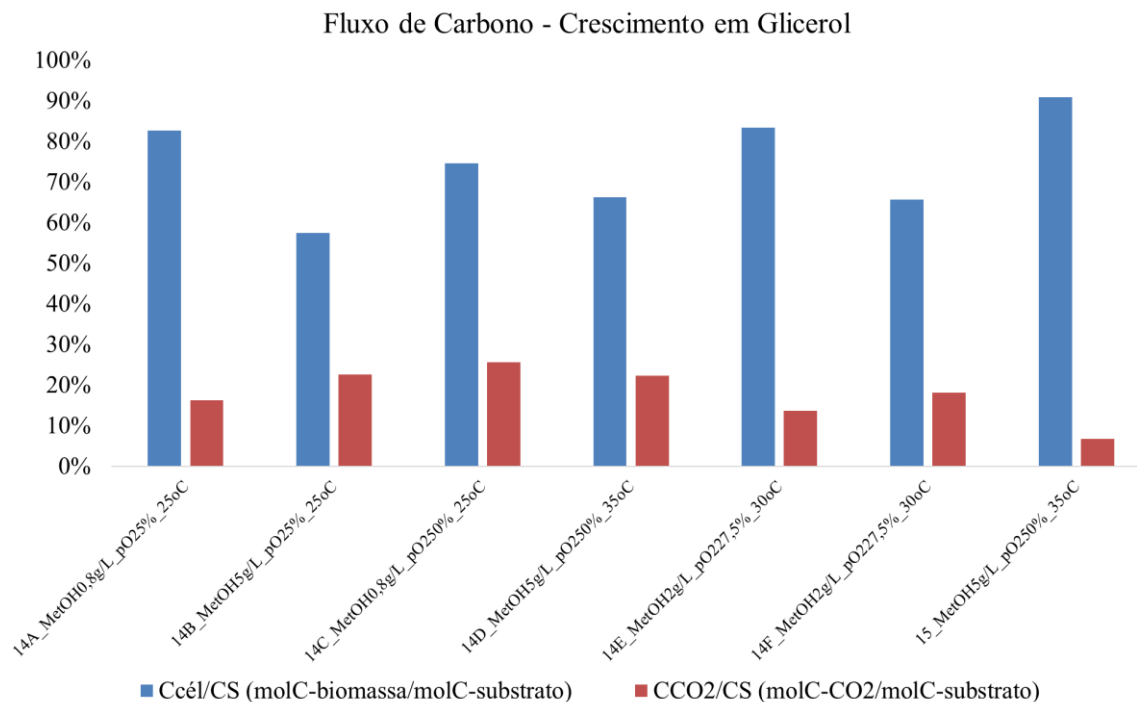
Tabela 35. Valores finais dos coeficientes e dos parâmetros cinéticos durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15. Em amarelo, os coeficientes recalculados por possuírem o maior erro (menor h) na segunda iteração.

Exp/ Ref	$\mu_{\text{máx}}$	qS	qCO ₂ médio	qO ₂ médio	Y_{XX}	Y_{SX}	Y_{CO_2X}	Y_{OX}
	(C-mol _{biomassa} / C-mol _{biomassa} /h)	(C-mol _{met} / C-mol _{biomassa} /h)	(C-molCO ₂ / C-mol _{biomassa} /h)	(molO ₂ / C-mol biomassa/h)	(C-mol biomassa/ C-mol biomassa)	(C-mol _{gli} / C- mol _{biomassa})	(C-mol CO ₂ / C-mol biomassa)	(molO ₂ /mol _{biomassa})
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,16	0,20	0,03	0,06	1,0	1,2	0,2	0,4
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,19	0,34	0,08	0,12	1,0	1,7	0,4	0,6
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,13	0,17	0,04	0,07	1,0	1,3	0,3	0,6
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,15	0,23	0,05	0,08	1,0	1,5	0,3	0,6
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,19	0,23	0,03	0,07	1,0	1,2	0,2	0,3
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,16	0,25	0,04	0,08	1,0	1,5	0,3	0,5
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,17	0,19	0,01	0,04	1,0	1,1	0,1	0,2

Tabela 36. Principais velocidades específicas, coeficiente respiratório, balanço de carbono e coeficiente de conversão calculados durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15 após a identificação de erros sistemático. O desvio padrão da média foi calculado considerando cultivos como replicatas experimentais.

Exp. / Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	$q_{\text{S}}^{\text{médio}}$ ($\frac{\text{g}_{\text{MetOH}}}{\text{g}_{\text{biomassa}} \text{seca/h}}$)	$q_{\text{CO}_2}^{\text{médio}}$ ($\frac{\text{g}_{\text{CO}_2}}{\text{g}_{\text{biomassa}} \text{seca/h}}$)	$q_{\text{O}_2}^{\text{médio}}$ ($\frac{\text{g}_{\text{O}_2}}{\text{g}_{\text{biomassa}} \text{seca/h}}$)	\overline{RQ} ($\frac{\text{mol}_{\text{CO}_2}}{\text{mol}_{\text{O}_2}}$)	BC (g/g)	Y_{XS} ($\frac{\text{g}_{\text{biomassa}}}{\text{g}_{\text{metanol}}}$)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,15	0,21	0,05	0,07	0,50	0,95	0,70
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,18	0,37	0,12	0,14	0,64	0,77	0,49
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,12	0,19	0,07	0,08	0,63	0,97	0,63
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,14	0,25	0,08	0,09	0,61	0,85	0,56
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,18	0,26	0,05	0,08	0,48	0,93	0,70
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,15	0,27	0,07	0,09	0,57	0,81	0,56
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,16	0,21	0,02	0,05	0,32	0,93	0,77
Média	0,15±0,02	0,25±0,06	0,07±0,03	0,08±0,03	0,54±0,11	0,89±0,07	0,63±0,10

Gráfico 42. Porcentagem do fluxo de carbono para biomassa e gás carbônico em relação ao fluxo de carbono do substrato durante a fase exponencial do crescimento em glicerol para os experimentos 14A a 14F e 15.



Para análise dos parâmetros cinéticos em metanol, foi assumida uma fase exponencial desde o início da indução com alimentação constante de metanol até o fim do terceiro dia. Nessa fase, o balanço de carbono médio, mostrado na Tabela 37, indicou que as medidas estavam inconsistentes (abaixo de 50% para muitas condições) e o coeficiente respiratório divergiu significativamente do valor teórico de 0,67 mol_{CO2}/mol_{O2}, indicando fermentação em alguns cultivos, o que não é plausível. Portanto, foi usada a metodologia de identificação de erros sistemáticos para avaliar essas medidas.

Tabela 37. Principais velocidades específicas, coeficiente respiratório e balanço de carbono médios calculados durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15. O desvio padrão da média foi calculado considerando os dois cultivos do ponto central como replicatas experimentais.

Exp. / Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	$q_{\text{S}}^{\text{médio}}$ (g _{MetOH} / g _{biomassa seca} /h)	$q_{\text{CO}_2}^{\text{médio}}$ (g _{CO2} /g _{biomassa} seca/h)	$q_{\text{O}_2}^{\text{médio}}$ (g _{CO2} /g _{biomassa} seca/h)	$\bar{R}Q$ (mol _{CO2} /mol _{O2})	BC _{médio} (g/g)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,05	0,04	0,02	1,1	0,70
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,07	0,03	0,04	0,5	0,40
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,006	0,06	0,03	0,06	0,4	0,48
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,015	0,06	0,03	0,01	2,7	0,66
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,003	0,08	0,03	0,05	0,5	0,32
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,002	0,08	0,05	0,05	0,7	0,49
Média Ponto Central	0,003±0,001	0,08±0,00	0,04±0,01	0,05±0,01	0,6±0,1	0,4±0,1
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,006	0,14	0,08	0,02	2,3	0,47

Em todas as condições, o teste estatístico apontou a existência de erros sistemáticos, $h > \chi^2$ (4,61), e mesmo a exclusão de apenas um coeficiente não foi suficiente, como mostra a Tabela 38, portanto havia indícios de erros nas medidas de substrato (14B e 14F), oxigênio (14A, 14D e 15) e dióxido de carbono (14C e 14E). Logo, foi realizada uma nova iteração no processo de exclusão sequencial.

Primeiramente, foram calculados novos valores de coeficientes a partir do balanço de massa para aquelas grandezas cuja exclusão no cálculo de h resultou no menor valor, são eles: coeficiente do substrato para os ensaios 14B e 14F; do oxigênio para 14A, 14D e 15; do dióxido de carbono para 14C e 14E. Para esses dois últimos cultivos, o método apontou para erro na biomassa, no entanto, por experiência, sabe-se que as medidas de biomassa eram mais confiáveis (medida por densidade óptica e confirmada por massa seca) do que as dos gases, por isso o erro foi mantido nos gases. Os valores dessa etapa são apresentados na Tabela 39.

Tabela 38. Parâmetros cinéticos originais e valor da função h durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15 na primeira etapa do método com comparação com χ^2 (4,61). Em amarelo, as grandezas cujos os coeficientes precisam ser recalculados por possuírem o maior erro (a exclusão resulta no menor h) na primeira iteração do método.

Exp/ Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (C- mol _{biomassa} /C- mol _{biomassa} /h)	q _S (C- mol _{met} /C- mol _{biomassa} / h)	q _{CO2} médio (C- mol _{CO2} /C- mol _{biomassa} /h)	q _{O2} médio (mol _{O2} / C-mol biomassa/h)	Y _{XX} (C-mol biomassa/ C-mol biomassa)	Y _{SX} (C- mol _{meti} /C- mol _{biomassa})	Y _{CO2X} (C-mol CO ₂ / C-mol biomassa)	Y _{Ox} (mol _{O2} / C- mol _{biomassa})	h				
									com todos	sem X	sem S	sem CO ₂	sem O ₂
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,04	0,03	0,02	1,0	8,1	4,7	3,2	374	164	339	42	8
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,06	0,02	0,03	1,0	11,3	3,5	6,5	41	19	7	31	35
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	0,006	0,05	0,02	0,05	1,0	8,1	2,9	8,1	152	6	132	6	26
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,016	0,05	0,02	0,01	1,0	3,2	1,2	0,5	860	192	801	46	10
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,003	0,07	0,02	0,04	1,0	21,6	5,9	13,5	115	6	74	30	46
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	0,002	0,07	0,03	0,04	1,0	32,4	14,7	20,3	35	35	7	31	26
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	0,006	0,12	0,05	0,02	1,0	18,9	7,9	2,7	766	233	693	75	27

Tabela 39. Novos coeficientes e novo valor da função h durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15 na segunda etapa do método com comparação com χ^2 (2,70). Em amarelo, os coeficientes recalculados por possuírem o maior erro (menor h) na primeira iteração e, em verde, as grandezas cuja a exclusão do coeficiente resultou em h < χ^2 (2,70) na segunda iteração.

Exp/ Ref	Y _{XX} (C-mol biomassa/ C-mol biomassa)	Y _{SX} (C-mol _{gli} / C-mol _{biomassa})	Y _{CO2X} (C-mol CO ₂ / C-mol biomassa)	Y _{Ox} (mol _{O2} / C-mol _{biomassa})	Novo h				
					com todos	sem X	sem S	sem CO ₂	sem O ₂
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	1,0	8,1	4,7	7,7	8,4	4,5	0,2	7,7	
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	1,0	4,7	3,5	6,5	7,4	3,7		0,4	0,1
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	1,0	8,1	5,2	8,1	6,0	4,7	0,1	6,0	
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	1,0	3,2	1,2	2,3	10,0	7,7	0,1	10,0	
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	1,0	21,6	8,7	13,5	30,0	25,0	0,0		29,0
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	1,0	14,9	14,7	20,3	6,7	3,4		0,2	0,3
15_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	1,0	18,9	7,9	12,5	27,8	20,0	0,2	27,0	

Em seguida, a função h foi calculada novamente com esses novos coeficientes e excluindo um segundo coeficiente, logo, o teste teve seu grau de liberdade reduzido para um e um novo valor de χ^2 (2,71), Tabela 39. Nessa segunda fase, foi possível encontrar valores satisfatórios ($h < \chi^2$). Nos casos em que o erro estava no consumo de substrato, a velocidade de consumo foi reduzida. Já naqueles em erro estava nos gases, a velocidade de consumo de oxigênio e de formação de CO_2 foram aumentadas. Os valores finais das velocidades são apresentados na Tabela 40 e o balanço de carbono, coeficiente respiratório e coeficientes de conversão mássicos na Tabela 41.

Tabela 40. Valores finais dos coeficientes e dos parâmetros cinéticos durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15. Em amarelo, os coeficientes recalculados por possuírem o maior erro (menor h) na segunda iteração.

Exp/ Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ /h)	q_S (C- mol_{met} / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ /h)	$q_{\text{CO}_2\text{médio}}$ (C- mol_{CO_2} / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ /h)	$q_{\text{O}_2\text{médio}}$ (molO_2 / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ /h)	Y_{XX} (C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$ / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$)	Y_{SX} (C- mol_{gli} / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$)	Y_{CO_2X} (C- mol_{CO_2} / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$)	Y_{O_X} (molO_2 / C- $\text{mol}_{\text{biomassa}}$)
14A_MetOH0,8g/ L_pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,03	0,03	0,04	1,0	5,8	4,7	7,7
14B_MetOH5g/L_ pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,03	0,02	0,03	1,0	4,7	5,8	6,5
14C_MetOH0,8g/ L_pO ₂ 50%_25°C	0,006	0,04	0,03	0,05	1,0	6,1	5,2	8,1
14D_MetOH5g/L_ pO ₂ 50%_35°C	0,016	0,04	0,02	0,04	1,0	2,2	1,2	2,3
14E_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,003	0,03	0,03	0,04	1,0	9,7	8,7	13,5
14F_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,002	0,03	0,03	0,05	1,0	14,9	22,5	20,3
15_MetOH5g/L_p O ₂ 50%_35°C	0,006	0,06	0,05	0,08	1,0	8,9	7,9	12,5

Tabela 41. Principais velocidades específicas, coeficiente respiratório, balanço de carbono e coeficientes de conversão calculados durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15 após a identificação de erros sistemático. O desvio padrão da média foi calculado considerando os dois cultivos do ponto central como replicatas experimentais.

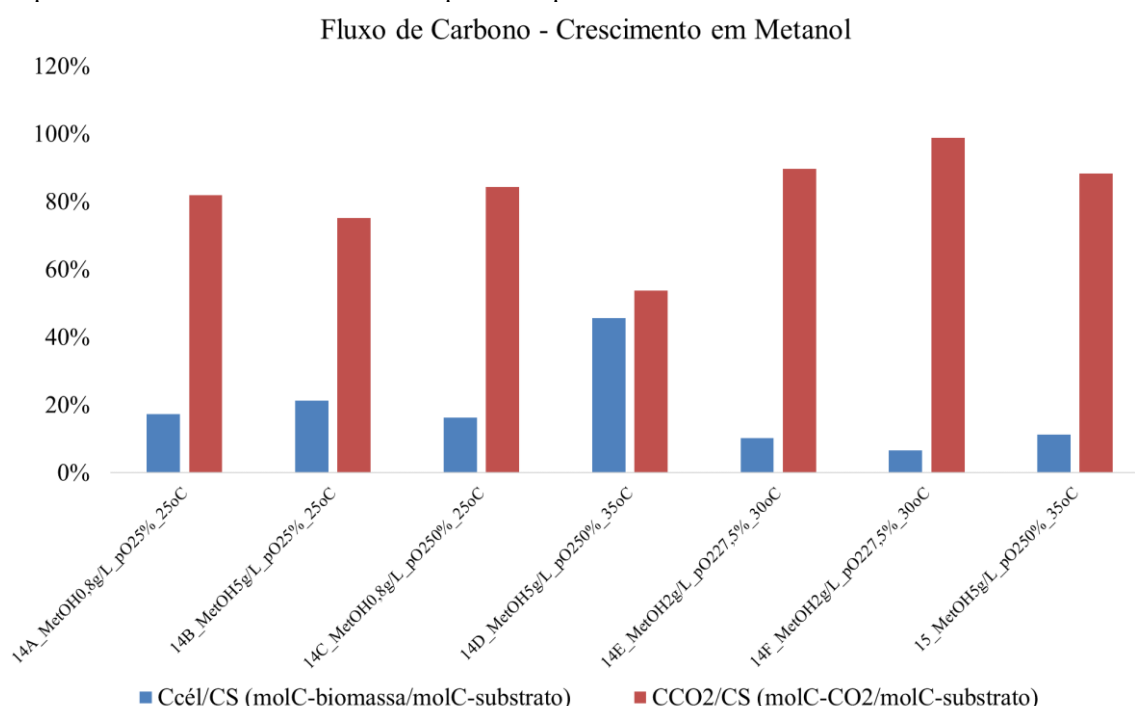
Exp. / Ref	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	$q_{\text{Smédio}}$ (g _{MetOH} / g _{biomassa} seca/h)	$q_{\text{CO2médio}}$ (g _{CO2} / g _{biomassa} seca/h)	$q_{\text{O2médio}}$ (g _{O2} / g _{biomassa} seca/h)	\overline{RQ} (mol _{CO2} / mol _{O2})	BC (g/g)	Y_{XS} g _{biomassa} / g _{metanol}	Y_{CO2S} mol _{CO2} /g _{met}	Y_{O2S} mol _{O2} /g _{met}
14A_MetOH0,8g/L_ pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,04	0,04	0,05	0,61	0,99	0,14	0,026	0,042
14B_MetOH5g/L_ pO ₂ 5%_25°C	0,005	0,03	0,03	0,04	0,61	0,97	0,17	0,024	0,039
14C_MetOH0,8g/L_ pO ₂ 50%_25°C	0,006	0,05	0,05	0,06	0,64	1,01	0,13	0,026	0,041
14D_MetOH5g/L_ pO ₂ 50%_35°C	0,015	0,04	0,03	0,04	0,52	0,99	0,37	0,017	0,033
14E_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,003	0,04	0,04	0,05	0,64	1,00	0,08	0,028	0,044
14F_MetOH2g/L_ pO ₂ 27,5%_30°C	0,002	0,04	0,05	0,06	0,66	1,06	0,05	0,031	0,047
Média Ponto Central	0,003± 0,001	0,04± 0,00	0,05± 0,00	0,05± 0,00	0,65± 0,01	1,03± 0,04	0,07± 0,02	0,029± 0,002	0,045± 0,002
15_MetOH5g/L_ pO ₂ 50%_35°C	0,006	0,07	0,08	0,09	0,63	1,00	0,09	0,026	0,040

A redução da velocidade de consumo de substrato corrobora para a hipótese de evaporação do metanol (conforme apresentado no Apêndice B), ou seja, nem todo metanol alimentado foi consumido. Os novos valores obtidos para a velocidade específica de consumo de metanol são similares entre as condições, mas ligeiramente diferentes entre os bancos de trabalho (ensaios 14 x 15) e estão de acordo com a literatura, entre 0,05 e 0,57 g_{metanol}/g_{biomassa seca}/h (BARRIGON; VALERO; MONTESINOS, 2015; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016). Já o aumento das velocidades de consumo de O₂ e de formação de CO₂ é plausível, pois, dadas as condições de operação acima da faixa aceitável pelo sensor e a falta de controle do fluxo de oxigênio para os ensaios 14, as medidas realmente poderiam estar erradas. Ademais, os novos valores dos coeficientes de consumo de O₂ e de formação de CO₂ por grama de metanol estão próximos ao teórico esperado para a oxidação do metanol, 0,047 mol_{O2}/g_{metanol} e 0,031 mol_{CO2}/g_{metanol}, respectivamente. Com exceção do experimento 14D, em que parte significativa do carbono é destinada para a biomassa e não apenas para a disseminação de energia e CO₂.

Comparando o fluxo de carbono, Gráfico 43, observa-se que, na maioria dos cultivos, mais de 80% do fluxo foi destinado para o CO₂, o que está de acordo com a literatura (Vanz et al., 2012). Segundo esses autores, no início da fase de indução, há um aumento muito mais

significativo das enzimas da via de disseminação do metanol do que das enzimas da via de assimilação, o que favorece a geração de energia durante a reoxidação do NADH na cadeia respiratória necessária para a manutenção celular. Por meio de balanço de massa, eles observaram que 70-80% do metanol é convertido a dióxido de carbono. Neste estudo, a única exceção foi o experimento 14D, em que parte significativa do fluxo de carbono foi destinada para a via assimilação, o que resultou na maior produção de ASNase. Os coeficientes de conversão de metanol a biomassa estão de acordo com a literatura para cepas Mut^S recombinantes, entre 0,11 e 0,38 g_{biomassa seca}/g_{metanol}.

Gráfico 43. Porcentagem do fluxo de carbono em relação ao fluxo de carbono do substrato durante a fase exponencial do crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e 15.



Portanto, a metodologia de identificação de erros sistemáticos se mostrou efetiva na determinação das medidas teoricamente corretas dos parâmetros cinéticos. No entanto, esses resultados precisam ser interpretados com limitações, pois foram assumidas hipóteses que não puderam ser provadas. Primeiramente, para cálculo do volume a cada instante de tempo foi assumida uma taxa de evaporação teórica para os ensaios do grupo 14 e uma taxa padrão definida experimentalmente para o ensaio 15, mas em condições diversas de operação. Logo, podem haver erros no volume que afetam todas as medidas, já que os balanços foram realizados na base mássica a partir de dados de concentração. Além disso, o crescimento em metanol não é muito significativo em algumas condições, ficando dentro do erro da medida, por isso assumir

uma fase exponencial também pode ser frágil. Contudo, a metodologia é útil para apontar métodos que precisam ser melhorados e os valores obtidos podem ser tomados como referências teóricas para guiar a melhoria do processo.

Em relação às velocidades específicas finais, notou-se que o crescimento foi influenciado pela temperatura, sendo muito maior a 35 °C do que nas demais condições, e pela concentração de oxigênio dissolvido, com pO₂ de 50% permitindo o crescimento mais rápido. Já a produção foi influenciada pela temperatura, com aumento da velocidade específica até 30 °C e depois estabilização. Já o consumo de metanol, foi similar nas diferentes condições. Relativo aos parâmetros respiratórios, tanto o consumo de oxigênio quanto a formação de gás carbônico reduziram com o aumento da concentração de metanol. Essas relações são mostradas no Gráfico 44.

Analisando os coeficientes de conversão do substrato, observou-se que nas condições em que o crescimento foi favorecido, a produção de ASNase ativa foi desfavorecida e a conversão em CO₂ foi reduzida. Considerando apenas a conversão em produto, as condições do ponto central deveriam ter levado à maior produção de ASNase, no entanto, ela foi alcançada nas condições de maior crescimento. Portanto, nesse caso, manter o crescimento foi mais importante e concluiu-se que as condições de cultivo possuem influência sobre a distribuição do fluxo de carbono pelo metabolismo celular. Essas relações são mostradas no Gráfico 45.

A maior produção de ASNase é resultante da subtração da proteína inativa do total de proteína que é produzida, portanto, além de se objetivar a maximização da sua produção, também é buscada a minimização da sua inativação. Como apresentado na revisão bibliográfica, um dos principais fatores de degradação de proteína se deve à atividade proteolítica. Além disso, a atividade pode ser reduzida pela formação de agregados pela proteína, escondendo seu sítio ativo. Portanto, para avaliar se esses fenômenos ocorreram nos cultivos, foram realizados ensaios que são apresentados no próximo item.

Gráfico 44. Relação entre as condições experimentais e as velocidades específicas, sendo elas: Velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$, 1/h) por A) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e B) Concentração de oxigênio dissolvido ($p\text{O}_2$, %); C) Velocidade específica de formação de produto (q_p , $\text{U}/\text{g}_{\text{biomassa seca}}/\text{h}$) pela temperatura ($^{\circ}\text{C}$); D) Velocidades específicas de consumo de O_2 (q_{O_2} , $\text{O}_2/\text{g}_{\text{biomassa seca}}/\text{h}$) e formação de C_2 (q_{CO_2} , $\text{CO}_2/\text{g}_{\text{biomassa seca}}/\text{h}$) pela concentração de metanol (g/L).

