



DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE
Zymomonas mobilis PARA APLICAÇÃO COMO BIOFÁRMACO

Karen Einsfeldt

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): Tito Lívio Moitinho Alves
Rodrigo Volcan Almeida
Ariane Leites Larentis

Rio de Janeiro
Setembro de 2014

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE
Zymomonas mobilis PARA APLICAÇÃO COMO BIOFÁRMACO

Karen Einsfeldt

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc.

Dr^a. Ariane Leites Larentis, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Prof^a. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

Prof. José Gregório Cabrera Gomez, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2014

Einsfeldt, Karen

Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco/ Karen Einsfeldt. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

XI, 143 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Rodrigo Volcan Almeida

Ariane Leites Larentis

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2014.

Referencias Bibliográficas: p. 114-135.

1. L-asparaginase. 2. Expressão de proteína recombinante. 3. *Zymomonas mobilis*. 4. *Escherichia coli*. 5. Planejamento de Experimentos. 6. Estabilidade Plasmidial. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu marido,
uma pessoa muito importante nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Tito, Ariane e Rodrigo, pelos ensinamentos, discussões e principalmente pela inspiração e motivação.

Agradeço à CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Engenharia Química/COPPE pela formação acadêmica, estrutura disponibilizada, e suporte para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Tito Lívio Moitinho Alves por toda sua contribuição, ensinamentos, atenção e recursos disponibilizados.

A D.Sc. Ariane Leites Larentis pela dedicação, generosidade, compreensão, pelo incentivo, apoio nos momentos difíceis, pelos ensinamentos e momentos agradáveis de discussão e muito aprendizado. Agradeço sobretudo por sua amizade.

Ao Prof. Rodrigo Volcan Almeida pelos ensinamentos, atenção, estrutura disponibilizada, apoio nos momentos difíceis e todo o suporte para a realização deste trabalho. Ao pessoal do LAMMP pelas conversas e pelo auxílio em parte deste trabalho. A Candida por ter me ajudado tanto, principalmente nas análises de HPLC. Ao pessoal do LaBiM7, em especial ao Antônio, por ter disponibilizado o uso do HPLC.

Ao Prof. Argimiro que sempre esteve disposto a ajudar e transmitir seu conhecimento.

Ao Tafarel e à Isis pelas noites que passaram comigo no laboratório, por sua ajuda durante este trabalho. À Isis, minha parceira de trabalho, por toda sua dedicação ao projeto da L-asparaginase. À Aline pelas conversas e por sua preciosa ajuda no último experimento. Agradeço à Juliana e à Sabrina por terem me ajudado tanto durante este trabalho. Agradeço também ao Bruno por ter me ajudado tão prontamente.

Às amigas Cláudia, Isis e Candida pelas tantas conversas, risadas, apoios e por suas amizades. Ao Tafarel agradeço pela amizade, pelas conversas e pela companhia nos lanches do final da tarde.

Aos grandes amigos que fiz aqui no Rio de Janeiro, em especial ao Aldo, Elis, Felipe, Gisele, Guillermo e Lívia, pelas conversas, risadas, festas, emails engraçados, e pelo apoio nos momentos difíceis no doutorado e no Rio.

A minha família que de alguma forma sempre esteve presente. Aos meus pais por toda a força, dedicação e pelo incentivo para que eu nunca desista dos meus sonhos, por mais difíceis que estes possam parecer.

Em especial ao meu marido, que me deu forças para realizar o doutorado, que sempre me encorajou a “querer mais” e a “fazer melhor” e que sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons e ruins.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA L-ASPARAGINASE RECOMBINANTE DE
Zymomonas mobilis PARA APLICAÇÃO COMO BIOFÁRMACO

Karen Einsfeldt

Setembro/2014

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Rodrigo Volcan Almeida

Ariane Leites Larentis

Programa: Engenharia Química

A L-asparaginase é uma proteína utilizada no tratamento de leucemia linfoblástica aguda e outras neoplasias linfoides. Os objetivos desta tese foram clonar e expressar a proteína L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli* utilizando duas estratégias distintas, expressão citoplasmática e extracelular, bem como otimizar a produção da proteína e estudar algumas variáveis do sistema. A expressão da proteína foi realizada em frascos agitados com meio de cultura complexo, obtendo-se 0,19UI/mL de L-asparaginase extracelular e 7,6UI/mL de L-asparaginase intracelular em 4 horas de indução com IPTG. A expressão também foi realizada em biorreatores com meio de cultura complexo, obtendo-se 0,13UI/mL da enzima extracelular (173UI/g de célula) e 3,6UI/mL de L-asparaginase intracelular (5185UI/g de célula) em 7 horas de cultivo. Estes valores foram superiores ao valor de 37,79 UI/g obtido em 33h do cultivo de *Z. mobilis*. As condições de expressão da L-asparaginase recombinante extracelular, em biorreatores utilizando meio de cultura definido e glicerol como substrato, foram avaliadas por um planejamento fatorial fracionado (2^{4-1}). A melhor condição (ponto central) apresentou média de 20,4 UI/mL, sendo a produtividade aumentada 50 vezes quando comparada ao cultivo em biorreator com meio complexo. Um modelo matemático foi proposto para representar o processo de expressão de proteínas recombinantes, sendo capaz de descrever satisfatoriamente os dados de produção em biorreator operando em modo batelada.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF A NEW RECOMBINANT L-ASPARAGINASE OF
Zymomonas mobilis FOR APPLICATION AS BIOPHARMACEUTICAL PRODUCT

Karen Einsfeldt

September/2014

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Rodrigo Volcan Almeida

Ariane Leites Larentis

Department: Chemical Engineering

L-asparaginase is a protein used for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and other lymphoid malignancies. The aims of this thesis were to clone and express the L-asparaginase protein of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli* using two different strategies, cytoplasmic and extracellular expression, as well to optimize protein production and study some variables of the system. The protein expression was performed in shake flasks in complex culture medium and it was obtained 0,19UI/mL of extracellular L-asparaginase and 7,6UI/mL of intracellular L-asparaginase in 4 hours of IPTG induction. The expression was carried out too in bioreactors with complex culture medium, and it was obtained 0,13UI/mL of extracellular enzyme (173UI/g of cell) and 3,6UI/ml of intracellular L-asparaginase (5185UI/g of cell) in 7 hours of cultivation. These values were higher than the value of 37,79IU/g obtained in 33h of *Z. mobilis* cultivation. The conditions for expression of recombinant extracellular L-asparaginase, in bioreactors using defined medium and glycerol as substrate, were evaluated by a fractional factorial design (2^{4-1}). The best condition (central point) showed average of 20,4UI/mL, and the productivity was increased by 50 times when compared to the bioreactor cultivation with complex culture medium. A mathematical model was proposed to represent the process of recombinant proteins expression, which was able to satisfactorily describe the data of production in bioreactor operating in batch mode.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 A enzima L-asparaginase	4
<i>2.1.1 Utilização da enzima para fins terapêuticos</i>	5
<i>2.1.2 Características, estrutura e propriedades bioquímicas da enzima</i>	7
<i>2.1.3 Micro-organismos produtores: selvagens e geneticamente modificados</i>	10
2.2 A bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> e sua L-asparaginase	14
2.3 Produção de proteínas recombinantes	15
<i>2.3.1 Escherichia coli como sistema de expressão de proteínas recombinantes</i>	17
<i>2.3.2 Estabilidade plasmidial</i>	21
<i>2.3.3 Meios de cultura para cultivos de Escherichia coli: complexos e quimicamente definidos</i>	23
<i>2.3.4 Planejamento de experimentos e modelagem matemática de processos com células recombinantes</i>	26
3 METODOLOGIA	31
3.1 Análises utilizando bioinformática	31
3.2 Meios de cultura	32
3.3 Clonagem de L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> em <i>Escherichia coli</i>	32
<i>3.3.1 Síntese do gene de L-asparaginase de Zymomonas mobilis</i>	32
<i>3.3.2 Vetores utilizados</i>	34
<i>3.3.3 Células eletrocompetentes e cepas utilizadas</i>	34

3.3.4	<i>Transformação de Escherichia coli</i>	35
3.3.5	<i>Seleção de clones e preparação de estoques em glicerol</i>	35
3.3.6	<i>Extração de DNA plasmidial</i>	36
3.3.7	<i>Digestão plasmidial</i>	36
3.3.8	<i>Preparação de lote de trabalho</i>	36
3.4	Expressão de L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> em <i>Escherichia coli</i>	37
3.4.1	<i>Expressão em frascos agitados</i>	37
3.4.2	<i>Expressão em biorreatores com meio de cultura complexo</i>	38
3.4.3	<i>Expressão em biorreatores com meio de cultura definido</i>	39
3.4.3.1	<u>Cinética de crescimento</u>	39
3.4.3.2	<u>Planejamento de experimentos</u>	40
3.4.3.3	<u>Validação do planejamento em biorreator de 3L</u>	42
3.4.3.4	<u>Obtenção de dados cinéticos em biorreator de 1,5L</u>	42
3.5	Modelagem matemática e simulação do cultivo em modo batelada	43
3.6	Ensaio de estabilidade da proteína	43
3.7	Avaliação da expressão de L-asparaginase	44
3.3.1	<i>SDS-PAGE</i>	44
3.3.2	<i>Atividade enzimática e quantificação de proteína total</i>	45
3.8	Análise da segregação plasmidial	46
3.9	Determinação de glicerol, lactose, ácido acético e ácido láctico	47
3.10	Determinação de crescimento celular	48
3.11	Determinação da concentração de canamicina	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

4.1 Análises de Bioinformática	50
4.2 Clonagem de L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> em <i>Escherichia coli</i>	53
4.3 Expressão de L-asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> em <i>Escherichia coli</i>	56
4.3.1 <i>Expressão utilizando frascos agitados</i>	56
4.3.2 <i>Expressão em biorreatores com meio de cultura complexo</i>	61
4.3.3 <i>Expressão em biorreatores com meio de cultura definido</i>	65
<u>4.3.3.1 Cinética de crescimento</u>	66
<u>4.3.3.2 Planejamento de Experimentos utilizando biorreator com 0,4L de meio definido</u>	69
<u>4.3.3.3 Validação do planejamento em biorreator com 3L</u>	79
<u>4.3.3.4 Aumento de escala para obtenção de dados cinéticos em biorreator com 1,5L</u>	83
4.4 Modelagem matemática e simulação do cultivo em modo batelada	89
4.4.1 <i>Modelo matemático proposto</i>	89
4.4.2 <i>Simulação e estimação de parâmetros</i>	94
4.4.3 <i>Modificação do modelo matemático proposto</i>	103
4.5 Ensaio de estabilidade da L-asparaginase recombinante	105
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
APÊNDICE A	136
APÊNDICE B	140
APÊNDICE C	141
APÊNDICE D	142

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo que, em 2008, ocorreram cerca de 7,6 milhões de mortes (OMS, 2008; PASUT E VERONESE, 2009). No Brasil, estima-se que em 2014 ocorrerão 394.450 novos casos de câncer, sendo que 11.840 ocorrerão em crianças e adolescentes (INCA, 2014). O câncer responde por cerca de 4-5% das mortes de menores de 15 anos em países desenvolvidos, sendo a segunda causa de morte desta faixa etária nestes locais. Estima-se que ocorram cerca de 160.000 novos casos e 90.000 mortes por câncer infantil por ano no mundo, sendo a leucemia o câncer mais comum durante a infância (OMS, 2008).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é um tipo de câncer no qual ocorre o acúmulo e a proliferação anormal de células linfóides imaturas dentro da medula óssea e em tecidos linfóides (FOA *et al.*, 2009; INCA, 2014). O tratamento da LLA inclui a utilização da enzima L-asparaginase como agente quimioterápico (KURTZBERG, 2000; NARTA *et al.*, 2007; PASUT E VERONESE, 2009; RIZZARI *et al.*, 2013; VROOMAN *et al.*, 2013), sendo a enzima utilizada mundialmente nos protocolos de tratamento da LLA que ocorrem na infância a mais de trinta anos (ORTEGA *et al.*, 1977; SCHRAPPE *et al.*, 2000; NARTA *et al.*, 2007; RIZZARI *et al.*, 2013; VROOMAN *et al.*, 2013).

A L-asparaginase utilizada no tratamento do câncer é obtida através dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, havendo formulações no mercado da enzima nativa de ambos os micro-organismos e da L-asparaginase de *Escherichia coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG) (KURTZBERG, 2000; PIETERS *et al.*, 2011; RYTTING, 2012). Ambas as formas nativas causam hipersensibilidade clínica e reações alérgicas agudas (PASUT E VERONESE, 2009), no entanto, como as L-asparaginases de *E. coli* e *Erwinia* possuem especificidades imunológicas diferentes, oferecem uma alternativa para pacientes que desenvolvem hipersensibilidade a uma destas enzimas (DUVAL *et al.*, 2002; VROOMAN *et al.*, 2010; RIZZARI *et al.*, 2013). Outra alternativa para pacientes que desenvolvem hipersensibilidade a uma das enzimas, é a L-asparaginase de *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG), já que o PEG é utilizado para proteger os sítios antigênicos na superfície da proteína (PASUT E VERONESE, 2009).

O medicamento utilizado no Brasil é todo importado. Em 2013 a empresa que realizava a importação do medicamento para o Brasil comunicou ao governo o fim do abastecimento. O Ministério da Saúde assumiu então a compra do medicamento, provendo para o país estoques suficientes para um ano. Além disso, em junho de 2013, o mesmo ministério estabeleceu uma parceria entre a Fiocruz e os laboratórios privados NT Pharma e Unitec Biotec para que a partir de 2015 a L-asparaginase passe a ser produzida no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Além disso, no Brasil é apenas autorizado o uso do medicamento obtido a partir de *E. coli*, deixando praticamente sem alternativas os pacientes que desenvolvem sensibilidade a esta droga. O paciente que desenvolve alergia ao medicamento disponível precisa entrar com um processo judicial para a importação de outra fonte de L-asparaginase, como a L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi*, a qual não é autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BAPTISTA, 2013), mas é utilizada mundialmente em protocolos de tratamento contra LLA (RIZZARI *et al.*, 2013). É vital que o protocolo completo de tratamento seja realizado para obtenção dos melhores resultados e diminuição do risco de recidiva (RIZZARI *et al.*, 2013), o que pode ser um problema para pacientes brasileiros que desenvolvem hipersensibilidade e toxicidade a droga disponível, já que não existem alternativas regulares ao tratamento no Brasil.

Diante dos problemas expostos, é muito importante a busca de novas fontes de L-asparaginase, que tenham atividade antileucêmica, possam ser menos imunogênicas, funcionem como alternativa para pacientes que desenvolvem sensibilidade aos medicamentos já existentes e tenham menores custos. Uma destas fontes é a bactéria *Zymomonas mobilis*, a qual tem sido estudada no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE para a produção de L-asparaginase (PINHEIRO, 2001; ABUD, 2005). No entanto, a baixa produtividade da enzima por *Z. mobilis* torna-se um obstáculo para o estudo e produção da enzima a partir deste micro-organismo. Porém, este obstáculo pode ser superado pela produção da enzima recombinante, em altas concentrações, utilizando *E. coli* como sistema de expressão.

Em face ao exposto, os objetivos desta tese foram clonar a proteína L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli* e expressar a proteína utilizando duas estratégias distintas, expressão citoplasmática e extracelular. Além disso, objetivou-se aumentar a produção da proteína e estudar algumas variáveis do

sistema. Desta forma, esta tese fornece uma contribuição original na produção de L-asparaginase, já que é a primeira vez que esta proteína de *Z. mobilis* é produzida de forma recombinante. Além desta contribuição, este trabalho contribui para o melhor entendimento da produção de proteínas heterólogas em bioreatores, para o estudo da estabilidade plasmidial, assim como para o desenvolvimento de modelos matemáticos que auxiliem na operação de sistemas com células recombinantes. Além disso, a produção de L-asparaginase recombinante de *Z. mobilis* facilita os estudos da atividade antileucêmica, pois é capaz de prover as quantidades necessárias da enzima através de um sistema de produção eficaz. Outro fator importante deste trabalho é que a produção de L-asparaginase no Brasil representaria uma importante ação de independência tecnológica com enorme importância social, já que os medicamentos à base de L-asparaginase empregados no país são importados, garantido o suprimento ininterrupto do medicamento.

Sendo assim, os objetivos específicos desta tese foram clonar a proteína L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*, expressar a proteína utilizando duas estratégias distintas (expressão citoplasmática e extracelular), aumentar a produção da proteína e estudar algumas variáveis do sistema, utilizando planejamento experimental, e por fim, propor um modelo matemático que auxilie na operação de sistemas com células recombinantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para auxiliar a discussão que será realizada neste trabalho sobre o desenvolvimento de um processo de produção da enzima L-asparaginase, este capítulo apresentará uma revisão abordando pontos importantes a respeito da enzima L-asparaginase, da bactéria de origem da enzima desenvolvida neste trabalho, e da produção de proteínas recombinantes.

2.1 A enzima L-asparaginase

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amino hidrolase, E.C. 3.5.1.1) (VERMA *et al.*, 2007) está entre as principais enzimas terapêuticas de origem microbiana, isto porque ela é um importante agente quimioterapêutico utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e outras neoplasias linfoides (KURTZBERG, 2000, NARTA *et al.*, 2007, VERMA *et al.*, 2007, PASUT E VERONESE, 2009). Esta enzima catalisa a hidrólise de L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia (VERMA *et al.*, 2007).

Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio mostram que, em 2013, o Brasil importou 1,4 toneladas de medicamentos contendo L-asparaginase, em doses, chegando ao valor de US\$ 1.798.823. Estes medicamentos, em doses, têm sido importados de dois blocos econômicos ao longo dos anos: União Europeia e NAFTA (Acordo de Livre Comércio da América do Norte), sendo que no último ano (2013) a totalidade de importações foi negociada com a União Europeia (MDIC, 2014). Na figura 2.1 é possível visualizar os valores de importações e a balança comercial de L-asparaginase ao longo dos últimos 10 anos, separadas de acordo com a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM). NCM é a classificação de mercadorias utilizada pelos países do bloco econômico Mercado Comum do Sul (MERCOSUL). Esta classificação é baseada no Sistema Harmonizado de Designação e de Codificação de Mercadorias (SH) que é a metodologia adotada por quase todos os países (MDIC, 2014).

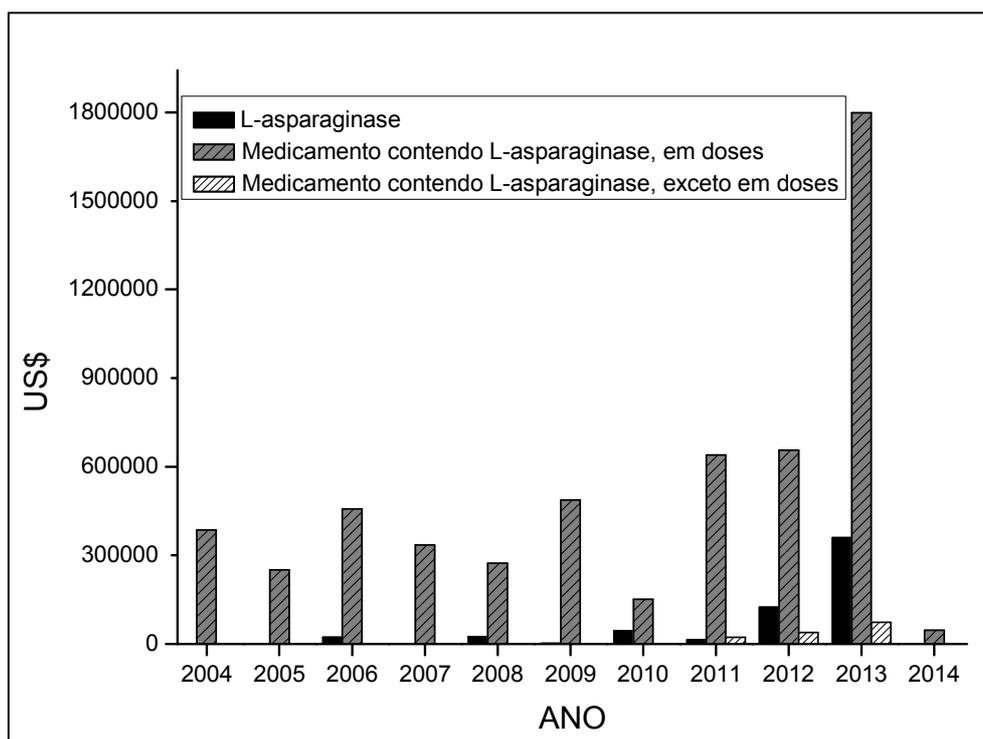


Figura 2.1 Importações de L-asparaginase realizadas pelo Brasil de 2004 à Janeiro de 2014, de acordo com a Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) (MDIC, 2014).

2.1.1 Utilização da enzima para fins terapêuticos

Como mencionado anteriormente, a enzima L-asparaginase é utilizada como agente quimioterapêutico no tratamento da LLA e de outras neoplasias linfoides (KURTZBERG, 2000, NARTA *et al.*, 2007, VERMA *et al.*, 2007, PASUT E VERONESE, 2009). A enzima foi utilizada pela primeira vez em humanos no tratamento de LLA em 1966 (KURTZBERG, 2000), e atualmente é um componente utilizado mundialmente no tratamento de LLA (ORTEGA *et al.*, 1977, SCHRAPPE *et al.*, 2000, NARTA *et al.*, 2007, VAN DEN BERG, 2011, RIZZARI *et al.*, 2013, VROOMAN *et al.*, 2013), sendo essencial no tratamento de LLA durante a infância (PIETERS *et al.*, 2011).

A atividade antineoplásica da L-asparaginase faz com que ocorra o esgotamento dos suprimentos exógenos de L-asparagina, privando as células tumorais de um fator imprescindível para a síntese protéica. Os linfoblastos leucêmicos e outras células tumorais sintetizam lentamente L-asparagina em comparação com a sua necessidade, já que têm níveis muito baixos de L-asparagina sintetase, e dependem de um fornecimento de L-asparagina presente no soro (exógeno) para sua proliferação e sobrevivência. Já as células normais conseguem

sintetizar normalmente o aminoácido necessário, e então não são prejudicadas pelo uso da L-asparaginase (LEE *et al.*, 1989, DUVAL *et al.* 2002, KOTZIA E LABROU, 2005, NARTA *et al.*, 2007, RIZZARI, 2013).

A figura 2.2 mostra um esquema da ação da enzima durante o tratamento do câncer, catalizando a hidrólise da L-asparagina para aspartato e amônia (NARTA *et al.*, 2007, VERMA *et al.*, 2007).

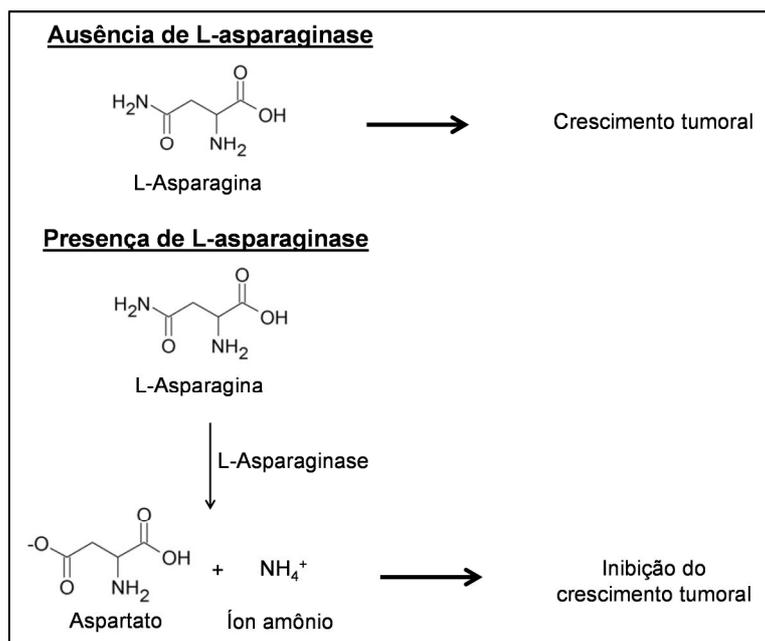


Figura 2.2 Representação esquemática da ação da L-asparaginase durante o tratamento do câncer (adaptado de NARTA *et al.*, 2007).