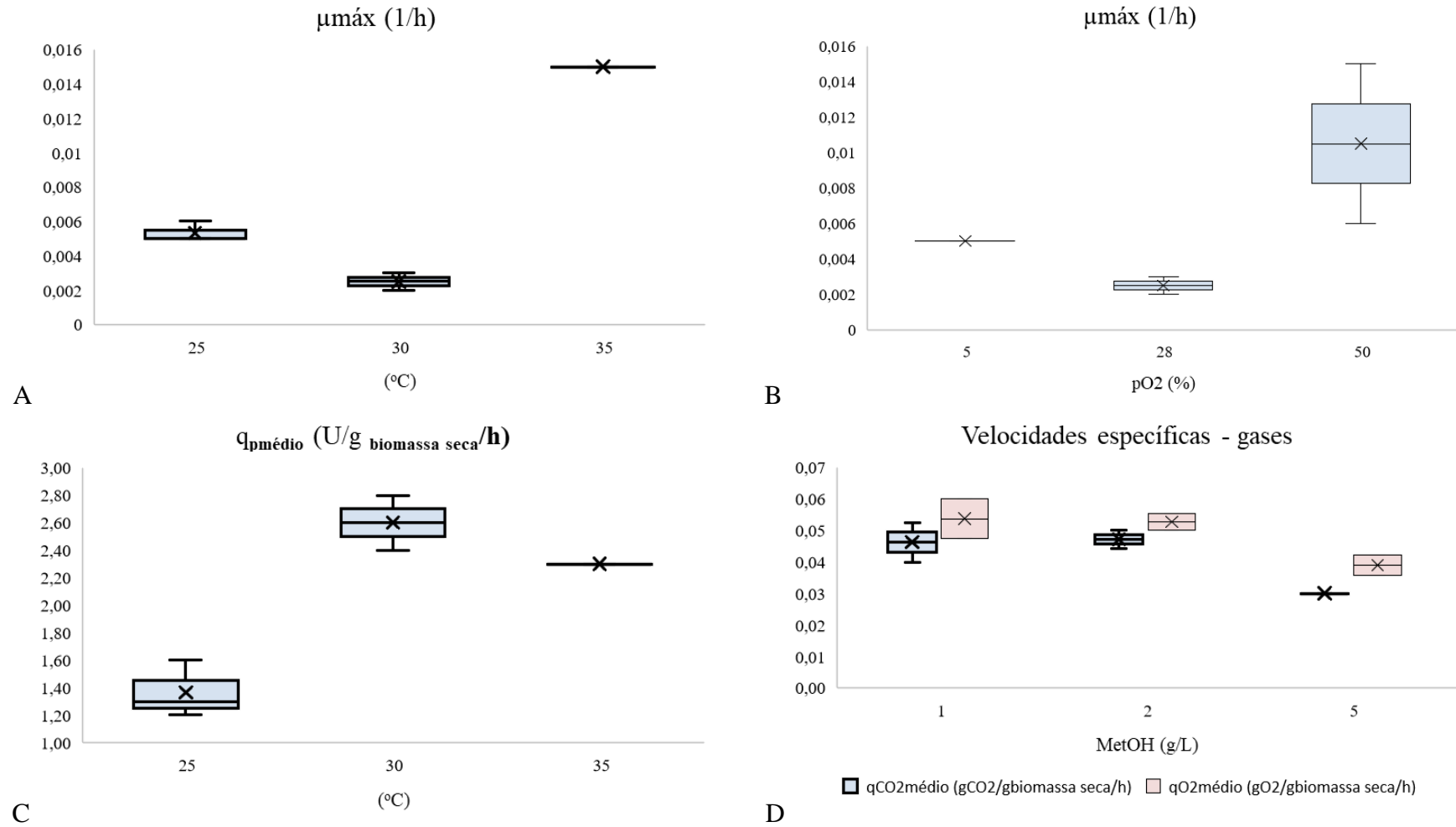
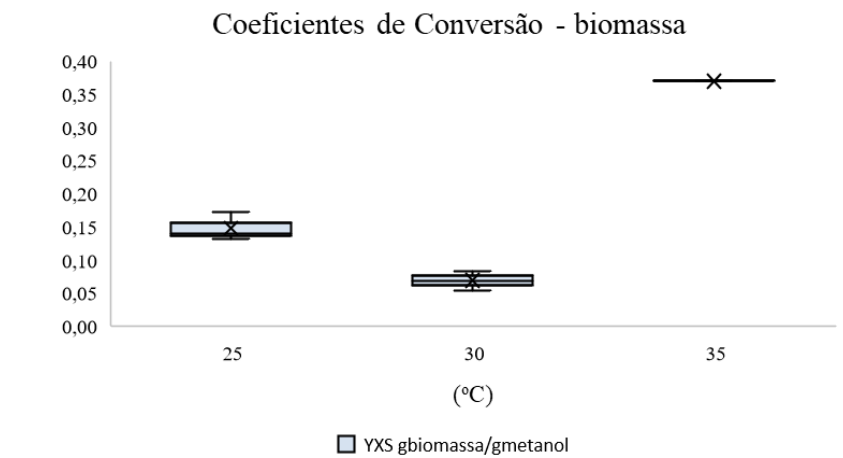
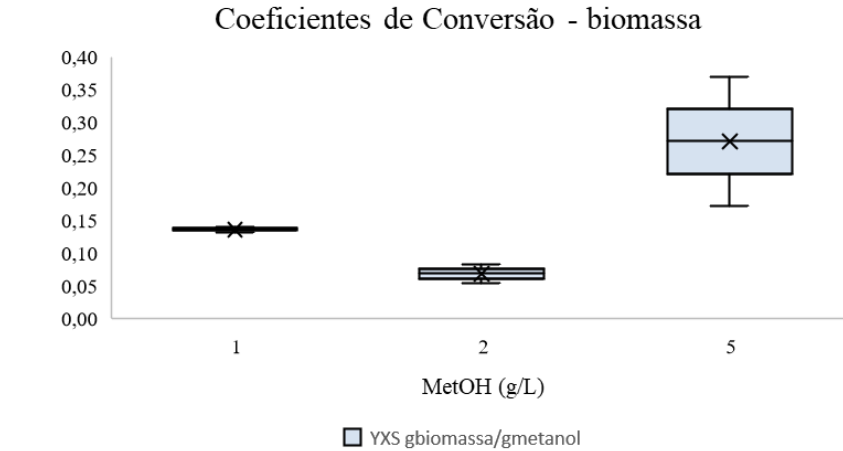


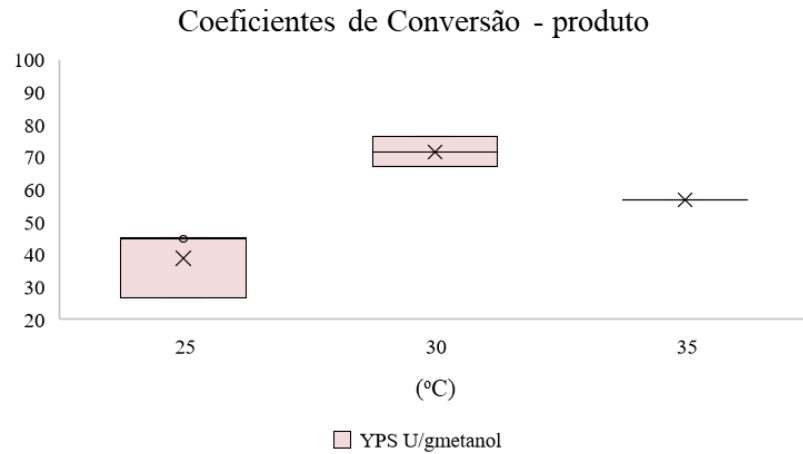
Gráfico 45. Relação entre as condições experimentais e os coeficientes de conversão, sendo elas: Coeficiente de conversão de substrato a biomassa (Y_{XS} , g_{biomassa seca}/ g_{metanol}) por A) Temperatura (°C) e B) Concentração de metanol (g/L); Coeficiente de conversão de substrato a produto (Y_{PS} , U/ g_{metanol}) por C) (°C) e D) Concentração de metanol (g/L).



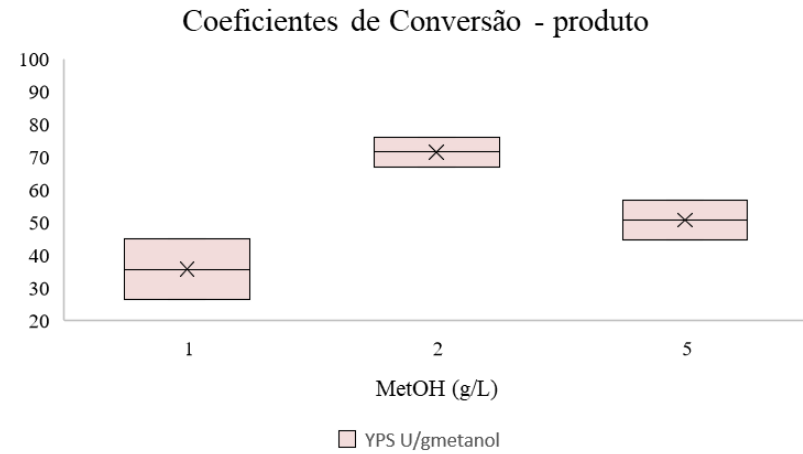
A



B



C



D

3.3.7. Avaliação da Atividade Proteolítica e da Formação de Agregados

O teste para detecção de proteases demonstrou que a 30 °C não há redução significativa da atividade volumétrica até 19 dias. No entanto, a 35 °C, a atividade reduziu significativamente após 5 dias. Portanto, esse teste sugeriu que a atividade proteolítica estava presente e aumentou com a temperatura maior. Apesar de não ser possível observar um rastro de proteínas menores no gel SDS do experimento 14D, que foi executado nessa temperatura, a presença de proteases no sobrenadante era plausível devido as condições de cultivo (meio sintético, pH ácido e alta temperatura). As atividades volumétricas medidas ao longo do tempo são apresentadas no Gráfico 46.

Relativo ao teste de formação de agregados, foram observados agregados em todas as condições de armazenamento testadas e a atividade volumétrica reduziu significativamente em todas as amostras. Portanto, o armazenamento da ASNase extracelular no sobrenadante não foi adequado para manter a atividade e concluiu-se que operações de purificação são necessárias para manter a proteínas estável por longos períodos. A Figura 15 destaca a presença de agregados em uma das amostras.

Gráfico 46. Atividade volumétrica no sobrenadante (U/L) medida ao longo do tempo (h) após início da incubação a A) 30 °C e B) 35 °C. Os erros são provindos de duplicatas analíticas.

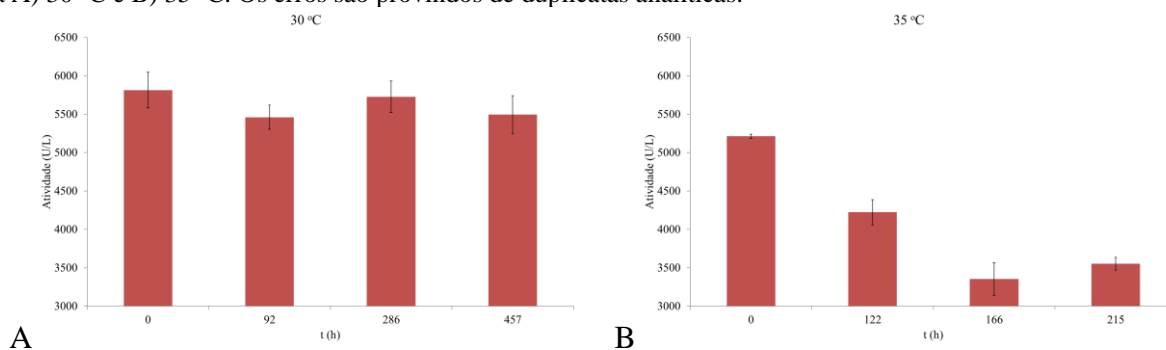
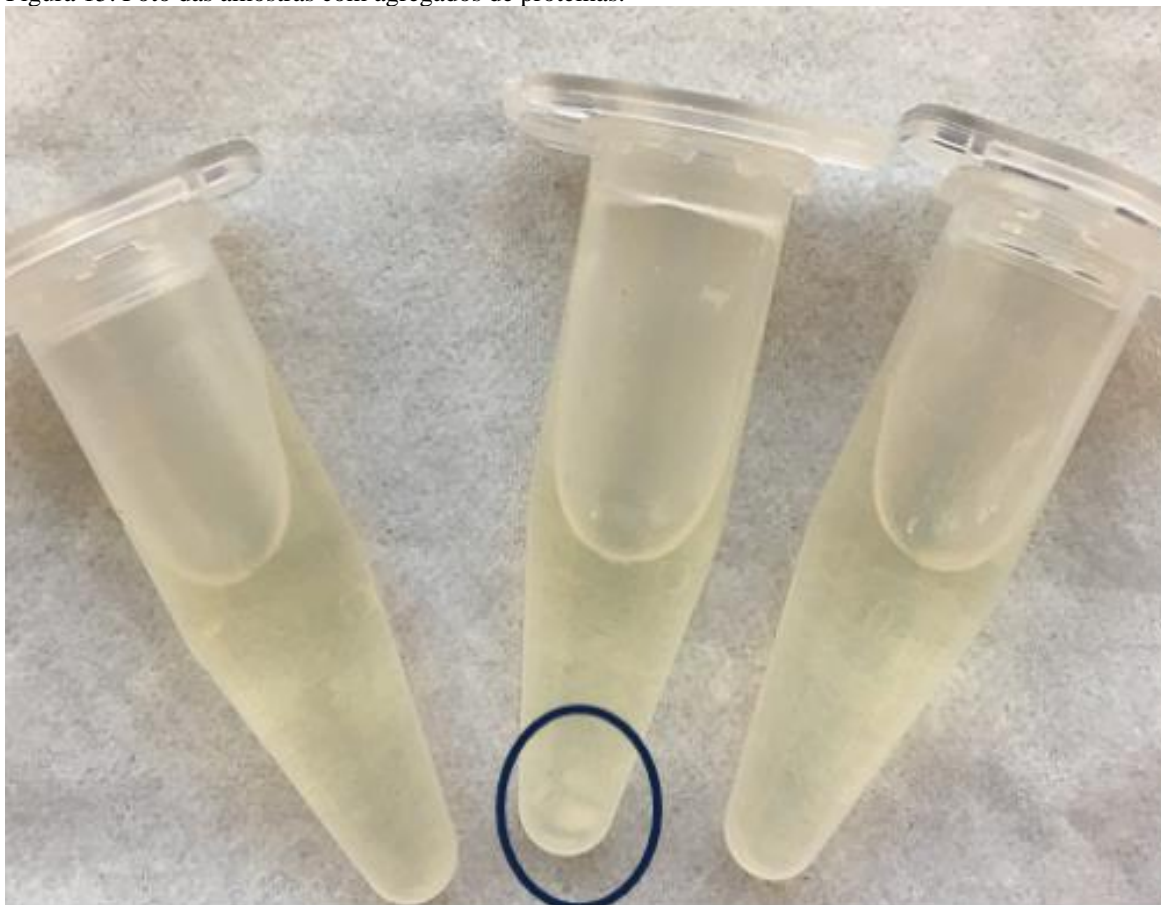


Figura 15. Foto das amostras com agregados de proteínas.



Fonte: foto tirada pela autora.

3.4. Discussão

No capítulo 2, ficou demonstrado que a cepa His⁺ foi capaz de produzir uma ASNase com glicosilação humanizada com atividade volumétrica superior a outros trabalhos da literatura. Além disso, foi observado que a alimentação constante de metanol e o controle do oxigênio dissolvido (*DO*-stat) foram essenciais no aumento da produtividade. No entanto, a atividade volumétrica obtida em frascos com meio complexo foi superior às melhores condições alcançadas em biorreator com meio sintético. Por isso, o objetivo deste capítulo foi estudar as condições de indução visando à melhoria da produção de ASNase ativa.

A maioria dos experimentos deste capítulo foi realizada no Instituto Técnico de Química da Universidade de Hanôver (TCI). Por esse motivo, o primeiro passo foi garantir que o novo banco de trabalho gerado para os experimentos realizados durante o estágio no exterior na Alemanha fosse comparável ao banco original do laboratório do Brasil. Os estudos em frascos agitados e em biorreator demonstraram que os bancos eram comparáveis, embora a atividade

em meio complexo tenha sido melhor com o banco brasileiro, o que também pode ser resultado da própria falta de acurácia intrínseca ao ensaio enzimático por cor.

Em seguida, foi realizada a seleção de um novo meio de cultivo em substituição ao meio BSM, pois a alta concentração de sais desse meio pode prejudicar o crescimento e a produção recombinante por: aumentar o gasto metabólico para manutenção célula; conter elementos em concentrações inibitórias ao metabolismo; e provocar resposta de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (DRAGOSITS et al., 2010; ISIDRO et al., 2016a; MATTHEWS et al., 2018). Esses três fenômenos justificam os resultados observados no experimento 13, em que o crescimento celular não foi impactado, pois a concentração celular final foi similar em ambos os meios, mas a atividade de ASNase aumentou significativamente no meio TCI. O aumento da atividade resultou da maior produção extracelular como demonstrado no gel SDS, dessa forma, foi demonstrado que a alta concentração de sais teve maior efeito sobre a capacidade da célula de secretar proteínas do que sobre a proteína no sobrenadante. Diante desses resultados, o meio TCI foi escolhido para prosseguir os experimentos.

Após a seleção de um novo meio de cultivo, foram estudados os efeitos da concentração de oxigênio, de metanol e da temperatura sobre a atividade no sobrenadante. Metanol e oxigênio foram escolhidos devido a sua importância na produção heteróloga como reportado na literatura e também pelos resultados do capítulo anterior, em que foi possível duplicar a atividade volumétrica com o *DO-stat*, e a temperatura por seu efeito sobre o processamento proteico. Apesar do pH ser um fator relevante, por limitação de número de experimentos e pelo risco de precipitação do meio sintético, ele foi excluído desse planejamento, mas ele está sendo estudado por outro doutorando do grupo de pesquisa. O valor de pH adotado foi de acordo com o recomendado pela literatura para evitar atividade proteolítica no meio (NIETO-TAYPE et al., 2020).

Para identificar as relações entre esses parâmetros, foi realizado um desenho experimental do tipo fatorial fracionário com adição de ponto central e análise dos dados com regressão linear múltipla pelo método *stepwise* com seleção bidirecional. Dessa forma, foi possível construir um modelo capaz de prever não apenas os efeitos primários, mas também quadráticos das variáveis de entrada sobre a atividade. Entre elas, concentração de metanol, temperatura e o quadrado da temperatura foram relevantes para o modelo de predição da atividade ao fim do segundo dia de indução (cerca de 84 horas de cultivo).

Na determinação dos parâmetros mais relevantes para o modelo, o oxigênio foi excluído, pois não apareceu no gráfico de Pareto e sua inclusão no modelo resultou na redução de R^2 . Isso significa que a concentração de oxigênio entre 5 e 50% foi indiferente para a atividade. Resultado semelhante foi obtido por Gmeiner et al. (2015), que também não observaram efeito da concentração de oxigênio sobre a produção de peroxidase recombinante por uma cepa Mut^S. De fato, os estudos discordam em relação a concentração de oxigênio ideal, o que indica que ela é dependente da combinação cepa – produto.

Alguns autores defendem que a não limitação de oxigênio aumenta as velocidades específicas de consumo de substrato e formação de produto, favorecendo a produção recombinante (LEE et al., 2003; PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016). Já outros afirmam que sua limitação reduz o estresse causado pelo metabolismo do metanol, assim beneficiando a produção heteróloga e as modificações pós traducionais (BAUMANN et al., 2008; BERDICHEVSKY et al., 2011; TRENTMANN; KHATRI; HOFFMANN, 2004). Mas, de forma geral, a concentração de oxigênio deve ser suficiente para a oxidação do metanol a formaldeído, regeneração do NADPH e abaixo do nível citotóxico. Portanto, teoricamente, para a cepa estudada a concentração de 5% já seria suficiente para alcançar o estado metabólico favorável para a máxima produção de ASNase, o que reduziria significativamente o custo do processo.

Em relação ao metanol, de acordo com o modelo, a concentração de 0,8 g/L já seria suficiente para levar à atividade máxima da região de estudo. Essa concentração está de acordo com a faixa sugerida para linhagens Mut^S de até 4 g/L (COS et al., 2006). De acordo com a literatura, o estresse causado pelo metabolismo do metanol resulta tanto em maior gasto energético para a manutenção, ou seja, há menos carbono direcionado para a assimilação em proteína, quanto em sobrecarga do retículo endoplasmático devido à produção heteróloga (VANZ et al., 2012a). Além disso, de acordo com J. L. Cereghino & Cregg (2000), o nível de transcrição do promotor do gene AOX1 é de 3 a 5 vezes maior com limitação de metanol do que com excesso. Portanto, com a menor concentração de metanol, provavelmente, o estresse metabólico também seria menor e a transcrição maior, o que permitiria a produção e o processamento de mais unidades de ASNase ativa. O fato de a concentração mais baixa ser suficiente para a produção máxima é vantajoso tanto em termos econômicos quanto para a segurança do processo, já que se trata de um combustível inflamável.

O efeito da temperatura foi contraditório com os resultados de muitos trabalhos, mas esperado para essa cepa – produto. De acordo com outros autores, a temperatura mais baixa durante a indução reduz o estresse causado pelo metabolismo do metanol e pelo processamento de proteínas no retículo endoplasmático, favorecendo a produção heteróloga, e ainda reduz a atividade proteolítica no sobrenadante, o que leva ao acúmulo do produto (DRAGOSITS et al., 2011; JAHIC et al., 2003; YANG; ZHANG, 2018; ZHONG et al., 2014). Além disso, foi reportado que temperaturas acima de 32 °C resultariam no fim da expressão recombinante e na lise celular (NIETO-TAYPE et al., 2020).

No entanto, em estudo prévio realizado em frascos agitados para a linhagem His^r expressando a mesma ASNase, Kleingesinds et al. (2019) obtiveram a maior atividade também a 35 °C. Além disso, os mesmos autores executaram cultivos em temperaturas mais elevadas, obtendo menor atividade e, por fim, concluíram que essa é a temperatura ideal para a proteína em estudo. Uma hipótese para justificar esse resultado é o aumento das velocidades específicas de formação de biomassa e de ASNase ativa, que favorecem a atividade recombinante de forma que o acúmulo de ASNase no meio supera a degradação por proteases, que foi constatada a 35 °C. Portanto, esse estudo contribuiu para mostrar que temperaturas mais altas podem ser interessantes para a produção recombinante em *Pichia Mut^S* pelo favorecimento das reações intracelulares.

Da literatura, sabe-se que há uma relação entre a velocidade específica de crescimento e a de formação de produto. De acordo com a cepa-produto, essa relação pode ser linear como pelo modelo de Luedeking-Piret (totalmente ou parcialmente acoplada ao crescimento), ou ter um formato de curva em sino, ou ainda ter seguir um modelo μ -saturado (NIETO-TAYPE et al., 2020). Neste estudo, como muitos parâmetros foram modificados simultaneamente e foi assumida uma única velocidade específica por toda indução, não é possível determinar o modelo de correlação entre esses parâmetros. Porém, analisando o experimento 14D, que alcançou a maior atividade volumétrica, observou-se que a velocidade específica de crescimento foi significativamente superior às demais condições, a velocidade específica de formação de produto foi máxima e que as atividades específicas por massa e proteínas também foram significativamente maiores que nos demais ensaios.

Além disso, o fluxo de carbono para via de disseminação de energia pela produção de CO₂ foi menor que os demais ensaios durante o consumo de metanol. De acordo com Unrean (2014), ambientes com excesso de oxigênio beneficiam a produção de biomassa em detrimento da

proteína recombinante, pois os fluxos do ciclo de Krebs seriam aumentados e mais cofator NADH_2 seria destinado para a produção de biomassa. Apesar de isso ter sido observado, já que esse foi o ensaio com a menor concentração final de proteína, a produção total foi muito superior e superou o valor obtido em frascos agitados com meio complexo de 10700 U/L. Portanto, reduzindo os efeitos negativos do estresse (meio sintético, cisalhamento) e da atividade proteolítica sobre a produção recombinante.

A avaliação da consistência dos dados indicou erros de medidas experimentais, principalmente, nas medidas dos gases e de consumo de substrato. Erros nas medidas dos gases já foram reportados por outros autores (N. S. Wang & Stephanopoulos, 1983) e também eram esperados dadas as limitações dos controladores e dos sensores. Já em relação aos substratos, a limitação estava na medida de consumo *online* do glicerol pela falta de um sensor e pela alta volatilidade do metanol, cuja evaporação, mesmo na presença de um sensor, é de difícil cálculo em um ambiente dinâmico durante o tempo. Logo, novos coeficientes de conversão foram obtidos usando a metodologia de N. S. Wang & Stephanopoulos (1983), reduzindo o erro de balanço de massa de carbono durante o crescimento em glicerol de 24% para 11% e drasticamente em metanol de acima de 40% para menos de 1%. Por hipótese, o erro no balanço em glicerol pode ser atribuído à produção de subprodutos, como citrato e arabitol, como já reportado pela literatura (Carnicer et al., 2009), mas que não foram medidos nesse estudo. Já para o crescimento em metanol, as novas velocidades específicas que foram obtidas são compatíveis com a literatura, como mostra a Tabela 42, demonstrando a eficácia do método.

Tabela 42. Comparação das principais condições de indução, velocidade específica de crescimento e coeficientes de conversão calculados o crescimento em metanol para os experimentos 14A a 14F e a literatura. Tabela adaptada de Ponte et al., 2016.

Exp. / Ref	Concentração de Metanol	Fenótipo	Produto	T (°C)	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	$Y_{\text{CO}_2\text{S}}$ molCO ₂ /gmet	$Y_{\text{O}_2\text{S}}$ molO ₂ /gmet	Y_{XS} gbiomassa/gmetanol
14A	0,8 g/L			25	0,005	0,026	0,042	0,14
14B	5,0 g/L			25	0,005	0,024	0,039	0,17
14C	0,8 g/L	GS115	ASNase	25	0,006	0,026	0,041	0,13
14D	5,0 g/L	(Mut ^S)		35	0,015	0,017	0,033	0,37
14E	2,0 g/L			30	0,003	0,028	0,044	0,08
14F	2,0 g/L			30	0,002	0,031	0,047	0,05
(PONTE; MONTESINOS-SEGUI; VALERO, 2016)	3,0 g/L	X33 (Mut ⁺)	ROL	30	0,034	0,025	0,041	0,19
(CURVERS et al., 2001)	4,0 g/L	GS115 (Mut ⁺)	Quimo-tripsinogênio B	25-30	0,040 -	-	0,034	0,32
(XIE et al., 2013)	MLFB	GS115 (Mut ^S)	Angiostatina	30	0,006	0,027	0,042	0,11
(KRAINER et al., 2012)	Pulsos MetOH 1%	CBS7435 (Mut ^S)	Peroxidase recombinante	28	0,022	0,018	0,033	0,38

ROL = lipase de *Rhizopus oryzae*; MLFB = *metanol limited fed-batch*

Por restrição de tempo e recursos, não foi possível realizar o ensaio nas condições otimizadas obtidas pelo modelo estatístico do planejamento experimental, que seriam com metanol mantido a 0,8 g/L, 35 °C e pO₂ a 5%. No entanto, foi realizado o experimento 15 com o objetivo de validar as condições do cultivo 14D na ausência do sensor de metanol. Apesar do modelo de alimentação ter sido executado de forma bem-sucedida, as diferenças metabólicas levaram a mudanças no consumo de metanol e acúmulo do mesmo até a toxicidade, consequentemente, as células morreram e atividade máxima do ensaio 14D não foi atingida. Esse experimento mostrou a importância da utilização de sensores de medida *online* de substrato.

Apesar das limitações experimentais, o desenvolvimento deste bioprocesso foi executado seguindo os princípios do *Quality by Design*. Primeiramente, foi escolhido um atributo de qualidade, a atividade volumétrica, e foram identificados os parâmetros críticos do processo, temperatura, metanol e oxigênio, com base na literatura e no conhecimento experimental prévio. Em seguida, foi realizado um planejamento estatístico para identificar a relação entre eles e o atributo escolhido e foram utilizados sensores *online* e modelos matemáticos (*PAT tools*) para controlar e monitorar os cultivos. Enfim, foram identificadas as regiões de operação em que a atividade volumétrica almejada pudesse ser obtida experimentalmente. Para ampliar este estudo, tanto outros atributos também poderiam ser estudados, como o padrão de glicosilação, a produção de variantes (monômeros e tetrâmeros) e a formação de agregados,

quanto outros parâmetros (pH, coalimentação de substratos) e assim seria possível delimitar um *design space* com a faixa de operação para cada parâmetro, tornando o processo mais robusto para o escalonamento.

Relativo ao escalonamento, outras fases do cultivo precisariam ser aprimoradas para tornar o processo mais atrativo, como a alimentação em batelada-alimentada com glicerol para obtenção de maior população celular antes da indução, mas, isso já foi amplamente estudado e é muito menos dependente da combinação cepa-produto do que a indução, podendo um modelo de alimentação bem-conhecido ser facilmente aplicado. Além disso, são necessários estudos de purificação para se obter um bom rendimento com pureza adequada para aplicação clínica, o que está sendo realizado concomitante a esta tese. Por fim, com os dados obtidos no *upstream* e no *downstream*, podem ser feitas simulações econômicas a fim de estudar a viabilidade do processo.

Apesar dessas melhorias serem necessárias, os resultados deste estudo já representam um grande avanço na produção de ASNases inovadoras provindas de produção recombinante. Não apenas pela atividade alcançada, como mostra a Tabela 43, mas pela obtenção de uma ASNase extracelular com N-glicanos com padrão mais similar ao de mamíferos, com cadeias de manose reduzidas (de 5 a 7 manoses na His⁻ e de 5 a 6 manoses na His⁺), e, em especial, a glicosilação de um epítipo reconhecido por células-T que resultou na redução da resposta imune causada por essa variante, portanto demonstrando ter potencial como biofármaco.

Tabela 43. Comparação da atividade volumétrica de novas ASNases recombinantes publicadas nos últimos anos.

Fonte	Gene da L-asparaginase	Sistema de Expressão	Meio de cultivo / Sistema	Principais características	Atividade
(SAJITHA et al., 2015)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pink</i> [®]	Meio Complexo --	Extracelular Glicosilada ¹	2.500 U/L ²
(NGUYEN et al., 2014)	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia pastoris</i> X33	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilada ¹	1.800 U/L ²
(GIRÃO et al., 2016)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Meio sintético Biorreator bancada	Intracelular Glicosilada	800 U/g _{biomassa} ²
(RODRIGUES et al., 2019)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Meio sintético Biorreator bancada	Intracelular Glicosilada ¹	3.315 U/L 37 U/g _{biomassa}
(EFFER et al., 2019)	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia Glycoswitch</i> [®]	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilação Humanizada ¹	457 U/L
Este estudo	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Pichia Glycoswitch</i> [®]	Meio Complexo Frascos	Extracelular Glicosilação Humanizada	10.700 U/L ³ 760 U/g _{biomassa}
			Meio sintético Biorreator bancada		12.300 U/L ⁴ 180 U/g _{biomassa}

¹Provavelmente glicosilada devido ao tamanho molecular, mas o teste de glicosilação não foi apresentado. ²Medida pelo método da hidrólise da asparagina (método de Nessler), que superestimada a atividade quando comparado com o método da hidroxilaminólise usado nesse estudo como demonstrado por (MAGRI et al., 2018). ³Obtida no experimento 8 com 48 horas de cultivo. ⁴ Obtida no experimento 14D com 96 horas de cultivo.

3.5. Conclusões Parciais

Deste capítulo, conclui-se que:

- As condições de indução com metanol mantido a 5 g/L, temperatura a 35 °C e oxigênio a 50% resultaram na maior atividade volumétrica;
- Modelo estatístico sugere que a redução de metanol e aumento da temperatura resultariam em atividade volumétrica maior do que a obtida experimentalmente;
- Manter as células crescendo durante a indução foi essencial para aumentar a produção;
- Apesar do indício de proteases no sobrenadante, foi possível aumentar a produção com melhoria nas condições de processo;
- Aplicação de sensores e de modelos matemáticos foi essencial para o desenvolvimento do bioprocessamento.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES

Capítulo 4: Conclusões

Esta tese objetivou o desenvolvimento da etapa de *upstream*, desde a seleção da linhagem celular até os cultivos em biorreator de bancada, do processo de produção da enzima recombinante L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* expressa por uma cepa de *Pichia pastoris* capaz de realizar glicosilação humanizada. Para alcançar esse objetivo, foram realizadas melhorias na cepa produtora e nas estratégias operacionais do processo.

Na primeira parte desta tese, **Capítulo 2**, foram estudadas as condições de crescimento e produção de duas cepas de *P. pastoris* Glycoswitch[®] SuperMan₅ produtoras de ErAII extracelular, sendo que uma é auxotrófica (His⁻) e outra prototrófica (His⁺) para histidina, em frascos e biorreator de 2 L. Os resultados demonstraram que cepa His⁺ é a mais adequada para o processo, tanto por sua maior produtividade quanto por não necessitar da suplementação de histidina, por isso ela foi escolhida para o prosseguimento da pesquisa. Em seguida, foi realizado o aprimoramento do protocolo de indução em biorreator de pulsos para *DO-stat*, resultando em cerca do dobro da atividade volumétrica.

A melhoria da produtividade do processo foi o principal objetivo do **Capítulo 3**. Primeiramente, dois meios sintéticos foram avaliados e observou-se que o meio com menor concentração de sais levou a maior produção de ASNase ativa, por isso ele foi selecionado para os demais cultivos. Posteriormente, foi realizado um planejamento fatorial fracionário com dois níveis de concentração de metanol, oxigênio dissolvido e temperatura e um ponto central. Foi obtido um aumento significativo da atividade volumétrica, sendo que na melhor condição foi obtido 10700 U/L de ASNase e concentração celular de 47 g_{biomassa seca}/L com 84 horas de cultivo com indução realizada com metanol mantido a 5 g/L, temperatura a 35 °C e oxigênio a 50%. Esse valor é oito vezes maior do que o obtido com pulsos e a atividade por biomassa é quatro vezes maior do que com *DO-stat*.

O modelo preditivo obtido com regressão linear dos dados demonstrou que a temperatura era mais relevante para o aumento da produção que o metanol e o oxigênio. Analisando o balanço de carbono corrigido pela metodologia de identificação de erros sistemáticos, foi possível concluir que o aumento da temperatura resultou no aumento tanto da velocidade específica de crescimento quanto de formação de produto, levando a

maior atividade volumétrica final. Dessa forma, esse estudo contribuiu para demonstrar que temperaturas mais altas podem beneficiar os cultivos de *Pichia*.

Apesar da temperatura ser mais relevante para o modelo, o controle do metanol ainda é essencial. Como observado no experimento 15, em que se tentou replicar as melhores condições de indução sem um sensor *online* de metanol, a falta de controle deste álcool resultou em acúmulo acima de níveis tolerados pelas células, conseqüentemente, houve lise celular e prejuízo da produção. Esse experimento demonstrou a necessidade de um sensor de metanol para o futuro escalonamento do processo.

Por fim, a ASNase produzida foi caracterizada em relação ao padrão de glicosilação por espectrometria de massa e por reação enzimática de desglicosilação em gel de eletroforese. Com essas análises, foi identificado que o resíduo Asn₁₇₀ que faz parte de um epítipo imunogênico de células-T relacionado à alergia a ASNase estava glicosilado. Portanto, essa ASNase inovadora tem potencial de prover um tratamento menos imunogênico.

Entre as limitações deste estudo, destaca-se a restrição ao acesso de ferramentas analíticas que poderiam auxiliar a interpretação dos dados e o desenvolvimento mais rápido do processo, como por exemplo o sensor de metanol *online* ou um equipamento de cromatografia para análise dos demais metabólitos. Além disso, por limitação de tempo e recursos, não foram realizadas replicatas experimentais para a maioria dos cultivos em biorreator. Ademais, os experimentos foram desenhados pensando no aumento da produtividade, no entanto, não foram avaliados outros atributos de qualidade da proteína, como o padrão de glicosilação em diferentes momentos, a formação de variantes (monômeros, dímeros, etc), o grau de pureza, entre outros. Por fim, os experimentos foram realizados com concentração celular abaixo de 100 g/L e, para o escalonamento do processo, seria mais interessante obter densidade celular maior.

Dos resultados desta tese, conclui-se que foi obtido um processo adequado para a produção de ASNase recombinante com glicosilação humanizada com alto potencial de escalonamento. Concomitante com esta tese, estão sendo desenvolvidos estudos das condições de purificação, da atividade *in vitro* e da viabilidade econômica do processo. Com esses resultados, será possível planejar as próximas etapas para uma possível

produção comercial. Em relação à continuidade do desenvolvimento do *upstream*, são feitas as seguintes recomendações:

- Explorar alternativas para reduzir a atividade proteolítica no meio, como substituir por uma cepa deficiente em proteases, ou utilizar inibidores de protease no meio ou suplementá-lo com uma fonte complexa, ou ainda modificar o pH durante a indução;
- Aumentar a concentração celular antes da indução com acréscimo de uma fase com batelada-alimentada de glicerol de acordo com modelos da literatura para que a atividade volumétrica final seja maior;
- Escolher um modelo de escalonamento e realizar experimentos em escala-piloto com as condições mais adequadas obtidas na bancada e analisar os perfis de crescimento, consumo de substrato, e de formação de produto assim como os atributos de qualidade do produto.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Trabalhos apresentados em congressos nacionais

- a) PARIZOTTO, L.; PESSOA Jr., A.; TONSO, A. Production of L-asparaginase: a bibliometric study. *In: PROCEEDINGS OF NATIONAL BIOPROCESSES SYMPOSIUM AND ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASS SYMPOSIUM*, 21., 2017. **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2017. Disponível em: <<https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-2017/papers/production-of-l-asparaginase--a-bibliometric-study?lang=pt-br>>. Acesso em: 25 out. 2021.
- b) PARIZOTTO, L.; PESSOA Jr., A.; TONSO, A. Online monitoring of *Pichia pastoris* metabolism through respiration. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ)*, 22., 2018, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: Blucher Chemical Engineering Proceedings, Volume 1, p. 4815-4818.
- c) ASTUDILLO, D.; RUSSO, G.; PARIZOTTO, L.; TOLEDO, B. Avaliação da motivação de um aluno de engenharia. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO EM ENGENHARIA*. 46., 2018, Salvador. **Anais eletrônicos...** Brasília, 2018. Disponível em: http://www.abenge.org.br/sis_artigos.php. Acesso em: 25 out. 2021.
- d) ORTENZIO, Y. T.; PARIZOTTO, L. A.; TAKAGI, M.; PESSOA Jr., A.; TONSO A. Influência do pH na produção de L-asparaginase em alta densidade celular por *Pichia pastoris*. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ 2021)*, 23., 2021, Gramado, RS. Videoposter, p. 1-4.

Trabalhos apresentados em congressos internacionais

- a) PARIZOTTO, L.; KLEINGESINDS, E.; PESSOA Jr., A.; TONSO, A. L-asparaginase production by glycoengineered *Pichia pastoris* in benchtop bioreactors. *In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCES*, 12., 2018, Lisboa. **Anais...** Lisboa, p.379.
- b) PARIZOTTO, L.; PESSOA Jr., A.; TONSO, A. Doubling humanized L-asparaginase expression by *Pichia pastoris* through DO-stat controlling induction strategy in bench-bioreactor. *In: EUROPEAN CONGRESS OF APPLIED BIOTECHNOLOGY*, 5., 2019, Florença. **Anais...** Milão. Disponível em: <https://www.aidic.it/ecce12/programma/1535parizotto.docx>. Acesso em: 25 out. 2021.
- c) KLEINGESINDS, E.; ROLDAN, B.; PARIZOTTO, L.; MONTEIRO, G.; PESSOA Jr., A. Upstream and downstream process of humanized L-asparaginase expressed by recombinant *Pichia pastoris*: A new biopharmaceutical against Acute Lymphoblastic Leukemia. *In: RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION*, 10., 2019, Creta. **Anais...** Creta, p. 224.

Artigo em revista nacional

- a) PARIZOTTO, L.; TONSO, A.; CARVALHO, A. The challenges of project management in small and medium-sized enterprises: a literature review based on

bibliometric software and content analysis. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 27, n. 1, p. 1-23, 2020 Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/0104-530x3768-20> > DOI: 10.1590/0104-530x3768-20. Acesso em: 25 out. 2021.

Artigos em revistas internacionais

- a) COSTA-SILVA, T. A., CAMACHO-CÓRDOVA, D. I., Agamez-Montalvo, G. S., PARIZOTTO, L. A., SÁNCHEZ-MOGUEL, I., & PESSOA Jr, A. Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos ,2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536990>. Acesso em: 25 out. 2021.
- b) PARIZOTTO, Letícia de Almeida; KLEINGESINDS, Eduardo Krebs; ROSA, Luiza Manfrinato Pedrotti da; et al. Increased glycosylated L-asparaginase production through selection of *Pichia pastoris* platform and oxygen-methanol control in fed-batches. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, 2021. Disponível em: < <https://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2021.108083> > DOI: 10.1016/j.bej.2021.108083. Acesso em: 25 out. 2021.

Capítulo de livro publicado (pré-venda)

- a) PARIZOTTO, L; BRUMANO, L; KLEINGESINDS, E; PESSOA Jr., A. Modern medicine relies on the help of microorganisms – from vaccine production to cancer medication. In: DE BRUJIN, F. J.; SMIDT, H; COCOLIN, L.; SAUER, M.; DOWLING, D. N.; THOMASHOW, L. **The Good Microbes in Medicine, Food Production, Biotechnology, Bioremediation, and Agriculture**. Wiley, 2022. ISBN: 1119762546, 9781119762546.

Referências Bibliográficas

- ADIS INSIGHT. Drug Profile. **Pegcrisantaspase**. Disponível em: <<https://adisinsight.springer.com/drugs/800029657>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- ADIS INSIGHT. Drug Profile. **Recombinant crisantaspase**. Disponível em: <<https://adisinsight.springer.com/drugs/800061647>>. Acesso em: 6 mar. 2021.
- AGHJAYAN, R. **FDA: Early 2019 Drug Shortages Announced**. Disponível em: <<https://www.clinicaladvisor.com/home/topics/practice-management-information-center/fda-early-2019-drug-shortages-announced/>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, Jun. 2014.
- ALIFANO, P. et al. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 1, p. 44–69, 1996.
- ANANE, E.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Comparison of constitutive and inducible β -fructofuranosidase production by recombinant *Pichia pastoris* in fed-batch culture using defined and semi-defined media. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 17–22, 2016.
- ANDAR, A. U. et al. Low-cost customizable microscale toolkit for rapid screening and purification of therapeutic proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 870–881, Abr. 2019.
- ANVISA. **Registro ANVISA nº 156260031 - Spectrila**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351567187201724/>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Quality-by-Design Approach for Biological API Encapsulation into Polymersomes Using “Off-the-Shelf” Materials: a Study on L-Asparaginase. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 251, Ago. 2019.
- AVRAMIS, V. I.; PANOSYAN, E. H. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationships of Asparaginase Formulations. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 4, p. 367–393, 2005.
- BADINO JR, A. C.; SCHMIDELL, W. Variação de Escala. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. E BORZANI, W. **Biociencia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 333–353.
- BARRIGÓN, J. M.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 47–54, Jun. 2013.
- BARRIGÓN, J. M.; VALERO, F.; MONTESINOS, J. L. A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 1132–1145, 2015.
- BARROS, T. et al. Development of processes for recombinant L-asparaginase II production by *Escherichia coli* B121 (De3): From shaker to bioreactors. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2021.
- BARTHOLOMEW, W. H. et al. Oxygen Transfer and Agitation in Submerged Fermentations. Mass Transfer of Oxygen in Submerged Fermentation of *Streptomyces griseus*. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1801–1809, Set. 1950.
- BARUCH, M. et al. An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 97–108, 2014.
- BATOOL, T. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016.
- BAUMANN, K. et al. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 177–183, 2008.
- BAUMANN, P.; HUBBUCH, J. Downstream process development strategies for effective bioprocesses: Trends, progress, and combinatorial approaches. **Engineering in Life Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1142–1158, Nov. 2017.
- BAYER, B. et al. Comparison of Modeling Methods for DoE-Based Holistic Upstream Process Characterization. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 5, p. 1900551, Maio 2020.
- BÉRANGÈRE, F. et al. Methodology for Bioprocess Analysis: Mass Balances, Yields and Stoichiometries. In: **Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine**. [s.l.] InTech, 2012.

- BERDICHEVSKY, M. et al. Improved production of monoclonal antibodies through oxygen-limited cultivation of glycoengineered yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 2, p. 217–224, 2011.
- BIOGRAMMATICS. **Preparing Pichia pastoris cells for Transformation by Electroporation**, 2013a.
- BIOGRAMMATICS. **Pichia Transformation Protocol. Electroporation of BioGrammatics competent Pichia cells.**, 2013b.
- BOEDEKER, B.; GOLDSTEIN, A.; MAHAJAN, E. Fully Disposable Manufacturing Concepts for Clinical and Commercial Manufacturing and Ballroom Concepts. In: KISS, B., GOTTSCHALK, U., POHLSCHIEDT, M. (Ed.). **New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 179–210.
- BÖER, E. et al. Yeast expression platforms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 513–523, 2007.
- BROOME, J. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. **Nature**, v. 191, p. 1114–1115, 1961.
- BROOME, J.; SCHWARTZ, J. Differences in the production of L-asparagine in asparaginase-sensitive and resistant lymphoma cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 138, p. 637–639, 1967.
- BRUMANO, L. P. et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. Jan, p. 1–22, 2019.
- CÁMARA, E.; ALBIOL, J.; FERRER, P. Droplet digital PCR-aided screening and characterization of Pichia pastoris multiple gene copy strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 7, p. 1542–1551, Jul. 2016.
- CAMPBELL, H. A. et al. Two L-Asparaginases from Escheria coli B. Their Separation, Purification, and Antitumor Activity. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 721–730, 1967.
- CARNICER, M. et al. Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of Pichia pastoris growing at different oxygen levels. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 65, 2009.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W. et al. (Eds.). **Biociologia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001a. p. 193–204.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: SCHMIDELL, W. et al. (Eds.). **Biociologia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001b. p. 205–218.
- CAVANA, M. et al. Comparative experimental evaluation of immunosuppressive and toxic effects of L-asparaginase NSC-109229 from Escherichia coli and from Erwinia carotovora. **Cancer Treatment Reports**, v. 60, n. 3, p. 255–257, 1976.
- CECCONELLO, D. K. et al. Monitoring asparaginase activity in middle-income countries. **The Lancet Oncology**, 2 ago. 2018.
- CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. Production of L-Asparaginase II by Escherichia coli. **American Society for Microbiology**, v. 96, n. 6, p. 2013–2048, 1968.
- ÇELİK, E.; ÇALIK, P.; OLIVER, S. G. Metabolic flux analysis for recombinant protein production by Pichia pastoris using dual carbon sources: Effects of methanol feeding rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 2, p. 317–329, Feb. 2010.
- CEREGHINO, G. P. et al. New selectable marker / auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of Pichia ... New selectable marker / auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of Pichia pastoris q. v. 263, n. February, p. 159–169, 2001.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45–66, 2000.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of biological chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–5, Dez. 1947.
- CHEN, J. Q.; RUSSO, J. **Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Biochim Biophys Acta, dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22750268/>>. Acesso em: 4 mar. 2021

- CHIRUVOLU, V. et al. Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 75, n. 2–3, p. 163–173, 1998.
- CHIU, M. et al. Glutamine depletion by crisantaspase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma xenografts. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 6, p. 1159–1167, Set. 2014.
- CHUNG, B. K. et al. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 50, 2010.
- CLARE, J. J. et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, v. 105, n. 2, p. 205–212, Set. 1991.
- CMC BIOTECH WORKING GROUP. **A-Mab: a Case Study in Bioprocess Development** October, 2009.
- COLE, K. S. et al. Removal of N-Linked Glycosylation Sites in the V1 Region of Simian Immunodeficiency Virus gp120 Results in Redirection of B-Cell Responses to V3. **Journal of Virology**, v. 78, n. 3, p. 1525–1539, Fev. 2004.
- COS, O. et al. Heterologous protein production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 86–94, 2005a.
- COS, O. et al. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 117, n. 1, p. 321–335, 2005b.
- COS, O. et al. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–20, 2006.
- COSTA-SILVA, T. A. et al. Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95–104, Jan. 2018.
- COSTA-SILVA, T. A. et al. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, n. xxxx, p. 100651, 2020.
- COSTA, I. M. et al. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 5, n. 12, p. 3376–3385, 1985.
- CREGG, J. M. et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 3, p. 1316–23, 1989.
- CURVERS, S. et al. Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 3, p. 495–502, 2001.
- D'ANJOU, M. C.; DAUGULIS, A. J. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 1–11, 2001.
- DA ROCHA, W. R. V. et al. Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426–1437, 2019a.
- DA ROCHA, W. R. V. et al. Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426–1437, 1 maio 2019b.
- DA ROSA, V. H. C. T. **Nota Técnica CAF nº 02, de 27 de fevereiro de 2018**, 2018.
- DAMASCENO, L. M. et al. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 37, n. 1, p. 18–26, 2004.
- DE MOURA, W. A. F. et al. Functional and structural evaluation of the antileukaemic enzyme L-asparaginase II expressed at low temperature by different *Escherichia coli* strains. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 11, p. 2333–2344, Nov. 2020.