No mercado, estão disponíveis formulações da enzima nativa obtida através dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* e da L-asparaginase de *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG) (KURTZBERG, 2000, PIETERS *et al.*, 2011, RYTTING, 2012). A tabela 2.1 apresenta as preparações de L-asparaginase de uso terapêutico disponíveis no mercado, sendo que algumas preparações não estão disponíveis em todos os países. Além destas preparações, um novo medicamento a base de L-asparaginase recombinante de *E. coli* está em fase de estudos clínicos (PIETERS *et al.*, 2008; PIETERS *et al.*, 2011) e uma formulação a base de L-asparaginase recombinante de *Erwinia chrysanthemi* conjugada ao polietilenoglicol está em estudos pré-clínicos (PIETERS *et al.*, 2011).

Tabela 2.1 Preparações de L-asparaginase de uso terapêutico disponíveis no mercado (adaptada de PIETERS *et al.*, 2011)

Nome Comercial	Empresa Farmacêutica	Micro-organismo Produtor
Kidrolase	EUSA Pharma	<i>Escherichia coli</i>
Elspar	Ovation Pharmaceuticals	<i>Escherichia coli</i>
Crasnitin	Bayer AG	<i>Escherichia coli</i>
Leunase	Sanofi-Aventis	<i>Escherichia coli</i>
Asparaginase Medac	Kyowa Hakko	<i>Escherichia coli</i>
Oncaspar (PEG-asparaginase)	Sigma-Tau Pharmaceuticals	<i>Escherichia coli</i>
Erwinase	EUSA Pharma	<i>Erwinia chrysanthemi</i>

Estudos feitos com L-asparaginases de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi* mostraram que ambas enzimas apresentaram alta taxa de imunogenicidade (NARTA *et al.*, 2007), ou seja, causaram uma resposta exagerada do sistema imunológico do paciente. No entanto, as L-asparaginases de *E. coli* e *Erwinia* oferecem uma alternativa para pacientes que se tornam hipersensíveis a uma destas enzimas (DUVAL *et al.*, 2002; VROOMAN *et al.*, 2010; RIZZARI *et al.*, 2013). Os efeitos colaterais menos preocupantes causados pelo tratamento com L-asparaginase são reações alérgicas e vômitos (OHNUMA *et al.*, 1970; VERMA *et al.*, 2007, VAN DEN BERG, 2011). Já os principais efeitos colaterais causados pelas formulações com L-asparaginase são anafilaxia, pancreatite, diabetes, leucopenia, e anormalidades da coagulação que podem levar à trombose ou hemorragia intracraniana (DUVAL *et al.*, 2002). Com o objetivo de reduzir a imunogenicidade da droga, aumentar a meia vida de enzima e reduzir a frequência de aplicações, foi desenvolvida a L-asparaginase obtida a partir de *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol (PEG) (NARTA *et al.*, 2007; PASUT E VERONESE, 2009; VAN DEN BERG, 2011; RYTTING, 2012). O polietilenoglicol é capaz de proteger os sítios antigênicos na superfície da proteína, representando um obstáculo para a aproximação ou interação de moléculas grandes, como anticorpos e proteases (PASUT E VERONESE, 2009).

2.1.2 Características, estrutura e propriedades bioquímicas da enzima

As asparaginases biologicamente ativas são homotetrâmeros (compostas por quatro subunidades) que possuem um enovelamento global altamente conservado (SWAIN *et al.*, 1993; KOZAK *et al.*, 2000; KOTZIA E LABROU, 2005). A massa molecular de L-asparaginase varia dependendo da cepa da qual a enzima foi isolada:

a enzima purificada de *E. coli* varia em torno de 142 kDa (SANCHES *et al.*, 2003), já a massa molecular da L-asparaginase de *Erwinia* tem sido relatada com valor em torno de 138 kDa. O ponto isoelétrico também varia em torno de pH 8,7 para a enzima de *Erwinia* e entre pH 4,6 e 5,5 para a enzima de *E. coli* (NARTA *et al.*, 2007).

Existem dois tipos de L-asparaginase de *Escherichia coli*, a tipo I que é citoplasmática e a tipo II que é periplasmática. Os dois tipos da enzima de *E. coli* têm afinidades muito diferentes pelo substrato, a enzima tipo I tem um Km aparente para asparagina de 3,5 mM, que indica uma baixa afinidade pelo substrato. Já a enzima do tipo II exibe um valor de Km para o substrato na faixa de μM (YUN *et al.*, 2007), ou seja, a enzima tipo II possui uma elevada afinidade pelo substrato. A L-asparaginase tipo II, tanto de *E. coli* como de *Erwinia*, é o tipo utilizado nos tratamentos antitumorais (KOZAK *et al.*, 2000). A enzima tipo I de *E. coli* não tem atividade antileucêmica *in vitro* ou *in vivo*. A explicação para esta falta de atividade provavelmente esteja nas propriedades bioquímicas da enzima: o elevado valor de Km para asparagina, a especificidade de substrato ou a potencial cinética alostérica (YUN *et al.*, 2007). Em seus estudos, YUN *et al.* (2007) mostraram que para a L-asparaginase tipo I a asparagina não é apenas substrato para a enzima, mas também atua como uma molécula que se liga a um sítio alostérico desta enzima. Na figura 2.3 é possível visualizar a estrutura tetramérica da molécula de L-asparaginase e são mostradas representações das estruturas das moléculas da enzima, tipo I e tipo II.

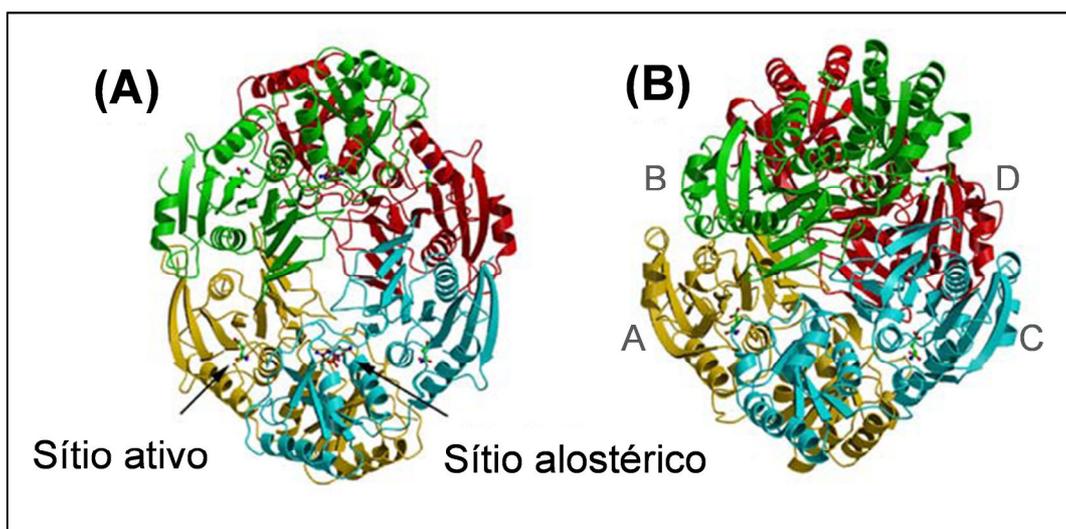


Figura 2.3 Estrutura tetramérica da molécula de L-asparaginase de *E. coli* complexada com L-asparagina em uma representação em fita. (A) L-asparaginase tipo I. (B) L-asparaginase tipo II. Em (B) são mostradas as quatro subunidades: A, B, C e D (adaptada de YUN *et al.*, 2007).

Como citado anteriormente, as asparaginases possuem um enovelamento global altamente conservado. As subunidades idênticas que formam o tetrâmero, A, B, C e D, estão organizadas na forma de dímeros, AB e CD, onde cada um dos dímeros possui dois sítios ativos (SWAIN *et al.*, 1993; KOZAK *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 2003; KOTZIA E LABROU, 2005). A estrutura tetramérica da L-asparaginase tipo II de *E. coli* pode ser visualizada na figura 2.4. Cada monômero desta estrutura consiste de 326 resíduos de aminoácidos (MICHALSKA E JASKOLSKI, 2006), e está dividido em dois domínios, um maior, o N-terminal, e um menor, o C-terminal, ligados por uma região de 20 aminoácidos (YUN *et al.*, 2007).

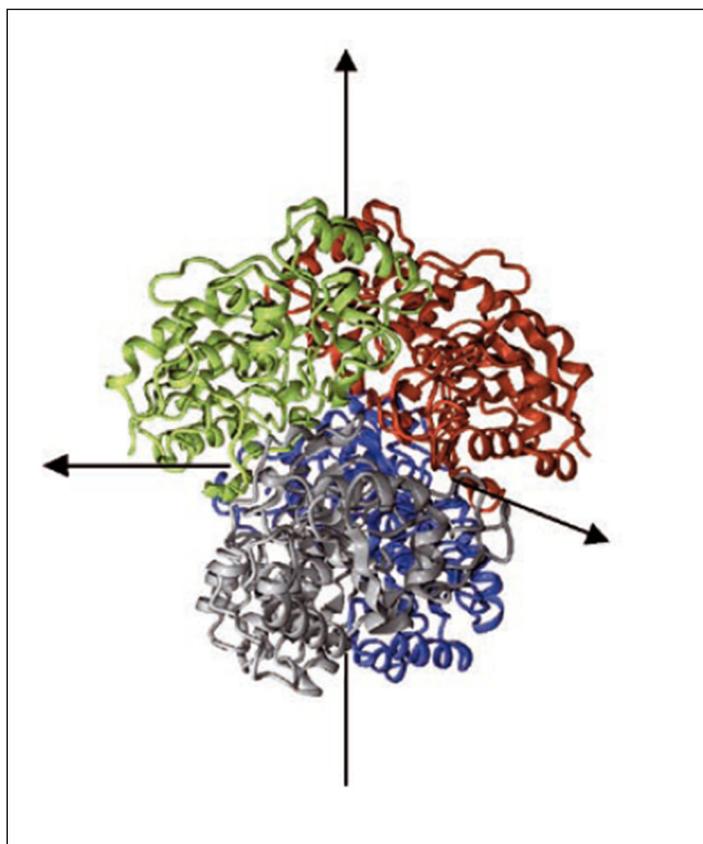


Figura 2.4 A estrutura tetramérica da L-asparaginase tipo II de *E. coli* (PDB code 3ECA) (MICHALSKA E JASKOLSKI, 2006).

Cada um dos quatro sítios ativos da enzima está localizado entre os domínios N-terminal e C-terminal de dois monômeros, ou seja, está na interface de duas subunidades (SWAIN *et al.*, 1993). Cada sítio ativo é formado principalmente por resíduos presentes da porção N-terminal da subunidade e por alguns resíduos da porção C-terminal da outra subunidade ligada. Na enzima de *Escherichia coli* tipo II, os resíduos Thr-12, Tyr-25, Ser-58, Gln-59, Thr-89, Asp-90, Ala-114, Lys-162 de uma subunidade juntamente com os resíduos Asn-248 e Glu-283 da outra subunidade do

dímero formam a cavidade de ligação do sítio ativo (SWAIN *et al.*, 1993; SANCHES *et al.*, 2007). No sítio ativo está presente uma alça flexível que contém dois importantes resíduos: Thr-12 e Tyr-25. O acesso à cavidade sítio ativo é controlado por esta alça flexível que abre e fecha, sendo observada na conformação fechada quando o sítio ativo está ocupado pelo produto de reação ou seu análogo (SWAIN *et al.*, 1993; KOTZIA E LABROU, 2005). A molécula de L-asparaginase possui uma tríade treonina-lisina-aspartato (Thr-89, Lys-162, Asp-90), similar à tríade catalítica de serino-proteases, onde se localiza o resíduo Thr89 que é altamente conservado em asparaginases microbianas e essencial para a catálise (PALM *et al.*, 1996; MICHALSKA E JASKOLSKI, 2006). Alguns trabalhos propõem que esta tríade treonina-lisina-aspartato é a segunda tríade catalítica da enzima L-asparaginase, ou seja a enzima possui duas tríades catalíticas, sendo a primeira tríade formada por treonina-tirosina-glutamato (Thr-12, Tyr-25, Glu-283) (ORTLUND *et al.*, 2000; SANCHES *et al.*, 2007).

2.1.3 Micro-organismos produtores: selvagens e geneticamente modificados

Uma grande variedade de micro-organismos, que inclui bactérias, fungos, leveduras, actinomicetos e algas, são produtores eficientes e de baixo custo de L-asparaginase (NARTA *et al.*, 2007). No entanto, nem todas as L-asparaginases apresentam atividade antileucêmica (VAN DEN BERG, 2011), além disso, as propriedades destas enzimas variam de organismo para organismo (NARTA *et al.*, 2007). Na tabela 2.2 são apresentados alguns micro-organismos produtores e as propriedades de suas respectivas enzimas. Cabe resaltar que a L-asparaginase só tem sido produzida em grandes quantidades a partir de duas espécies bacterianas, *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (KURTZBERG, 2000; KOTZIA E LABROU, 2005).

A enzima produzida por *E. coli* é ativa a 37°C em uma ampla faixa de pH, de 4,5 a 11,5 (STECHEER *et al.*, 1999). Outros micro-organismos produtores de L-asparaginase são: *Zymomonas mobilis* (ABUD, 2005), *Bacillus brevis* (NARTA *et al.*, 2011), *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Thermus aquaticus*, *Rhodotorula sp.*, entre outros (VERMA *et al.*, 2007).

Tabela 2.2 Propriedades de algumas L-asparaginases (SINGH *et al.* (2013); SAVITRI *et al.* (2003); KURTZBERG (2000); DUNLOP *et al.* (1978).

Micro-organismo produtor	pH ótimo	Temperatura ótima	<i>K_m</i> (M)
<i>Escherichia coli</i> (tipo II)	-	-	1,2x10 ⁻⁵
<i>Erwinia carotovora</i>	8,0	50	1,8x10 ⁻⁵
<i>Pseudomonas</i> 7A	7,2	37	4,4x10 ⁻⁶
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	7,0	40	2,5x10 ⁻³
<i>Vibrio succinogenes</i>	8,5	37	1,7x10 ⁻⁵
<i>Bacillus</i> sp.	8,0	37	2,4x10 ⁻⁴
<i>Aspergillus terreus</i>	5-7	40-45	5,8x10 ⁻⁴
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	9,0	37	1,4x10 ⁻⁴
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,8	-	3,5x10 ⁻⁴
<i>Bacillus aryabhatai</i> ITBHU02	8,5	40	2,57x10 ⁻⁴

Muitos estudos têm sido feitos sobre L-asparaginases de diversos micro-organismos, tanto da produção da proteína por seus micro-organismos de origem como em micro-organismos recombinantes. Sistemas recombinantes utilizando *E. coli* como hospedeiro têm sido utilizados para produção de L-asparaginases de outros micro-organismos. GUO *et al.* (2002) demonstraram que a L-asparaginase de *Escherichia coli* AS-1357, clonada e expressa em *E. coli* tem grande potencial como agente antimetabólico quando comparada à enzima selvagem. A enzima de *Erwinia chrysanthemi* também foi expressa em *E. coli* (KOTZIA E LABROU, 2007), assim como a enzima de *Erwinia carotovora* (KOTZIA E LABROU, 2005; WINK *et al.*, 2010). A tabela 2.3 mostra alguns dos trabalhos com L-asparaginase recombinante nos últimos anos utilizando diferentes cepas de *E.coli* como hospedeiras.

Tabela 2.3 L-asparaginases recombinantes descritas na literatura

Micro-organismo de origem	Sistema de expressão (Hospedeiro) / Plasmídeo	Referência
<i>Escherichia coli</i> AS-1357	<i>E. coli</i> (PKA/CPU 210009)	GUO <i>et al.</i> (2002)
<i>Escherichia coli</i> K-12	<i>E. coli</i> BLR (DE3) / pET22b	KHUSHOO <i>et al.</i> (2004)
<i>Erwinia carotovora</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS / pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	KOTZIA E LABROU (2005)
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS / pCR [®] T7/CT-TOPO [®]	KOTZIA E LABROU (2007)
<i>Helicobacter pylori</i> HP26695	<i>E. coli</i> BL21(DE3) / pET101	CAPPELLETTI <i>et al.</i> (2008)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	<i>E. coli</i> Codon Plus Rosetta / pET14b	BANSAL <i>et al.</i> (2010)
<i>Erwinia carotovora</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) / pET30a	WINK <i>et al.</i> (2010)
<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	<i>E. coli</i> BL21(DE3) / pBAD24	POKROVSKY <i>et al.</i> (2012)

Quando a produção da enzima é realizada através de micro-organismos recombinantes, diferentes modos de produção e purificação podem ser utilizados levando em consideração a cepa e o plasmídeo empregados. A estratégia de clonagem utilizada influencia diretamente na produção, purificação e conformação da proteína. Desta forma, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com L-asparaginases recombinantes, utilizando diversas formas de produção e purificação. A L-asparaginase de *E. coli* AS1.357 foi clonada, utilizando o plasmídeo pBV220, e expressa em cinco diferentes cepas de *Escherichia coli*: JM105, JM109, TG1, DH5 α e na própria cepa de origem da L-asparaginase, AS1.357. Estas expressões foram realizadas durante 4 horas, conduzidas em frascos agitados e induzidas por choque térmico. A melhor produção foi observada na cepa AS1.357, que apresentou atividade de 228 UI/mL (WANG *et al.*, 1999). Em outro trabalho utilizando a enzima nativa de *Escherichia coli*, a L-asparaginase tipo II de *E. coli* K-12 foi clonada em *E. coli* BLR (DE3), expressa e purificada (KHUSHOO *et al.*, 2004). Neste trabalho os autores realizaram a expressão extracelular da proteína através do uso da sequência sinal *pelB* de *Erwinia carotovora*, presente no vetor pET22b, no qual o gene foi clonado. Após 24 horas de indução com IPTG, em meio de cultivo TB (Terrific Broth), foi obtida

atividade de 20,9 UI/L (0,02UI/mL) (KHUSHOO *et al.*, 2004). A proteína foi expressa fusionada a uma cauda de histidina na parte amino-terminal da cadeia; desta forma, foi purificada em coluna de níquel, utilizando apenas uma etapa de purificação. (KHUSHOO *et al.*, 2004). Em outro trabalho, utilizando o mesmo clone (*E. coli* BLR (DE3) e pET22b), a enzima foi expressa em biorreator operando em batelada alimentada, utilizando meio de cultura TB e alimentação com solução de extrato de levedura, triptona e glicerol, mantendo a taxa específica de crescimento em $0,3 \text{ h}^{-1}$. A expressão da enzima foi induzida quando a concentração celular atingiu 32,5 g/L, sendo obtida atividade enzimática no meio de cultivo de 870 UI/mL e concentração celular de 45 g/L em 24 horas de indução e 35 horas de cultivo total (KHUSHOO *et al.*, 2005).

KOTZIA E LABROU (2005) clonaram, expressaram e purificaram L-asparaginase de *Erwinia carotovora* em *E. coli* BL21(DE3) pLysS utilizando o plasmídeo pCR®T7/CT-TOPO®. A produção neste trabalho foi realizada em cultivos batelada em frascos agitados, com meio de cultura LB (Luria-Bertani), sendo a expressão realizada durante 5 horas (KOTZIA E LABROU, 2005). A L-asparaginase tipo II de *Erwinia carotovora* (*subsp. atroseptica*) também foi clonada e expressa em *E. coli* C41(DE3), com seu peptídeo sinal nativo, e em *E. coli* BL21(DE3), sem o peptídeo sinal (WINK *et al.*, 2010). ROTH *et al.* (2013) testaram diferentes cepas de *E. coli* para a expressão da enzima tipo II de *Erwinia carotovora* clonada no vetor pET30a, sendo que a cepa C43 (DE3) foi a que apresentou melhores resultados em cultivos em frascos agitados. Neste caso os níveis de expressão foram maiores quando o cultivo foi realizado a 30°C do que a 37°C . Neste mesmo trabalho, os autores pesquisaram a produção da enzima, utilizando a cepa *E. coli* C43 (DE3), em cultivo em biorreatores, sendo que os experimentos foram realizados utilizando meio de cultura TB a 30°C . O modo de operação utilizado foi batelada alimentada, sendo o cultivo dividido em três fases: batelada, alimentação, alimentação com indução. A taxa de crescimento foi mantida em $0,6 \text{ h}^{-1}$ na fase batelada, $0,1 \text{ h}^{-1}$ na fase de alimentação e variando entre 0,08 e $0,02 \text{ h}^{-1}$ na fase de alimentação com indução. Em 30 horas de cultivo, os autores obtiveram 30,7 g/L de células e 0,9 mg de L-asparaginase recombinante por litro de meio de cultura (ROTH *et al.*, 2013).

Outra L-asparaginase recombinante produzida utilizando *E. coli* como hospedeiro foi a enzima de *H. pylori* CCUG 17874 (CAPPELLETTI *et al.*, 2008). Neste trabalho os autores expressaram a enzima no citoplasma da cepa *E. coli* BL21(DE3), fusionada a uma cauda de histidina, utilizando o vetor pET 101. A expressão foi

realizada em frascos agitados e induzida por 7 horas utilizando IPTG como indutor (CAPPELLETTI *et al.*, 2008). A utilização de sistemas recombinantes também possibilitou a produção de L-asparaginase de um micro-organismo termófilo, *P. furiosus*. Esta L-asparaginase foi clonada no vetor pET14b e expressa na cepa *E. coli* Codon Plus Rosetta. A expressão foi conduzida em frascos agitados por 6 horas e induzida por IPTG, sendo a enzima posteriormente purificada utilizando cromatografia de afinidade com níquel (BANSAL *et al.*, 2010). Em trabalho posterior, BANSAL *et al.* (2012) mostraram que a sequência de aminoácidos da enzima de *P. furiosus* apresenta 22% de identidade com a sequência da L-asparaginase tipo II de *Escherichia coli*, que é utilizada nos protocolos de tratamento de leucemia. Além disso, este trabalho testou a L-asparaginase de *P. furiosus* expressa quanto à sua citotoxicidade em linhagens de células leucêmicas. Nestes testes a enzima apresentou atividade antileucêmica e uma melhor atividade anti-proliferativa quando comparada aos testes utilizando a enzima L-asparaginase tipo II de *E. coli* (BANSAL *et al.*, 2012).

2.2 A bactéria *Zymomonas mobilis* e sua L-asparaginase

A bactéria *Zymomonas mobilis* foi isolada da cidra em 1911, por Baker e Hillier. No início dos anos 1950, Gibbs e DeMoss descobriram que o catabolismo anaeróbico da glicose desta bactéria segue a via de Entner-Doudoroff, sendo a *Zymomonas* uma das poucas bactérias anaeróbicas que utilizam esta via (SWINGS E DE LEY, 1977). *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, geralmente móvel, não esporulada, anaeróbia facultativa (SWINGS E DE LEY, 1977; TOMA *et al.*, 2003). Esta bactéria é amplamente conhecida por ser produtora de etanol. Além disso, ela possui alta tolerância para o etanol e tem boa resistência aos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos (GRANGE *et al.*, 2010).

No Brasil, a bactéria começou a ser estudada na década de 50 por pesquisadores do nordeste brasileiro (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1970), sendo relatada por ter propriedades terapêuticas. Há relatos de aplicações terapêuticas de culturas de *Zymomonas* em casos de enterocolites bacterianas e infecções ginecológicas (WANIK E SILVA, 1971; LOPES *et al.*, 1980). Além disso, a bactéria apresentou proteção contra infecção por *Schistosoma mansoni* quando a cultura de *Z. mobilis* foi administrada oralmente em camundongos (SANTOS *et al.*, 2004). *Z. mobilis* também tem sido utilizada para o desenvolvimento de probióticos (JALES *et al.*, 2007) e para a produção de levana, substância que tem apresentado atividade antitumoral (CALAZANS *et al.*, 1997; CALAZANS *et al.*, 2000).

O Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ (localizado na cidade do Rio de Janeiro – Brasil) utiliza há alguns anos a bactéria *Z. mobilis* para o estudo e produção de várias substâncias, como etanol, ácido glicônico, sorbitol e ácido lactobiônico (ALVES, 1993; WILBERG, 1996; FERRAZ, 1999; FONSECA, 2003; SEVERO JÚNIOR, 2008). Além disso, o laboratório vem estudando o cultivo de *Z. mobilis* visando à produção da enzima L-asparaginase (PINHEIRO, 2001; ABUD, 2005). O trabalho de PINHEIRO (2001) começou os estudos de cultivo desta bactéria com o objetivo de produzir L-asparaginase, utilizando L-asparagina como única fonte de nitrogênio. Já o trabalho de ABUD (2005) analisou a reprodutibilidade da produção de L-asparaginase pela bactéria *Z. mobilis* em processos batelada, desenvolvendo um modelo cinético para descrever o processo de produção e otimizar a produção da enzima. Em seus estudos, ABUD (2005) estimou o Km (constante de Michaelis-Menten) da enzima no valor de $1,5 \times 10^{-5} \text{M}$, evidenciando uma grande afinidade da L-asparaginase de *Z. mobilis* pelo substrato L-asparagina. Este valor é muito próximo ao valor do Km da enzima L-asparaginase tipo II de *E. coli* que é a enzima que possui atividade antileucêmica. Além disso, ABUD (2005) mostrou que a enzima de *Z. mobilis* é uma L-asparaginase periplasmática. Este trabalho gerou um pedido de patente no qual a enzima L-asparaginase nativa de *Z. mobilis* foi obtida em cultivos em meio líquido em frascos agitados com atividade de 37,79 UI/g de célula ou 0,005UI/mL de meio de cultura em 33 horas de cultivo (ABUD *et al.*, 2004).

Na literatura é possível encontrar outro estudo da produção de L-asparaginase nativa a partir de *Zymomonas mobilis*. Neste estudo, também realizado no Brasil, os autores obtiveram 0,016 UI/mL em 21 horas de cultivo a 30°C, em frascos sem agitação (NETO *et al.*, 2006).

2.3 Produção de proteínas recombinantes

Atualmente, para suprir as necessidades e demanda das indústrias, proteínas são produzidas em altos níveis utilizando engenharia genética, as chamadas proteínas recombinantes. A chegada da tecnologia do DNA recombinante transformou o cenário das indústrias de imunobiológicos, vacinas, enzimas, entre outras, possibilitando a produção de importantes proteínas de forma recombinante, segura e em altas quantidades/concentrações (DEMAIN E VAISHNAV, 2009). Nesta seção serão apresentados alguns aspectos importantes na clonagem e expressão de proteínas recombinantes, em especial quando o hospedeiro *Escherichia coli* é utilizado como sistema de expressão.

As proteínas recombinantes podem ser expressas utilizando como hospedeiros: bactérias, leveduras e células de insetos, plantas ou mamíferos (LARENTIS *et al.*, 2006; MADIGAN *et al.*, 2010). A escolha do hospedeiro é de fundamental importância para a produção bem sucedida da proteína desejada e tal escolha deve levar em consideração a estrutura, funcionalidade e complexidade da proteína, assim como a produtividade a ser alcançada (LARENTIS *et al.*, 2006; DEMAIN E VAISHNAV, 2009; MADIGAN *et al.*, 2010). Normalmente, as bactérias são a primeira escolha para expressar proteínas, pois apresentam inúmeras vantagens como rápido crescimento, facilidade de trabalhar em grandes escalas, facilidade de manipulação genética, entre outras (GREENE, 2004). Se a proteína requer modificações pós-traducionais para ser funcional, como glicosilações, por exemplo, é necessário escolher um sistema de expressão eucariótico (GREENE, 2004; LARENTIS *et al.*, 2006; DEMAIN E VAISHNAV, 2009). O hospedeiro mais adequado, normalmente, é aquele de célula mais simples capaz de produzir a proteína desejada de forma funcional, com os menores custos e tempos de processos possíveis (GREENE, 2004).

Além do hospedeiro, para a produção da proteína recombinante, o gene da proteína a ser expresso deve primeiramente ser inserido em um vetor. Os vetores são formados por estruturas como: sítios de múltipla clonagem ou de ligação do gene isolado, promotores, origens de replicação, marcadores seletivos e sítios iniciadores e terminadores da transcrição e da tradução (LARENTIS *et al.*, 2006). Os vetores se auto-replicam e regulam a expressão dos genes neles codificados (MADIGAN *et al.*, 2010). Dentre os vetores, os plasmídeos são os utilizados nos trabalhos descritos para a clonagem e expressão do gene de L-asparaginase, incluindo este estudo. Plasmídeos são estruturas de DNA circular extracromossomal, que se auto-replicam, encontrados tanto em procarionotos quanto em eucariotos (PALOMARES *et al.*, 2004; MADIGAN *et al.*, 2010; EINSFELDT, 2010). Plasmídeos são muito utilizados para expressão de genes em procarionotos, uma vez que a manipulação genética destes vetores é relativamente simples (PALOMARES *et al.*, 2004). Este tipo de vetor pode ser encontrado naturalmente em bactérias, sendo replicados e passados para as novas células geradas durante a divisão celular. Os plasmídeos utilizados para a expressão de proteínas recombinantes normalmente possuem um gene que confere resistência a algum antibiótico para selecionar as células com plasmídeo das células sem o vetor (LARENTIS *et al.*, 2006; MADIGAN *et al.*, 2010).

Além dos vetores e hospedeiro utilizados, a produção de proteínas recombinantes envolve vários outros fatores que devem ser considerados e profundamente conhecidos, como as características da proteína a ser produzida, o compartimento celular em que a proteína será expressa, o processo utilizado e a purificação da proteína. Alguns fatores podem influenciar o nível de expressão da proteína, como as características estruturais do gene a ser expresso, os códons utilizados na sequência do gene, o enovelamento correto da proteína, a estabilidade e eficiência do mRNA, a toxicidade da proteína para a célula hospedeira e a degradação da proteína por proteases (SCHUMANN E FERREIRA, 2004; LARENTIS *et al.*, submetido).

2.3.1 *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para expressão de proteínas recombinantes (BANEYX, 1999; LARENTIS *et al.*, 2006; TERPE, 2006; DEMAINE VAISHNAV, 2009; EINSFELDT *et al.*, 2011; GOPAL E KUMAR, 2013). A utilização desta bactéria como sistema de expressão apresenta inúmeras vantagens, como a capacidade de crescer rapidamente em altas concentrações celulares e em substratos baratos, a facilidade do cultivo, a genética é bem caracterizada e o genoma pode ser modificado com facilidade (BANEYX, 1999; LARENTIS *et al.*, 2006; EINSFELDT *et al.*, 2011, LARENTIS *et al.*, submetido) . Além disso, estão disponíveis comercialmente vários vetores e cepas mutantes, próprias para produção de proteínas recombinantes (BANEYX, 1999; PETI E PAGE, 2007; DEMAINE VAISHNAV, 2009). Outra vantagem das células de *E. coli* é que estas têm capacidade de acumular mais de 80% da sua massa seca em proteína recombinante. Os cultivos de *E. coli* em altas densidades celulares podem apresentar concentrações celulares entre 20 g/L e 175 g/L (DEMAINE VAISHNAV, 2009).

A utilização de *E. coli* como sistema de expressão também apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de produzir proteínas biologicamente ativas e solúveis, com formação de corpos de inclusão, dificuldade de produzir proteínas com pontes de enxofre e múltiplas subunidades (BANEYX, 1999; LARENTIS *et al.*, 2006; DEMAINE VAISHNAV, 2009). Além disso, esta bactéria não é capaz de produzir proteínas glicosiladas (DEMAINE VAISHNAV, 2009). A produção de acetato é um obstáculo a ser superado durante a produção em altas concentrações celulares, já que concentrações elevadas reduzem o crescimento celular (ARISTIDOU *et al.*, 1995; LARENTIS *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2009; LARENTIS *et al.*, submetido). Alguns

autores afirmam que valores em torno de 0,9 a 1,5 g/L prejudicam a expressão da proteína recombinante (ARISTIDOU *et al.*, 1995) e que valores acima de 5g/L reduzem a taxa de crescimento celular (TRIPATHI *et al.*, 2009). Este composto tende a ser formado quando a taxa específica de crescimento celular ultrapassa 0,2 h⁻¹, quando em meio de cultura complexo, e 0,35 h⁻¹ quando em meio de cultura definido, sendo que estes valores variam de acordo com as cepas e os meios de cultura utilizados (TRIPATHI *et al.*, 2009).

Como mencionado anteriormente, uma das desvantagens da utilização de *E. coli* para superprodução de proteínas recombinantes é a formação de corpos de inclusão (BANEYX, 1999; LARENTIS *et al.*, 2006). Os corpos de inclusão são agregados insolúveis resultantes de problemas na conformação, que possuem em sua composição não apenas cadeias de proteínas, mas também diversas impurezas (BANEYX, 1999; SCHUMANN E FERREIRA, 2004; TERPE, 2006), que provavelmente ocorrem, pois durante a superprodução das proteínas a capacidade do sistema de chaperonas é extrapolado. As chaperonas são responsáveis pelo enovelamento correto e secreção das proteínas, assim como, pela ação proteolítica sobre as proteínas com má formação (SØRENSEN E MORTENSEN, 2005; MERGULHÃO *et al.*, 2005). Outra desvantagem apresentada pela utilização de *E. coli* como sistema de expressão é a presença de lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas pirogênicas para humanos e outros mamíferos, que devem ser completamente removidas durante a purificação (TERPE, 2006).

Para superar os problemas apresentados e melhorar a produção e a solubilidade das proteínas expressas, muitos estudos têm sido desenvolvidos e algumas estratégias podem ser adotadas. A escolha do vetor em que será clonado o gene de interesse é muito importante, em alguns casos, é possível mudar o vetor para minimizar ou superar os problemas apresentados durante a expressão (GOPAL E KUMAR, 2013). O plasmídeo utilizado está fortemente associado à eficiência da produção de proteína, sendo que esta pode ser melhorada dependendo do promotor e sua regulação, da eficiência de ligação ao ribossomo, da origem de replicação, número de cópias e dos marcadores de resistência presentes no plasmídeo (MAKRIDES, 1996; SØRENSEN E MORTENSEN, 2005; JANA E DEB, 2005). Vários plasmídeos utilizam o sistema de promotor do bacteriófago T7 (BANEYX, 1999), isto porque, a enzima T7 RNA polimerase é capaz de estender cadeias cinco vezes mais rápido que a RNA polimerase de *E. coli*. O gene que codifica a T7 RNA polimerase foi inserido no cromossomo de algumas cepas de *E. coli*, como a BL21 (DE3), sob

controle de um promotor derivado do sistema *lac* (TERPE, 2006), que é um sistema composto por uma região de promotor/operador que antecede os genes a serem transcritos. Neste sistema, na ausência de um indutor, o repressor do sistema, codificado pelo gene *lacI*, impede a transcrição através de sua ligação ao operador (SCHUMANN E FERREIRA, 2004). Este sistema permite uma forte indução da produção da enzima T7 RNA polimerase pela adição de IPTG ou lactose (TERPE, 2006; PETI E PAGE, 2007).

Outra estratégia que pode ser adotada para superar alguns problemas apresentados durante a expressão heteróloga em *E. coli* é a mudança da cepa de expressão. Atualmente, estão disponíveis comercialmente diferentes cepas de *E. coli* com diversas alterações genéticas próprias para cada tipo de expressão, dependendo da proteína a ser produzida, plasmídeo ou estratégia utilizada (LARENTIS *et al.*, 2006). Por exemplo, expressões que utilizam vetores do sistema pET, que utiliza o promotor T7, devem ser realizadas em cepas que contenham em seu genoma o gene que codifica a enzima T7 RNA polimerase, como é o caso da cepa *E. coli* BL21(DE3). No genoma desta cepa também foram deletados os genes de duas importantes proteases, *Lon* e *OmpT*, para evitar a degradação da proteína recombinante. Quando a proteína a ser produzida utiliza códons raros em *E. coli*, é possível utilizar cepas modificadas que possuem maior frequência destes códons que são raros em cepas não modificadas (GOPAL E KUMAR, 2013). Recentemente, foi desenvolvida a cepa Lemo21(DE3), que pode ser escolhida como hospedeiro, quando o promotor T7 é utilizado, para expressão de proteína de membrana, para proteínas tóxicas ou quando ocorrem problemas de corpos de inclusão (SCHLEGEL *et al.*, 2012; GOPAL E KUMAR, 2013). Nesta cepa, a atividade da T7 RNA polimerase é modulada por seu inibidor natural, a T7 lisozima. O gene da enzima T7 lisozima está sob controle do promotor de ramnose, sendo possível controlar os níveis de expressão variando a quantidade de ramnose adicionada no sistema (SCHLEGEL *et al.*, 2012).

Para melhorar a expressão, também é possível mudar a sequência do gene de interesse. A deleção de regiões transmembranares e peptídeos sinais, frequentemente melhoram os níveis de expressão e solubilidade da proteína (LARENTIS *et al.*, 2011; GOPAL E KUMAR, 2013). Além disso, para diminuir ou evitar a formação de agregados insolúveis é possível modificar algumas condições do processo como temperatura de expressão e pH, ou ainda, co-expressar as chaperonas (TERPE, 2006). Já o problema de produção excessiva de acetato pode ser contornado através da manutenção da taxa específica de crescimento em níveis adequados para impedir

a formação deste composto (DEMAIN E VAISHNAV, 2009; TRIPATHI *et al.*, 2009; LARENTIS *et al.*, submetido), ou através da utilização de glicerol como fonte de carbono (TRIPATHI *et al.*, 2009).

As proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* podem ser expressas no citoplasma ou podem ser direcionadas para o periplasma ou para o meio de cultivo através da fusão com um peptídeo sinal que direcione a sua translocação. A estratégia mais utilizada é a produção no citoplasma e é a que normalmente apresenta os maiores rendimentos (SORENSEN E MORTENSEN, 2005; DEMAIN E VAISHNAV, 2009). Já a expressão extracelular de proteínas recombinantes pode ser uma solução para problemas comuns associados à expressão de proteínas em *E. coli*, e que interferem no processo de purificação das mesmas. A proteína expressa e secretada no meio de cultivo possui poucos contaminantes, já que *E. coli* não secreta muitas proteínas no meio de cultura; além disso, a célula não precisa ser lisada para a extração da proteína, facilitando o processo de purificação. Normalmente, as proteínas secretadas no meio de cultivo são mais solúveis, relativamente livres de endotoxinas e são menos prejudiciais à célula hospedeira. Em *Escherichia coli* não há rotas eficientes para a translocação da proteína através da membrana externa, sendo assim, as proteínas podem ser exportadas para o periplasma, de onde passam para o meio extracelular. Algumas sequências sinalizadoras são utilizadas para a exportação das proteínas para o espaço periplasmático, de onde podem ser secretadas por transporte passivo para o meio de cultivo, tais como PhoA, OmpA, OmpT e OmpF (nativas de *E. coli*), pelB (nativo de *Erwinia carotovora*), entre outras (SHOKRI *et al.*, 2003; KHUSHOO *et al.*, 2004; MORGULHÃO *et al.*, 2005; SORENSEN E MORTENSEN, 2005). Apesar de detalhes sobre o direcionamento para o meio extracelular não serem completamente esclarecidos, acredita-se que as proteínas sejam secretadas do periplasma para o meio de cultivo por transporte passivo através das estruturas da membrana desestabilizadas (SORENSEN E MORTENSEN, 2005).

Com o intuito de aumentar o rendimento da proteína recombinante é possível aumentar a densidade celular no cultivo. Para tanto algumas variáveis do processo devem ser estudadas e manipuladas, como: temperatura, composição do meio de cultivo, modo de operação do biorreator e aeração (HANNING E MAKRIDES, 1998; BANEYX, 1999; JANA E DEB, 2005; SØRENSEN E MORTENSEN, 2005; PETI E PAGE, 2007; TRIPATHI *et al.*, 2009, LARENTIS *et al.*, submetido). Além disso, uma questão importante para produção em altas densidades celulares e superexpressão de

proteínas, utilizando vetores de expressão, é a estabilidade plasmidial. Esta questão será discutida com detalhes no próximo item.

2.3.2 Estabilidade plasmidial

Uma das questões mais importantes no processo de produção de proteínas recombinantes é a estabilidade plasmidial, particularmente em larga escala, quando é preciso manter os altos rendimentos de produto na produção industrial (GUPTA *et al.*, 1995; TRIPATHI *et al.*, 2009; EINSFEDLT *et al.*, 2011; LARENTIS *et al.*, submetido). Existem dois tipos de instabilidade plasmidial: a instabilidade estrutural e a segregação plasmidial. A instabilidade estrutural é caracterizada por alterações nas estruturas do plasmídeo, ocorrendo alterações na sequência de nucleotídeos, inserções, deleções ou rearranjos no DNA. A segregação plasmidial é caracterizada pela perda do plasmídeo durante a divisão celular (GUPTA *et al.*, 1995; FRIEHS, 2004; SILVA *et al.*, 2012). Neste processo, a taxa de crescimento específico de células sem plasmídeo é maior quando comparado à de células com plasmídeo, fazendo com que as células que perdem o plasmídeo tornem-se dominantes no cultivo. Uma vez que a manutenção do plasmídeo dentro das células filhas é essencial para manter a produtividade da proteína recombinante (TRIPATHI *et al.*, 2009), a perda do plasmídeo pode afetar drasticamente esta produtividade (FRIEHS, 2004). Segundo FRIEHS (2004), nenhuma conclusão real pode ser feita sobre a produtividade da proteína recombinante sem um estudo para determinar a estabilidade plasmidial no processo. Na literatura, na maioria das vezes, a expressão “instabilidade plasmidial” se refere à segregação plasmidial (FRIEHS, 2004), o que ocorrerá também neste trabalho.

A estabilidade plasmidial é influenciada por muitos fatores, como a taxa de crescimento celular, o número de cópias do plasmídeo, o tamanho do inserto e do plasmídeo, o nível de expressão da proteína recombinante e a toxicidade da proteína recombinante. Além disso, o meio de cultivo utilizado, a concentração de oxigênio dissolvido, o pH, a temperatura, o tipo e a concentração de indutor, e o modo de operação do cultivo podem afetar de maneira significativa a estabilidade plasmidial (GUPTA *et al.*, 1995; FRIEHS, 2004; XU *et al.*, 2006; TRIPATHI *et al.*, 2009; EINSFELDT, 2010; POPOV *et al.*, 2011; EINSFELDT *et al.*, 2011).

Os plasmídeos conferem uma carga metabólica elevada ao hospedeiro, uma vez que ocorre uma demanda energética na célula, além das funções metabólicas normais, para replicar o plasmídeo e expressar os genes nele contidos (PALOMARES

et al., 2004). Alguns autores afirmam que a carga metabólica imposta à célula pelo plasmídeo é um dos fatores responsáveis pela instabilidade plasmidial (CORCHERO E VILLAVERDE, 1998; SILVA *et al.*, 2012). Alguns estudos mostram que ocorre uma diferença no nível de expressão de diversos genes entre células de *E. coli* com plasmídeo e sem plasmídeo, como genes envolvidos na síntese e metabolismo de aminoácidos e proteínas, no metabolismo de carboidratos e genes de proteínas de choque térmico (SILVA *et al.*, 2012). Há também a questão de número de cópias do plasmídeo por célula. Alguns autores afirmam que plasmídeos de alto número de cópias por célula favorecem a estabilidade plasmidial, visto que aumentam as chances de pelo menos um plasmídeo estar presente na célula (FRIEHS, 2004). Já outros autores relatam que a presença de muitas cópias de plasmídeo por célula pode aumentar a perda do plasmídeo (BANEYX, 1999). O tamanho do plasmídeo também influencia na segregação plasmidial, sendo que plasmídeos maiores podem apresentar maior instabilidade (FRIEHS, 2004).

A composição do meio de cultivo também afeta a estabilidade plasmidial. Alguns autores afirmam que meios de cultura mais complexos diminuem a estabilidade plasmidial (GUPTA *et al.*, 1995), que a adição de extrato de levedura diminui e que cultivos em meios mínimos apresentam maior estabilidade plasmidial que aqueles em meios com aminoácidos (FRIEHS, 2004). No entanto, em seus estudos, GOYAL *et al.* (2009) observaram que a adição de extrato de levedura e triptona não causou o aumento da segregação plasmidial. A concentração de oxigênio dissolvido também pode influenciar na segregação. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido leva a uma diminuição da estabilidade plasmidial (FRIEHS, 2004, SILVA *et al.*, 2012), visto que a diminuição da concentração de oxigênio no meio diminui a geração de energia pelo catabolismo celular e pode afetar a replicação e partição do plasmídeo. Isso ocorre porque a replicação e a transcrição de um plasmídeo com múltiplas cópias requer uma grande quantidade de energia (LARENTIS *et al.*, 2006).

Além do oxigênio dissolvido, o pH também pode afetar a estabilidade plasmidial. Meios de cultura com pH baixo causam estresse às células e desta forma contribuem para diminuir a estabilidade plasmidial (SILVA *et al.*, 2012). Sabe-se também que é possível melhorar a estabilidade plasmidial diminuindo a taxa específica de crescimento celular, o que pode ser alcançado através da diminuição da temperatura ou pela substituição da fonte de carbono do meio de cultivo (SELVAMANI *et al.*, 2014). Além disso, quando o cultivo de células é realizado em alta densidade

celular ou de forma contínua, a instabilidade plasmidial tende a aumentar (BANEYX, 1999).

A indução da expressão da proteína é um dos principais fatores que diminuem a estabilidade plasmidial, aumentando a segregação plasmidial, provavelmente devido à sobrecarga metabólica imposta à célula e aos possíveis efeitos tóxicos da proteína para a célula (FRIEHS, 2004; XU *et al.*, 2006; EINSFELDT, 2010; EINSFELDT *et al.* 2011). Em seus estudos, XU *et al.* (2006) e EINSFELDT *et al.* (2011) mostraram que a instabilidade plasmidial depende mais da indução em si do que da presença do antibiótico no meio de cultivo. EINSFELDT *et al.* (2011) mostraram que a estabilidade de um plasmídeo da família pET foi influenciada negativamente pela concentração de IPTG na faixa de 0,1 a 1 mM e não sofreu influência da concentração de antibiótico (nas concentrações de 0-50 µg/mL). Além disso, alguns autores afirmam que o indutor utilizado influencia na estabilidade do plasmídeo, sendo que a indução com IPTG apresenta maior perda do plasmídeo que aquela feita com lactose (FRIEHS, 2004).