- DE, S. et al. Established tools and emerging trends for the production of recombinant proteins and metabolites in *Pichia pastoris*. **Essays in Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 293–307, 2021.
- DE SCHUTTER, K. et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat. Biotechnol.**, p. 561–566, 2009.
- DEPARTAMENTO DE GEOGRAFIA - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Regressão Linear**. Disponível em: <<https://lcb.fflch.usp.br/sites/lcb.fflch.usp.br/files/upload/paginas/AULA5-REGRESSÃO LINEAR.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2021.
- DIETZSCH, C.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 85, 2011.
- DOBBIN, J. **Leucemia Aguda**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=344>. Acesso em: 5 maio. 2016.
- DRAGOSITS, M. et al. The Effect of Temperature on the Proteome of Recombinant *Pichia pastoris*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 3, p. 1380–1392, 2009.
- DRAGOSITS, M. et al. The response to unfolded protein is involved in osmotolerance of *Pichia pastoris*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 207, 2010.
- DRAGOSITS, M. et al. Influence of growth temperature on the production of antibody Fab fragments in different microbes: A host comparative analysis. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 38–46, 2011.
- DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. **Induction and measurement of UPR and osmotic stress in the yeast *Pichia pastoris***. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 489
- DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 493–501, 1977.
- DUFOUR, E. et al. Pancreatic tumor sensitivity to plasma L-asparagine starvation. **Pancreas**, v. 41, n. 6, p. 940–948, Ago. 2012.
- DUVAL, M. S. et al. Comparison of *Escherichia coli*- asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer—Children’s Leukemia Group phase 3 trials. **Blood**, v. 99, p. 2734–2739, 2002.
- EFFER, B. et al. **Recombinant expression of L-asparaginase from *Dickeya chrysanthemi* in yeast: Effect of endogenous signal sequence and histidine tag in the expression protein.**, 2017.
- EFFER, B. et al. L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 7, p. 679–685, Ago. 2019.
- EFFER, B. et al. Glycosylation of *Erwinase* results in active protein less recognized by antibodies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 163, n. April, 2020.
- EFROYMSON, M. A. Multiple regression analysis. In: RALSTON, A.; WILF, H. S. (Eds.). **Mathematical Methods for Digital Computers**. New York: John Wiley and Sons Inc, 1960.
- EL-NAGGAR, N. E.-A. et al. Process development for scale-up production of a therapeutic L-asparaginase by *Streptomyces brolosae* NEAE-115 from shake flasks to bioreactor. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13571, Dez. 2019.
- EMA. **Spectrila - asparaginase**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002661/human_med_001954.jsp&mid=WC0b01ac058001d124>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- EMA. **Product Report - Spectrila**. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spectrila-epar-product-information_en.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001. p. 223–246.
- FARBER, S. et al. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). **The New England Journal of medicine**, v. 238, p. 787–793, 1948.
- FDA. **Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Elspar**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=101063>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

- FDA. **Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Oncaspar**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- FDA. **PAT guidance for industry—a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/71012/download>>. Acesso em: 5 ago. 2022.
- FDA. **Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products - Erwinaze**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=125359>>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- FDA. **Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs - Asparlas**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=761102>>. Acesso em: 4 mar. 2021.
- FDA. **Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs - VYEPTI**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&varApplNo=761119>>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- FDA. **Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs - RYLAZE**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=761179>>. Acesso em: 6 nov. 2021.
- FDA; CDER; CBER. **Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/immunogenicity-assessment-therapeutic-protein-products>>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- FERNANDES, H. S. et al. targeted therapy for cancer and viral infections Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 0, n. 0, 2017.
- FERRARA, M. A. et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 7, p. 1457–1463, 2006.
- FERRARA, M. A. et al. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 3, p. 71–76, 2010.
- FERREIRA, G. S. **Expressão recombinante e caracterização funcional da β -amilase de banana produzida em *Pichia pastoris***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Faculdade de Ciência Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São PAulo, 2013.
- FREIRE, R. K. B. et al. Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020.
- FRICKE, J. et al. Designing a fully automated multi-bioreactor plant for fast DoE optimization of pharmaceutical protein production. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 738–747, Jun. 2013.
- FROHWEIN, Y. et al. Sensitive and rapid assay for L-asparaginase. **Nature New Biology**, v. 230, p. 158–159, 1971.
- FUKUDA, I. M. et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. spe, Nov. 2018.
- G1. **Farmacêutica levanta novas dúvidas sobre remédio para câncer infantil**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2017/04/farmacautica-levanta-novas-duvidas-sobre-remedio-para-cancer-infantil.html>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- GADELHA, M. I. P.; LIMA, R. A. T. **Nota Informativa Conjunta n01/2017 - DAF/SCTIE/MS E DAET/SAS/MS**, 2017. Disponível em: <[http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/07/Nota Informativa Conjunta 01-2017 DAF-DAET.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/07/Nota%20Informativa%20Conjunta%2001-2017%20DAF-DAET.pdf)> Acesso em: 05 dez. 2017.
- 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.
- GIELDANOWSKI, J. Studies on the immunosuppressive and anti-inflammatory action of L-asparaginase. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 24, p. 243–247, 1976.
- GIRÃO, L. F. C. et al. Protein Expression and Purification *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II , a

- potential antileukemic drug : Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. v. 120, p. 118–125, 2016.
- GLOBALDATA HEALTHCARE. **Non-stop investment from CMOs and US Government into continuous manufacturing**. Disponível em: <<https://www.pharmaceutical-technology.com/comment/investment-continuous-manufacturing/>>. Acesso em: 2 jul. 2022.
- GMEINER, C. et al. Development of a fed-batch process for a recombinant *Pichia pastoris* Δ och1 strain expressing a plant peroxidase. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.
- GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **The Journal of biological chemistry**, v. 187, n. 1, p. 111–25, Nov. 1950.
- GUIA, T. M. **Uso do Poder de Compras e Biofármacos**. Seminário Propostas da Indústria Brasileira de IFAs e Medicamentos. **Anais[...]**. 2020. Disponível em: <http://www.abifina.org.br/arquivos/download/thiago_gui_a_biofarmacos_e_poder_de_compra.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2022.
- GURRAMKONDA, C. et al. Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 13, 2009.
- GURRAMKONDA, C. et al. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 31, 2010.
- HABICHER, T. et al. Glucose-containing polymer rings enable fed-batch operation in microtiter plates with parallel online measurement of scattered light, fluorescence, dissolved oxygen tension, and pH. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 116, n. 9, p. 2250–2262, Set. 2019.
- HARUMI, J. **Boldrini suspende uso de medicamento chinês**. Disponível em: <http://correio.rac.com.br/_conteudo/2017/03/campinas_e_rmc/474101-boldrini-suspende-uso-de-medicamento-chines.html>. Acesso em: 28 mar. 2017.
- HASHIMOTO, S. et al. Isolation of Auxotrophic Mutants of Diploid Industrial Yeast Strains after UV Mutagenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 312–319, Jan. 2005.
- HEIJDEN, R. T. J. M. VAN DER; HELLINGA, B. R. J. J. H. C. Linear Constraint Relations in Biochemical Reaction Systems : II . Diagnosis and Estimation of Gross Errors. v. 43, 1994.
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. E BORZANI, W. (Ed.). **Biociencia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 93–122.
- HITZMANN, B. Accuracy and Reliability of Measured Data. In: SCHÜGERL, K.; BELLGARDT, K.-H. (Eds.). **Bioreaction Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 125–145.
- HOELZER, D. et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 27, n. February, p. v69–v82, 2016.
- HOLLEMAN, A. et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. **New england journal of medicine**, v. 351, n. 6, p. 533–542, 2004.
- HOLMES, W. J. et al. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: The influence of culture conditions, biomass and induction regime. **Microbial Cell Factories**, v. 8, 2009.
- HUANG, C.-M.; CHANG, H.-C.; HENDERSON, S. Knowledge Transfer Barriers Between Research and Development and Marketing Groups Within Taiwanese Small- and Medium-Sized Enterprise High-Technology New Product Development Teams. **Human Factors and Ergonomics in Manufacturing**, v. 18, n. 6, p. 621–657, 2008.
- INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 2013.
- INCA. Leucemia Agudas na Infância e Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 245–257, 2001.
- INCA. **Coordenação de prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 5 maio. 2016.
- INCA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2019.

- INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2022.
- INVITROGEN. **Pichia Fermentation Process Guidelines Overview**. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2020.
- INVITROGEN. **Pichia Expression Kit. User Guide**, v. A.0, n. 25, p. 100, 2014.
- IRANI, Z. A. et al. Development and in silico analysis of a new nitrogen-limited feeding strategy for fed-batch cultures of *Pichia pastoris* based on a simple pH-control system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 1–9, Jun. 2015.
- ISIDRO, I. A. et al. Hybrid metabolic flux analysis and recombinant protein prediction in *Pichia pastoris* X-33 cultures expressing a single-chain antibody fragment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 9, p. 1351–1363, 2016a.
- ISIDRO, I. A. et al. Analysis of culture media screening data by projection to latent pathways: The case of *Pichia pastoris* X-33. **Journal of Biotechnology**, v. 217, p. 82–89, 2016b.
- IZADPANAH, F. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, n. January, p. 99–112, 2018.
- JACOBS, P. P. et al. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 58–70, 2009.
- JACOBS, P. P. et al. Fed-batch fermentation of GM-CSF-producing glycoengineered *Pichia pastoris* under controlled specific growth rate. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 93, p. 1–9, 2010.
- JAHIC, M. et al. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 2, 2003.
- JASKÓLSKI, M. et al. Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: A case of enantiomorphic space groups. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 3, p. 369–377, 2001.
- JAZINI, M.; CEKICI, G.; HERWIG, C. Quantifying the Effects of Frequency and Amplitude of Periodic Oxygen-Related Stress on Recombinant Protein Production in *Pichia pastoris*. **Bioengineering**, v. 1, n. 1, p. 47–61, Dez. 2013.
- JAZZ PHARMACEUTICALS PLC. **Jazz Pharmaceuticals Announces First Patient Enrolled in Pivotal Phase 2/3 Study Evaluating JZP-458 for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoblastic Lymphoma**. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/jazz-pharmaceuticals-announces-first-patient-enrolled-in-pivotal-phase-23-study-evaluating-jzp-458-for-the-treatment-of-acute-lymphoblastic-leukemia-or-lymphoblastic-lymphoma-300979651.html>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- JIN, H. et al. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. 91–98, 2010.
- JIN, H. et al. Improvement of Porcine Interferon- α Production by Recombinant *Pichia pastoris* via Induction at Low Methanol Concentration and Low Temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 559–571, Set. 2011.
- JÖRCK, C. et al. Transient hyperammonemia due to L-asparaginase therapy in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 28, n. 1, p. 3–9, Fev. 2011.
- JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 479–492, Ago. 2013.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris* : Latest Research Progress and Applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7–21, Jan. 2018.
- KANEHISA LABORATORIES. **Histidine metabolism - Komagataella phaffii**. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppa00340>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- KANEHISA LABORATORIES. **Alanine, aspartate and glutamate metabolism - Komagataella phaffii**. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppa00250>. Acesso em: 5 ago. 2018.
- KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2017.

- KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306–322, Maio 2018.
- KHANCHEZAR, S. et al. Hydrodynamics and mass transfer in miniaturized bubble column bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 2, p. 257–266, Fev. 2019.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, Dez. 1953.
- KILIKIAN, B. V.; PESSOA-JUNIOR, A. Recuperação de produtos obtidos em bioprocessos (downstream processing). In: ALTERHUM, F. et al. (Eds.). **Biotecnologia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 339–396.
- KLEINGESINDS, E. K. et al. **Upstream and downstream process of humanized L-Asparaginase expressed by recombinant Pichia pastoris: A new biopharmaceutical against Acute Lymphoblastic Leukemia**. Recombinant Protein Production 10. **Anais...Creete**: 2019
- KLEINGESINDS, E. K. et al. **Downstream process of an L-asparaginase with human-like glycosylation pattern expressed by recombinant Pichia pastoris**, 2021.
- KNOTT, S. R. V. et al. Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer. **Nature**, v. 554, n. 7692, p. 378–381, 2018.
- KOBAYASHI, K. et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 55–61, Jan. 2000.
- KRAINER, F. W. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 22, 2012.
- KREYE, S. et al. A novel scale-down mimic of perfusion cell culture using sedimentation in an automated microbioreactor (SAM). **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 5, Set. 2019.
- KULLAS, A. L. et al. L-asparaginase II produced by salmonella typhimurium inhibits t cell responses and mediates virulence. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 6, p. 791–798, 2012.
- KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 2009.
- KWONG LAM FUNG, M.; CHI-FUNG CHAN, G. Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 10, n. 144, 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. august, p. 680–685, 1970.
- LANDUYT, L. VAN et al. Customized protein glycosilation to improve biopharmaceutical function and targeting. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 17–28, 2019.
- LARSON, R. **Patient education: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment in adults (Beyond the Basics)**. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/acute-lymphoblastic-leukemia-all-treatment-in-adults-beyond-the-basics>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- LEAL, A. **Governo normatiza produções estratégicas para o SUS**. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2014-11/governo-normatiza-producoes-estrategicas-para-o-sus>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- LEE, C. Y. et al. High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1147–1154, 2003.
- LEUKEMIA & LYMPHOMA SOCIETY. **Acute Lymphoblastic Leukemia**. Disponível em: <<http://www.lls.org/leukemia/acute-lymphoblastic-leukemia/treatment/chemotherapy>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- LIM, H. K. et al. Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamerin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 4, p. 342–348, 2003.
- LIMA, C. N. DE. **Escolha de tratamentos e blocagem otimizados na construção de fatoriais fracionários**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2009.
- LIMA, G. M. et al. Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, n. July 2019, 2020.
- LIU, C.-P. et al. Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic

- glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 4, p. 720–725, Jan. 2018.
- LIU, W.-C. et al. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 258–271, Fev. 2019.
- LOMELINO, C. L. et al. **Asparagine synthetase: Function, structure, and role in disease** *Journal of Biological Chemistry* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 8 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000070669-ASNS/tissue>>. Acesso em: 17 fev. 2021
- LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017.
- LORENZI, P. L. et al. Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for L-asparaginase activity in ovarian cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 11, p. 2613–2623, 2006.
- LOWRY, O. et al. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MACIOŁA, A. K. et al. The length of N-glycans of recombinant H5N1 hemagglutinin influences the oligomerization and immunogenicity of vaccine antigen. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. Apr., p. 444, Abr. 2017.
- MAGGI, M. et al. A protease-resistant *Escherichia coli* asparaginase with outstanding stability and enhanced anti-leukaemic activity in vitro. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14479, Dez. 2017.
- MAGRI, A. et al. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1–6, Ago. 2018.
- MATTHEWS, C. B. et al. Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 103–113, 2018.
- MAURER, M. et al. Versatile modeling and optimization of fed-batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 37, p. 1–10, 2006.
- MEGA, T. P. **Cenário pós-incorporação de medicamentos biológicos para artrite reumatoide disponibilizados pelo componente especializado da assistência farmacêutica no SUS**. [s.l.] Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esclarecimentos L-Asparaginase**, 2017. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cssf/arquivos-de-eventos/audiencia-publica-do-dia-10-e-11-05.17/apresentacao-ms>>. Acesso em: 07 ago. 2022.
- MINISTÉRIO PÚBLICO. **EXTRATO DE CONTRATO Nº 11/2017 - UASG 250005 Diário oficial da União- Seção 3 Issn 1677-7069**, 2017. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=3&pagina=87&data=26/01/2017&captchafield=firistAccess>>. Acesso em: 07 ago. 2022.
- MINITAB, I. **Minitab 17 Statistical Software**, 2010. Disponível em: <www.minitab.com>
- MINITAB INC. **Fundamentos de regressão stepwise**. Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/supporting-topics/basics/basics-of-stepwise-regression/>>. Acesso em: 29 ago. 2021.
- MOGUEL, I. S. et al. L-asparaginase Production by *Leucosporidium scottii* in a Bench-Scale Bioreactor With Co-production of Lipids. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, Dez. 2020.
- MORAIS, R. **Justiça federal proíbe compra e uso de Leuginase da China em toda a rede SUS**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/justica-federal-proibe-compra-de-leuginase-da-china.ghtml>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- MÜLLER, J. et al. Elucidation of auxotrophic deficiencies of *Bacillus pumilus* DSM 18097 to develop a defined minimal medium. **Microbial Cell Factories**, v. 17, p. 106, 2018.
- NADEEM, T. et al. Glycosylation of Recombinant Anticancer Therapeutics in Different Expression Systems with Emerging Technologies. **Cancer Research**, v. 78, n. 11, p. 2787–2798, Jun. 2018.
- NASCIMENTO, T. C. E. DA S. **Atividades biológicas de hidrolisados de caseinato caprino e bovino obtidos a partir de proteases produzidas por *Acremonium sp. L1-4b* e *geomyces pannorum s2b* isolados da Antártica**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência) - Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2017.
- NGUYEN, H. A. et al. A Novel L-Asparaginase with low L-Glutaminase Coactivity Is Highly Efficacious

- against Both T- and B-cell Acute Lymphoblastic Leukemias In Vivo. **Cancer Research**, v. 78, n. 6, p. 1549–1560, Mar. 2018.
- NGUYEN, T. C. et al. Expression, purification and evaluation of recombinant L-asparaginase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Vietnamese Environment**, v. 6, n. 3, p. 288–292, 2014.
- NIETO-TAYPE, M. A. et al. Continuous Cultivation as a Tool Toward the Rational Bioprocess Development With *Pichia Pastoris* Cell Factory. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 632, Jun. 2020.
- NOURA EL-AHMADY, E. N.; SARA, M. E. E.; NANCY, M. E. S. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 10, p. 182–199, 2014.
- NUCCI, M. L.; SHORR, R.; ABUCHOWSKI, A. The therapeutic value of poly (ethylene glycol) - modified proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 6, p. 133–151, 1991.
- OLZ, R. et al. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 8, p. 2205–2213, Abr. 1993.
- PAGLIA, E. **Vacinação contra a Covid: por que Brasil depende tanto de insumos vindos de fora.** Disponível em: <<https://g1.globo.com/fantastico/noticia/2021/01/31/vacinacao-contra-a-covid-por-que-brasil-depende-tanto-de-insumos-vindos-de-fora.ghtml>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- PEÑA, D. A. et al. Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic Engineering**, v.50, p 2-15, Nov. 2018.
- PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de Biomoléculas. In: VITOLO, M. et al. (Eds.). . **Biociencia Farmacêutica**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2015. p. 229–246.
- PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Appl Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 64–67, 1969.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, Jan. 2011.
- PILLACA-PULLO, O. et al. Recombinant l-asparaginase production using *Pichia pastoris* (MUTs strain): establishment of conditions for growth and induction phases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 283–292, 2021.
- PONTE, X.; MONTESINOS-SEGUI, J. L.; VALERO, F. Bioprocess efficiency in *Rhizopus oryzae* lipase production by *Pichia pastoris* under the control of PAOX1 is oxygen tension dependent. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1954–1963, 2016.
- POTGIETER, T. I. et al. Antibody expression kinetics in glycoengineered *Pichia Pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 6, p. 918–927, 2010.
- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.
- POTVIN, G.; LI, Z.; ZHANG, Z. Statistical Medium Optimization for the Increased Production of Recombinant Phytase in the Fed-Batch Cultivation of *Pichia pastoris*. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 13, n. 3, p. 427–435, 2015.
- PRONK, J. T. MINIREVIEWS - Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095–2100, 2002.
- PUI, C.-H.; ROBISON, L.; LOOK, T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, p. 1030–1043, 2008.
- PUI, C.; EVANS, W. E. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Semin Hematol.**, v. 50, n. 3, p. 185–196, 2013.
- RASOULI, M. Basic concepts and practical equations on osmolality: Biochemical approach. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 936–941, Ago. 2016.
- RATHORE, A. S.; BHAMBURE, R.; GHARE, V. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 137–154, 2010.
- RATHORE, A. S.; WINKLE, H. Quality by design for biopharmaceuticals. v. 27, n. 1, 2009.
- REN, H. T.; YUAN, J. Q.; BELLGARDT, K. H. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. **Journal of Biotechnology**, v. 106, n. 1, p. 53–68, 2003.
- RODRIGUES, D. et al. Fed-Batch Production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by Recombinant *Pichia pastoris* MUTs Strain. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 16, Fev. 2019.