Durante a produção de proteínas recombinantes, muitas vezes, antibióticos são utilizados no meio de cultivo para exercerem pressão seletiva sobre as células (BANEYX, 1999; FRIEHS, 2004; TRIPATHI *et al.*, 2009), mantendo no cultivo, teoricamente, apenas as células com o plasmídeo que possui o gene de resistência ao antibiótico. No entanto, a perda plasmidial pode ocorrer mesmo na presença de antibiótico (pressão seletiva), por degradação ou esgotamento do antibiótico do meio de cultivo, ou por algum outro mecanismo ainda não compreendido (EINSFELDT, 2010; EINSFELDT *et al.*, 2011). Durante longos períodos de cultivo deve-se levar em consideração a estabilidade do antibiótico em questão e sua alimentação durante o cultivo para manter a estabilidade do plasmídeo (TRIPATHI *et al.*, 2009). Um dos problemas do uso de antibiótico é a contaminação da biomassa e do produto (BANEYX, 1999; FRIEHS, 2004; EINSFELDT *et al.*, 2011). Em processos industriais, a utilização de antibióticos acontece nos pré-inóculos e o cultivo principal, normalmente, é realizado sem a adição de antibióticos (TRIPATHI *et al.*, 2009).

2.3.3 Meios de cultura para cultivos de *Escherichia coli*: complexos e quimicamente definidos

Na produção de proteínas recombinantes, a composição do meio de cultivo tem grande influência sobre o metabolismo de *E. coli* e sobre a expressão da proteína recombinante (TRIPATHI *et al.*, 2009). Os meios de cultivo são divididos entre

complexos e quimicamente definidos (MADIGAN *et al.*, 2010), sendo que o crescimento da bactéria pode ser realizado utilizando estes dois tipos de meio de cultivo (TRIPATHI *et al.*, 2009). Os meios de cultivo complexos são compostos por digestos de produtos animais ou vegetais, como extrato de levedura, caseína digerida, extrato de carne, peptona, entre outros. Neste tipo de meio de cultivo não se tem o controle preciso da composição do meio de cultivo. Já os meios de cultura definidos tem sua composição exata conhecida, uma vez que são compostos por quantidades exatas de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos, e sua composição pode ser reproduzida fielmente (SCHMIDELL *et al.*, 2001; MADIGAN *et al.*, 2010).

Como mencionado no parágrafo anterior, os meios de cultura complexos contêm como fonte de nitrogênio e carbono algum substrato complexo, como extrato de levedura ou caseína digerida (STUDIER, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2009). Este tipo de meio suporta o crescimento de várias cepas de *E. coli* e, além disso, o crescimento ocorre normalmente mais rápido que em meios definidos. Uma das desvantagens da utilização destas fontes complexas de nutrientes é a oscilação que ocorre de um lote para outro do substrato e a falta de controle dos componentes presentes no meio de cultivo (STUDIER, 2005; FONTANI *et al.*, 2003; LARENTIS *et al.*, submetido). Alguns meios de cultura complexos utilizados para o crescimento de *E. coli* são: Luria-Bertani (LB), *Terrific Broth* (TB), *Super broth* (SB), que são compostos por triptona ou peptona e extrato de levedura em diferentes concentrações e com diferentes sais (SEZONOV *et al.*, 2007; TRIPATHI *et al.*, 2009; LARENTIS *et al.*, submetido). Quando se trata da adição de extrato de levedura ao meio de cultivo, alguns autores afirmam que uma das vantagens da presença deste substrato é que pode ocorrer a redução da produção de ácido acético pelas células e a diminuição do efeito inibitório deste metabólito sobre a bactéria (TRIPATHI *et al.*, 2009). Outra vantagem seria que as concentrações utilizadas de extrato de levedura, assim como de peptona e alguns sais, podem aumentar a produção das proteínas recombinantes (PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014), no entanto, isto depende da proteína e da cepa empregada como hospedeiro, pois o resultado não é necessariamente o mesmo para todos os sistemas recombinantes (LARENTIS *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2014; LARENTIS *et al.*, submetido)

Quando se trata de meios quimicamente definidos, normalmente, o crescimento celular é mais lento quando comparado a meios complexos, no entanto, este tipo de meio de cultura possibilita um melhor controle e monitoramento do processo (TRIPATHI *et al.*, 2009), evitando a presença de componentes que podem

estar em concentrações inibitórias para o metabolismo da *E. coli* ou para a expressão da proteína recombinante (FONTANI *et al.*, 2003; NICCOLAI *et al.*, 2003; LARENTIS *et al.*, submetido). Desta forma, os meios de cultivo definidos são utilizados frequentemente para obter altas densidades celulares, pois é possível um ótimo controle dos nutrientes durante o processo. Outra vantagem da utilização do meio definido surge no momento da purificação, que é facilitada neste caso (TRIPATHI *et al.*, 2009).

Uma das fontes de carbono que podem ser utilizadas em meios definidos para suportar o crescimento de *E. coli* é a glicose. A utilização de glicose apresenta algumas vantagens, mas também algumas desvantagens. O uso de glicose previne a expressão da proteína antes da indução, mas também impede a indução quando esta é realizada pela lactose. O uso de glicose em excesso pode fazer com que o cultivo se torne tão ácido que o crescimento seja interrompido (STUDIER, 2005, LARENTIS *et al.*, submetido). Como fonte de carbono e energia, *E. coli* também é capaz de utilizar o glicerol (STUDIER, 2005; SELVAMANI *et al.*, 2014). Uma das principais vantagens que o glicerol apresenta sobre a glicose é que sua presença não impede a indução da expressão da proteína pela lactose (STUDIER, 2005). O glicerol é transportado para dentro membrana citoplasmática com o auxílio da proteína GlpF. Dentro do citoplasma, o glicerol pode ser utilizado por duas rotas diferentes dependendo das condições do crescimento (SELVAMANI *et al.*, 2014). A rota preferencial na bactéria é a seguinte: a molécula de glicerol é fosforilada pela glicerol quinase (GlpK), gerando L-glicerol-3-fosfato, e esta molécula é então oxidada a diidroxiacetona fosfato (DHAP) por uma desidrogenase (GlpD em condições aeróbicas e GlpABC na falta de oxigênio). A molécula DHAP é então transformada em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) pela ação da enzima triose fosfato isomerase (TpiA). O GA3P é então oxidado através da via glicolítica. Sabe-se que na ausência da enzima TpiA, o composto DHAP é transformado em um composto tóxico para a célula (SELVAMANI *et al.*, 2014)

Como já apontado, os nutrientes presentes no meio de cultivo podem inibir o crescimento a partir de certas concentrações. As concentrações a partir das quais o crescimento de *E. coli* é inibido, segundo RIESENBERG (1991), são apresentadas na tabela 2.4.

Tabela 2.4 Concentrações de inibição do crescimento de *Escherichia coli* (adaptado de RIESENBERG, 1991).

Composto	Concentração
Glicose	50 g/L
Amônia	3 g/L
Fósforo	10 g/L
Magnésio	8,7 g/L
Molibdênio	0,8 g/L
Boro	44 mg/L
Cobre	4,2 mg/L
Manganês	68 mg/L
Cobalto	0,5 mg/L
Zinco	38 mg/L
Ferro	1,15 g/L

Algumas modificações nos meios de cultivo podem aumentar a produção de proteína. Como exemplo é possível mencionar a adição de glicina, que aumenta a liberação de proteínas do periplasma para o meio de cultivo sem causar lise celular (TRIPATHI *et al.*, 2009). Outro exemplo é a adição de altas concentrações de poliois no cultivo, o que pode auxiliar na diminuição da formação de agregados de proteínas que são secretadas no periplasma (PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014).

2.3.4 Planejamento de experimentos e modelagem matemática de processos com células recombinantes

Durante a produção de proteínas recombinantes muitas variáveis influenciam no processo. Quando se trata de escala industrial estas variáveis são ainda mais numerosas, por isso é de extrema importância conhecer muito bem o processo e suas variáveis, a fim de obter reprodutibilidade e maximizar a produção de forma a tornar o processo economicamente rentável. Para obter informações sobre o processo de produção de uma proteína recombinante, assim como realizar o controle, otimização e aumento de escala deste processo, as técnicas de planejamento de experimentos e a

modelagem matemática se tornam ferramentas poderosas e imprescindíveis (LARENTIS *et al.*, submetido).

Assim como mencionado anteriormente, as variáveis que influenciam na expressão de proteínas recombinantes são numerosas e interagem umas com as outras. É comum, na área de expressão de proteínas recombinantes, os fatores que influenciam no processo serem avaliados variando um fator por vez (SWALLEY *et al.*, 2006; EINSFELDT *et al.*, 2011; PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014, MARINI *et al.*, 2014, LARENTIS *et al.*, submetido). Entretanto, esta estratégia acarreta em um número elevado de experimentos, não permite avaliar as interações entre as variáveis (RODRIGUES E IEMMA, 2005; PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014) e pode não levar ao ponto de máximo dentro das faixas estudadas (MANDENIUS E BRUNDIN, 2008; LARENTIS *et al.*, submetido). A estratégia de variar um fator por vez, na expressão de proteínas recombinantes, tem sido substituída recentemente por técnicas de planejamento de experimentos (PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014; LARENTIS *et al.*, submetido). O planejamento de experimentos é considerado uma importante e poderosa ferramenta para otimização de processos (ILZARBE *et al.*, 2008). Estas técnicas apresentam várias vantagens sobre a estratégia de variar um fator por vez (PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014), como a redução do número de experimentos envolvidos (RODRIGUES E IEMMA, 2005; MANDENIUS E BRUNDIN, 2008; PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014; LARENTIS *et al.*, submetido), redução do tempo dispendido e do custo final do processo, análise de interações e de vários fatores simultaneamente, avaliação dos erros experimentais, e ainda são capazes de otimizar mais de uma variável ao mesmo tempo (RODRIGUES E IEMMA, 2005; LARENTIS *et al.*, submetido).

São várias as técnicas de planejamento de experimentos que existem. Em problemas de engenharia as principais técnicas utilizadas são: planejamentos fatoriais completos e fracionados, delineamento composto central (metodologia de superfície de resposta), Placket-Burmann e Matrix ortogonal de Taguchi (ILZARBE *et al.*, 2008). Apesar das técnicas de planejamento de experimentos permitirem sua utilização separadamente é frequente a utilização destas técnicas em estratégias sequenciais de dois ou mais planejamentos (RODRIGUES E IEMMA, 2005). Normalmente, o primeiro passo em planejamento de experimentos começa com uma primeira investigação das variáveis com efeito significativo, para isso podem ser utilizados planos como os fatoriais fracionados ou Placket-Burmann, por exemplo. Após a determinação das variáveis significativas é realizado um planejamento completo, como o delineamento

composto central, para a otimização das variáveis dentro das faixas estudadas (MANDENIUS E BRUNDIN, 2008; PAPANEOPHYTOU E KONTOPIDIS, 2014).

Como citado anteriormente, os planejamentos fatoriais e fatoriais fracionados estão entre as principais técnicas de planejamento de experimentos utilizados em problemas de engenharia (ILZARBE *et al.*, 2008). Planejamentos fatoriais envolvem combinações entre os níveis de duas ou mais variáveis independentes. São considerados fatoriais completos aqueles em que ocorrem todas as possíveis combinações entre os níveis de cada variável independente, caso todas as combinações possíveis não ocorram, chamamos de fatoriais fracionados. A técnica que será utilizada neste trabalho, o planejamento fatorial fracionado, permite calcular os efeitos principais das variáveis e indica quais as variáveis são significativas estatisticamente e devem ser incluídas nos planejamentos seguintes para a otimização do processo (RODRIGUES E IEMMA, 2005; MARINI *et al.*, 2014).

Como mencionado anteriormente, o planejamento de experimentos tem sido recentemente utilizado para avaliação de variáveis envolvidas nos processos de produção de proteínas recombinantes, bem como, na otimização de tais processos. Neste campo, estas técnicas têm sido utilizadas para avaliação da composição dos meios de cultura (NIKEREL *et al.*, 2005; NIKEREL *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; LARENTIS *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2014) e para as variáveis envolvidas na indução, como temperatura, tempo pós-indução, concentração celular, concentração do indutor e cepa empregada na expressão (LEÓN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005; CAO *et al.*, 2006; SWALLEY *et al.*, 2006; MALDONADO *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2007; LO *et al.*, 2007, EINSFELDT, 2010; LARENTIS *et al.*, 2011b; EINSFELDT *et al.*, 2011; LARENTIS *et al.*, 2011a; MOURA *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2014). No entanto, a utilização das técnicas de planejamento de experimentos ainda não é um procedimento usual para avaliação das variáveis citadas acima e de outras envolvidas no processo de produção de proteínas recombinantes, e seu potencial pode ser mais bem explorado (LARENTIS *et al.*, submetido).

A utilização de modelos matemáticos para a representação de processos recombinantes é uma ferramenta de grande utilidade na análise do desempenho, controle, otimização e aumento de escala do processo. Esta ferramenta pode ser empregada em qualquer fase do processamento, desde a formulação do meio reacional até as etapas finais de separação e purificação de produtos. A instabilidade plasmidial é um dos principais problemas na produção de proteínas recombinantes

utilizando *E. coli* como sistema de expressão (GUPTA *et al.*, 1995; FRIEHS, 2004), e por isso deve ser considerada no desenvolvimento de modelos matemáticos destes processos. IMANAKA E AIBA (1981) foram os primeiros a modelar o fenômeno da instabilidade plasmidial, considerando que as células perdem plasmídeo durante uma divisão celular com uma probabilidade “p”. Desta forma o balanço de massa para as células é descrito pelas equações (2.1) e (2.2).

$$\frac{dX^+}{dt} = (1-p) \cdot \mu^+ \cdot X^+ \quad (2.1)$$

$$\frac{dX^-}{dt} = p \cdot \mu^+ \cdot X^+ + \mu^- \cdot X^- \quad (2.2)$$

onde t é o tempo de operação (h), X é a concentração de células (g/L), p é o coeficiente de segregação (adimensional), μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1}) e os superescritos + e – denotam células com e sem plasmídeo, respectivamente.

A modelagem matemática de culturas recombinantes abordando o fenômeno da estabilidade plasmidial tem sido feita de forma estruturada e não-estruturada, e é possível encontrar vários trabalhos que descrevem diferentes modelos para processos recombinantes prevendo a instabilidade plasmidial (LEE *et al.*, 1988; BENTLEY E KOMPALA, 1989; BENTLEY E KOMPALA, 1990; HORTACSU E RYU, 1991; MIAO E KOMPALA, 1992; MOSRATI *et al.*, 1993; BAHERI *et al.*, 2001, GUPTA *et al.*, 2001; SHENE *et al.*, 2003; GANDURI *et al.*, 2005; MATHUR E CHAND, 2009; POPOV *et al.*, 2011). No entanto, os trabalhos não consideram os efeitos do oxigênio dissolvido para o desenvolvimento dos modelos e também não consideram o efeito da presença de antibiótico no meio de cultivo. Além disso, são raros os trabalhos que modelam a produção de proteína, consumo de substrato e crescimento celular ao mesmo tempo. O desenvolvimento de um modelo matemático para processos com células recombinantes abordando o fenômeno da estabilidade plasmidial, prevendo a produção de proteína, crescimento celular, consumo de substrato, efeito do oxigênio dissolvido e do antibiótico começou a ser desenvolvido por nosso grupo de pesquisa em 2006 e foi utilizado para fins didáticos em um curso sobre bioprocessos com células recombinantes (LARENTIS *et al.*, 2006). Nesta tese ele servirá de base para o desenvolvimento de um modelo matemático capaz de representar o processo de produção de L-asparaginase recombinante.

Outra questão importante no desenvolvimento de processos com células recombinantes é a ampliação de escala. Quando ocorre a passagem de cultivos em frascos agitados para biorreatores pode ocorrer uma diminuição no rendimento de

produção da proteína recombinante (GOYAL *et al.*, 2009), sendo importante estudar e adequar os componentes do meio de cultivo e os parâmetros do biorreator para manter os níveis de produção de proteína (ROTH *et al.*, 2013). Além disso, quando se trata de ampliar a escala de processos com células recombinantes é preciso prestar atenção nos principais obstáculos presentes, como a instabilidade plasmidial, a diminuição da qualidade da mistura dentro do vaso do biorreator, o aumento da exposição das células ao estresse e possíveis mudanças metabólicas (SCHMIDT, 2005). O problema da redução da mistura pode aumentar muito quanto mais forem aumentadas as dimensões do biorreator, aumentado os gradientes, opostos, de substrato e oxigênio, quando é realizada a alimentação de substrato no topo e de oxigênio na parte inferior. As células no topo do biorreator sofrem com o excesso de substrato e ao mesmo tempo com a limitação de oxigênio enquanto as células na base estão em situação oposta. Esta situação acarreta mudanças metabólicas importantes. O excesso de glicose aumenta a formação de acetato, enquanto a limitação de oxigênio leva à formação de outros produtos também prejudiciais ao cultivo, além disso, estas mudanças também podem afetar a estabilidade plasmidial (SCHMIDT, 2005; CASCAVAL *et al.*, 2011). A estabilidade plasmidial é um dos mais importantes problemas do aumento de escala de processos com células recombinantes (LEE *et al.*, 1988; GANDURI *et al.*, 2005; SCHMIDT, 2005). A produtividade de um biorreator com células recombinantes depende muito da capacidade da célula conseguir propagar o plasmídeo para as células-filha durante a duplicação (GANDURI *et al.*, 2005).

Para realizar a ampliação de escala é necessária a escolha de um ou mais parâmetros e coeficientes envolvidos na mistura, aeração, transferência de oxigênio e calor, para serem as variáveis de escalonamento, ou seja, serem mantidos constantes. Estas variáveis de escalonamento podem ser utilizadas sozinhas, combinadas umas com as outras ou com outras variáveis relevantes do processo. Algumas destas possíveis variáveis de escalonamento são o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), a potência por unidade de volume (P/V), velocidade periférica (que relaciona a velocidade de agitação com o diâmetro do impelidor), tempo de mistura, número de Reynolds (Re), taxa de aeração (vvm), coeficiente de transferência de calor, entre outros. Dentre estes parâmetros o $k_L a$ é o mais frequentemente utilizado (SCHMIDT, 2005; GARCIA-OCHOA E GOMEZ, 2009).

3 METODOLOGIA

3.1 Análises utilizando bioinformática

Neste item, além de descrever as análises realizadas com a sequência do gene que codifica a proteína L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*, também serão descritos alguns termos das ferramentas de bioinformática utilizadas neste trabalho.

Primeiramente, a sequência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína L-asparaginase pertencentes à cepa *Z. mobilis* foi buscada no *GenBank*, um banco de dados onde se encontram sequências públicas disponíveis de nucleotídeos e proteínas, sendo que este pode ser acessado pelo sítio do NCBI (*National Center for Biotechnology*), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. A sequência do gene encontrada foi utilizada para a realização de um múltiplo alinhamento através do programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994), capaz de fazer alinhamentos globais de múltiplas sequências. O gene *ans* (*asparaginase*) de *Z. mobilis* foi alinhado com genes de L-asparaginases que apresentam atividade antileucêmica e com genes sem esta atividade. Este múltiplo alinhamento foi realizado com o objetivo de identificar o percentual de identidade e similaridade entre a sequência de *Z. mobilis* e outras sequências que já são utilizadas no tratamento da Leucemia linfoblástica aguda (LLA), assim como identificar o grau de conservação entre estes genes e também a conservação dos seus sítios ativos.

O tamanho, massa molecular e ponto isoelétrico da proteína foram estimados através do programa *Compute pI/Mw tool*, o qual está disponível no sítio http://web.expasy.org/compute_pi/. As possíveis sequências sinalizadoras (peptídeos sinais) presentes na proteína foram verificadas através do programa *SignalP 3.0*. Este programa permite fazer predições de peptídeos sinais e da localização do sítio de clivagem entre a proteína e o peptídeo sinal, de micro-organismos gram-negativos, gram-positivos e eucariotos, utilizando combinações de redes neurais e de modelos escondidos de Markov (BENDTSEN *et al.*, 2004). Para verificar possíveis regiões transmembranares foi utilizado o programa *TMHMM Server v2.0*. Para avaliar a presença de regiões transmembranares é realizada uma predição de regiões hidrofóbicas na sequência de aminoácidos da proteína.

3.2 Meios de cultura

Neste trabalho foram utilizados meio de cultura complexo e meio quimicamente definido. O meio de cultura complexo utilizado foi o LB (Luria-Bertani) (Sigma), composto por 5g/L de extrato de levedura, 10g/L de triptona e 10g/L de NaCl. O meio de cultura quimicamente definido foi baseado no meio descrito por KORZ *et al.* (1995). Os componentes utilizados no meio de cultura e suas composições são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição do meio de cultura quimicamente definido

Compostos	Concentração (g/L)
Glicerol	30
KH ₂ PO ₄	13,3
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
Ácido Cítrico	1,7
EDTA	0,0084
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,015
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0015
H ₃ BO ₃	0,003
Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	0,013
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,0025
FeCl ₃	0,11
Tiamina.HCl	0,0045

3.3 Clonagem de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*

3.3.1 Síntese do gene de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*

O gene de L-asparaginase de *Z. mobilis* utilizado neste trabalho foi sintetizado quimicamente pela empresa *Epoch Life Science Inc.* O desenho do gene foi realizado a partir da sequência de 1101 nucleotídeos do gene da cepa *Z. mobilis* CP4 (ATCC 31821), sendo retirados os nucleotídeos que codificam os primeiros 29 aminoácidos desta sequência, já que estes fazem parte de uma sequência sinalizadora (peptídeo sinal). À sequência do gene que codifica a proteína sem o peptídeo sinal foi adicionada uma sequência de nucleotídeos que codificam seis

histidinas, permitindo a expressão da proteína fusionada com uma cauda de histidina na sua extremidade N-terminal para facilitar posterior purificação por coluna de afinidade com níquel. Também foram adicionados nucleotídeos que codificam a sequência de aminoácidos: Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, um sítio de clivagem da enzima enteroquinase, para posterior retirada da cauda de histidina, isto porque, existem discussões na literatura sobre uma possível interferência da cauda de histidina em produtos para uso humano (LARENTIS *et al.*, 2011a). No entanto, as opiniões sobre o uso da cauda de histidina em produtos para uso humano ainda são muito divergentes.

Os códons utilizados no gene sintético foram otimizados para os códons mais frequentes utilizados por *E. coli*. O gene sintético flanqueado pelas enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* foi inserido nos vetores pET26b e pET28a (Novagen). A sequência do gene sintetizado pode ser visualizada na figura 3.1. O sequenciamento dos vetores com o gene sintético, pET26b/*ans* e pET28a/*ans*, foi realizado pela empresa *Epoch Life Science Inc.*



Figura 3.1 Sequência do gene sintetizado de L-asparaginase de *Z. mobilis* CP4.

3.3.2 Vetores utilizados

Neste trabalho foram utilizados dois vetores diferentes, com o intuito de expressar a proteína em compartimentos diferentes da célula e comparar suas expressões. Os vetores utilizados foram o pET28b (Novagen), para expressão citoplasmática, e o vetor pET26b (Novagen), para expressão extracelular. O vetor pET26b possui uma sequência sinalizadora (peptídeo sinal), *peIB* (nativo de *Erwinia carotovora*), para exportar a proteína para o espaço periplasmático, de onde poderá ser secretada para o meio de cultivo através de transporte passivo. Ambos os vetores utilizam o promotor do bacteriófago T7 RNA polimerase e marcador de resistência à canamicina. O gene sintético flanqueado pelas enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* foi inserido nos vetores mencionados acima, sendo obtidos os vetores pET26b/*ans* e pET28a/*ans*.

3.3.3 Células eletrocompetentes e cepas utilizadas

A cepa *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) foi utilizada como hospedeiro nas rotinas de propagação dos vetores e a cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) foi empregada como hospedeiro nas rotinas de expressão da proteína. A cepa *E. coli* DH5 α é ideal para a propagação do plasmídeo, permitindo a replicação estável de plasmídeos de alto número de cópias. Já a cepa *E. coli* BL21 (DE3) possui o gene que codifica a T7RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*, o qual pode ser induzido por IPTG ou lactose. Além disso, esta cepa é deficiente nas proteases *lon* e *OmpT*, reduzindo a degradação das proteínas heterólogas expressas.

A transformação dos hospedeiros com os plasmídeos pET26b/*ans* e pET28b/*ans* foi realizada por eletroporação das células. Para isso as células passaram por um processo com lavagens sucessivas para a retirada do sal presente no meio de cultivo. Para obter as células eletrocompetentes, uma colônia isolada foi inoculada em meio LB (Luria-Bertani), e então, incubada a 37°C e 200 rpm por 16 horas. Depois deste período, 2,5 mL deste pré-inóculo foi inoculado em 250 mL de LB e incubado a 37°C e 200 rpm até a biomassa atingir a fase exponencial de crescimento (Abs_{600nm} aproximadamente 0,7). O cultivo foi colocado no gelo por 15 minutos e, logo após, centrifugado por 20 minutos a 4000 x g e 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com o mesmo volume de água ultrapura gelada. As células lavadas foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas delicadamente em 20 mL de

água ultrapura gelada. As células foram centrifugadas (nas mesmas condições) e o sobrenadante descartado. Nesta etapa as células foram ressuspensas com 10 mL de glicerol 10% gelado e centrifugadas por 15 minutos a 4000 x g e 4°C. Por fim, as células foram ressuspensas em 1mL de glicerol 10% gelado. Esta dispersão de células foi alíquotada em amostras de 100 µL, as quais foram congeladas rapidamente. As alíquotas com as células eletrocompetentes foram estocadas a -80°C.

3.3.4 Transformação de *Escherichia coli*

As células de *E. coli* eletrocompetentes preparadas foram utilizadas como hospedeiros para os plasmídeos pET26b/*ans* e pET28b/*ans*. A inserção destes plasmídeos nas células foi feita por eletroporação. O método da eletroporação consiste na inserção do plasmídeo na célula mediante um choque elétrico, o qual produz rompimentos transientes na membrana celular.

Para a eletroporação foram misturados 1µL do plasmídeo e 100 µL de *E. coli* eletrocompetente. Cada mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm de distância entre os eletrodos, e então submetida a uma descarga elétrica, com voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω em um eletroporador Gene Pulser® II (Bio-Rad). Após o choque elétrico, rapidamente foram adicionados 1 mL de meio LB e a mistura foi incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 1 hora. Depois deste período, 100µL da mistura foi espalhada em placa LB ágar contendo 50 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. A placa com antibiótico permitiu fazer a seleção das colônias que foram transformadas com o plasmídeo contendo o gene de resistência à canamicina.

3.3.5 Seleção de clones e preparação de estoques em glicerol

A seleção dos clones transformados com o plasmídeo foi feita através do espalhamento das células em meio LB ágar com o antibiótico canamicina. Algumas colônias presentes na placa foram selecionadas, e inoculadas em meio LB líquido com 50 µg/mL de canamicina e incubadas a 37°C e 200 rpm por 16 horas. A partir destes cultivos foram feitos os estoques de glicerol (chamados de banco mãe) para serem armazenados a -80°C e as extrações plasmidiais para a confirmação dos clones. Os estoques em glicerol foram preparados com 100 µL do cultivo e 100 µL de glicerol 50% estéril.

3.3.6 Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial, foi utilizado o *kit QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Este sistema é baseado na separação do DNA plasmidial através de uma membrana de sílica presente dentro de uma coluna. Para realizar as extrações foram utilizados 5 mL de um cultivo de 16 horas das células contendo o DNA plasmidial. Para tanto, foram realizadas todas as etapas conforme protocolo do *kit QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) e o DNA foi isolado na membrana de sílica e posteriormente eluído com 50 µL de água ultrapura estéril. A solução contendo DNA plasmidial foi estocada a -20°C.

3.3.7 Digestão plasmidial

Para a confirmação dos clones, os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão. Para a digestão foi utilizada a enzima de restrição *XhoI*, que digere o plasmídeo na posição 158, no final do gene da L-asparaginase, resultando em uma banda com tamanho de 6301pb no caso do plasmídeo pET28a/*ans* e 6368pb no caso do plasmídeo pET26b/*ans*. As reações de digestão foram realizadas utilizando 4 µL da extração plasmidial (cerca de 320 ng de DNA), 4U de *XhoI* (New England Biolabs), 2 µL do Tampão *Buffer 4* (New England Biolabs), 0,2 µL de BSA (Albumina do soro bovino) 100 mg/mL e o volume completado com água ultrapura até 20 µL. As reações de digestão foram incubadas a 37°C por 2 horas. A enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. As digestões foram visualizadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

3.3.8 Preparação de lote de trabalho

Foram preparados lotes de trabalho dos clones *E. coli* BL21 (DE3) pET26b/*ans* e *E. coli* BL21 (DE3) pET28a/*ans* a partir de uma alíquota do banco mãe. A partir destes lotes foram realizadas todas as expressões da proteína L-asparaginase deste trabalho. O lote de trabalho foi preparado a partir do estoque de glicerol chamado de banco mãe. As cepas foram crescidas em 10 mL de meio LB enriquecido com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina, a 37°C e agitação de 200 rpm, até atingirem Abs_{600nm} de aproximadamente 1,0. Neste ponto foram preparadas várias alíquotas com 100 µL do cultivo e 100 µL de glicerol 50% estéril. As alíquotas (lote de trabalho) foram estocadas a -80°C.

3.4 Expressão de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*

3.4.1 Expressão em frascos agitados

Um esquema geral dos procedimentos realizados na expressão é mostrado na figura 3.2.

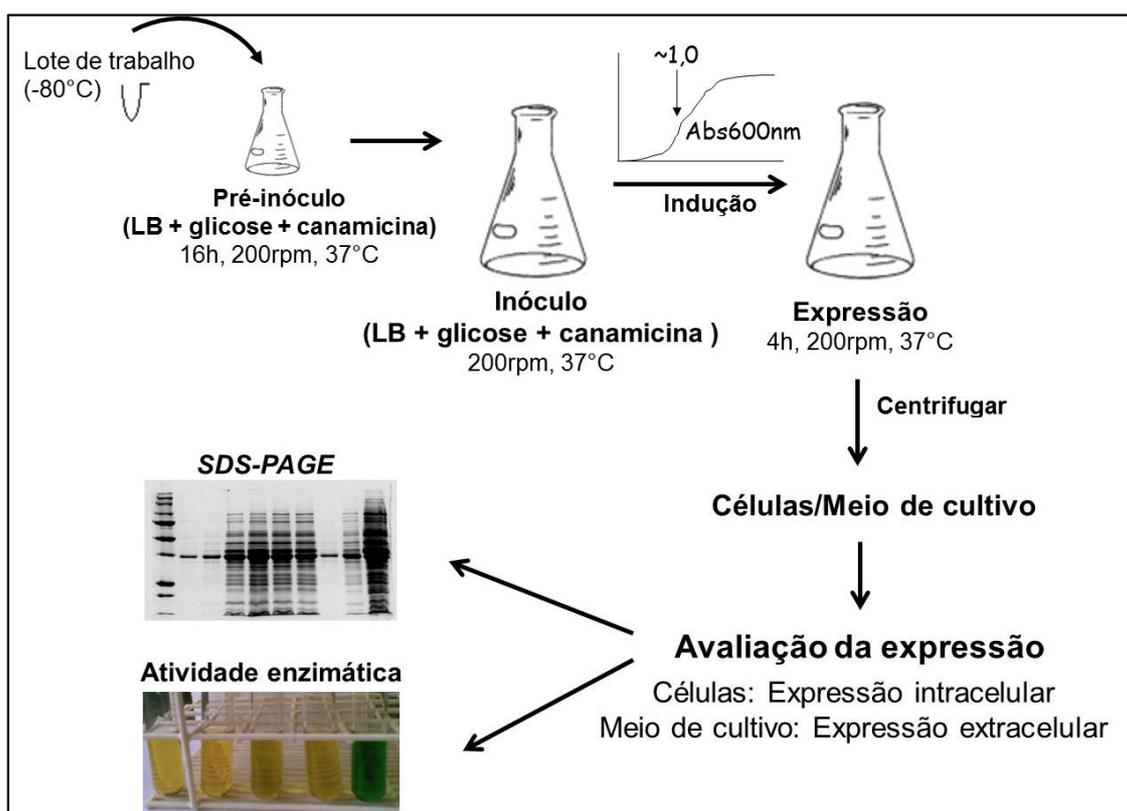


Figura 3.2 Esquema dos procedimentos realizados nos experimentos de expressão da L-asparaginase em frascos agitados (adaptado de EINSFELDT, 2010).

Para fazer o pré-inóculo, 10 µL de uma alíquota do lote de trabalho da bactéria recombinante *E.coli* BL21(DE3)/pET26b/*ans* foi inoculado em 10 mL de meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O pré-inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C e 200 rpm, em frascos agitados de 50 mL. Após as 16 horas, o cultivo foi preparado, em frascos de 250 mL, através do inóculo de 1 mL do pré-inóculo em 50 mL do meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O cultivo foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento ($Abs_{600nm} \sim 1,0$). Neste ponto, a expressão da L-asparaginase foi induzida com 0,55 mM de IPTG. Amostras do cultivo foram retiradas ao final de 4 horas de expressão para análise de crescimento celular e produção de proteína. Amostras de 30 mL dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) pET26b/*ans* foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 x g e 4°C,

sendo o sobrenadante utilizado para avaliar a expressão da proteína. Amostras de 1 mL dos cultivos do clone *E. coli* BL21 (DE3) pET28a/ans foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 x g e 4°C, sendo as células utilizadas para avaliar a expressão da proteína. A avaliação da expressão da proteína foi realizada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e por atividade enzimática. Os cultivos em frascos agitados foram realizados em triplicata.

O clone *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans também foi utilizado para expressar a proteína através de indução por lactose ao invés de IPTG. Para fazer o pré-inóculo, 10 µL de uma alíquota do lote de trabalho da bactéria recombinante *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans foi inoculado em 10 mL de meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O pré-inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C e 200 rpm, em frascos agitados de 50 mL. Após as 16 horas, o cultivo foi preparado, em frascos de 250 mL, através do inóculo de 1 mL do pré-inóculo em 50 mL do meio LB com 50 µg/mL de canamicina. O cultivo foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento ($Abs_{600nm} \sim 1,0$). Neste ponto, a expressão foi induzida por duas concentrações de lactose diferentes. Em um experimento foi utilizada a indução com 2g/L de lactose e no outro experimento com 10g/L de lactose. Amostras do cultivo foram retiradas, antes e ao final da expressão, e centrifugadas por 20 minutos a 4000 x g e 4°C, para avaliar a expressão da proteína L-asparaginase no sobrenadante. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.2 Expressão em biorreatores com meio de cultura complexo

Nesta etapa do trabalho, as bactérias recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans e *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans foram cultivadas em biorreatores Multifors 2 (INFORS HT) com 400 mL de meio LB suplementado com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. A figura 3.3 mostra um esquema geral dos experimentos de expressão da proteína em biorreatores utilizando meio de cultura complexo. Os cultivos foram mantidos a 37°C, com agitação entre 200 e 800 rpm, mantendo pO₂ mínimo em 60%. O pH dos cultivos foi mantido em 7,0 através da adição de NaOH 2M e H₃PO₄ 1M. Para fazer o pré-inóculo, 10 µL de uma alíquota do lote de trabalho das bactérias recombinantes foram inoculados em 10 mL de meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O pré-inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C e 200 rpm, em frascos agitados de 50 mL. Os biorreatores foram inoculados com 8 mL deste pré-inóculo. A indução da expressão da proteína foi realizada com 0,55 mM de IPTG por 4 horas a partir do final da fase exponencial de crescimento

(Abs_{600nm} aproximadamente 2,0). Foram realizadas amostragens a cada hora para analisar o crescimento celular, concentração de ácido acético, quantidade de L-asparaginase e proteína total produzida. A expressão da proteína foi confirmada por análise de atividade enzimática. O crescimento celular foi avaliado através de Absorbância a 600nm e a concentração de ácido acético foi avaliada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

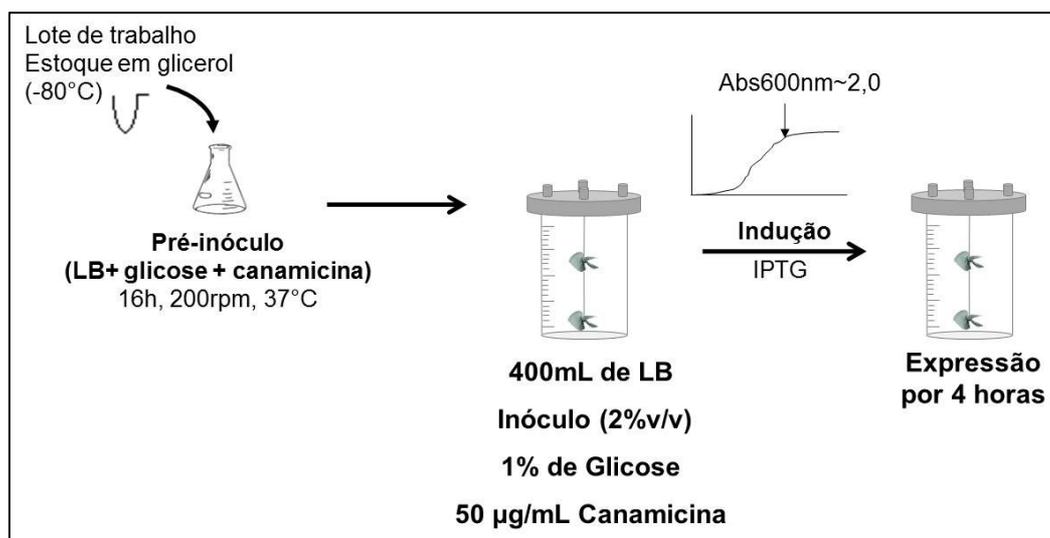


Figura 3.3 Esquema dos experimentos de expressão da proteína em biorreatores com meio de cultura complexo

3.4.3 Expressão em biorreatores com meio de cultura definido

3.4.3.1 Cinética de crescimento

Nesta etapa do trabalho, a bactéria recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans foi cultivada em biorreatores com meio de cultura definido. Foram realizados experimentos para determinação das fases de crescimento da bactéria *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans em biorreator Multifors 2 (INFORS HT) com volume de trabalho de 400 mL de meio de cultura definido. Este experimento foi realizado em duplicata. Para tanto, 10 µL de uma alíquota do lote de trabalho da bactéria recombinante *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans foi inoculado em 10 mL de meio LB enriquecido com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. Este pré-inóculo foi incubado por 16 horas a 37°C e 200 rpm, em frascos agitados de 50 mL. Após as 16 horas, o inóculo foi preparado, em frascos de 500 mL, com 2 mL do pré-inóculo em 100 mL do meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O cultivo foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento (Abs_{600nm}

~1,0). Nesta fase as células foram centrifugadas por 20 minutos a 4000g e 30°C, e ressuspensas no meio de cultura definido, apresentado na tabela 3.1, suplementado com 50 µg/mL de canamicina, com volume necessário para que a suspensão celular atingisse concentração de 1g/L. Esta suspensão celular foi utilizada para inocular o biorreator, sendo o inóculo 5% v/v do volume de trabalho do biorreator. No biorreator, foi utilizado o meio de cultura descrito na tabela 3.1, acrescido de canamicina (concentração 50 µg/mL). O biorreator foi mantido a 37°C, com agitação de 500 rpm e vazão de ar de 0,4 L/min (taxa de aeração de 1 vvm). O pH foi mantido em 6,7 através da adição de NaOH 2M. Após o inóculo foram retiradas amostras a cada hora para análise de crescimento celular através de Abs_{600nm} . A absorbância foi convertida em concentração celular através de uma curva padrão. As amostras foram centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 14000 x g e 4°C. O sobrenadante foi utilizado para analisar glicerol e alguns metabólitos por HPLC.

3.4.3.2 Planejamento de experimentos

Com o objetivo de conhecer melhor algumas variáveis do processo e aumentar a produção da enzima foi realizado um planejamento de experimentos (fatorial fracionado 2^{4-1} com adição de pontos centrais para avaliar os erros e a curvatura do sistema). As variáveis independentes estudadas foram: temperatura de expressão, concentração de canamicina, concentração de lactose e absorbância de indução. A matriz do planejamento fatorial utilizado neste estudo é mostrada na tabela 3.2. Foram realizados 12 experimentos, sendo 4 réplicas no ponto central. Os 12 experimentos do planejamento foram realizados com o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans em biorreatores Multifors 2 (INFORS HT) com volume de trabalho de 400mL. O pré-inóculo foi realizado da mesma forma que o pré-inóculo da cinética de crescimento. O inóculo foi preparado, em frascos de 500 mL, com 2 mL do pré-inóculo em 100 mL do meio LB com 1% de glicose e 50 µg/mL de canamicina. O cultivo foi incubado a 37°C e 200 rpm até atingir a fase exponencial de crescimento ($Abs_{600nm} \sim 1,0$). Nesta fase as células foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 x g e 30°C, e ressuspensas com volume de meio necessário para que a suspensão celular atingisse concentração de 1g/L. Para isso foi utilizado o meio de cultura quimicamente definido (tabela 3.1), suplementado com canamicina para atingir concentração de acordo com os experimentos do planejamento (tabela 3.2). Esta suspensão celular foi utilizada para inocular o biorreator, sendo o inóculo 5% v/v do volume de trabalho do biorreator. Nos biorreatores foi utilizado o meio de cultura descrito na tabela 3.1 acrescido de canamicina com concentração variando de acordo com os experimentos do

planejamento fatorial fracionado (tabela 3.2). Em todos os experimentos o biorreator foi mantido a 37°C (antes da indução), com agitação de 500 rpm e vazão de ar de 0,4L/min (taxa de aeração de 1 vvm). O pH foi mantido em 6,7 através da adição de NaOH 2M. A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada com lactose quando o cultivo atingiu a absorvância (Abs600nm) desejada, de acordo com cada experimento do planejamento (tabela 3.2). A concentração de lactose utilizada também variou de acordo com os experimentos do planejamento (tabela 3.2). A partir da indução a temperatura do biorreator foi alterada de acordo com o planejamento fatorial (tabela 3.2). Foram retiradas amostras após 4 horas e 16 horas de indução. Foram avaliadas as variáveis dependentes: concentração celular, L-asparaginase, e fração de células com plasmídeo (estabilidade plasmidial).

Tabela 3.2 Tabela com as condições dos experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} com adição de pontos centrais (PC). Os números entre parênteses são os valores das variáveis independentes normalizados.

Experimento	Temperatura de Expressão (°C)	Canamicina (µg/mL)	Lactose (g/L)	Abs600nm de Indução
1	25 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,2 (-1)
2	37 (+1)	25 (-1)	5 (-1)	4,6 (+1)
3	25 (-1)	75 (+1)	5 (-1)	4,6 (+1)
4	37 (+1)	75 (+1)	5 (-1)	0,2 (-1)
5	25 (-1)	25 (-1)	15 (+1)	4,6 (+1)
6	37 (+1)	25 (-1)	15 (+1)	0,2 (-1)
7	25 (-1)	75 (+1)	15 (+1)	0,2 (-1)
8	37 (+1)	75 (+1)	15 (+1)	4,6 (+1)
PC1	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)
PC2	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)
PC3	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)
PC4	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)

O software STATISTICA 9.1 foi utilizado para realizar as análises estatísticas, empregando as variáveis normalizadas. O efeito e o erro padrão de cada um dos fatores (variáveis independentes) foram estimados e avaliados pelo teste t, considerando estatisticamente significativos aqueles com $p < 0,1$ (RODRIGUES E IEMMA, 2005).

3.4.3.3 Validação do planejamento em biorreator com 3L

A validação do planejamento foi realizada em biorreator Biostat B (B. Braun) com volume de trabalho de 3L. O experimento foi realizado nas mesmas condições e com o mesmo meio de cultura (tabela 3.1) dos experimentos do ponto central do planejamento, mantendo a mesma taxa de aeração (1 vvm). No biorreator com 3L de meio de cultura foi utilizada concentração de canamicina de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a indução da expressão da proteína foi realizada em $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ igual a 2,4 (metade da fase exponencial) com 10 g/L de lactose, sendo a temperatura durante a expressão mantida em 31°C. As amostragens foram realizadas a cada 1,5h antes da indução e a cada 3h após a indução. Foram realizadas análises de atividade enzimática (proteína expressa), concentração celular, estabilidade plasmidial (fração de células com plasmídeo), concentração de lactose, de glicerol, de ácido acético e de ácido láctico.

3.4.3.4 Obtenção de dados cinéticos em biorreator com 1,5L

A obtenção de dados cinéticos do processo em biorreatores foi realizada com base nos resultados obtidos no planejamento de experimentos. Este experimento foi realizado em biorreator Minifors (INFORS HT) com volume de trabalho de 1,5L. O experimento foi conduzido da mesma forma e com o mesmo meio de cultura (tabela 3.1) que nos experimentos da curva de crescimento e planejamento de experimentos, mantendo a mesma taxa de aeração (1 vvm). No entanto, o experimento foi iniciado com 25 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e a indução da expressão da proteína foi realizada em $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ igual a 4,6 (final da fase exponencial) com 5 g/L de lactose, sendo a temperatura durante a expressão mantida em 37°C. As amostragens foram realizadas a cada 2h antes da indução e a cada 3h após a indução. Foram realizadas análises de atividade enzimática (proteína expressa), concentração celular, estabilidade plasmidial (fração de células com plasmídeo), concentração de lactose, de glicerol, de ácido acético, de ácido láctico e de canamicina.

3.5 Modelagem matemática e simulação do cultivo em modo batelada

O modelo desenvolvido neste estudo considera os principais fenômenos envolvidos na expressão de proteínas recombinantes. A solução do sistema de equações do modelo descreve como cada espécie varia com o tempo de operação do reator. Sendo assim, foram realizadas simulações do processo operando o biorreator em batelada, utilizando o modelo desenvolvido. Para tanto, o sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO) do modelo foi resolvido utilizando o software EMSO (SOARES E SECCHI, 2003) através da rotina DASSLC para resolução de sistemas de equações algébrico-diferenciais (SECCHI, 2008). Os valores iniciais utilizados para a resolução das EDOs são mostrados no apêndice D. Para realizar a simulação a partir do modelo proposto, os parâmetros utilizados, em sua maioria, foram baseados nos parâmetros descritos por MIAO E KOMPALA (1992). Alguns parâmetros foram estimados no software EMSO utilizando o algoritmo determinístico dos poliedros flexíveis (NELDER E MEAD, 1965), sendo utilizada como função objetivo a função de mínimos quadrados ponderados.