- RODRIGUES, D. M. DA C. **L-asparaginase production by fed-batch fermentation with recombinant *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Engenharia Biológica, Técnico Lisboa, Lisboa, 2016.
- RODRIGUES, I. **Pacientes com câncer têm tratamento suspenso por falta de medicação no AC: “cada dose custa R\$ 7,7 mil”**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2019/04/19/pacientes-com-cancer-tem-tratamento-suspenso-por-falta-de-medicacao-no-ac-cada-dose-custa-r-77-mil.ghtml>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- RODRIGUES, M. A. D. et al. Influence of lysosomal protease sensitivity in the immunogenicity of the antitumor biopharmaceutical asparaginase. **Biochemical Pharmacology**, v. 182, p. 114230, Dez. 2020.
- ROMANOS, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 527–533, Jan. 1995.
- ROTH, G. et al. Fate of the UPR marker protein Kar2/Bip and autophagic processes in fed-batch cultures of secretory insulin precursor producing *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 123, 2018.
- SABA, C. et al. Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed canine lymphoma. **J Vet Intern Med**, v. 23, p. 1058–1063, 2009.
- SACCHAROMYCES GENOME DATABASE (SGD). **Saccharomyces cerevisiae Pathway: histidine biosynthesis**. Disponível em: <<https://pathway.yeastgenome.org/YEAST/new-image?type=PATHWAY&object=HISTSYN-PWY&detail-level=2>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- SAGONOWSKY, E. **The top 20 drugs by global sales in 2020**. Disponível em: <<https://www.fiercepharma.com/special-report/top-20-drugs-by-2020-sales>>. Acesso em: 14 jan. 2022.
- SAITUA, F. et al. Dynamic genome-scale metabolic modeling of the yeast *Pichia pastoris*. **BMC Systems Biology**, v. 11, n. 1, p. 27, 2017.
- SAJITHA, S. et al. Cloning and expression of l-asparaginase from *E. coli* in eukaryotic expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 14–17, 2015.
- SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 33, Dez. 2016.
- SANTOS, J. et al. In situ purification of periplasmatic L-asparaginase by aqueous two phase systems with ionic liquids (ILs) as adjuvants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 7, p. 1871–1880, Jul. 2018.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Heterologous expression and purification of active L-asparaginase I of *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* host. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 2, p. 416–424, Mar. 2017.
- SÃO PEDRO, M. N. et al. Minimizing the Influence of Fluorescent Tags on IgG Partition in PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems for Rapid Screening Applications. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, p. 1800640, Ago. 2019.
- SCHENK, J.; MARISON, I. W.; VON STOCKAR, U. A simple method to monitor and control methanol feeding of *Pichia pastoris* fermentations using mid-IR spectroscopy. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 2, p. 344–353, 2007.
- SCHERF, U. et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. **Nature genetics**, v. 24, n. 3, p. 236–44, 2000.
- SCHMIDELL, W. Agitação e Aeração em Biorreatores. In: **Biotecnologia Industrial: Volume 2 - Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 277–329.
- SCHMIDT, F. **Ministério da Saúde garante medicamento contra leucemia infantil**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/ministério-da-saúde-garante-medicamento-contr-leucemia-infantil>>. Acesso em: 8 jul. 2022.
- SCHUMPE, A. Gas Solubilities in Biomedica. In: REHN, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes**. [s.l.] H. Brauer, 1985. p. 159–170.
- SCHWARZHANS, J. P. et al. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2016.
- SERVIER PHARMACEUTICALS LLC. **Highlights Of Prescribing Information - Asparlas**, 2020. Disponível em: <www.fda.gov/medwatch>. Acesso em: 4 mar. 2021

- SHIROMIZU, S. et al. Optimizing the dosing schedule of L-asparaginase improves its anti-tumor activity in breast tumor-bearing mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 136, n. 4, p. 228–233, 2018.
- SHRIVASTAVA, A. et al. KINETIC STUDIES OF L-ASPARAGINASE FROM *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574–581, Nov. 2012.
- SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; FILHO, F. M. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5–6, p. 717–724, Abr. 2005.
- SINHA, J. et al. Improved Production of Recombinant Ovine Interferon- τ by Mut+ Strain of *Pichia pastoris* Using an Optimized Methanol Feed Profile. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 3, p. 794–802, Jun. 2003.
- SINHA, J. et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- τ ? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 102–112, Jan. 2005.
- SMITH, E. T. et al. Expression of recombinant human mast cell chymase with Asn-linked glycans in glycoengineered *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 102, p. 69–75, 2014.
- SOLOMON, B. et al. **Global incidence and prevalence of acute lymphoblastic leukemia: A 10-year forecast**. *Journal of Blood Disorders & Transfusion*. **Anais...**2017
- SOMASUNDARAM, B. et al. Progression of continuous downstream processing of monoclonal antibodies: Current trends and challenges. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 12, p. 2893–2907, Dez. 2018.
- SOUZA, C. M. C. DE. **Avaliação da qualidade de vida de sobreviventes de câncer na infância: uma proposta alternativa de coleta de dados**. 2014. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- SOYASLAN, E. Ş.; ÇALIK, P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris* in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 59–65, 2011.
- STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. Material Balances and Data Consistency. In: **Metabolic Engineering**. Elsevier, 1998, p. 115–146.
- STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M. High Cell-Density Fermentation. In: HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. (Eds.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, 1998. v. 103p. 107–120.
- SWAIN, A. L. et al. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy (amidohydrolase/leukemia/active site/aspartate). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 1474–1478, 1993.
- TAGUCHI, H.; HUMPHREY, A. E. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems. **J. Ferment. Technol.**, v. 44, p. 881–889, 1966.
- TARDITO, S. et al. The inhibition of glutamine synthetase sensitizes human sarcoma cells to L-asparaginase. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 60, n. 5, p. 751–758, Out. 2007.
- TOLSTRUP, A. **Economical Aspects of Animal Cell Technology Bioprocess**. Online Course. European Society of Animal Cell Technology, 2020.
- TONG, W. H. et al. Cost-analysis of treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia with asparaginase preparations: The impact of expensive chemotherapy. **Haematologica**, v. 98, n. 5, p. 753–759, 2013.
- TONSO, A.; BADINO JR, A.; SCHMIDELL, W. Tipos de biorreatores e formas de operação. In: ALTERHUM, F. et al. (Eds.). **Biotecnologia Industrial: Vol.2 Engenharia Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 109–126.
- TORRES-OBREQUE, K. et al. Production of a novel N-terminal PEGylated crisantaspase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 281–289, 2019.
- TRENTMANN, O.; KHATRI, N. K.; HOFFMANN, F. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1766–1775, 2004.
- TRINH, L. B.; PHUE, J. N.; SHILOACH, J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 438–444, 2003.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins:

- Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. December, 2019.
- U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **Solubility of oxygen in water at various temperatures and pressures - Table 6.2-6**. Disponível em: <https://water.usgs.gov/owq/FieldManual/Chapter6/table6.2_6.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- ULTEE, M. **Developing Biosimilars and Biobetters**. Disponível em: <<https://www.pda.org/docs/default-source/website-document-library/chapters/presentations/metro/strategies-for-developing-biosimilars-and-biobetters.pdf?sfvrsn=6>>. Acesso em 07 ago. 2022.
- UNREAN, P. Pathway analysis of *Pichia pastoris* to elucidate methanol metabolism and its regulation for production of recombinant proteins. **Biotechnology Progress**, v. 30, n. 1, p. 28–37, 2014.
- VALERO, F. Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System. **Protein Engineering - Technology and Application**, p. 3–32, 2013.
- VALOR. **MPF pede que ministério recolha medicamento chinês contra câncer**. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/brasil/5031014/mpf-pede-que-ministerio-recolha-medicamento-chines-contracancer>>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168–178, Fev. 2011.
- VANZ, A. et al. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 103, Dez. 2012a.
- VANZ, A. et al. Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 103, Dez. 2012b.
- VANZ, A. L.; NIMTZ, M.; RINAS, U. Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.
- VERMA, N. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.
- VERMA, S. et al. Improvement of stability and enzymatic activity by site-directed mutagenesis of *E. coli* asparaginase II. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 7, p. 1219–1230, Jul. 2014.
- VERVECKEN, W. et al. Modification of the N-glycosylation pathway to produce homogeneous, human-like glycans using GlycoSwitch plasmids. **Methods Mol Biol**, v. 389, p. 119–138, 2007.
- VIMAL, A.; KUMAR, A. L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 0, 2018.
- VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, Maio 2013.
- VOGL, T.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1094–1101, dez. 2013.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, Dez. 2018.
- WANG, J. et al. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 41850, Mar. 2017.
- WANG, L.; LOMINO, J. Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins. **ACS Chem Biol**, v. 7, p. 110–122, 2012.
- WANG, N. S.; STEPHANOPOULOS, G. Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement errors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 9, p. 2177–2208, 1983.
- WECHSELBERGER, P.; SAGMEISTER, P.; HERWIG, C. Real-time estimation of biomass and specific growth rate in physiologically variable recombinant fed-batch processes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 9, p. 1205–1218, 2013.
- WECHSELBERGER, P.; SEIFERT, A.; HERWIG, C. PAT method to gather bioprocess parameters in real-time using simple input variables and first principle relationships. **Chemical Engineering Science**,

- v. 65, n. 21, p. 5734–5746, 2010.
- WEI-SHOU HU. Continuous Cell Culture Processes. In: **Cell Culture - Bioprocess Engineering**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2020. p. 328–348.
- WEI, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 307–312, Mar. 2003.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 11 abr. 2021.
- XIE, J. et al. Efficiencies of Growth and Angiostatin Expression in Cultures of *Pichia pastoris* Fed with Mixed Carbon Sources. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 27, n. 2, p. 235–244, 2013.
- YANG, Z.; ZHANG, Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 182–195, Jan. 2018.
- ZHANG, J. et al. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. **Molecular Cell**, v. 56, n. 2, p. 205–218, 2014.
- ZHANG, J. et al. Optimization of defined medium for recombinant *Komagataella phaffii* expressing cyclodextrin glycosyltransferase. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 5, Set. 2019.
- ZHANG, J.; PAVLOVA, N. N.; THOMPSON, C. B. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. **The EMBO Journal**, v. 36, p. 1302–1315, 2017.
- ZHONG, Y. et al. High-temperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 163, Dez. 2014.
- ZHU, W. et al. Medium optimization for high yield production of human serum albumin in *Pichia pastoris* and its efficient purification. **Protein Expression and Purification**, v. 181, n. January, p. 105831, 2021.
- ZILJLSTRA, G. **Continuous and Intensified Bioprocessing: A Practical Guide**. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=T3QWMqvkvhU&t=894s>>. Acesso em: 30 jul. 2022.

**APÊNDICE A. MÉTODOS ANALÍTICOS
USADOS NOS CAPÍTULOS 2 E 3**

Apêndice A: Métodos Analíticos

A.1 Curva de calibração de massa seca pela densidade óptica para espectrômetro

Spectra Max[®] - Laboratório USP

Gráfico Apêndice A. 1. Curva de Calibração da Densidade Óptica (DO_{600}) lida a $\lambda=600\text{nm}$ pela Concentração de Biomassa (X , $g_{\text{biomassa seca}}/L$) pela Absorbância com linearidade de até 25g/L obtida por filtração em membrana seguida de secagem em triplicata experimental.

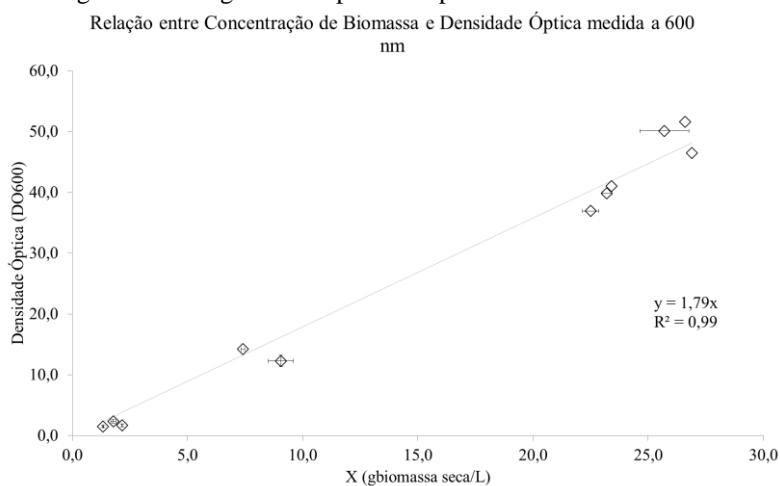


Tabela Apêndice A. 1 Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de biomassa medida (X) e estimada (X_{DO}) pela relação do gráfico anterior. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	$X(g/L)$	$X_{DO}(g/L)$
Média	10,1	8,5
Variância	65,3	66,2
Observações	12	12
Variância agrupada	65,8	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	22	
Stat t	0,48	
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,32	
t crítico uni-caudal	1,72	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	0,64	
t crítico bi-caudal	2,07	

A.2. Curvas de calibração de massa seca pela densidade óptica para espectrômetro

Biochrom Libra S50® - Laboratório TCI

Gráfico Apêndice A. 2. Curva de Calibração da Densidade Óptica (DO_{600}) lida a $\lambda=600$ nm pela Concentração de Biomassa (X , g_{biomassa seca}/L) pela Absorbância com linearidade de até 20 g/L em meio complexo BMGY obtida por secagem em estufa em duplicata experimental.

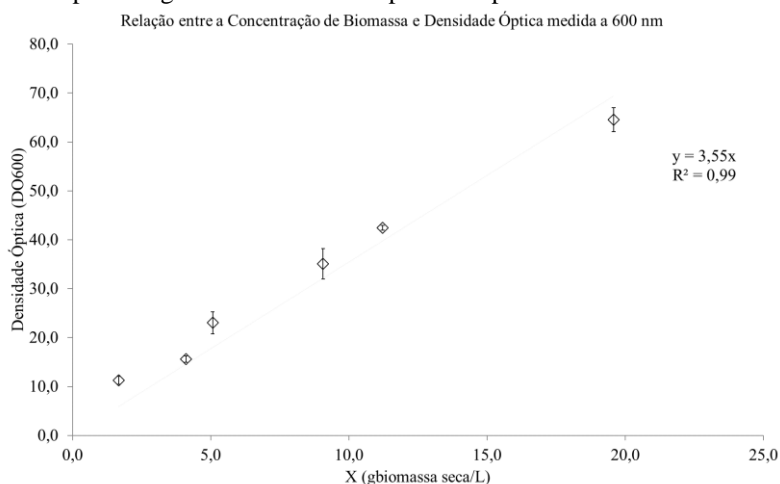


Tabela Apêndice A. 2. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de biomassa medida (X) e estimada (X_{DO}) pela relação do gráfico anterior. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	X (g/L)	X_{DO} (g/L)
Média	8,45	8,92
Variância	41,67	30,43
Observações	6,00	6,00
Variância agrupada	36,05	
Hipótese da diferença de média	0,00	
gl	10,00	
Stat t	-0,13	
P(T<=t) uni-caudal	0,45	
t crítico uni-caudal	1,81	
P(T<=t) bi-caudal	0,90	
t crítico bi-caudal	2,23	

Gráfico Apêndice A. 3. Curva de Calibração da Densidade Óptica (DO_{600}) lida a $\lambda=600$ nm pela Concentração de Biomassa (X , $g_{\text{biomassa seca}}/L$) pela Absorbância com linearidade até 10 g/L em meio sintético obtida por secagem em estufa em duplicata experimental.

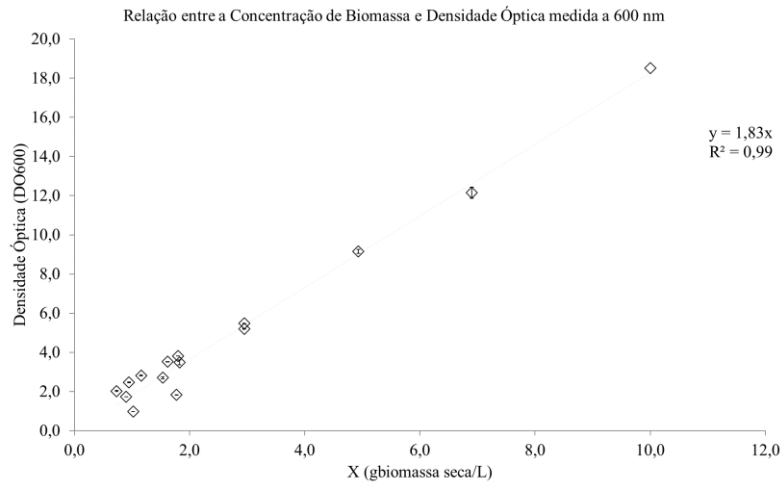


Tabela Apêndice A. 3. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de biomassa medida (X) e estimada (X_{DO}) pela relação do gráfico anterior. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	X (g/L)	X_{DO} (g/L)
Média	11,20	8,97
Variância	28,69	19,99
Observações	3,00	3,00
Variância agrupada	24,34	
Hipótese da diferença de média	0,00	
gl	4,00	
Stat t	0,55	
P(T<=t) uni-caudal	0,30	
t crítico uni-caudal	2,13	
P(T<=t) bi-caudal	0,61	
t crítico bi-caudal	2,78	

Gráfico Apêndice A. 4. Curva de Calibração da Densidade Óptica (DO_{600}) lida a $\lambda=600$ nm pela Concentração de Biomassa (X , g_{biomassa seca}/L) pela Absorbância com linearidade entre 10g/L e 15 g/L em meio sintético obtida por secagem em estufa em duplicata experimental.

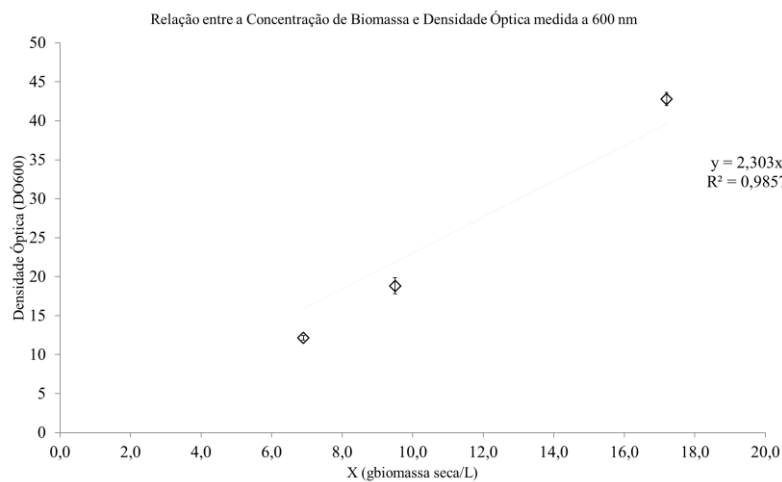


Tabela Apêndice A. 4. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de biomassa medida (X) e estimada (X_{DO}) pela relação do gráfico anterior. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	X (g/L)	X_{DO} (g/L)
Média	27,59	26,65
Variância	85,55	107,25
Observações	10,00	10,00
Variância agrupada	96,40	
Hipótese da diferença de média	0,00	
gl	18,00	
Stat t	0,22	
P(T<=t) uni-caudal	0,42	
t crítico uni-caudal	1,73	
P(T<=t) bi-caudal	0,83	
t crítico bi-caudal	2,10	

Gráfico Apêndice A. 5. Curva de Calibração da Densidade Óptica (DO_{600}) lida a $\lambda=600$ nm pela Concentração de Biomassa (X , g_{biomassa seca}/L) pela Absorbância com linearidade entre 15g/L e 40 g/L em meio sintético obtida por secagem em estufa em duplicata experimental.

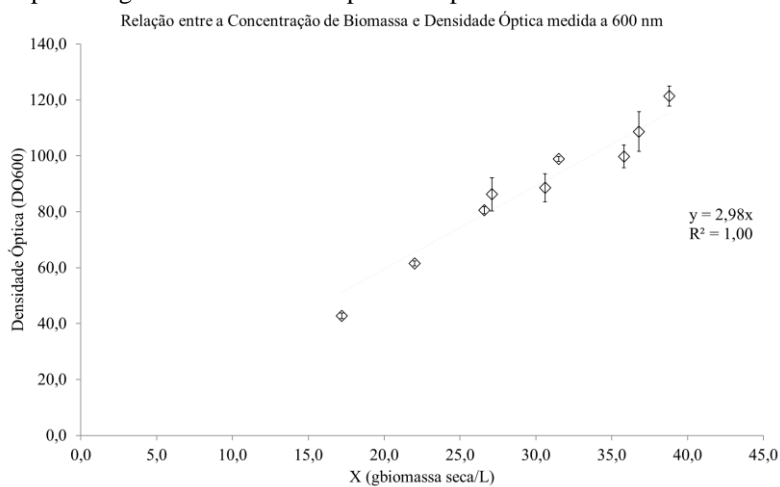


Tabela Apêndice A. 5. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de biomassa medida (X) e estimada (X_{DO}) pela relação do gráfico anterior. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	X (g/L)	X_{DO} (g/L)
Média	27,59	26,65
Variância	85,55	107,25
Observações	10,00	10,00
Variância agrupada	96,40	
Hipótese da diferença de média	0,00	
gl	18,00	
Stat t	0,22	
P(T<=t) uni-caudal	0,42	
t crítico uni-caudal	1,73	
P(T<=t) bi-caudal	0,83	
t crítico bi-caudal	2,10	

A.3 Protocolo de Medida de ASNase de amostra pelo método do L-aspartil- β -Hidroxâmico (AHA) adaptado de Drainas, Kinghorn e Pateman (1977)

Autora	Letícia de Almeida Parizotto
Supervisor	Aldo Tonso
Descrição	Método para determinação da atividade de L-asparaginase pela quantificação do β -hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminólise em microplaca. A curva de calibração é realizada com solução de β -hidroxamato aspártico e é apresentada no arquivo 20200714_1224_Curva de calibração de hidroxamato aspártico para método AHA - microplaca
Referência Bibliográfica	Drainas, C., Kinghorn, J. R., & Pateman, J. A. (1977). Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus <i>Aspergillus nidulans</i> . <i>Journal of General Microbiology</i> , 98, 493–501. https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-98-2-493Y . Frohwein, M., Friedman, J., Reizer, N., Grossowicz, Sensitive and rapid assay for L-asparaginase, <i>Nat. New Biol.</i> 230 (1971) 158–159. http://www.nature.com/nature-newbio/journal/v230/n13/abs/newbio230158a0.html Grossowicz, E., Wainfan, E., Borek, H., Waelsch, The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine., <i>J. Biol. Chem.</i> 187 (1950) 111–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14794696 .

Preparação das soluções

Solução Tris-HCl 20 mM	Pesar 1,21 g de Tris-HCl e dissolver em água destilada. Ajustar o pH para 8,6 com HCl (1M) e completar o volume para 500 mL. Armazenar em geladeira após filtrá-lo com membrana de 0,22 μ m.
Solução 0,1 M de asparagina	Pesar 0,66 g em 50 mL de água destilada. Essa solução pode ser armazenada em alíquotas congeladas para evitar precipitação
Solução de hidroxilamina (1M)	<i>Solução A:</i> Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina (2 M). Pesar 6,94 gramas e dissolver em 50 mL de água destilada. Esta solução deve ser armazenada a 5° C. <i>Cuidado:</i> essa solução é tóxica! <i>Solução B:</i> Solução estoque de hidróxido de sódio (2 M). Pesar 8 g e dissolver em 100 mL de água destilada. <i>Solução 1M de hidroxilamina.</i> Misturar a solução A com solução B na proporção 1:1. A mistura final tem um pH de 6,4 a 7,0. Esta solução de hidroxilamina neutralizada é instável, portanto, deve-se prepará-la (neutralizá-la) no momento do uso e mantê-la em geladeira por até uma semana. <i>Reagente altamente corrosivo. Usar luvas!</i>
Solução de Cloreto Férrico / TCA / HCl	<i>Solução C.</i> Pesar 10g de Cloreto férrico e dissolver em 100 mL de água destilada. <i>Solução D.</i> Preparar 100 mL de uma solução de HCl na concentração de 0,66 M (2,4 mL em 100 mL). Nesta solução adicionar 5,0 g de TCA. Mistura a solução C e D e guardar em frasco escuro na geladeira a 5° C.

Construção da curva padrão.

Solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM. Pesar 7,4 mg do padrão e completar para 10 mL de água ultrapura usando balão volumétrico a concentração desta solução e 5mM (Tabela Apêndice A.5). Construir a curva padrão como é descrito a seguir na Tabela Apêndice A.6.

Tabela Apêndice A. 6. Cálculo de concentração de β -hidroxamato aspártico utilizado para a construção das curvas padrão.

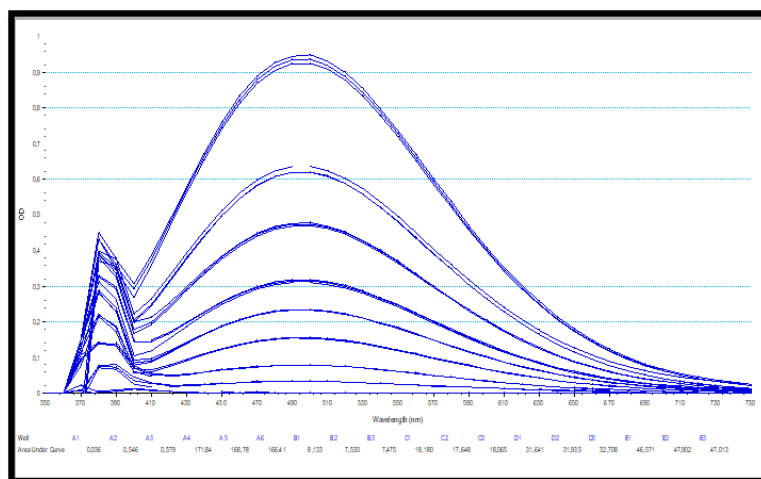
β- HIDROXAMATO ASPÁRTICO	
Gramas pesadas (g)	0,0074
massa molecular(g/mol)	148,12
Moles	0,00005
μ mol	50,0
Concentração (mM) em 10 mL	5

Tabela Apêndice A. 7. Preparação das soluções padrão para o método de β -hidroxamato aspártico.

Solução padrão	Moles AHA (μmol)	β-hidroxamato aspártico 5 mM (μL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mM) (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0,0	0	1,000	0,25
Padrão 1	0,1	20	0,980	0,25
Padrão 2	0,25	50	0,950	0,25
Padrão 3	0,50	100	0,900	0,25
Padrão 4	0,75	150	0,850	0,25
Padrão 5	1,0	200	0,800	0,25
Padrão 6	1,5	300	0,700	0,25
Padrão 7	2,0	400	0,600	0,25
Padrão 8	3,0	600	0,400	0,25

Espectro UV do β -hidroxamato aspártico.

Gráfico Apêndice A. 6. Espectro UV- Vis (350 -750 nm) do β -hidroxamato aspártico. Curva construídas pelos doutores Tales Costa e Ignácio Moguel.