3.6 Ensaios de estabilidade da proteína

Os ensaios de preservação foram realizados com a enzima em duas diferentes soluções, chamados de agentes de preservação, e em tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 7,3 (padrão). Foram utilizados como agentes de preservação soluções de 550 mg/L de sorbitol e 550 mg/L de manitol. Várias alíquotas de 50 µL da enzima, em tampão e nos dois agentes de preservação, foram conservadas a 4°C e a -20°C. As alíquotas foram analisadas quanto à atividade enzimática ao longo do tempo de armazenamento. Os resultados de percentual de atividade mantida em 92 dias de armazenamento foram analisados utilizando um planejamento fatorial completo com dois níveis e duas variáveis independentes (2²). A matriz do planejamento é mostrada na tabela 3.3. O software STATISTICA 9.1 foi utilizado para realizar as análises estatísticas, empregando as variáveis normalizadas. O efeito e o erro padrão de cada um dos fatores (variáveis independentes) foram estimados e avaliados pelo teste t, considerando estatisticamente significativos aqueles com p<0,1 (RODRIGUES E IEMMA, 2005).

Tabela 3.3 Tabela com as condições dos experimentos do planejamento fatorial 2². Os números entre parênteses são os valores das variáveis independentes normalizados.

Experimento	Agente de preservação	Temperatura (°C)
1	Sorbitol (-1)	-20 (-1)
2	Manitol (+1)	-20 (-1)
3	Sorbitol (-1)	4 (+1)
4	Sorbitol (-1)	4 (+1)
5	Manitol (+1)	4 (+1)
6	Manitol (+1)	4 (+1)

3.7 Avaliação da expressão de L-asparaginase

3.7.1 SDS-PAGE

Para a análise da expressão da proteína intracelular foram retiradas amostras de 1 mL antes da indução e ao final cultivo (4 horas de indução). Estas amostras foram centrifugadas, conforme descrito no capítulo 3.4.1, e as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2% de SDS e 0,5% de azul de bromofenol, seguindo a razão de 25 μ L de tampão para cada 0,1 de Abs_{600nm}, normalizando as amostras pela Abs_{600nm}. As amostras foram incubadas em banho de água fervente por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, corado com Coomassie Blue R-250. A corrida foi realizada por 90 minutos com voltagem de 120 V em tampão de corrida (3 g/L de Tris Base, 14,5 g/L de glicina, 0,1 g/L de SDS e pH 8,3) (LAEMMLI, 1970).

Para a análise da expressão da proteína extracelular foram retiradas amostras antes da indução e ao final cultivo (4 horas de indução). Estas amostras foram centrifugadas, conforme descrito no capítulo 3.4.1. O sobrenadante foi concentrado 10X em unidades de ultrafiltração com membrana de 10 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore) e centrifugação a 4000g por 40 minutos. As amostras foram preparadas com 50 μ L deste sobrenadante concentrado e 50 μ L de tampão Tris-HCl 60 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 5% β -mercaptoetanol, 2% de SDS e 0,5% de azul de bromofenol. As amostras foram incubadas em banho de água fervente e foram seguidos os mesmos procedimentos para aplicação em SDS-PAGE.

3.7.2 Atividade enzimática e quantificação de proteína total

A atividade enzimática foi mensurada através da hidrólise de asparagina em aspartato e amônio (DUNLOP *et al.*, 1980), sendo que uma unidade internacional de L-asparaginase (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de amônia por minuto a 37°C e pH 7,3 (GUO *et al.*, 2000; KURTZBERG, 2000).

Para realizar as análises de atividade da enzima obtida de forma intracelular foram utilizadas as células provenientes de 1 mL de cultivo. A estas células foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,3. Esta suspensão celular foi submetida a ultrassom por 5 ciclos de 10 segundos com amplitude de 30% em sonicador, sendo posteriormente utilizada na análise de atividade enzimática e quantificação de proteína total .

Para realizar as análises de atividade da enzima obtida de forma extracelular foram utilizados 10 mL do meio livre de células. Este meio livre de células foi substituído por manitol 0,55 g/L e concentrado 10 vezes utilizando unidades de ultrafiltração com membrana de 10 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore) e centrifugações a 4000 x g por 30 minutos. Esta amostra, em manitol e concentrada 10 vezes, foi utilizada para as análises de atividade e quantificação de proteína total.

Para a análise de atividade enzimática, a reação foi realizada com 50 μL da amostra (preparada conforme descrito nos dois parágrafos anteriores) adicionados a 50 μL de asparagina 5 g/L. A solução de asparagina foi preparada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,3. Além da reação foram realizados controles para a confirmação da ausência de íons amônio no tampão e na amostra e para a determinação do valor de absorbância correspondente à molécula de asparagina. Isto foi feito porque, a molécula de asparagina também reage com os reagentes formadores de cor, independente do tempo de reação, mas dependente do número de moles de asparagina. Esta reação é similar a da molécula de aspartato, que reage com os reagentes formadores de cor da mesma forma que a asparagina, ou seja, neste teste 1 mol de asparagina corresponde a mesma absorbância que 1 mol de aspartato. Logo o valor de absorbância correspondente ao controle de asparagina foi descontado do valor de absorbância da reação para o cálculo da atividade enzimática. O controle de tampão foi preparado com 100 μL de tampão, o controle de asparagina foi preparado com 50 μL de asparagina 5 g/L e 50 μL de tampão fosfato e o controles

de amostra foi preparado com 50 μL de amostra e 50 μL de tampão fosfato. A reação e os controles foram incubados a 37°C por 30 minutos. Imediatamente após este tempo, 40 μL da reação e dos controles foram adicionados a 10 μL de TCA (ácido tricloroacético) 1,5 M. A estes 50 μL resultantes foram adicionados 2 mL de um reagente composto por Salicilato de Sódio 60 mM, Nitroprussiato de Sódio 3,4 mM e EDTA dissódico 1,35 mM. A mistura foi agitada. Na sequência foram adicionados 2 mL de um segundo reagente composto por Hipoclorito de Sódio 4,8 mM e Hidróxido de Sódio 150 mM. Estes procedimentos foram realizados porque os íons amônio na presença destes reagentes formam um composto cromógeno azul esverdeado (TABACCO *et al.*, 1979). A mistura foi incubada a 37°C por 5 minutos. A amostra foi então submetida à leitura de $\text{Abs}_{600\text{nm}}$. A partir de uma curva padrão foram determinadas as concentrações do íon amônio liberado durante a reação enzimática.

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A análise foi realizada em microplaca de 96 poços. Para tanto, foram utilizados 10 μL de amostra e adicionados 190 μL de reagente de Bradford (Bio-Rad). Na mesma microplaca foi realizada uma curva padrão com 10 μL de diferentes concentrações da proteína BSA (Bio-Rad) com a adição de 190 μL de reagente de Bradford (Bio-Rad). A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos. Após este período foi realizada a leitura de $\text{Abs}_{595\text{nm}}$ das amostras. A partir da curva padrão realizada foram determinadas as concentrações de proteína total das amostras.

3.8 Análise da segregação plasmidial

A segregação plasmidial foi avaliada através da contagem de UFC (unidades formadoras de colônia) na presença e ausência de canamicina (BAHERI *et al.*, 2001; TOMAZETTO *et al.*, 2007; EINSFELDT, 2010; EINSFELDT *et al.*, 2011). As análises foram realizadas através de 100 μL do cultivo, os quais passaram por diluições seriadas em NaCl 0,85% estéril. Foram colocados 10 μL de cada diluição, em no mínimo 3 réplicas, em placas de LB ágar, com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina e também sem o antibiótico. A estabilidade plasmidial foi mensurada através de F (fração de células com plasmídeo). Para tanto, foi realizada a razão entre a contagem de colônias da placa com antibiótico (apenas células com plasmídeo) e a contagem de colônias da placa sem antibiótico (total de células presentes). A figura 3.4 mostra um esquema das etapas realizadas na análise da estabilidade plasmidial. As diluições foram realizadas

de modo que na placa sempre houvesse uma diluição sem células e uma diluição com crescimento confluyente.

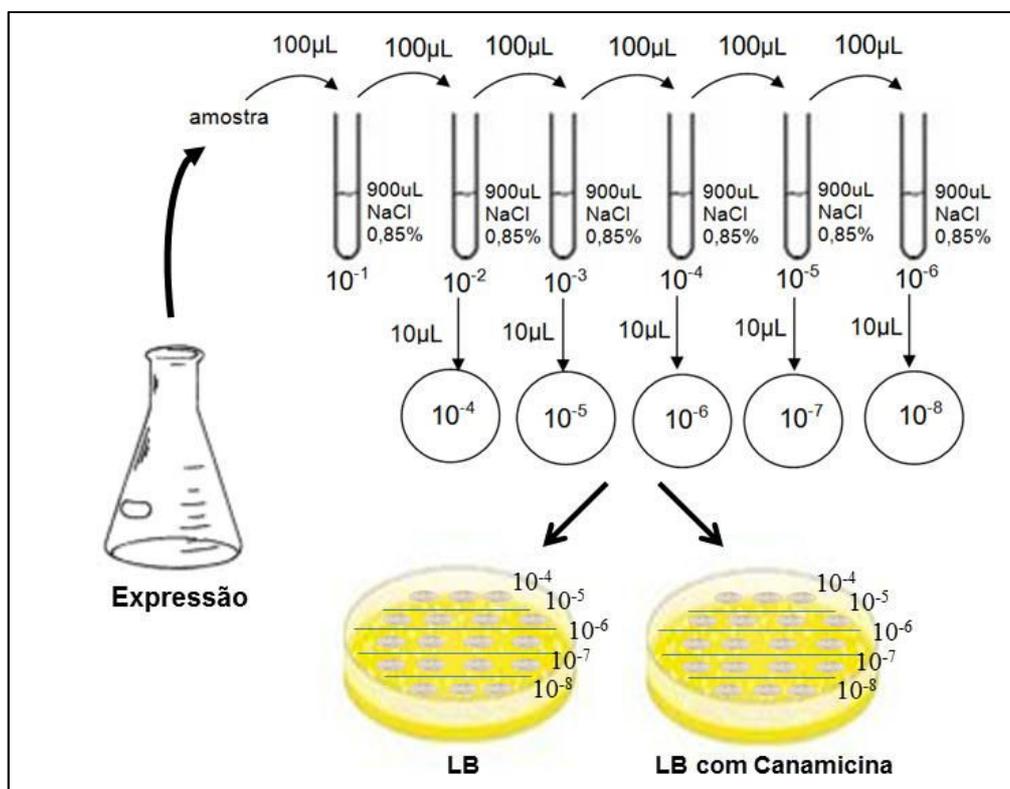


Figura 3.4 Desenho esquemático das etapas realizadas na análise de segregação plasmidial (adaptado de EINSFELDT, 2010).

3.9 Determinação de glicerol, lactose, ácido acético e ácido láctico

As concentrações de glicerol, de lactose, de ácido acético e de ácido láctico foram determinadas por Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamento Shimadzu, com detector de índice de refração (modelo RID-10A) e injetor automático (modelo SIL-20A). Amostras do sobrenadante do cultivo livre de células foram diluídas 10 vezes e filtradas em membrana 0,22 µm antes da injeção. Para estas determinações foi utilizada coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel (BENNETT E BRADEY, 1984; GARCÍA-ARRAZOLA *et al.*, 2005). Foram injetados 20 µL de cada amostra, sendo o fluxo da fase móvel mantido em 0,6 mL/min e a temperatura do forno em 64°C. Para determinar as concentrações foram injetadas diferentes concentrações conhecidas de soluções padrão de cada composto, de forma a possibilitar a correlação entre as concentrações de cada composto e suas respectivas áreas abaixo dos picos.

3.10 Determinação de crescimento celular

A avaliação do crescimento celular foi realizada através de medidas de absorvância em um comprimento de onda de 600 nm utilizando os equipamentos: espectrofotômetro Shimadzu (UV/VIS modelo UV Mini 1240) e espectrofotômetro Agilent (modelo 8453). No entanto, todas estas leituras foram convertidas para massa seca de células. Sendo assim, uma curva de absorvância em função da concentração de células foi realizada para correlacioná-las. A massa de células foi determinada por técnica gravimétrica. Para tanto, foram retiradas três alíquotas de 25 mL do crescimento celular em fase exponencial. As alíquotas foram centrifugadas a 5514 x g por 30 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 20 mL de água ultrapura e centrifugadas novamente a 5514 x g por 30 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Na última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de água ultrapura. A suspensão celular resultante foi levada para estufa a 90°C em formas de alumínio, previamente secas e pesadas, até que fossem observados pesos constantes. Simultaneamente, foram realizadas seis diluições diferentes da mesma amostra do crescimento celular na fase exponencial. As absorvâncias destas diluições foram medidas nos espectrofotômetros utilizados nas análises. Com isso foi traçado um gráfico da Abs_{600nm} em função da concentração de células e assim foi obtido através de regressão linear a equação que correlaciona Abs_{600nm} com concentração de células. A equação que correlaciona a concentração de células da cepa *E.coli* BL21(DE3)/pET28a/ans e a Abs_{600nm} medida no equipamento Shimadzu é mostrada na equação (3.1) e a que correlaciona a Abs_{600nm} medida no equipamento Agilent é mostrada na equação (3.2). A equação que correlaciona a concentração de células da cepa *E.coli* BL21(DE3)/pET26b/ans e a Abs_{600nm} medida no equipamento Shimadzu é mostrada na equação (3.3) e a que correlaciona a Abs_{600nm} medida no equipamento Agilent é mostrada na equação (3.4).

$$Abs_{600nm} = 2,99 \times \text{células (g/L)} \quad (3.1)$$

$$Abs_{600nm} = 3,64 \times \text{células (g/L)} \quad (3.2)$$

$$Abs_{600nm} = 2,90 \times \text{células (g/L)} \quad (3.3)$$

$$Abs_{600nm} = 3,38 \times \text{células (g/L)} \quad (3.4)$$

3.11 Determinação da concentração de canamicina

A concentração de canamicina foi determinada através da técnica da macrodiluição em tubos utilizada em testes de suscetibilidade aos antibióticos (NCCLS, 2003; RODRIGUES, 2008), uma vez que nos trabalhos de expressão de proteínas recombinantes esta não é uma avaliação usual. Para tanto, foi realizada uma curva correlacionando várias concentrações de canamicina com o crescimento celular (Abs_{600nm}). Para construir a curva de calibração de Abs_{600nm} em função da concentração de canamicina, triplicatas de tubos contendo 500 μ L de meio LB e 500 μ L de meio definido (tabela 3.1), com diferentes concentrações de canamicina, foram todos inoculados com a mesma concentração da bactéria *E. coli* BL21(DE3), de forma a ficarem com concentração inicial de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Os tubos foram incubados a 37°C e 200 rpm por 16 horas. Após este período foi realizada a leitura de absorbância do crescimento celular dos tubos. Com isso foi traçado um gráfico da Abs_{600nm} em função do logaritmo da concentração de canamicina (figura 3.5) e assim, através de regressão linear, foi obtida a equação que correlaciona Abs_{600nm} com o logaritmo da concentração de canamicina.

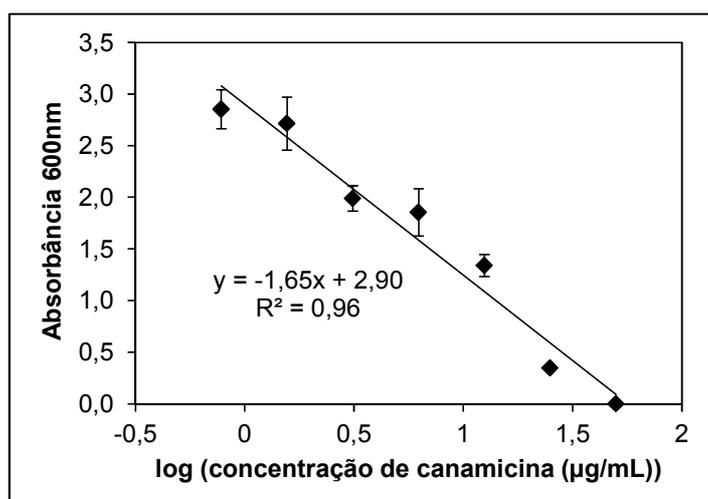


Figura 3.5 Curva de calibração de Abs_{600nm} versus log (concentração de canamicina).

Para a análise da concentração de canamicina nas amostras do cultivo, foram realizados os mesmos procedimentos da confecção da curva de calibração. As análises também foram realizadas em triplicata. Em tubos de 15 mL, foram adicionados 500 μ L da amostra e 500 μ L de meio LB. Os tubos foram inoculados com a bactéria *E. coli* BL21(DE3) de forma a ficarem com concentração inicial de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e então incubados a 37°C e 200rpm por 16 horas. Após este período foi realizada a leitura de absorbância do crescimento celular dos tubos. Através da equação obtida na curva de calibração, a absorbância foi convertida em concentração de canamicina presente na amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho, bem como as discussões relacionadas a eles. Partes destes resultados estão descritos no pedido de patente número BR102014000585-4 (EINSFELDT *et al.*, 2014).

4.1 Análises de Bioinformática

Foram realizados estudos de bioinformática com as duas sequências de genes que codificam a proteína L-asparaginase de *Z. mobilis* disponíveis no *GenBank*:

- *L-asparaginase (ans)*, tipo II, de *Z. mobilis subsp. mobilis* NCIMB 11163;
- *L-asparaginase (ans)*, tipo II, de *Z. mobilis subsp. mobilis* ATCC 31821 (ZM4; CP4).

Estas sequências gênicas foram utilizadas nas análises de bioinformática realizadas para conhecer melhor o gene da enzima, bem como desenhar o gene para a síntese e também verificar possíveis indícios de atividade antileucêmica desta L-asparaginase. O tamanho e massa molecular da proteína foram estimados no sítio <http://www.uniprot.org>, resultando em 366 aa e 38,7 kDa para as duas sequências estudadas (cepa NCIMB 11163 e ATCC 31821). A sequência da proteína da cepa NCIMB 11163, quando comparada à sequência da cepa ATCC 31821, possui uma asparagina no lugar de uma treonina na posição 179 da sequência e uma alanina no lugar de uma serina na posição 360 da sequência. O ponto isoelétrico teórico da proteína das duas cepas analisadas foi predito ser 6,18 (realizado no sítio http://web.expasy.org/compute_pi/).

Para a verificação da presença de possíveis sequências sinalizadoras (peptídeos sinais) na proteína, a sequência de aminoácidos da enzima foi analisada através do programa SignalP 3.0. Uma sequência sinalizadora (peptídeo sinal) tipicamente é formada por uma região N-terminal com carga positiva (polar), uma região central hidrofóbica e uma região C-terminal polar, contendo muitas vezes os aminoácidos prolina e glicina e resíduos apolares, onde se localiza o sítio de clivagem (VON HEIJNE, 1990; NETO, 2012). A figura 5.1 mostra a análise feita pelo programa SignalP 3.0. Conforme indicado nesta figura, a linha verde mostra a probabilidade de um aminoácido fazer parte da sequência sinalizadora, enquanto as linhas, vermelha e azul indicam o provável começo da proteína. Através desta análise, pode-se inferir que os 29 primeiros aminoácidos da proteína têm elevada probabilidade de fazer parte do peptídeo sinal. Isto corrobora os resultados de ABUD (2005), que demonstrou que a

L-asparaginase de *Z. mobilis* é uma enzima periplasmática. Outras L-asparaginases possuem peptídeo sinal. A L-asparaginase tipo II de *E. coli*, a qual possui atividade antileucêmica, é uma enzima periplasmática e por isso possui um peptídeo sinal (KOZAK *et al.*, 2000; KHUSHOO *et al.*, 2004; YUN *et al.*, 2007). Já a enzima tipo I de *E. coli*, a qual não possui atividade antileucêmica, não possui peptídeo sinal por se tratar de uma enzima citoplasmática (KOZAK *et al.*, 2000; YUN *et al.*, 2007). A enzima L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi*, que assim como a tipo II de *E. coli*, também é utilizada no tratamento de LLA, também possui peptídeo sinal (YUN *et al.*, 2007; KOTZIA E LABROU, 2007).

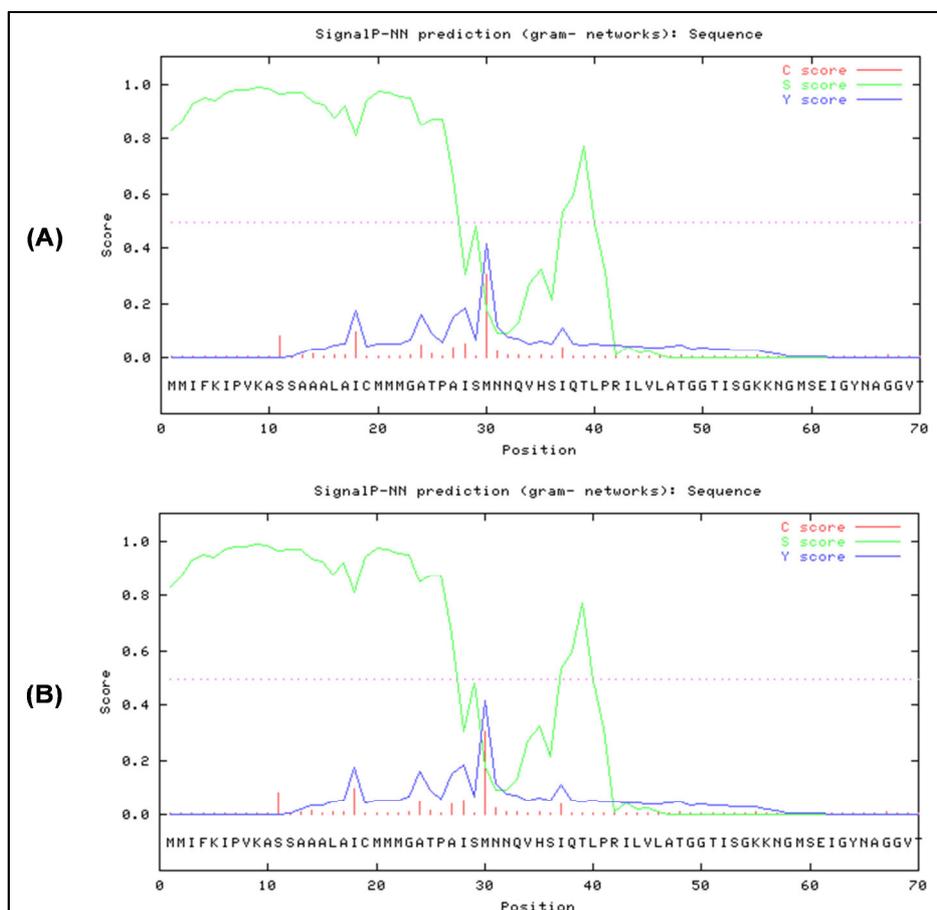


Figura 4.1 Análise da sequência de aminoácidos de L-asparaginase de *Z. mobilis*. Predição do peptídeo sinal através do programa SignalP 3.0. S score (linha verde) mostra a probabilidade de um aminoácido estar presente no peptídeo sinal, C score (linha vermelha) e Y score (linha azul) mostram onde seja o provável começo da proteína. (A) *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* NCIMB 11163. (B) *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* ATCC31821.

As sequências da proteína das cepas ATCC31821 e NCIMB 11163 foram também analisadas através do programa TMHMM Server v. 2.0, para verificar a possível existência de regiões transmembranares. Esta análise mostrou que a

proteína, de ambas as cepas, não possui regiões transmembranares (caracterizadas por serem regiões hidrofóbicas).

Foram também realizados alinhamentos globais entre as seqüências de aminoácidos de L-asparaginases tipo I e tipo II de *E. coli*, *E. chrysanthemi* e *Z. mobilis*. Estes alinhamentos foram realizados com o auxílio do programa CLUSTAL W. Os alinhamentos são mostrados no apêndice A, e um resumo dos resultados obtidos pode ser visualizado na tabela 4.1. A seqüência de *Z. mobilis* mostrou elevada identidade com a seqüência da enzima tipo II de *E. coli*: 40,4%, na mesma ordem em termos de percentual que a identidade apresentada entre *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi*, ambas com atividade antileucêmica. Já o alinhamento entre as duas L-asparaginases de *E. coli* (tipo I, sem atividade antileucêmica e tipo II, com atividade antileucêmica) resultou em identidade de 20,0%. Estes dados podem ser considerados mais um indício da atividade antileucêmica da enzima de *Z. mobilis*. Alguns trabalhos na literatura apresentam dados do alinhamento de novas seqüências de L-asparaginase, com efeitos citotóxicos sobre células leucêmicas, com as seqüências de L-asparaginases comerciais, de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi*. A L-asparaginase de *P. furiosus* apresentou 22% de identidade com a seqüência da L-asparaginase tipo II de *E. coli*, sendo que não foram apresentados dados de alinhamento com *Erwinia chrysanthemi* (BANSAL *et al.*, 2012). Já a L-asparaginase de *Helicobacter pylori* CCUG 17874 apresentou 18,78% de identidade com a seqüência da L-asparaginase tipo II de *E. coli*, mas apresentou 46,67% de identidade com a seqüência da L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (CAPPELLETTI *et al.*, 2008). Outro indício da atividade antileucêmica da enzima de *Zymomonas mobilis* é que os aminoácidos do sítio ativo da L-asparaginase tipo II de *E. coli* são altamente conservados e alinhados com os aminoácidos da L-asparaginase de *Z. mobilis* (estes aminoácidos estão grifados em amarelo nos alinhamentos apresentados no apêndice A). Os aminoácidos das duas tríades catalíticas, (Thr-12, Tyr-25, Glu-283) e (Thr-89, Lys-162, Asp-90), são conservados e alinhados entre as seqüências das L-asparaginases tipo II com conhecida atividade antileucêmica (*E. coli* e *Erwinia chrysanthemi*) e a seqüência de aminoácidos da enzima tipo II de *Z. mobilis*.

Tabela 4.1 Resultados dos múltiplos alinhamentos realizados com o auxílio do programa CLUSTAL W

Sequências Alinhadas	Identidade	Forte similaridade	Fraca similaridade	Diferença
<i>E. coli</i> tipo I				
<i>E. coli</i> tipo II	22,0 %	19,0 %	14,1 %	44,9 %
<i>Erwinia chrysanthemi</i> tipo II				
<i>E. coli</i> tipo II	46,46 %	17,85 %	14,73 %	20,96 %
<i>Z. mobilis</i> ZM4 tipo II				
<i>E. coli</i> tipo II	40,38 %	21,14 %	11,92 %	26,56 %
<i>Z. mobilis</i> ZM4 tipo II				
<i>Erwinia chrysanthemi</i> tipo II	29,00 %	23,31 %	9,49 %	38,21 %

4.2 Clonagem de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*

Como mencionado anteriormente, o gene da L-asparaginase de *Z. mobilis* utilizado neste trabalho foi sintetizado quimicamente, fusionado a uma cauda de histidina para permitir a purificação por afinidade em coluna de níquel. O gene sintético teve seus *códons* otimizados considerando a frequência de *códons* utilizados em *E. coli* (alterando os *códons* com frequência menor que 15%) e a formação de fortes estruturas secundárias (alterando os *códons* para evitar este problema). Na figura 4.2 é mostrado um alinhamento do gene da L-asparaginase de *Z. mobilis* original com o gene da L-asparaginase otimizado.

original	ATGATGATTTTAAATCCCTGTTAAGGCCCTTCTGCTGCGGCCTTGGCAATATGCATG
otimizado	-----
original	ATGATGGGGCTACTCCGGCATCT -----
otimizado	----- <u>ATGGGCCACCATCATCATCACCCTCCAGCGGT</u>
original	-----ATGAATAATCAGGTTCAATCAATCAGACGTTACCGCGC
otimizado	<u>CATATCGACGATGATGACAAAATGAACAATCAGGTTCACTCTATCCAAACTCGCCGCGT</u> *****
original	ATTTAGTCTTGGCAACGGCGGCACGATTTCCGGCAAGAAAATGSAATGTCTGAAATC
otimizado	ATCCTGGTGTGGCAACGGCGGTACCATCTCTGGCAAGAAGAACGGCATGTCCGAAAT ** * ** *
original	GGCTATAATGACGGCGCGTACTGGAACACAGCTCGTTGAAGATATACCGGAATTAGCT
otimizado	GTTTAAACGACGGCGGTACTGGCAAGCAGTGGTAGAAGACATCCAGAATGGCG ** * ** *
original	AAACTCGCTGAAATCAATGTCGAACAATTGCCAATATCGGCTCGCAAGATATGAATGAT
otimizado	AAACTGGCAGAAATCAACGTAGACAGATCGCAACATGGTAGCCAGGACATGAACGAT *****
original	GCGATATGGCTGCGCTTGGCCAAGCGCATCCAAGACGCGCTCGCCATAACGAAGCGGAT
otimizado	GCAATCGGCTGCGCCTGGCGAAGCGTATCCAGGATGCGGTAGCGCACAAATGAAGCAGAT ** * ** *
original	GGTATTGTGATTACCCATGGCACCATACCATGGAAGAAACCGCCTTTTCTTGTATACG
otimizado	GGCATCGTATCACCCACGGTACCGATACTATGGAAGAAACCGCATTCTTCTGGACACC ** * ** *
original	GTTATTCGACCCGACAAGCCGATTATCTGACAGGGCCATGCGCCCTAGCACTGCCATT
otimizado	GTTATTCGTACCGATAAACCGATCATCCTGACCGGTGCAATGCGTCCGTCACCGCAATC *****
original	GGTGCAGATGGTCCCGCAATTTATATGAGGCGATTGAAGTCGCGCCACCCCAAGGCC
otimizado	GGTGCACCGGTCCCGCTAACCTGTACGAAGCAATCGAAGTGGCAGCGCCCGAAGGCA *****
original	AAGATCATGGCGTCATGATGTCATGAATGACACTATTCATGCAGCCAGATGGCAAGC
otimizado	AAGGACCACGGTGAATGATTGTTATGAACGATACCATTATGCGGCGGTTGGCATCT ** * ** *
original	AAAACCACACAAACCGCGTCGAAACCTTTCAGTCCATCAATGCAGACCTATCGGTTAT
otimizado	AAGACCACACTACTGCGGTAGAAACCTTCCAGTCTATCAACGCTGGCCGATCGGTTAT ** * ** *
original	GTGATCCGGCTTCGGTTCGGTTTATGAGCCGAAAAACAGCCTGTCCCAAGCTATGGC
otimizado	GTAGACCCGCGATCTGTTCTGTTTCAATGAACCAGAAAGCAGCCGTTCCGCTCTATGGT ** * ** *
original	CTTCCGACGACTGCGCCTTTCCTGCGGTCGAAATCCTTACGCCATAGCGGTATGGGG
otimizado	CTGCGCACCACTGCCCCGCTGCGGCGGTGGAATCCTGTATGCACACTCTGGCATGGGC ** * ** *
original	GCTCAATTATCAATGATCTCATAAAACGGGCGTAAAGGCATTATCTTGGCGGTGTT
otimizado	GCTTCCATCATCAACGATCTGATTAACCGGCGTAAAGGCATCATCTGGCAGGCGTG *****
original	GGTGACGGGAATAGTTCAAAAAGCGATGGCTGCCCTCAATCTTGCCTCAAAACAGGC
otimizado	GGTGATGGTAACTCCTCTAAAAGAGCAATGGCTGCACTGAACCTGGCGGTTAAACAAGT *****
original	GTGATTGTTGCGGTTATCCAGAACGGATCAGGCTTTGTGAATCGCAATGTCGAGGTC
otimizado	GTGATTGTTGTACGTTCTAGCCGTACCGGTAGCGGTTTCGTAAACCGTAAACGTTGAAGTA *****
original	AATGATGACAAAACGACTTTGTTGTCTTATGATCTTTCGCCCCAGAAAGCCCGCATC
otimizado	AACGACGATAAGAAGCATTGTTGGTGAAGTATGACCTGAGCCCGCAGAAAGGCTCGCATC ** * ** *
original	CTTCTCAGATTTTAAATAGCAATGGCAAAAACAACTTCTGATATCCAATCTGCATTT
otimizado	CTGCTGCAAACTCCTGATCGCAATGGCAAGAAACAGCTGAGCGATATCCAGAGCGCATTC ** * ** *
original	GAAGCTGGTTTTTAA
otimizado	GAAGCGGTTTCTAA *****

Figura 4.2 Alinhamento do gene da L-asparaginase original com o gene da L-asparaginase com otimização de códons utilizando o software CLUSTAL 2.0.1. Os nucleotídeos grifados em negrito representam o peptídeo sinal do gene original que foram retirados do gene otimizado. Os nucleotídeos sublinhados são referentes à cauda de histidina e ao sítio de clivagem de enteroquinase adicionados ao gene otimizado.

O gene sintético otimizado foi inserido em dois vetores distintos: pET26b, para possibilitar a obtenção da proteína no meio extracelular, e pET28a, para possibilitar a expressão e obtenção da proteína no citoplasma de *E. coli*. A sequência da L-asparaginase codificada pelo gene sintético otimizado foi estimado com 37,8 kDa e o ponto isoelétrico teórico da proteína foi predito ser 5,94. Há uma diferença entre as predições, de massa molecular e ponto isoelétrico quando utilizado o gene sintético otimizado e quando utilizado o gene original (mostrado na seção 4.1). Esta diferença se deve ao fato do gene sintético não possuir o peptídeo sinal presente na proteína original e de terem sido adicionados vários códons correspondentes aos aminoácidos da cauda de histidina e ao sítio de clivagem de enteroquinase.

Os vetores construídos pET26b/*ans* e pET28a/*ans* foram inseridos na cepa *E. coli* BL21 (DE3) para a obtenção dos clones, *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/*ans* e *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/*ans*, utilizados para a expressão da proteína.

Após a transformação da cepa *E. coli* BL21 (DE3) com os plasmídeos pET26b/*ans* e pET28a/*ans* foram selecionadas colônias de possíveis clones *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/*ans* e *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/*ans*. Os plasmídeos das colônias foram extraídos e confirmados por digestão com enzima de restrição *Xho*I, que reconhece e cliva os plasmídeos na posição 158, no final do gene da L-asparaginase. Estes resultados podem ser visualizados nas figuras 4.3 e 4.4, onde é possível verificar o tamanho esperado do plasmídeo pET26b/*ans* linearizado (6368pb) e do plasmídeo pET28a/*ans* linearizado (6301pb), respectivamente. Desta forma, os clones *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/*ans* e *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/*ans* foram confirmados.

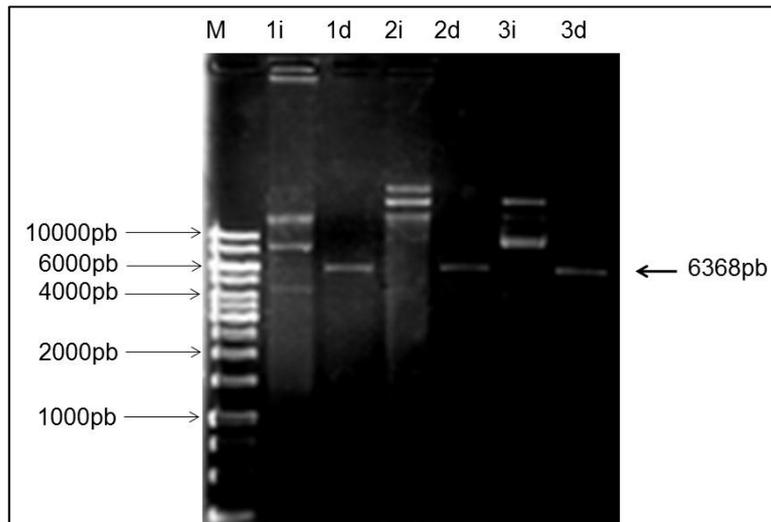


Figura 4.3 Padrão eletroforético dos plasmídeos extraídos de clones de *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/*ans* e de suas digestões. **M**, padrão de tamanho de fragmento GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); **i**, plasmídeos pET26b/*ans* intactos; **d**, plasmídeos pET26b/*ans* digeridos com a enzima *Xho*I. A seta indica o fragmento de 6368 pb correspondente ao vetor pET26b/*ans* linearizado.

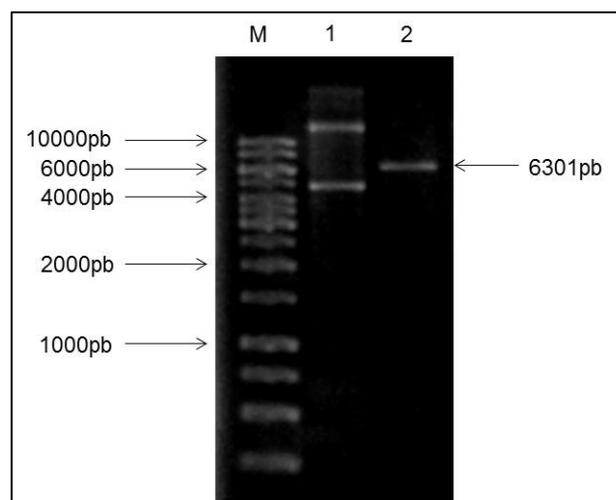


Figura 4.4 Padrão eletroforético do plasmídeo extraído do clone de *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/*ans* e de sua digestão. **M**, padrão de tamanho de fragmento GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); **1**, vetor pET28a/*ans* intacto; **2**, vetor pET28a/*ans* digerido com a enzima *Xho*I. A seta indica o fragmento de 6301pb correspondente ao vetor pET28a/*ans* linearizado.

4.3 Expressão de L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*

4.3.1 Expressão utilizando frascos agitados

Com o objetivo de verificar a expressão da proteína L-asparaginase nos clones da cepa *E. coli* BL21 (DE3), foram realizados cultivos em triplicata de cada bactéria

recombinante (*E. coli* BL21(DE3)/pET28a/ans e *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans) em frascos agitados. Os cultivos foram realizados em frascos agitados com meio de cultivo LB e a expressão da proteína foi induzida na fase exponencial de crescimento, pela adição de 0,55mM de IPTG, por 4 horas, conforme descrito no capítulo de Metodologia. Um gráfico da cinética de crescimento do clone *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans é apresentado no apêndice B para verificação das fases de crescimento nos dois espectrofotômetros utilizados para as medidas de absorbância realizadas neste trabalho. Ao final de 4 horas de expressão, foram retiradas amostras de células e do sobrenadante dos cultivos, para as análises da expressão da proteína intracelular e extracelular, conforme o clone utilizado no experimento. As análises de expressão da proteína foram realizadas através de SDS-PAGE e atividade enzimática. Os resultados de crescimento celular e atividade enzimática obtidos nestes experimentos em frascos agitados são apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 Concentração celular e atividade enzimática em cultivos em frascos agitados com meio LB a 37°C ao final de 4 horas de indução com 0,55 mM de IPTG.

Bactéria Recombinante	Concentração celular (g/L)	Atividade Enzimática (U/mL)	Rendimento (U/g _{célula})
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET28a/ans (enzima intracelular)	0,46 ± 0,02	7,6 ± 0,8	7630
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pET26b/ans (enzima extracelular)	0,90 ± 0,01	0,19 ± 0,04	209,9

A expressão da proteína foi induzida quando os cultivos de ambas as cepas atingiram concentração celular de aproximadamente 0,3 g/L (Abs600nm~1,0). No entanto, após as quatro horas de expressão, o cultivo da cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans aumentou a concentração celular para 0,90 g/L, aproximadamente o dobro da concentração celular final do cultivo da cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/ans, de 0,46 g/L (tabela 4.2). Este aumento no crescimento não foi proporcional à produção de proteína, como pode ser visualizado na tabela 4.2 através da atividade enzimática e rendimento de proteína por grama de célula. A cepa *E.coli* BL21(DE3)/pET28a/ans cresceu menos durante o período de expressão da proteína, no entanto, produziu uma quantidade muito superior de proteína em comparação com a cepa de produção extracelular (tabela 4.2). Os dados de menor crescimento da cepa com expressão intracelular podem indicar a possibilidade da

proteína L-asparaginase exercer um efeito tóxico sobre a célula do hospedeiro. Outra possibilidade é que como o clone de expressão intracelular produziu mais proteína, também sofreu uma maior sobrecarga metabólica, já que a produção de proteína pode gerar uma sobrecarga metabólica na célula, levando a um menor crescimento celular e diminuição da taxa de crescimento (TOKSOY *et al.*, 2002). Além disso, a expressão da L-asparaginase utilizando o vetor pET26b é direcionada para o espaço periplasmático, de onde é extravasada através de transporte passivo para o meio extracelular (SORENSEN E MORTENSEN, 2005). Sendo assim, parte da proteína expressa pode ter ficado retida no periplasma e isto pode justificar a menor produção da enzima, já que não foi mensurada a atividade enzimática no periplasma.

Os resultados obtidos nestes experimentos em frascos agitados (tabela 4.2) mostram que o gene de L-asparaginase de *Z. mobilis* foi expresso em ambas as bactérias recombinantes produzidas. Esta é a primeira vez que a enzima L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* é produzida em outro micro-organismo, de forma recombinante. A L-asparaginase foi secretada no meio de cultivo quando a bactéria recombinante *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/*ans* foi utilizada para a expressão, e ocorreu a expressão da proteína no citoplasma quando a bactéria recombinante *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/*ans* foi utilizada. Os valores de atividade enzimática obtida são superiores aos obtidos por KHUSHOO *et al.* (2004). Estes autores obtiveram uma produção de 0,02 UI/mL da L-asparaginase recombinante de *E. coli* K-12, utilizando *E. coli* BLR (DE3) como hospedeiro, de forma extracelular, em 24 horas de indução com IPTG, em meio de cultivo TB (*Terrific Broth*).

Na figura 4.5 é mostrado o gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos proteicos totais obtidos na expressão da proteína utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/*ans* (expressão citoplasmática). Assim como comprovado pela análise de atividade enzimática (tabela 4.3), através da análise da figura 4.5 é possível verificar que o clone *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/*ans* expressa a proteína L-asparaginase de forma intracelular (cerca de 37,8 kDa), visualizada no gel na região acima da banda de 37 kDa do marcador de massa molar, em quantidade maior em comparação com a amostra sem indução, empregando mesma concentração celular em ambas as amostras.

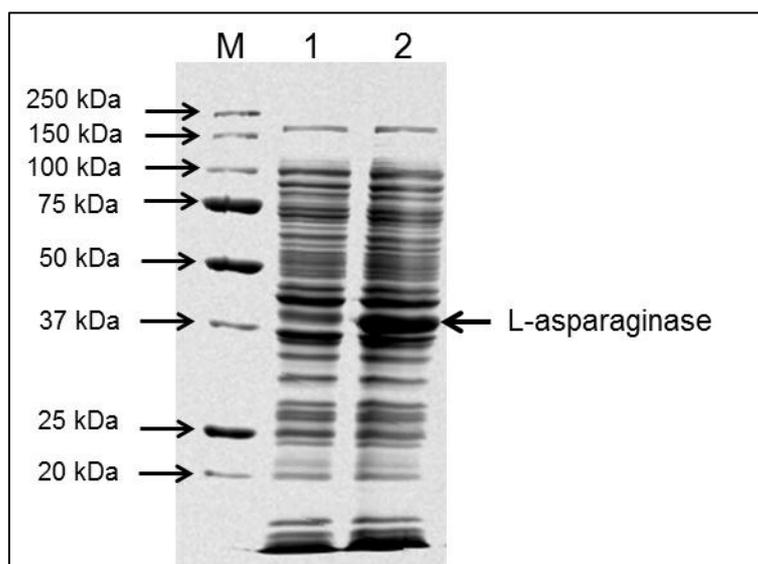


Figura 4.5 Gel de SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos totais obtidos através da expressão da proteína L-asparaginase de forma citoplasmática pela cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans. **M**, padrão de massa molar; **1**, amostra de extrato proteico total do lisado celular do cultivo não induzido; **2**, amostra de extrato proteico total do lisado celular do cultivo induzido com IPTG por 4 horas. As amostras aplicadas no gel foram normalizadas por Abs_{600nm}.

A baixa produtividade da enzima L-asparaginase por *Z. mobilis* era um obstáculo para o estudo e produção da enzima a partir deste micro-organismo, sendo assim, um dos objetivos deste trabalho que era produzir a enzima L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* em *Escherichia coli*, em quantidade suficiente para possibilitar a realização de estudos da atividade antileucêmica, foi alcançado (EINSFELDT *et al.*, 2014). Com os resultados obtidos, a enzima L-asparaginase recombinante de *Z. mobilis*, expressa pelo clone *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans, possibilitou a realização de testes em células de linhagens Jurkat e Reh e em células primárias de pacientes (BAPTISTA, 2013; EINSFELDT *et al.*, 2014). Em seus estudos, BAPTISTA (2013) mostrou que a enzima recombinante de *Zymomonas mobilis* é capaz de causar efeitos citostáticos e citotóxicos, além de apresentar eficácia semelhante a L-asparaginase comercial.

A bactéria recombinante *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans (produção extracelular) também teve a expressão da proteína induzida com lactose ao invés de IPTG em cultivo em frascos agitados. Na tabela 4.3 são apresentados os resultados destes experimentos através das médias obtidas de crescimento celular e L-asparaginase produzida.