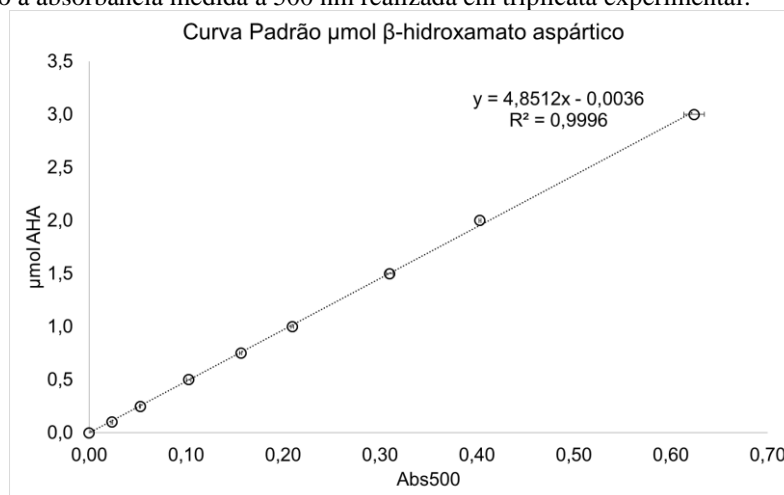


Pode-se observar através da varredura UV-visível que o β -hidroxamato aspártico no Gráfico Apêndice A.5, apresenta absorbância máxima aos 500 nm, e é neste comprimento de onda que se trabalhou para a construção da curva padrão.

Tabela Apêndice A. 8. Curva padrão empregada para a quantificação da atividade de ASNase pelo método de AHA construída com triplicata experimental.

Solução padrão	μmols	A1	$\bar{x}_{A1} - \bar{x}_{branco}$	A2	$\bar{x}_{A2} - \bar{x}_{branco}$	A3	$\bar{x}_{A3} - \bar{x}_{branco}$	$\bar{x}_{média} (A1,A2)$
Branco	0	0,046	-0,001	0,047	0,001			0,000
1	0,1	0,069	0,023	0,070	0,024	0,070	0,024	0,023
2	0,25	0,098	0,052	0,099	0,053			0,053
3	0,5	0,150	0,104	0,146	0,100	0,150	0,104	0,103
4	0,75	0,203	0,157	0,203	0,157	0,202	0,155	0,156
5	1	0,256	0,210	0,255	0,208	0,257	0,211	0,210
6	1,5	0,355	0,309	0,360	0,314	0,354	0,307	0,310
7	2	0,449	0,403	0,451	0,405	0,448	0,402	0,403
8	3	0,660	0,613	0,681	0,635	0,671	0,625	0,624

Gráfico Apêndice A. 7. Curva padrão em μmols de β -hidroxamato aspártico pH 8,6, tampão Tris-HCl 20 mM, em relação à absorbância medida a 500 nm realizada em triplicata experimental.



Procedimento de quantificação de ASNase pelo método de AHA.

Reação Enzimática	
Amostra	Branco
0,75 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)	0,75 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)
0,1 mL L-asparagina (100 mM)	0,1 mL L-asparagina (100 mM)
0,1 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)	0,1 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)
0,050 mL da amostra (enzima ou extrato bruto)	↓
↓	Incubar 37° C por t minutos
Incubar 37° C por t minutos	↓
↓	Adicionar 0,25 mL de solução de cloreto férico/TCA/HCl
Adicionar 0,25 mL de solução de cloreto férico/TCA/HCl	↓
↓	0,050 mL da amostra (enzima ou extrato bruto)
Vórtex por 10s	↓
↓	Vórtex por 10s
Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos	↓
↓	Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos
Ler a 500 nm a alíquota de 0,20 mL em microplaca	↓
	Ler a 500 nm a alíquota de 0,20 mL em microplaca

A reação entre o hidroxamato aspártico produzido e o FeCl_3 produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm. Uma unidade de ASNase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol β -hidroxâmico aspártico por minuto (U). O tempo de reação deve ser determinado pelo procedimento abaixo.

Cálculos.

Cálculo de μmol de β -hidroxamato aspártico a partir da curva padrão.

Primeiro, descontar o valor da absorbância do branco.

$$\text{Absreal} = \text{Absamostra} - \text{Absbranco} \quad \text{A.3. 1}$$

$$\mu\text{mol } \beta - \text{hidroxamato aspártico} = 4,8512 \text{ Absreal} - 0,0036 \quad \text{A.3. 2}$$

Cálculo de U/mL de ASNase.

	Fatores
μmol β -hidroxamato aspártico produzidos	$4,8512 \text{ Absreal} - 0,0036$
Volume da amostra	0,05 mL
Tempo da reação	t

$$\frac{U}{mL} \text{ de ASNase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume de amostra})(\text{tempo da reação})} \right] \quad \text{A.3. 3}$$

$$\frac{U}{mL} \text{ de ASNase} = \left[\frac{4,8512 \text{ Absreal} - 0,0036}{(0,05 \text{ mL})(t \text{ min})} \right] \quad \text{A.3. 4}$$

OBS1: Sempre levar em conta as diluições feitas com anterioridade se for o caso. Caso o valor de absorbância ultrapasse o valor do ponto máximo da curva de calibração obtida, deve-se repetir a análise de atividade enzimática diluindo a amostra inicial. Não diluir somente para a leitura no espectrofotômetro.

OBS2: Caso haja formação de bolhas na microplaca, centrifugar a microplaca por 5 minutos a 3220 x g antes da leitura ou usar ar quente com cuidado para não derreter a microplaca.

OBS3: Não aumentar o volume de enzima utilizado.

Como calcular o número de unidades de ASNase por mg de proteínas totais.

$$U/mg = \frac{U/mL \text{ de Asparaginase}}{mg/mL \text{ proteínas totais}} \quad \text{A.3. 5}$$

Como determinar o tempo de reação.

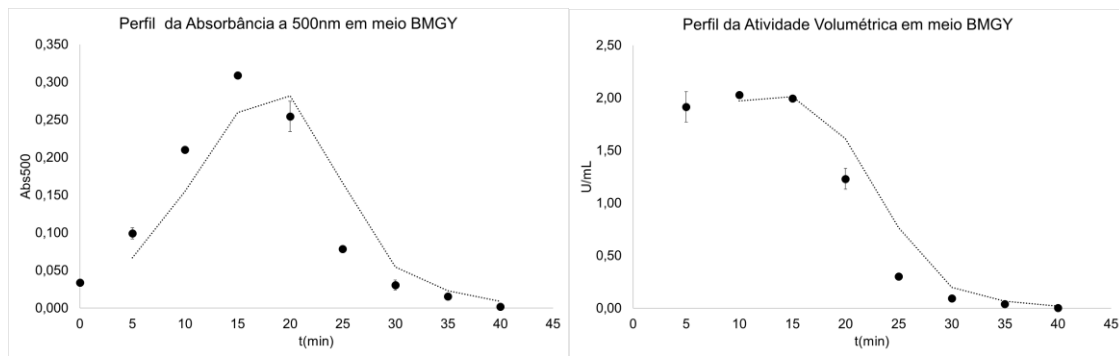
Importante: Os tempos devem variar para cada tipo de L-asparaginase e meio em que ela se encontra, por isso esse procedimento deve ser realizado para cada caso.

Misturar componentes da reação enzimática de acordo com o procedimento padrão e incubar as amostras a 37 °C de 0 a 40 minutos, retirando a cada 5 minutos. Fazer amostras em duplicata e um branco para cada tempo.

Calcular a atividade volumétrica de acordo com as equações A.3.3 e A.3.4 e plotar ao longo do tempo. Escolha o menor tempo em que a atividade volumétrica é constante.

Ex: Determinação de atividade de Erwinase produzida por *Pichia pastoris* no meio de cultura BMGY (1% m/v extrato de levedura, 2% m/v peptona, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% m/v YNB, 4x10⁻⁵% m/v biotina, 1% v/v glicerol e água até volume final de 1L). O tempo escolhido para a reação foi de 10 minutos.

Gráfico Apêndice A. 8. Método de determinação do tempo de reação enzimática, escolher um tempo na faixa de aumento linear da absorbância (esquerda) e que tenha atividade volumétrica constante (direita).



Materiais Utilizados

Reagente	Marca	Lote
Asparagina	Inlab	836541
Cloridrato de Hidroxilamina	Merck	A0905116543
Hidróxido de Sódio	Dinâmica	71266
Tris- Aminometano	Synth	187912
Ácido Clorídrico	Synth	118244
Cloreto Férrico	Merck	B1059843508
TCA	Synth	187912
Padrão β – hidroxamato aspártico		

A.4 Curva de calibração de proteínas totais pela absorvância pelo método BCA

Gráfico Apêndice A. 9. Curva de Calibração da Concentração de Proteínas Totais ($\mu\text{g/mL}$) pela Absorvância lida a λ 562 nm com linearidade até 1000 $\mu\text{g/mL}$ obtida por triplicata experimental pelo método BCA, Sigma, lote SHBH4613V

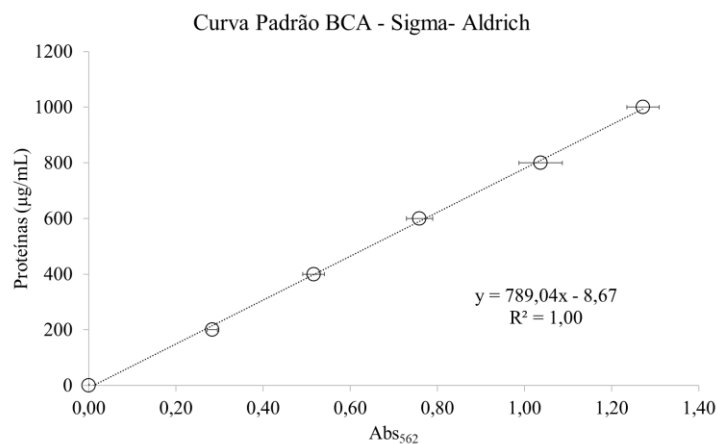


Tabela Apêndice A. 9. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de proteínas medida (P_{rot}) e estimada (P_{rotest}) pela relação da Figura B3.1. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	P_{rot} ($\mu\text{g/mL}$)	P_{rotest} ($\mu\text{g/mL}$)
Média	0,73	0,50
Variância	0,22	0,14
Observações	6	6
Variância agrupada	0,18	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	0,92	
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,19	
t crítico uni-caudal	1,81	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	0,38	
t crítico bi-caudal	2,23	

Gráfico Apêndice A. 10. Curva de Calibração da Concentração de Proteínas Totais ($\mu\text{g/mL}$) pela Absorbância lida a λ 562 nm com linearidade até 2000 $\mu\text{g/mL}$ obtida por triplicata experimental pelo método Pierce® BCA Protein Assay kit, ThermoFisher, lote PI209533.

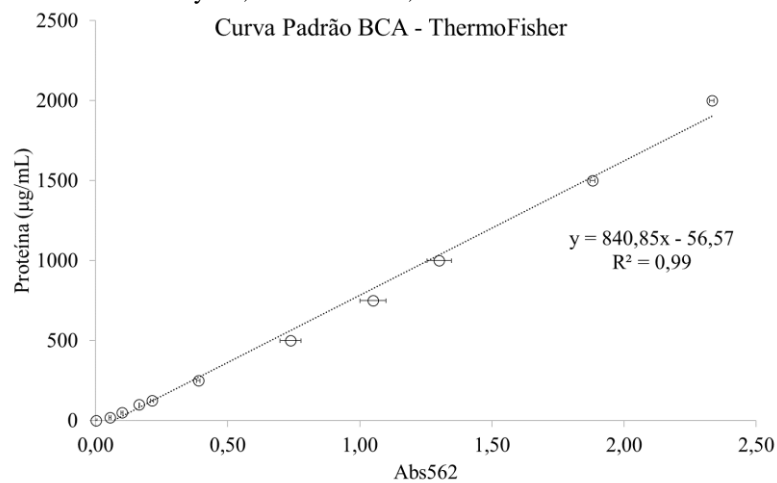


Tabela Apêndice A. 10. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de proteínas medida (P_{rot}) e estimada (P_{rotest}) pela relação da Figura B3.2. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	P_{rot} ($\mu\text{g/mL}$)	P_{rotest} ($\mu\text{g/mL}$)
Média	572,3	572,7
Variância	455106,8	453539,6
Observações	11,0	11,0
Variância agrupada	454323,2	
Hipótese da diferença de média	0,0	
gl	20,0	
Stat t	0,0	
$P(T \leq t)$ uni-caudal	0,5	
t crítico uni-caudal	1,7	
$P(T \leq t)$ bi-caudal	1,0	
t crítico bi-caudal	2,1	

A.5 Curva de calibração de glicerol pela absorvância pelo kit Triglicérides Liquiform (Labtest)

Gráfico Apêndice A. 11. Curva de calibração da Concentração de Glicerol (g/L) pela Absorvância lida a λ 505 nm dada pelo *kit* Liquiform (Labtest) com linearidade até 2,5 g/L de glicerol obtida por triplicata experimental. Lote 1909.

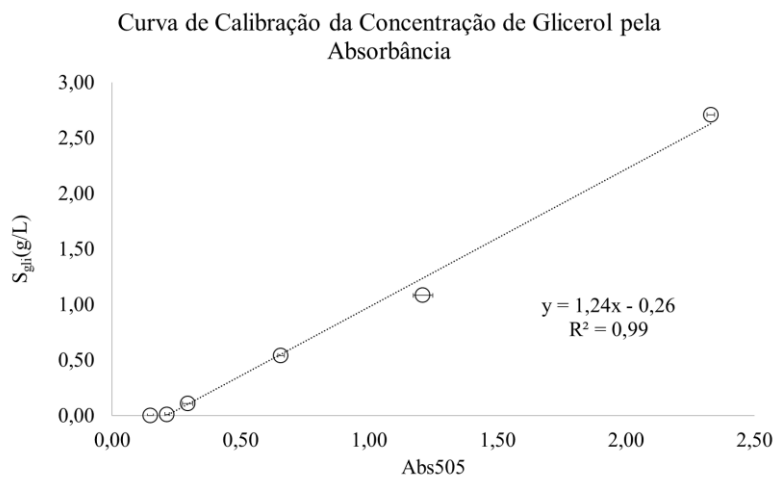


Tabela Apêndice A. 11. Teste t presumindo variâncias equivalentes entre a concentração de glicerol medido (S_{gli}) e estimada (S_{gliest}) pela relação da Figura B4.1. O valor de t abaixo de t-crítico indica que a hipótese nula de diferença entre as amostras foi aceita, ou seja, os valores são estatisticamente iguais.

	S_{gli} (g _{gli} /L)	S_{gliest} (g _{gli} /L)
Média	0,74	0,73
Variância	1,10	1,07
Observações	6	6
Variância agrupada	1,09	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	0,01	
P(T<=t) uni-caudal	0,49	
t crítico uni-caudal	1,81	
P(T<=t) bi-caudal	0,99	
t crítico bi-caudal	2,23	

A.6 Cálculo da Constante de Henry para Meios de Cultura

Segundo Schumpe (1985), a constante de Henry para uma determinada solução pode ser obtida subtraindo da constante de Henry para água (H_{H_2O}) o produto dos coeficientes do soluto (c_i) tabelados pelo autor pela concentração molar (C_{Mi}) como mostram as equações A.6. 1e A.6. 2.

$$H_{meio} = H_{H_2O} - \sum H_i \quad \text{A.6. 1}$$

$$H_i = c_i \times C_{Mi} \quad \text{A.6. 2}$$

Os valores da constante de Henry para a água em diferentes temperaturas segundo o U.S. Geological Survey (2007) são apresentados na Tabela Apêndice A. 12, os coeficientes tabelados por Schumpe estão na Tabela Apêndice A. 13, os valores de H_i para o meio BSM está na Tabela Apêndice A. 14 e para o meio de Gurramkonda et al. (2010) na Tabela Apêndice A. 15, e os valores finais de H e C_s para cada meio e condição são apresentados na Tabela Apêndice A. 16.

Tabela Apêndice A. 12. Constante de Henry para a água de acordo com o U.S. Geological Survey (2007) em diferentes temperaturas.

Condições	H_{H_2O} (mgO ₂ /L/atm)
25°C - 760 mmHg	39,52
30°C - 760 mmHg	36,17
35°C - 760 mmHg	33,25

Tabela Apêndice A. 13. Coeficientes para os compostos de acordo com Schumpe (1985) em diferentes temperaturas.

Íon ou composto	c_i (O ₂), 25°C (L/mol)	c_i (O ₂), 30°C (L/mol)	c_i (O ₂), 37°C (L/mol)
H ⁺	-0,776	-0,787	-0,803
K ⁺	-0,587	-0,583	-0,578
NH ₄ ⁺	-0,704	-0,694	-0,681
Mg ²⁺	-0,297	-0,307	-0,321
Ca ²⁺	-0,309	-0,312	-0,316
Mn ²⁺	-0,324	-0,324	-0,325
Cl ⁻	0,849	0,854	0,861
OH ⁻	0,943	0,932	0,917
PO ₄ ³⁻	0,398	0,398	
SO ₄ ²⁻	0,955	0,947	0,935
GLICEROL	4,74E-04	4,46E-04	4,07E-04

Tabela Apêndice A. 14. Valores de H_i ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$) para o meio BSM calculado de acordo com a equação B6.2, em que os coeficientes para cada soluto são dados pela soma do produto do número de partículas dissociadas (n) pelos coeficientes para cada espécie dados pela Tabela B6.2

Reagente	Volume (L)	Massa (g)	Molaridade estoque (mol/L)	Densidade (g/L)	MM (g/mol)	C_{Mi} (mol/L)	Reação	Coefficientes (L/mol) $\sum n x c_i$	H_i ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$)
H3PO4	0,023			1680	98	0,389	$\text{H}_3\text{PO}_4 = 3\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-}$	-1,96	-0,76
K2SO4	0,209		0,5			0,105	$\text{K}_2\text{SO}_4 = 2\text{K}^+ + \text{SO}_4^{2-}$	-0,22	-0,02
KOH		4,13			56,10	0,074	$\text{KOH} = \text{K}^+ + \text{OH}^-$	0,35	0,03
CaCl2.2H2O	0,007		1			0,007	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ca}^{2+} + 2\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	1,40	0,01
GLICEROL	0,040	50,45		1261,3	92,07	0,548	GLICEROL	0,00	0,02
MGSO4.7H2O	0,060		1			0,0605	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + 7\text{H}_2\text{O}$	0,64	0,04
NH4OH	0,012			910	35,04	0,325	$\text{NH}_4\text{OH} = \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	0,24	0,08
SOMA									-0,61

* Apenas para exemplificar, o coeficiente de H3PO4 é dado por $3 \cdot (0,787) + 1 \cdot (0,398) = -1,96 \text{ L/mol}$ e $H_i = -1,96 \cdot 0,389 = -0,76 \text{ mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$

Tabela Apêndice A. 15. Valores de H_i ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$) para o meio TCI calculado de acordo com a equação B6.2, em que os coeficientes para cada soluto são dados pela soma do produto do número de partículas dissociadas (n) pelos coeficientes para cada espécie dados pela Tabela B6.2

Reagente	Volume (L)	Massa (g)	Molaridade estoque (mol/L)	Densidade (g/L)	MM (g/mol)	C_{Mi} (mol/L)	Reação	Coefficientes (L/mol) $\sum n x c_i$	H_i ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$)
KH2PO4		9,4			136,09	0,069	$\text{KH}_2\text{PO}_4 = \text{K}^+ + 2\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-}$	-1,76	-0,12
(NH4)2SO4		15,7			132,14	0,119	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 2\text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{2-}$	-0,44	-0,05
CaCl2.2H2O	0,002		1		147,01	0,002	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ca}^{2+} + 2\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	1,40	0,00
GLICEROL	0,04	50,4		1261,3	92,08	0,548	GLICEROL	0,00	0,02
MGSO4.7H2O	0,04		1		246,47	0,038	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = \text{Mg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} + 7\text{H}_2\text{O}$	0,64	0,02
NH4OH	0,012			910	35,04	0,325	$\text{NH}_4\text{OH} = \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	0,24	0,08
SOMA									-0,05

Tabela Apêndice A. 16. Constante de Henry para os meios de acordo com o U.S. Geological Survey (2007) em diferentes temperaturas.

Condições	H_i ($\text{mgO}_2/\text{L}/\text{atm}$)	C_s (mgO_2/L)
30°C - 760 mmHg – Meio BSM	36,78	7,11
25°C - 760 mmHg – Meio Gurrakonda et al. (2010)	39,57	8,27
30°C - 760 mmHg – Meio Gurrakonda et al. (2010)	36,22	7,57
35°C - 760 mmHg – Meio Gurrakonda et al. (2010)	33,30	6,96

A.7 Osmolaridade dos Meios Definidos

A osmolaridade de cada meio definido foi calculada de acordo com a Equação A.7.1 (RASOULI, 2016). Na Tabela Apêndice A. 17 estão os valores referentes ao meio BSM e na Tabela Apêndice A. 18 ao meio de Gurramkonda et al., 2010.

$$\text{Osmolaridade de solução} = \sum \frac{c(\text{g/L}) \times n \text{ partículas}}{\text{Massa Molecular (g/mol)}} \text{ (Osmol/L)} \quad \text{A.7.1}$$

Tabela Apêndice A. 17. Valores de osmolaridade (Osmol/L) para o meio BSM calculado de acordo com a equação B7.1, em que a osmolaridade para cada soluto é dada pelo produto do número de partículas dissociadas (n) pela concentração molar C_{Mi} cada espécie.

Reagente	Volume (L)	Massa (g)	Molaridade estoque (mol/L)	Densidade (g/L)	MM (g/mol)	C_{Mi} (mol/L)	Reação	n Número de Partículas Dissociadas	Osmolaridade Osmol/L
H3PO4	0,02			1680	98	0,39	H3PO4 = 3H+ + PO4-3	4	1,56
K2SO4	0,21		0,5			0,10	K2SO4 = 2K+ + SO4-2	3	0,31
KOH		4,1			56,11	0,07	KOH = K+ + OH-	2	0,15
CACL2.2H2O	0,01		1			0,01	CACL2.2H2O = CA2+ + 2CL- + 2H2O	3	0,02
GLICEROL	0,04	50,5		1261	92,08	0,55	GLICEROL	1	0,55
MGSO4.7H2O	0,06		1			0,06	MGSO4.7H2O = MG2+ + SO4-2 + 7H2O	2	0,12
NH4OH	0,01			910	35,04	0,32	NH4OH = NH4+ + OH-	2	0,65
SOMA									3,36

* Apenas para exemplificar, a osmolaridade de H3PO4 é dada por (3+1)*(0,39) = 1,56 Osmol/L

Tabela Apêndice A. 18. Valores de osmolaridade (Osmol/L) para o meio TCI calculado de acordo com a equação B7.1, em que a osmolaridade para cada soluto é dada pelo produto do número de partículas dissociadas (n) pela concentração molar C_{Mi} cada espécie.

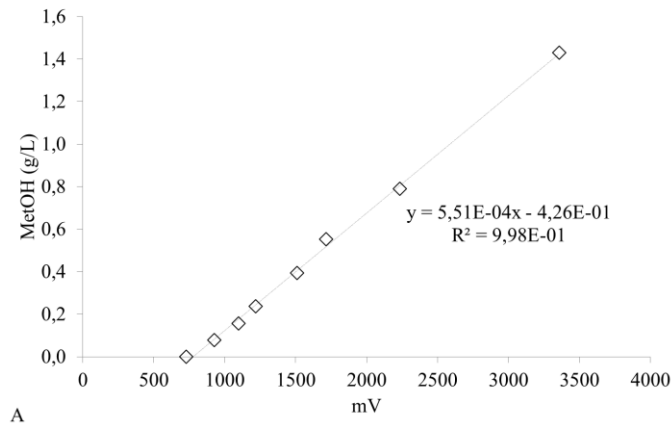
Reagente	Volume (L)	Massa (g)	Molaridade estoque (mol/L)	Densidade (g/L)	MM (g/mol)	C_{Mi} (mol/L)	Reação	n Número de Partículas Dissociadas	Osmolaridade Osmol/L
KH2PO4		9,4			136,09	0,069	KH2PO4 = K+ + 2H+ + PO4-3	4	0,28
(NH4)2SO4		15,7			132,14	0,119	(NH4)2SO4 = 2 NH4+ + SO4-2	3	0,36
CACL2.2H2O	0,002		1		147,01	0,002	CACL2.2H2O = CA2+ + 2CL- + 2H2O	3	0,01
GLICEROL	0,04	50,4		1261,3	92,08	0,548	GLICEROL	1	0,55
MGSO4.7H2O	0,04		1		246,47	0,038	MGSO4.7H2O = MG2+ + SO4-2 + 7H2O	2	0,08
NH4OH	0,012			910	35,04	0,325	NH4OH = NH4+ + OH-	2	0,65
SOMA									1,91

Portanto, a osmolaridade do meio BSM é de 3,36 Osmol/L e a TCI é de 1,91 Osmol/L.

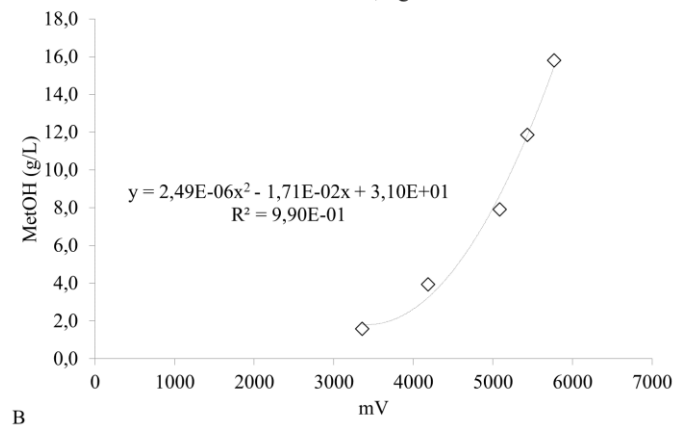
A.8. Calibração do sensor de metanol da Raven Biotech

Gráfico Apêndice A. 12. Curvas de calibração da Concentração de Metanol (g/L) pela Voltagem (mV) lida pelo sensor de metanol da Raven Biotech: A) com linearidade até 1,3 g/L de metanol e B) com regressão polinomial acima de 1,6 até 15 g/L à direita, ambas obtidas por duplicata experimental.

Relação entre Concentração de Metanol e milivoltagem
- até 1,3 g/L



Relação entre Concentração de Metanol e milivoltagem
- acima de 1,6 g/L



APÊNDICE B. FUNÇÃO DE EVAPORAÇÃO

Apêndice B: Função de Evaporação

B.1 Função de Evaporação – Cultivos no Biorreator Biostat B

Para determinar a taxa de evaporação de água e de metanol no biorreator BIOSTAT B de 2-L foram realizados dois experimentos. No primeiro para determinar a evaporação da água, a dorna foi alimentada com 1 L de água e foi mantida com aeração de 1 vvm, agitação de 800 rpm e temperatura 35 °C controlado. Após 24 horas, o volume de água foi medido novamente e calculou-se a taxa de evaporação de água de acordo com a equação B.1.1.

$$evap_{H_2O} = \frac{V_{inicial} - V_{final}}{\Delta t} = 1,9 \text{ mL/h} \quad \text{B.1.1}$$

Para determinar a taxa de evaporação de metanol, foi realizado um experimento com volume inicial de 1 L de água, demais condições iguais ao experimento anterior e adição de metanol com alimentação linear. Foram coletadas amostras ao longo do tempo e medidas em HPLC, os dados experimentais são apresentados no

Gráfico Apêndice B. 1. A. O volume final foi medido e por meio de balanço de volume, equação B.1. 2, foi determinada uma taxa de evaporação dependente da concentração real de metanol que resultasse no volume final medido usando a função “Atingir Meta” no Excel (Microsoft), de acordo com a equação B.1. 3.

$$V_i = V_{i-1} - (evap_{H_2O} + evap_{MET}) \times (t_i - t_{i-1}) + V_{MET,ALIMENTADO} \quad \text{B.1. 2}$$

$$evap_{METOH} = K \times \ln(S_{MET,HPLC}) \quad \text{B.1. 3}$$

Para cálculo do volume alimentado de metanol ($V_{MET,ALIMENTADO}$, mL) foi usada uma balança para medir a massa ao longo do experimento e a função de alimentação pelo tempo foi obtida por duas regressões lineares apresentadas no

Gráfico Apêndice B. 1. B. A partir dos dados de HPLC, também foi possível estabelecer duas regressões lineares que representassem a concentração real de metanol no meio que são mostradas no

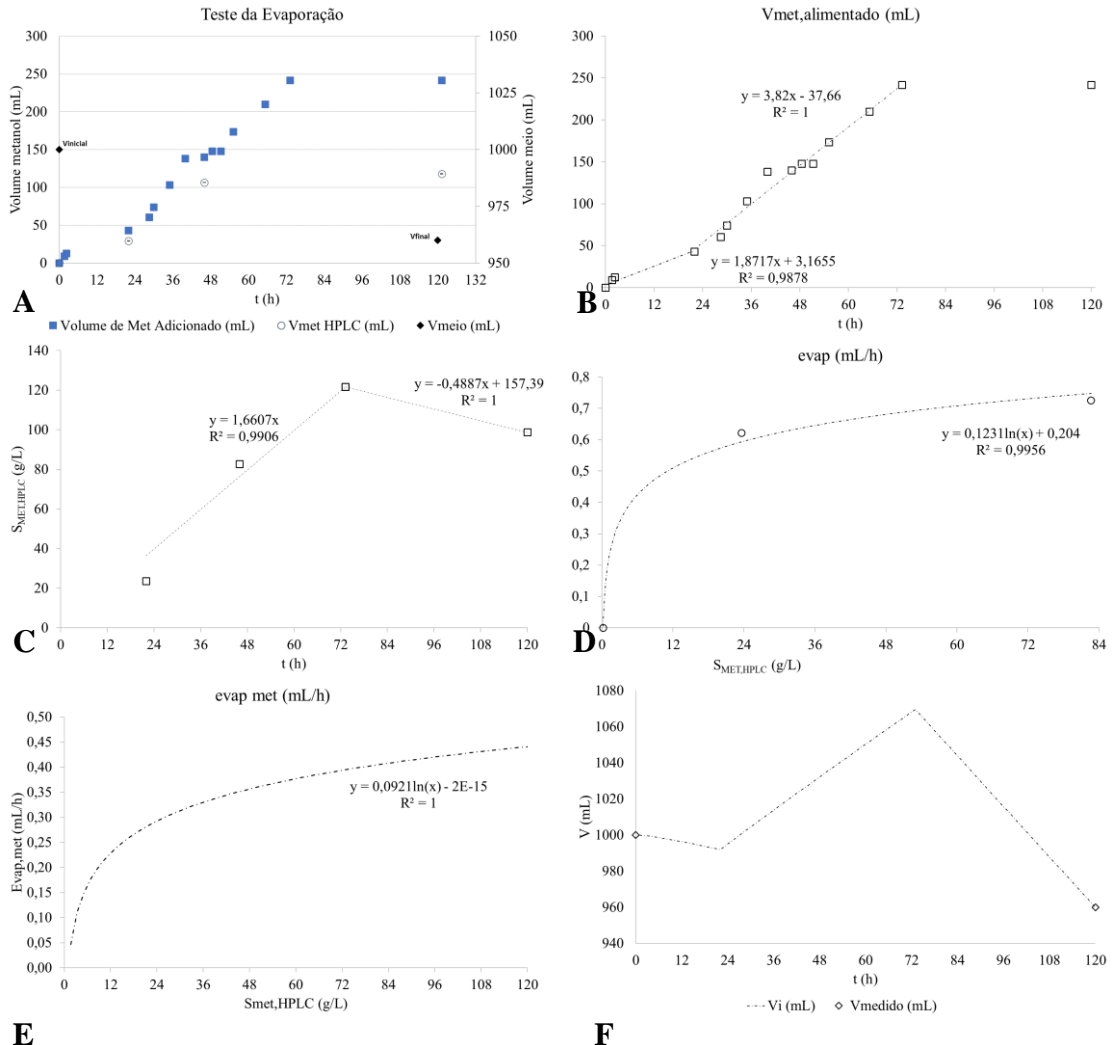
Gráfico Apêndice B. 1.C. Ademais, com as concentrações medidas em HPLC foi possível calcular taxas de evaporação pontuais e analisando essas taxas em comparação à concentração real de metanol,

Gráfico Apêndice B. 1.D, foi observada uma tendência logarítmica, por isso foi adotado que a taxa de evaporação seria proporcional ao logaritmo natural da concentração. Dessa forma, foi obtido um valor de K de 0,09 mL/h, a função está no

Gráfico Apêndice B. 1.E, e o volume final obtido por balanço ficou igual ao medido, o perfil teórico do volume total é apresentado no

Gráfico Apêndice B. 1.F. Portanto, essa função de evaporação foi considerada para os experimentos nesse biorreator e como uma referência para os demais cultivos em outros reatores.

Gráfico Apêndice B. 1. Dados experimentais para determinar a evaporação de metanol: volume adicionado de metanol, volume medido por HPLC presente no meio e volumes totais do meio medidos no início e no fim do experimento (A); função de alimentação de metanol obtida por regressões lineares (B); função de concentração real de metanol (HPLC) obtida por regressões lineares (C); perfil da taxa de evaporação pela concentração real (D); novo perfil da taxa de evaporação pela concentração real usando a função “Atingir Meta” (E); perfil dos volumes teóricos e valores medidos do meio ao longo do experimento (F).



B.2 Função de Evaporação – Cultivos no Biorreator do TCI

Para determinar a taxa de evaporação de água no biorreator projetado no TCI, a dorna foi alimentada com 1 L de água e foi controlada com aeração de 1 vvm, agitação de 800 rpm e 30°C. Após 24 horas, o volume de água foi medido novamente e calculou-se a taxa de evaporação de água de acordo com a equação B.2. 1.

$$evap_{H_2O} = \frac{V_{inicial} - V_{final}}{\Delta t} = 2,1 \text{ mL/h} \quad \text{B.2. 1}$$

Para determinar a taxa de evaporação de metanol, foi feito um cálculo teórico para cada condição com base nos volumes finais medidos em que foi inserido um fator de correção do volume (v) específico para cada cultivo. Assim sendo, primeiramente foi calculado o volume a cada instante de tempo considerando o balanço de massa (V_{BMt}), ou seja, subtraindo da soma das entradas (soluções de controle de pH e de substrato) a soma das saídas (amostragem e evaporação de água) conhecidas (Equação B.2. 2) e, a partir do início da alimentação do metanol, foi calculado um volume corrigido em cada instante de tempo (V'_t) (Equação B.2. 3) e usando a função “solver” do Microsoft Excel para calcular o v tal que o volume calculado pelo balanço de massa (V_{BM}) final seja idêntico ao real medido (V_{real}), Equação B.2. 4. Finalmente, a taxa de evaporação média teórica (r_{evap}) foi obtida pela Equação B.2. 5.

$$V_{BMt} = V_{BM_{t-1}} - evap_{H_2O} \times (t_i - t_{i-1}) + V_S + V_{BASE} + V_{ÁCIDO} - V_{AMOSTRA} \quad \text{B.2. 2}$$

$$V'_t = V_{BMt} - \sum_{i=t \text{ início alimentação}}^{i=t} vxt_i \quad \text{B.2. 3}$$

$$\sum_{i=t \text{ início alimentação}}^{t \text{ final}} vxt_i = V_{BMfinal} - V_{realfinal} \quad \text{B.2. 4}$$

$$r_{evap} = \frac{V_{BMfinal} - V_{realfinal}}{t_{final} - t_{início \text{ alimentação}}} \quad \text{B.2. 5}$$

Os valores encontrados para a r_{evap} são apresentados na Tabela Apêndice B. 1.

Tabela Apêndice B. 1. Valores reais do volume medido ao fim do experimento ($V_{realfinal}$, mL), fator de correção de volume (v , mL/h) e estimativa de uma taxa de evaporação (r_{evap} , mL/h) necessária para que o volume calculado pelo balanço de massa seja igual ao real.

Exp. / Ref	$V_{realfinal}$ (mL)	v (mL/h)	r_{evap} (mL/h)
14A_MetOH0,8g/L_pO ₂ 5%_25°C	700	5x10 ⁻³	1,9
14B_MetOH5g/L_pO ₂ 5%_25°C	990	3x10 ⁻⁴	0,1
14C_MetOH0,8g/L_pO ₂ 50%_25°C	850	4x10 ⁻³	2,0
14D_MetOH5g/L_pO ₂ 50%_35°C	1200	2x10 ⁻³	0,7
14E_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	850	4x10 ⁻⁴	1,6
14F_MetOH2g/L_pO ₂ 27,5%_30°C	850	3x10 ⁻⁴	1,3
Média ponto central			1,4±0,2

Ao contrário do esperado, a maior temperatura e a maior concentração de metanol não resultaram na maior taxa de evaporação, portanto não é correto afirmar que essa correção seja apenas devido à taxa de evaporação. Mas, esses valores corrigidos de volume foram adotados como ponto de partida para cálculo das massas dos componentes do sistema (biomassa, substratos, produtos, etc).

APÊNDICE C. ALGORITMOS MATLAB

Apêndice C: Algoritmos Matlab

C.1 Algoritmo da Função de Suavização

```

%%%%%%%%%%
% Algoritmo para suavização dos dados do balanço gasoso%
% Autoria: Letícia Parizotto %
%%%%%%%%%%
clc

clc
%carregam dados medidos e dados modificados manualmente
load BGdata
%carregam valores para cada variável
tBG = BGdata(:,1);
CER = BGdata(:,2);
OUR = BGdata(:,3);

smoothCER = fastsmooth(CER,50,3,1);
smoothOUR = fastsmooth(OUR,50,3,1);
figure(1)
subplot(1,2,1),plot(tBG,CER,'ks'),hold on, plot(tBG, OUR,'k*'), legend ('CPR (gCO2/L/h)', 'OUR
(gO2/L/h)');
subplot(1,2,2),plot(tBG, smoothCER,'b--'),hold on, plot(tBG, smoothOUR,'r--'),legend('smoothCER
(mgCO2/L/h)', 'smoothOUR (mgO2/L/h)');

```

A função `fastsmooth` é de autoria de Thomas C. O'Haver (2012).

```

function SmoothY=fastsmooth(Y,w,type,ends)
% fastsmooth(Y,w,type,ends) smooths vector Y with smooth
% of width w. Version 3.0, October 2016.
% The argument "type" determines the smooth type:
% If type=1, rectangular (sliding-average or boxcar)
% If type=2, triangular (2 passes of sliding-average)
% If type=3, pseudo-Gaussian (3 passes of sliding-average)
% If type=4, pseudo-Gaussian (4 passes of same sliding-average)
% If type=5, multiple-width (4 passes of different sliding-average)
% The argument "ends" controls how the "ends" of the signal
% (the first w/2 points and the last w/2 points) are handled.
% If ends=0, the ends are zero. (In this mode the elapsed
% time is independent of the smooth width). The fastest.
% If ends=1, the ends are smoothed with progressively
% smaller smooths the closer to the end. (In this mode the
% elapsed time increases with increasing smooth widths).
% fastsmooth(Y,w,type) smooths with ends=0.
% fastsmooth(Y,w) smooths with type=1 and ends=0.
% Examples:
% fastsmooth([1 1 1 10 10 10 1 1 1 1],3)= [0 1 4 7 10 7 4 1 1 0]%
% fastsmooth([1 1 1 10 10 10 1 1 1 1],3,1,1)= [1 1 4 7 10 7 4 1 1 1]%
% x=1:100;
% y=randn(size(x));
% plot(x,y,x,fastsmooth(y,5,3,1),'r')
% xlabel('Blue: white noise. Red: smoothed white noise.')
%
% Copyright (c) 2012, Thomas C. O'Haver
%
% Permission is hereby granted, free of charge, to any person obtaining a copy
% of this software and associated documentation files (the "Software"), to deal
% in the Software without restriction, including without limitation the rights
% to use, copy, modify, merge, publish, distribute, sublicense, and/or sell

```

```

% copies of the Software, and to permit persons to whom the Software is
% furnished to do so, subject to the following conditions:%
% The above copyright notice and this permission notice shall be included in all copies or substantial
portions of the Software.%
% THE SOFTWARE IS PROVIDED "AS IS", WITHOUT WARRANTY OF ANY KIND, EXPRESS
OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE WARRANTIES OF
MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE AND NONINFRINGEMENT. IN
NO EVENT SHALL THE AUTHORS OR COPYRIGHT HOLDERS BE LIABLE FOR ANY CLAIM,
DAMAGES OR OTHER LIABILITY, WHETHER IN AN ACTION OF CONTRACT, TORT OR
OTHERWISE, ARISING FROM, OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE SOFTWARE OR THE
USE OR OTHER DEALINGS IN THE SOFTWARE.
if nargin==2, ends=0; type=1; end
if nargin==3, ends=0; end
switch type
case 1
    SmoothY=sa(Y,w,ends);
case 2
    SmoothY=sa(sa(Y,w,ends),w,ends);
case 3
    SmoothY=sa(sa(sa(Y,w,ends),w,ends),w,ends);
case 4
    SmoothY=sa(sa(sa(sa(Y,w,ends),w,ends),w,ends),w,ends);
case 5
    SmoothY=sa(sa(sa(sa(Y,round(1.6*w),ends),round(1.4*w),ends),round(1.2*w),ends),w,ends);
end
function SmoothY=sa(Y,smoothwidth,ends)
w=round(smoothwidth);
SumPoints=sum(Y(1:w));
s=zeros(size(Y));
halfw=round(w/2);
L=length(Y);
for k=1:L-w,
    s(k+halfw-1)=SumPoints;
    SumPoints=SumPoints-Y(k);
    SumPoints=SumPoints+Y(k+w);
end
s(k+halfw)=sum(Y(L-w+1:L));
SmoothY=s./w;
% Taper the ends of the signal if ends=1.
if ends==1,
    startpoint=(smoothwidth + 1)/2;
    SmoothY(1)=(Y(1)+Y(2))./2;
    for k=2:startpoint,
        SmoothY(k)=mean(Y(1:(2*k-1)));
        SmoothY(L-k+1)=mean(Y(L-2*k+2:L));
    end
    SmoothY(L)=(Y(L)+Y(L-1))./2;
end
end

```

C.2 Algoritmo para a Detecção de Erros Grosseiros nas Medidas

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Algoritmo para a detecção de erros grosseiros nas medidas      %
% obtidas experimentalmente nos cultivos de Pichia pastoris      %
% de acordo com Wang & Stephanopoulos (1983)                    %
% Autoria: Letícia Parizotto                                     %

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
clc
clear all

% Matriz reduzida do balanço elemental de CHNO considerando a composição
% da Pichia dada por Carnicer et al (2009) e consumo de glicerol
Aglicerol = [-1 0 1 1; -0.67 4 0.07 -4];

% Matriz reduzida do balanço elemental de CHNO considerando a composição
% da Pichia dada por Carnicer et al (2009) e consumo de metanol
Ametoh = [-1 0 1 1; -2 4 0.07 -4];

% Vetor com os coeficientes de conversão de substrato, oxigênio, biomassa,
% e gás carbônico a biomassa na base molar
vetorY = [96.5 144 1.00 94.88];
x= vetorY';

% Escolha do balanço em glicerol ou metanol
A = Ametoh;

% Matriz que representa as equações estequiométricas para cada elemento
e = -A*x;

% Desvios padrões médios dos métodos de medida
erroS = 0.1;
erroX = 0.05;
erroO2 = 0.03;
erroCO2 = 0.03;

% Matriz variância-covariância
qui = [(x(1,1)*erroS)^2 0 0 0;
0 (x(2,1)*erroO2)^2 0 0;
0 0 (x(3,1)*erroX)^2 0;
0 0 0 (x(4,1)*erroCO2)^2];

fi = A*qui*A';
fiinv = inv(fi);

% Função dos resíduos das medidas, esse valor é comparado com o valor de
% Qui-quadrado com n graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%
% n é o rank da matriz A, nesse caso, n é 2
% Qui-quadrado (2, 90%) = 4,61
h = e'*fiinv*e;

if h <= 4.61
    fprintf('Não há erros nas medidas');
    h
else

% Escolha qual parâmetro deseja testar se há erros de medidas

O2=1;
CO2=2;
X=3;
S=4;

erro =4;
% O erro está no oxigênio
if erro==1;

```

```
%Ac matriz com os coeficientes referentes ao parâmetro que será recalculado
%Au matriz com os coeficientes referentes aos demais compostos
```

```
Acgli = [0;4];
Augli = [-1 1 1; -0.67 0.07 -4];
```

```
Acmet = [0;4];
Aumet= [-1 1 1; -2 0.07 -4];
```

```
Ac = Acmet;
Au = Aumet;
```

```
Aut=Au';
Act = Ac';
```

```
%Recalcula o vetor de coeficientes de conversão
```

```
xu(1,1) = x(1,1);
xu(2,1)=x(3,1);
xu(3,1)=x(4,1);
```

```
%Matriz variância-covariância
```

```
gamau = [(xu(1,1)*erroS)^2 0 0; 0 erroX^2 0; 0 0 (xu(3,1)*erroCO2)^2];
```

```
escalar = Act *fiinv*Ac;
invescalar = 1/ escalar;
I = eye(2);
fiuinv = fiinv *(I - Ac*invescalar*Act*fiinv);
```

```
%Recalcula o vetor de resíduos
```

```
hnovo = e'*fiuinv*e;
```

```
% Recalcula os resíduos
```

```
vetorerro = gamau*Aut*fiuinv*e;
```

```
%Recalcula os coeficientes de conversão
```

```
xureal = xu+vetorerro;
```

```
%Recalcula os parâmetros cinéticos
```

```
YSXnovo = xureal(1,1);
YXXnovo = xureal(2,1);
YCO2Xnovo = xureal(3,1);
if Au == Augli;
    YO2Xreal = (0.67*YSXnovo - 0.07*YXXnovo + 4*YCO2Xnovo)/4;
else
    YO2Xreal = (2*YSXnovo - 0.07*YXXnovo + 4*YCO2Xnovo)/4;
end
```

```
%% erro está em Co2
```

```
elseif erro==2;
```

```
Acgli = [1;-4];
Augli = [-1 0 1; -0.67 4 0.07];
Acmet = [1;-4];
Aumet = [-1 0 1; -2 4 0.07];
```

```
Ac = Acmet;
Au = Aumet;
```

```
Aut=Au';
```

```

Act = Ac';

xu(1,1) = x(1,1);
xu(2,1)=x(2,1);
xu(3,1)=x(3,1);

gamau = [(xu(1,1)*erroS)^2 0 0; 0 (xu(2,1)*erroO2)^2 0; 0 0 (xu(3,1)*erroX)^2];
escalar = Act *fiinv*Ac;
invescalar = 1/ escalar;
I = eye(2);

fiuinv = fiinv *(I - Ac*invescalar*Act*fiuinv);
hnovo = e'*fiuinv*e;
vetorerro = gamau*Aut*fiuinv*e;
xureal = xu+vetorerro;
YSXnovo = xureal(1,1);
YO2Xnov = xureal(2,1);
YXXnovo = xureal(3,1);
if Au == Augli;
    YCO2Xreal = YSXnovo - YXXnovo;
else
    YCO2Xreal = YSXnovo - YXXnovo;
end
% o erro está em X
elseif erro==3;
    Acgli = [1;0.06];
    Augli = [-1 0 1; -0.67 4 -4];
    Acmet = [1;0.08];
    Aumet = [-1 0 1; -2 4 -4];
    Ac = Acmet;
    Au = Aumet;
    Aut=Aut';
    Act = Ac';
    xu(1,1) = x(1,1);
    xu(2,1)=x(2,1);
    xu(3,1)=x(4,1);
    gamau = [(xu(1,1)*erroS)^2 0 0; 0 (xu(2,1)*erroO2)^2 0; 0 0 (xu(3,1)*erroCO2)^2];
    escalar = Act *fiinv*Ac;
    invescalar = 1/ escalar;
    I = eye(2);
    fiuinv = fiinv *(I - Ac*invescalar*Act*fiuinv);
    hnovo = e'*fiuinv*e;
    vetorerro = gamau*Aut*fiuinv*e;
    xureal = xu+vetorerro;
    YSXnovo = xureal(1,1);
    YO2Xnovo = xureal(2,1);
    YCO2Xnovo = xureal(3,1);
    if Au == Augli;
        YXXreal = YSXnovo - YCO2Xnovo;
    else
        YXXreal = YSXnovo - YCO2Xnovo;
    end
%erro em S
else
    Acgli = [-3;-2];
    Augli = [0 1 1; 4 0.07 -4];
    Acmet = [-1;-2];
    Aumet = [0 1 1; 4 0.07 -4];
    Ac = Acmet;
    Au = Aumet;

```

```

Aut=Au';
Act = Ac';
xu(1,1) = x(2,1);
xu(2,1)=x(3,1);
xu(3,1)=x(4,1);
gamau = [(xu(1,1)*erroO2)^2 0 0; 0 (xu(2,1)*erroX)^2 0; 0 0 (xu(3,1)*erroCO2)^2];
escalar = Act *fiinv*Ac;
invescalar = 1/ escalar;
I = eye(2);
fiinv = fiinv *(I - Ac*invescalar*Act*fiinv);
hnovo = e'*fiinv*e;
vetorerro = gamau*Aut*fiinv*e;
xureal = xu+vetorerro;
YO2Xnovo = xureal(1,1);
YXXnovo = xureal(2,1);
YCO2Xnovo = xureal(3,1);
if Au == Augli;
    YSXreal = (YXXnovo + YCO2Xnovo);
else
    YSXreal = YXXnovo + YCO2Xnovo;
end

    end

% Salva qual parâmetro foi recalculado
resposta(1,1)=h;
resposta(1,2) = hnovo;
if erro==1;
resposta (1,3) = YO2Xreal;
elseif erro==2;
resposta (1,3) = YCO2Xreal;
elseif erro==3;
    resposta (1,3) = YXXreal;
else
    resposta (1,3) = YSXreal;
end
resposta
% Avalia o vetor de resíduos novo em relação ao Qui-quadrado (n-1, 90%)
if hnovo <=2.71
    fprintf('Não há mais erros nas medidas');
else
    fprintf('Ainda há erros nas medidas');
end

end

%Se ainda há erros nas medidas, o novo coeficiente de conversão deve ser
% inserido no vetorY e uma nova análise deve ser conduzida

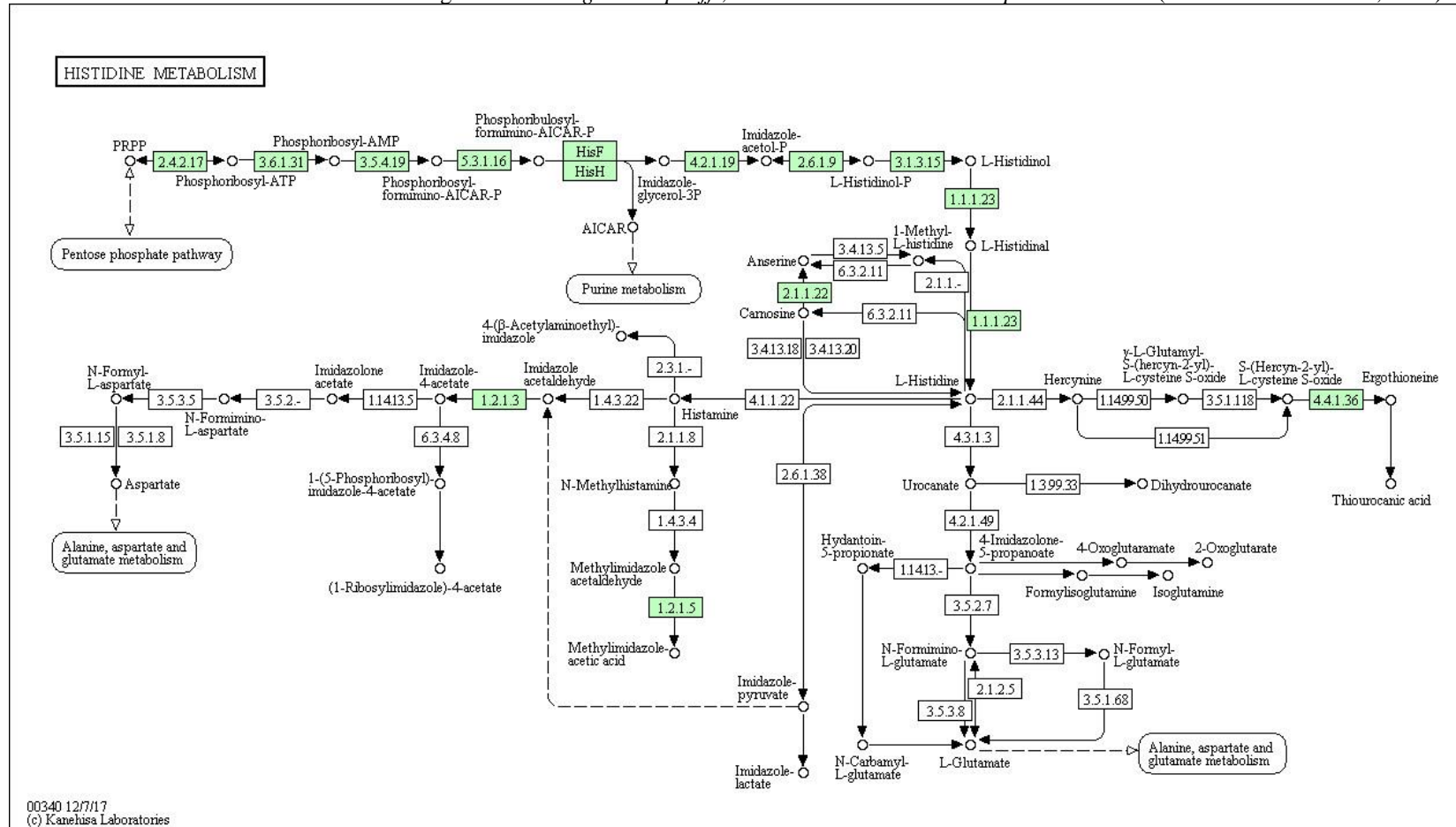
```


ANEXOS

Anexo A: Fluxos Metabólicos com Participação da Histidina

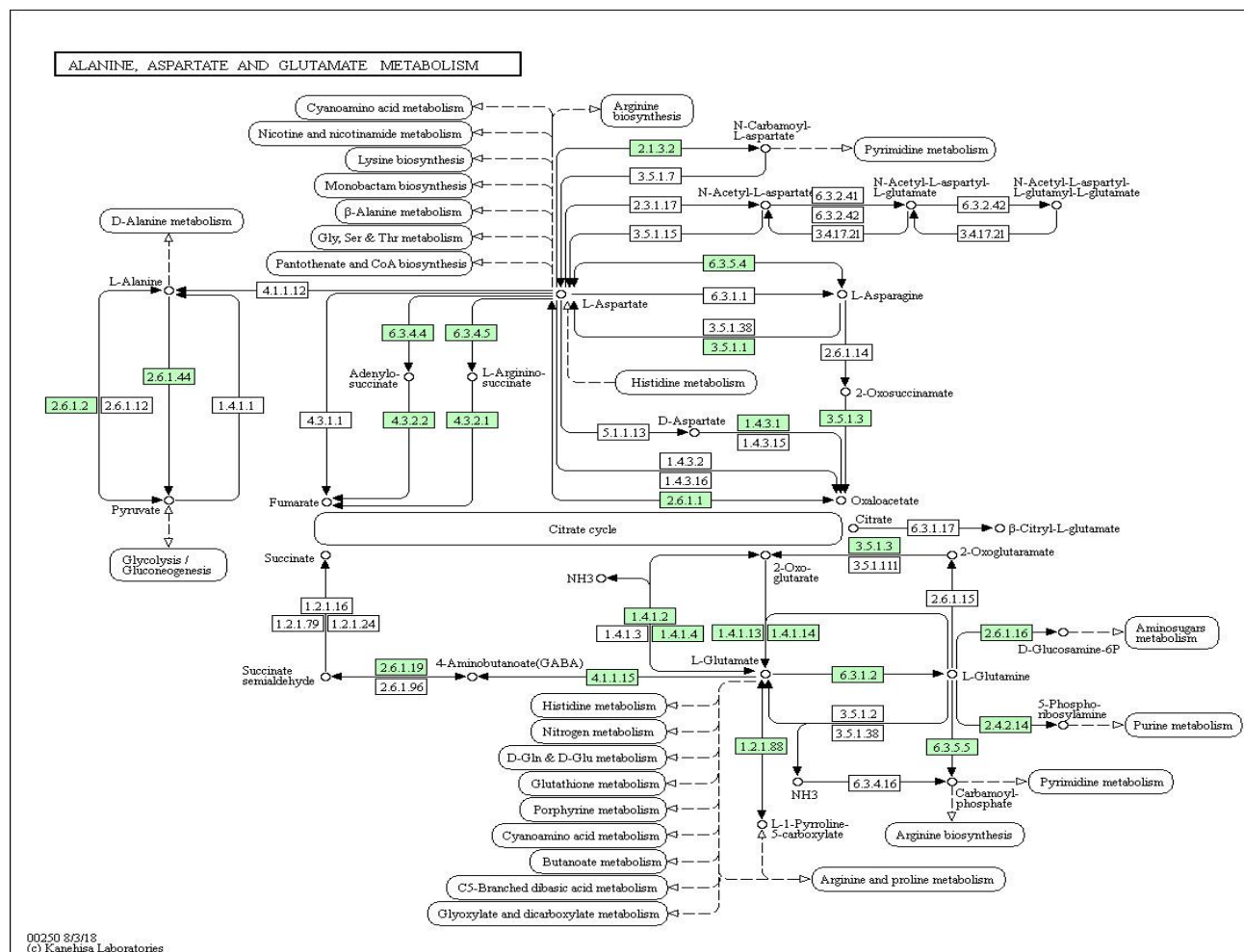
As vias metabólicas foram retiradas de KANEHISA LABORATORIES (2018).

Fig. Anexo A. 1. Via metabólica da Histidina no microrganismo *Komagataella phaffii*, também denominado *Pichia pastoris* GS115 (DE SCHUTTER et al., 2009).



Fonte: Retirado de KANEHISA LABORATORIES (2017).

Fig. Anexo A. 2. Metabolismo de alanina, aspartato e do glutamato no microrganismo *Komagataella phaffi*, também denominado *Pichia pastoris* GS115 (DE SCHUTTER et al., 2009).



Fonte: Retirado de KANEHISA LABORATORIES (2018).

Anexo B: Protocolo de gel de poliacrilamida para Eletroforese SDS-PAGE

Autor	Zhaopeng Li
Supervisor	Ursula Rinas
Descrição	Protocolo para formação de géis de poliacrilamida de 13,5%
Referência Bibliográfica	Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. <i>Nature</i> , 227(august), 680–685. Retrieved from https://www.nature.com/articles/227680a0.pdf

Tab. Anexo B. 1. Soluções para preparo do gel de poliacrilamida 13,5%.

	Gel de Separação	Gel de Empilhamento
Solução	13,5%	5%
Acrilamida / Bisacrilamida 30% / 0,8%	13,5 ml	1,5 ml
4x Tampão-Inferior	7,6 ml	
4x Tampão-Superior		2,5 ml
10% SDS	300 µl	
d H ₂ O	8,6 ml	5,9 ml
	Polimerizar com	
20% TEMED	100 µl	150 µl
10% Persulfato de amônia	120 µl	120 µl

Preparo das Amostras:

- Diluir a amostra na proporção 1:1 com tampão de amostra Laemmli 2x
- Aqueça a amostra a 95°C por 5 minutos
- Comece a corrida com 120 V por aproximadamente 5 minutos, em seguida, com 160 V por 1 hora

Receitas

Tampão de Amostra Laemmli 2x: 9,3 mL de solução 1; 200 µL de β-mercaptoetanol; 500 µL de solução 2.

Solução 1: 12,5 ml de tampão superior; 10 ml de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS); 50 ml de dH₂O (estéril); 20 ml de glicerol.

Solução 2: 5 mg/ml de azul de bromofenol em 50% de glicerol.

4x Tampão Superior: 30,5 g de Tris-base (0,5 M); 20 ml de 10% SDS em 500 ml de dH₂O; ajuste o pH 6,8 com HCl.

4x Tampão Inferior: 91 g de Tris-base (1,5 M) em 500 ml dH₂O; ajuste o pH 8,8 com HCl.

10X Tampão de corrida: 30 g de Tris-base; 144 g de glicina; 10 g SDS em 1000 ml dH₂O; meça o valor do pH deve estar 8,3.

Solução Fixadora / Descolorante Coomassie: 600 ml dH₂O; 300 ml de etanol 100%; 100 ml de ácido acético 100% em 1000 ml dH₂O.

Solução para o Armazenamento de Gel: 10 mL SDS 10%; 250 mL de 4X Tampão Inferior e complete o volume com dH₂O até 1 L. Os géis podem ser armazenados até uma semana nessa solução a 4°C.

Tab. Anexo B. 2. Método de preparo de Coomassie coloidal.

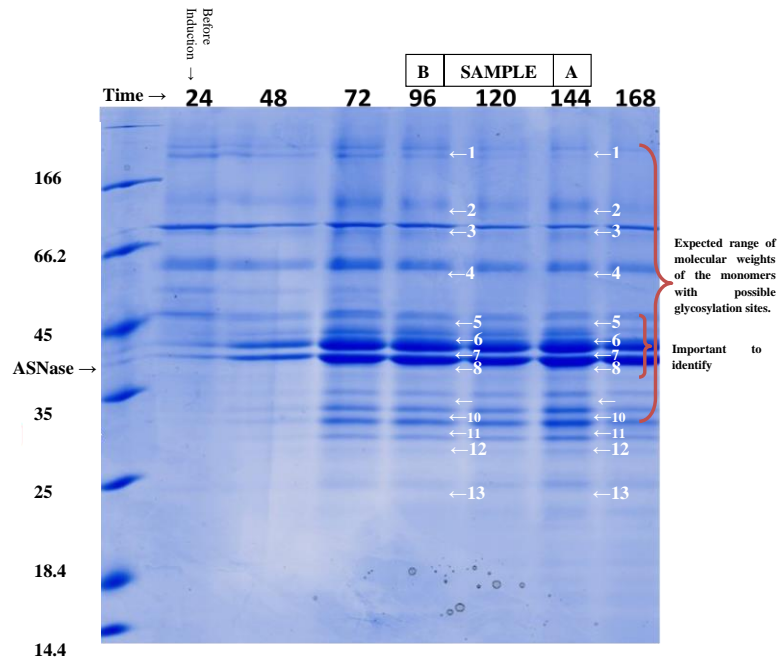
Compostos	Concentração m/v	Método de Preparação
H ₃ PO ₄	8.5%	Em primeiro lugar, adicione 500 ml de água Milli-Q a 500 ml de H ₃ PO ₄ 85% e misture. Em segundo lugar, adicione 500 g (NH ₄) ₂ SO ₄ com água Milli-Q até o volume final de 1 L. Adicione um agitador magnético para misturar completamente. Em terceiro lugar, adicione 5 g de Coomassie Blue G250 com água Milli-Q para obter um volume final de 1 L. Adicione um agitador magnético para misturar completamente. Após o (NH ₄) ₂ SO ₄ e Coomassie Blue G-250 dissolverem completamente, misture-os com a solução de H ₃ PO ₄ e adicione 1 L de água Milli-Q para o volume final de 4 L. Deixe misturando em alta velocidade de agitação durante a noite. Depois disso, muito lentamente (importante) adicione 1 L de Metanol a esta solução. Esta solução deve ser armazenada em um frasco escuro a temperatura ambiente.
(NH ₄) ₂ SO ₄	10%	
Coomassie Blue G250	0.1%	
Metanol	20%	

Após a corrida, deixar o gel em solução fixadora por 30 minutos com agitação orbital. Em seguida, deixe o gel em água pela noite até a remoção dos resíduos de Coomassie.

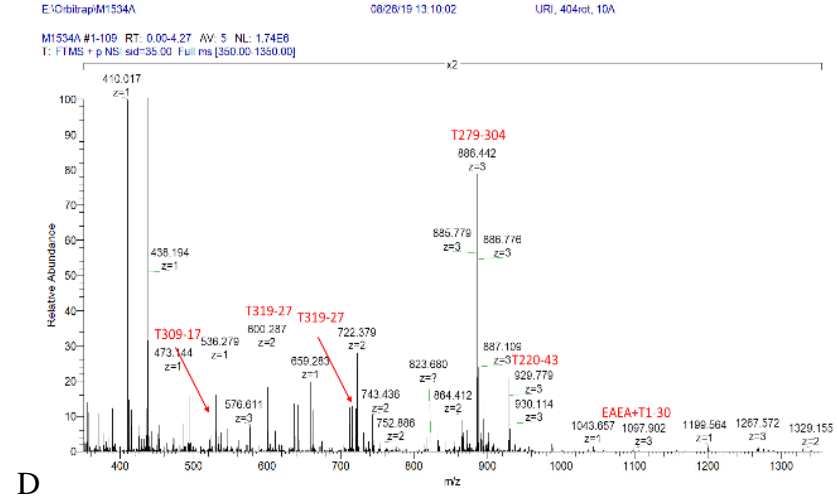
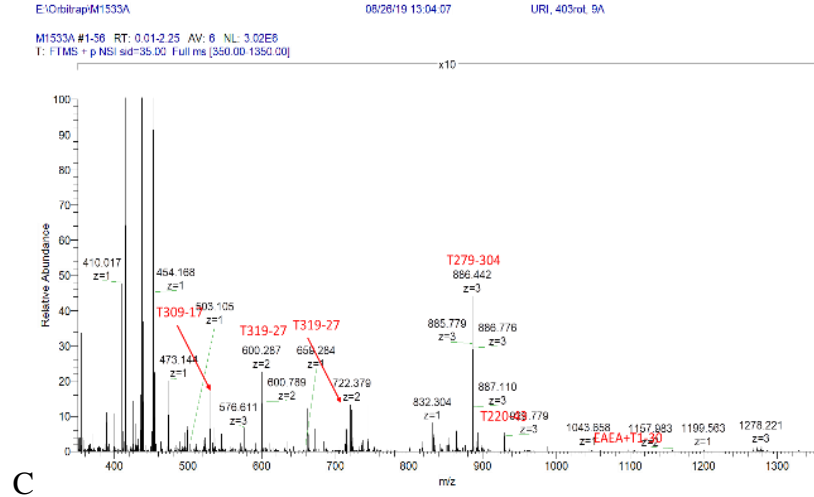
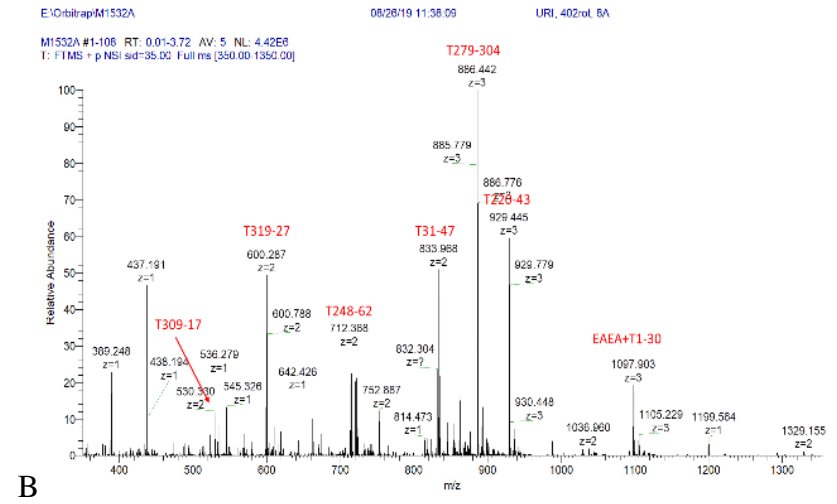
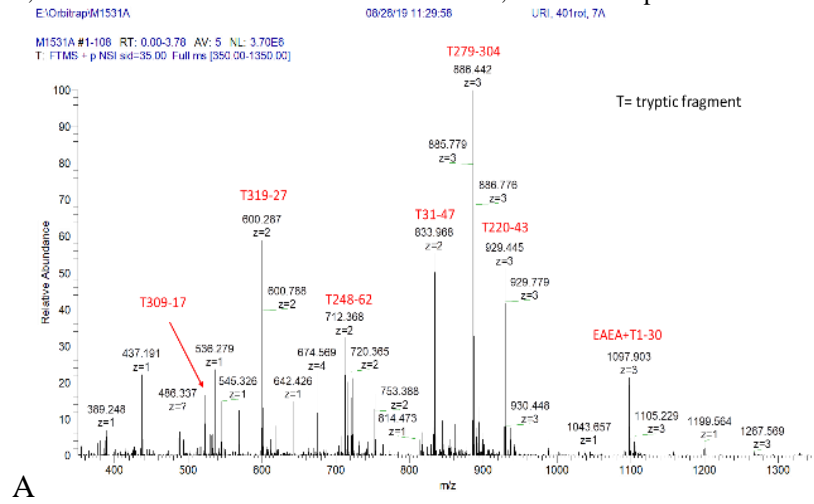
Anexo C: Análise MALDI-TOF da ASNase glicosilada

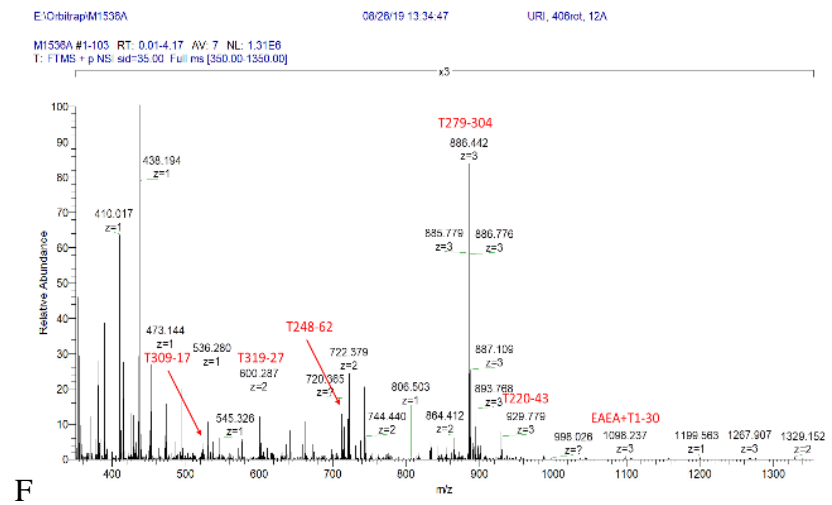
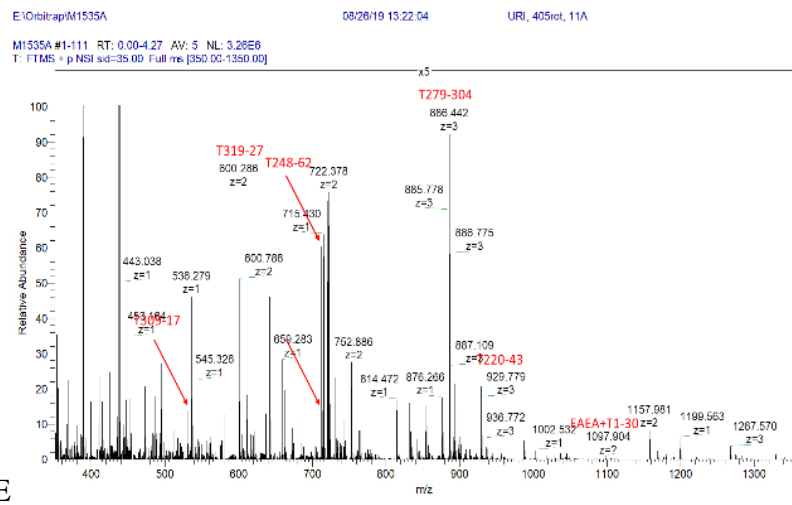
Esta análise foi realizada gentilmente pelo Dr. Manfred Nimtz do *Helmholtz Center for Infection Research*.

Fig, Anexo C. 1. Gel de eletroforese contendo as amostras utilizadas na análise MALDI-TOF. Foram avaliadas as bandas de 7 a 12 da coluna de 144 horas de cultivo da cepa prototrófica em meio complexo em frasco.



Fig, Anexo C. 2. Espectro de massa das bandas 7 (A), 8 (B), 9 (C), 10 (D), 11 (E) e 12 (F) da coluna de 144 horas do gel da figura C.1.1. Foi possível observar que, nas bandas inferiores, os resíduos do N-terminal foram reduzindo, indicando a proteína estava truncada nessas bandas.





Fig, Anexo C. 3. Espectro de massa dos resíduos 49-72 com presença de glicanos GlcNAcMan₅ e GlcNAcMan₆ (A), e do resíduo 169-178 com presença de glicanos GlcNAcMan₅ e GlcNAcMan₆ (B) e com ausência de glicanos (C).