Tabela 4.3 Crescimento celular e L-asparaginase recombinante produzida em 4 horas de expressão em frascos agitados com lactose como indutor utilizando a cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans (enzima extracelular)

Experimento (Concentração de Indutor)	Crescimento celular (g/L)		L-asparaginase (UI/mL)	
	Antes da Indução	4 horas de Indução	Antes da Indução	4 horas de Indução
Exp. 1 (Lactose 2 g/L)	0,36 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,00	0,48 ± 0,05
Exp. 2 (Lactose 10 g/L)	0,35 ± 0,01	0,91 ± 0,06	0,00	1,36 ± 0,22

Através da visualização dos dados da tabela 4.3 é possível perceber que a enzima L-asparaginase extracelular não é expressa antes da indução, mesmo não sendo utilizada glicose neste experimento. A glicose é frequentemente utilizada para evitar “vazamentos” de expressão, uma vez que, a presença de glicose faz que ocorra repressão catabólica do *operon lac*, mantendo baixos níveis de AMP cíclico e assim, reduzindo a possibilidade do início da transcrição. Quando comparamos a indução da expressão realizada com IPTG (tabela 4.2) e a realizada por lactose (tabela 4.3) no clone *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans é possível perceber um aumento na expressão em torno de 2,5 vezes quando utilizada 2 g/L de lactose como indutor do sistema ao invés de IPTG. No experimento com concentração maior de lactose (10 g/L), a expressão da proteína foi aproximadamente 7 vezes maior quando comparada ao experimento utilizando IPTG e aproximadamente 3 vezes maior quando comparada ao experimento utilizando 2 g/L de lactose, sendo todos estes experimentos realizados da mesma forma, mudando apenas o indutor. Este aumento na produção poderia ser explicado pelo fato do IPTG ser relatado como um composto potencialmente tóxico para a célula por vários autores (PAN *et al.*, 2008; VOLONTÈ *et al.*, 2008; EINSFELDT *et al.*, 2011; LARENTIS *et al.*, 2011). Além disso, estes resultados indicam que a concentração de lactose pode influenciar na concentração de proteína produzida. Em seus estudos, BELLÃO (2006) mostrou que na expressão, em *Escherichia coli*, da proteína recombinante canacistatina, quando o IPTG foi substituído pela lactose como indutor da expressão, a produtividade da proteína aumentou. Quando a lactose foi utilizada em concentração de 1,4 g/L a produtividade passou de 45,1 mg/g (induzida por IPTG) para 70,2 mg/g, e quando a lactose foi utilizada em concentração de 13,7 g/L a produtividade alcançou o valor de 140,7 mg/g. SUNITHA *et al.* (2000) também reportaram que a concentração de lactose tem influência sobre a expressão da proteína recombinante em seus experimentos expressando a proteína fitase em *E. coli*. No entanto, estes autores verificaram que altas concentrações de lactose, acima de 8 mM (2,7 g/L), causam repressão da expressão da proteína. Verificaram ainda que quando lactose é utilizada ao invés de IPTG, a expressão ocorre de forma mais lenta

no começo da indução, atribuindo isto as mudanças metabólicas que devem ocorrer com a introdução de um novo substrato (SUNITHA *et al.*, 2000).

O gel de SDS-PAGE dos sobrenadantes dos experimentos em frascos agitados e induzidos com lactose, descritos no parágrafo anterior, pode ser visualizado na figura 4.6. Observando o gel é possível verificar a banda correspondente a enzima L-asparaginase (pouco acima de 37kDa) no experimento induzido com 2 g/L de lactose (poço número 2), a qual fica mais intensa quando o cultivo é induzido com 10g/L de lactose (poço número 3).

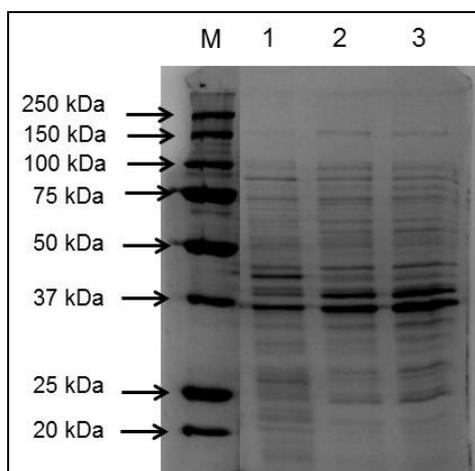


Figura 4.6 Gel de SDS-PAGE 12% das amostras dos sobrenadantes dos cultivos da cepa *E. coli* BL21 Star (DE3)/pET26b/ans em frascos agitados utilizando meio rico (LB) e lactose como indutor para expressão da L-asparaginase. **M**, padrão de massa molar; **1**, sobrenadante não induzido (concentrado 10 vezes); **2**, sobrenadante do cultivo induzido com 2g/L de lactose por 4 horas (concentrado 10 vezes); **3**, sobrenadante do cultivo induzido com 10g/L de lactose por 4 horas (concentrado 10 vezes).

4.3.2 Expressão em biorreatores com meio de cultura complexo

Após os experimentos de expressão em frascos agitados e a comprovação da expressão da enzima por ambos os clones, foram realizados experimentos de cultivo e expressão em biorreatores utilizando meio de cultura complexo. Para tanto, foram realizadas expressões utilizando os dois clones obtidos neste trabalho, *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans (enzima extracelular) e *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/ans (enzima citoplasmática). Os cultivos no biorreator foram induzidos com IPTG, por 4 horas, quando atingiram absorbância de aproximadamente 2,0 conforme descrito no

capítulo de Metodologia. Nas figuras 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10 são apresentados os dados obtidos nestes experimentos.

O gráfico de crescimento celular e L-asparaginase expressa e secretada por *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans ao longo do cultivo é mostrado na figura 4.7. Em aproximadamente 7 horas (420 min) de cultivo foi possível obter uma concentração celular de 0,76 g/L da cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans. Em 4 horas de indução da expressão obteve-se atividade de 0,132 UI/mL da enzima extracelular e rendimento máximo de 172,7 UI/g de célula após 4 horas de indução da expressão. KHUSHOO *et al.* (2005) expressaram L-asparaginase de *E. coli* K-12 em *E. coli* BLR (DE3) de forma extracelular em biorreatores, utilizando meio TB, em batelada alimentada. Em 35 horas de cultivo, sendo 24 horas de indução da expressão, estes autores obtiveram concentração celular de 45 g/L e atividade de 870 UI/mL, sendo 19333 UI/g de célula (KHUSHOO *et al.*, 2005). Estes valores são maiores que os obtidos nos experimentos apresentados na figura 4.7, pois no trabalho de KHUSHOO *et al.* (2005) foram realizados cultivos bem mais longos, de 35 horas, e operados em batelada alimentada, o que possibilita um maior crescimento celular e maior produção de proteína, diferente da operação em batelada que foi realizada nos estudos apresentados neste trabalho. Além disso, deve ser ressaltado que a comparação da expressão de outras L-asparaginases com a L-asparaginase produzida neste trabalho através de atividade enzimática fica bastante comprometida, pois as análises de atividade são realizadas em diferentes condições de temperatura e pH. Um fator que pode influenciar na baixa produção da proteína extracelular pelo clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans é que a expressão da proteína no vetor pET26b é orientada para o espaço periplasmático, de onde a proteína é secretada para o meio extracelular por transporte passivo através de estruturas da membrana desestabilizadas (SORENSEN E MORTENSEN, 2005). Desta forma, parte da proteína expressa poderia não ser capaz de passar para o espaço extracelular e permanecer no periplasma, e com isso não ser mensurada na atividade de L-asparaginase no meio de cultivo.

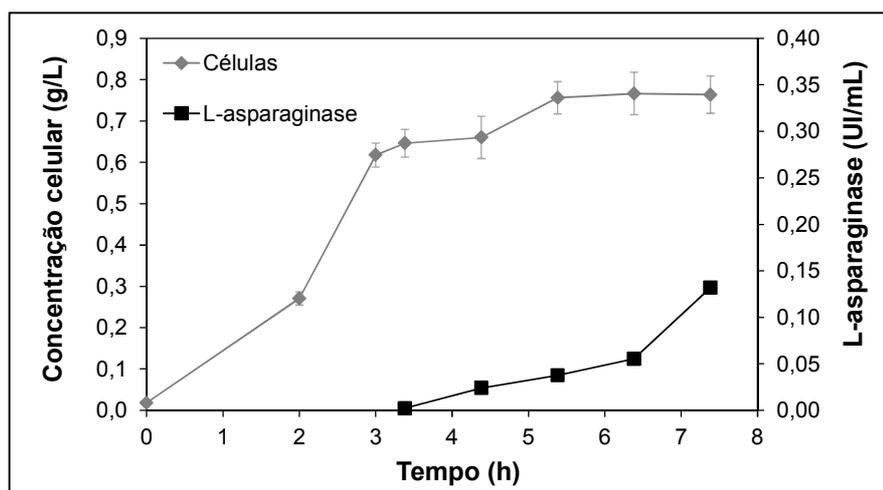


Figura 4.7 Crescimento celular e atividade de L-asparaginase ao longo do tempo do experimento utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans (expressão extracelular). A expressão da proteína foi induzida com 203 minutos de cultivo (~3,3 horas).

O gráfico de crescimento celular e L-asparaginase expressa no citoplasma por *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans ao longo do cultivo é mostrado na figura 4.8. Em aproximadamente 7 horas de cultivo (420 min) foi possível obter uma concentração celular de 0,68 g/L da cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/ans, similar aos obtido para o crescimento da cepa com expressão extracelular. Em 4 horas de indução obteve-se atividade de 3,57 UI/mL de cultivo (enzima intracelular) e rendimento máximo de 5185 UI/g de célula após 4 horas de indução da expressão, o que significa uma produção muito superior ao da expressão extracelular.

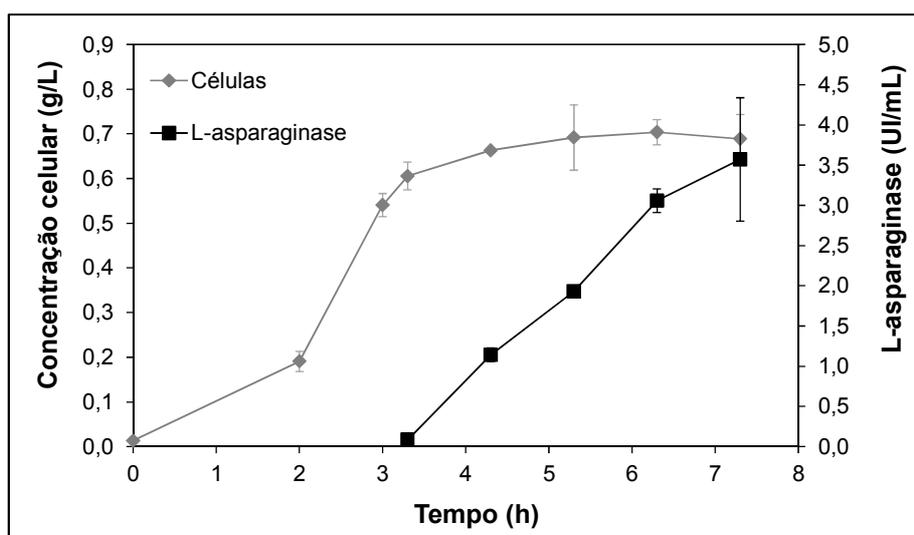


Figura 4.8 Crescimento celular e atividade de L-asparaginase ao longo do tempo do experimento utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans (expressão intracelular). A expressão da proteína foi induzida com 198 minutos de cultivo (~3,3 horas).

Os valores de produção de L-asparaginase apresentados neste trabalho (figura 4.7 e 4.8) são superiores aos apresentados pelo micro-organismo nativo desta L-asparaginase (*Zymomonas mobilis*). Em cultivos de *Zymomonas mobilis* realizados em frascos agitados foi obtida atividade de 37,8 UI/g de célula em 33 horas de cultivo (ABUD *et al.*, 2004). Através da produção da L-asparaginase recombinante foi possível obter aproximadamente 4 vezes mais UI/g de célula da enzima extracelular e 135 vezes mais UI/g de célula da enzima intracelular, em um tempo 4 vezes menor.

Apesar dos valores de proteína expressa de forma intracelular serem maiores, quando analisamos os valores em termos de atividade específica, ou seja, a relação de L-asparaginase expressa em relação à quantidade de proteína total, podemos perceber que os valores de atividade específica dos cultivos de expressão extracelular e intracelular são similares (figura 4.9). Como a quantidade de L-asparaginase do cultivo que produz a enzima de forma intracelular é maior que a do cultivo que produz de forma extracelular, sendo a atividade específica similar, pode-se afirmar que a amostra da proteína extracelular tem menos contaminantes, o que facilita muito a sua purificação. Além disso, a utilização de um processo onde o produto é obtido de forma extracelular exclui a etapa de rompimento celular, o que diminui tempo e custos de produção. Por estes motivos, o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans (expressão extracelular) foi escolhido para ser utilizado nas etapas seguintes do trabalho.

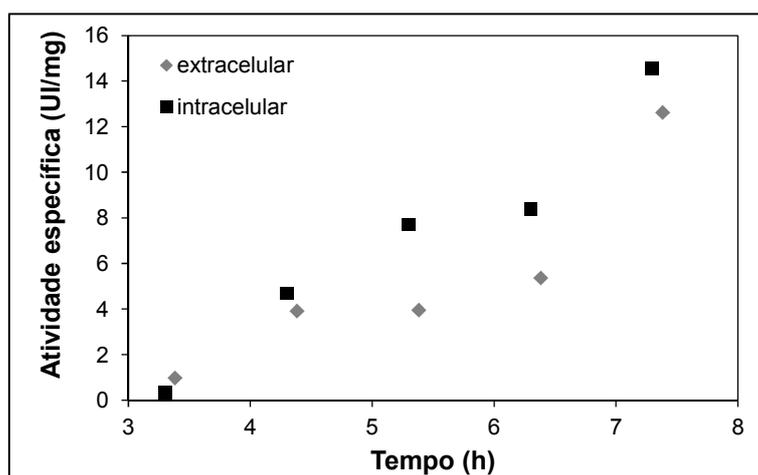


Figura 4.9 Atividade específica de L-asparaginase ao longo do tempo a partir da indução da expressão da proteína. Os losangos representam a atividade específica do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans (expressão extracelular) e os quadrados representam a atividade específica do cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans (expressão intracelular).

Nestes experimentos também foram realizadas análises de concentração de ácido acético, já que este pode inibir o crescimento celular. Alguns autores afirmam que a inibição ocorre em concentrações de ácido acético acima de 2 g/L (SHILOACH e FASS, 2005) e outros que a inibição ocorre acima de 5 g/L (TRIPATHI *et al.*, 2009), sendo que a expressão da proteína pode ser prejudicada com valores ainda menores, em torno de 0,9 a 1,5 g/L de ácido acético (ARISTIDOU *et al.*, 1995). Os resultados das análises de concentração de ácido acético são mostrados na figura 4.10. Observando os resultados mostrados nesta figura, pode-se perceber que a concentração de ácido acético atingiu cerca de 0,25 g/L ao final dos cultivos para as duas cepas, valor este que está bem abaixo dos relatados como inibidores do crescimento celular.

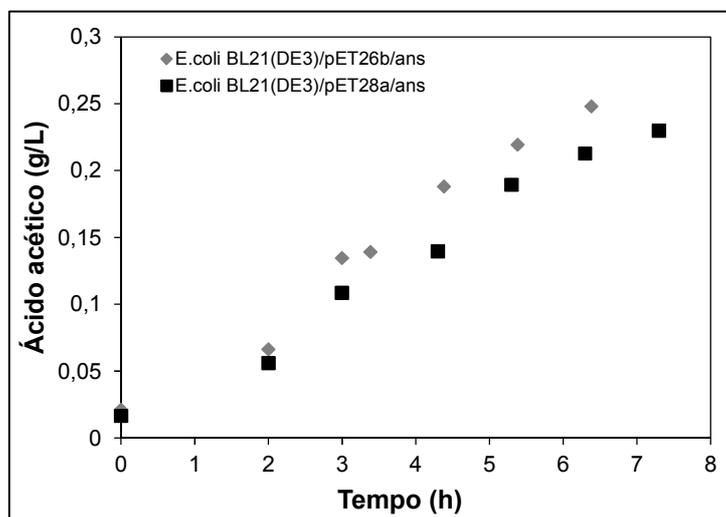


Figura 4.10 Concentração de ácido acético ao longo do tempo nos experimentos em biorreator utilizando as cepas recombinantes de expressão da L-asparaginase (*E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans e *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans).

4.3.3 Expressão em biorreatores com meio de cultura definido

A partir deste ponto os experimentos foram todos realizados utilizando a bactéria recombinante *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans, a qual possibilita a obtenção da L-asparaginase no meio extracelular. Com o intuito de obter um processo melhor controlado, os cultivos a seguir foram realizados utilizando meio de cultura definido, conforme descrito no capítulo de Metodologia.

4.3.3.1 Cinética de crescimento

A fim de identificar as fases do crescimento celular da bactéria *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans em biorreator com meio de cultura definido, foi realizado um cultivo celular obtendo-se perfis de concentração de células, glicerol, ácido acético e lático, e percentual de oxigênio dissolvido ao longo do tempo. A figura 4.11 representa os dados obtidos neste experimento. Através da análise da figura 4.11(A.1) e 4.11(B.1), é possível observar que em 11 horas de cultivo a concentração celular chegou a 2,3 g/L. Para identificar o início e final da fase exponencial foi construído um gráfico do logaritmo natural da concentração celular versus o tempo (figura 4.11(A.2) e 4.11(B.2)). O crescimento exponencial ocorre quando o número de células é duplicado em um intervalo de tempo constante, sendo a velocidade específica de crescimento constante e máxima (SCHMIDELL *et al.*, 2001; MADIGAN *et al.*, 2010). Sendo assim, através da integração da equação (4.1), de conservação de biomassa (X) para processos em batelada, de X_i a X e de t_i a t, sendo X_i a concentração celular no início da fase exponencial ($t=t_i$), obtém-se a equação (4.2).

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot \mu \quad (4.1)$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_i}\right) = \mu \cdot (t - t_i) \quad (4.2)$$

Desta forma, através da equação (4.2) é possível traçar um gráfico do logaritmo natural da concentração celular em função do tempo (figura 4.11(A.2) e 4.11(B.2)), onde a fase exponencial de crescimento é representada pela reta no gráfico e o coeficiente angular da reta representa a velocidade específica de crescimento durante a fase exponencial. Sendo assim é possível observar, na figura 4.11(A.2) e 4.11(B.2), que a fase exponencial de crescimento termina próximo às oito horas de cultivo. A velocidade específica de crescimento na fase exponencial foi $0,47 \text{ h}^{-1}$ para o experimento (A) e $0,46 \text{ h}^{-1}$ para o experimento (B), sendo o experimento (A) e (B) réplicas. O meio de cultivo utilizado nestes experimentos foi baseado no meio utilizado por KORZ *et al.* (1995). Estes autores cultivaram a cepa *E. coli* TG1 em biorreator em modo batelada a 28°C e obtiveram velocidade específica de crescimento na fase exponencial de $0,29 \text{ h}^{-1}$. De posse dos dados de início e fim da fase exponencial de crescimento foi determinado em que valor de absorbância (concentração celular) seriam realizadas as induções da expressão dos experimentos do planejamento de experimentos que serão mostrados no item 4.3.3.2.

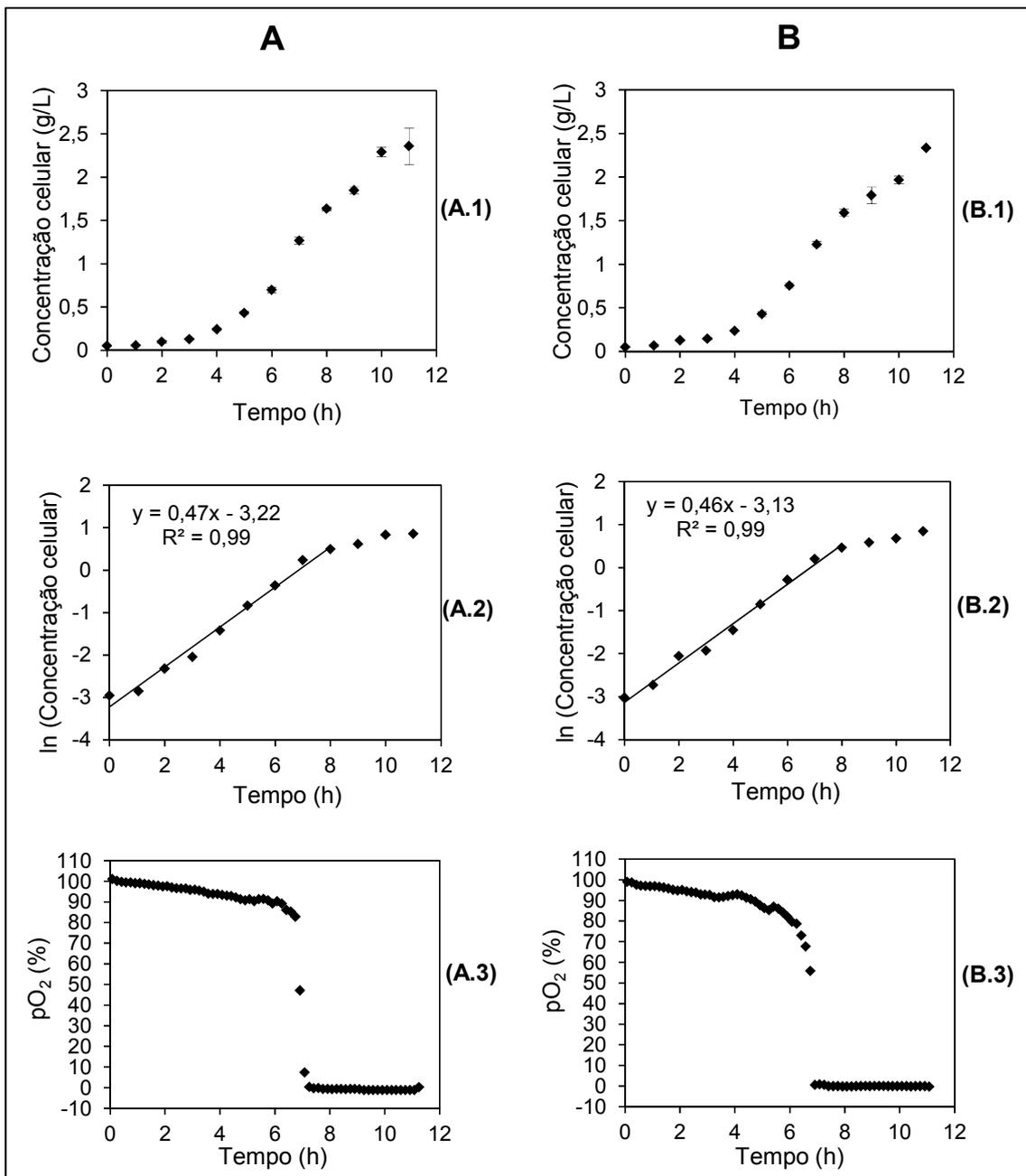


Figura 4.11 Cinética de crescimento celular da bactéria *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans (expressão extracelular) em meio de cultura definido a 37°C, com pH mantido em 6,7 e agitação de 500rpm. **A** e **B** são réplicas do experimento. **(A.1)** e **(B.1)**, Curvas de crescimento celular. **(A.2)** e **(B.2)**, Logaritmo natural da concentração celular ao longo do tempo de cultivo. **(A.3)** e **(B.3)**, Percentual de oxigênio dissolvido na fase líquida ao longo do tempo de cultivo.

Na figura 4.11 também são mostrados os percentuais de oxigênio dissolvido na fase líquida ao longo do tempo de cultivo (4.11 (A.3) e 4.11 (B.3)). É possível perceber que o percentual de oxigênio dissolvido chega a zero em aproximadamente 7 horas de cultivo, uma hora antes de terminar a fase exponencial de crescimento. Um dos fatores que podem ter contribuído para o final da fase exponencial de crescimento foi a

falta de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. A disponibilidade de oxigênio dissolvido afeta a taxa de crescimento celular de *Escherichia coli*, mesmo sendo esta bactéria um micro-organismo facultativo (LEE, 1996; GUPTA *et al.*, 2001b).

Neste experimento de cinética de crescimento celular também foram avaliados o consumo de glicerol (substrato) e outros metabólitos formados durante o cultivo, como os ácidos orgânicos. Estes dados são apresentados na figura 4.12, onde é possível perceber que o glicerol não foi esgotado em 11 horas de cultivo, no entanto as células saíram da fase exponencial de crescimento em torno 8 horas após o início do processo. Neste mesmo intervalo de tempo, ácido acético e ácido láctico começaram a ser produzidos no cultivo. Como mencionado anteriormente, uma das possíveis causas para a célula sair da fase exponencial antes de terminar o substrato é a quantidade muito baixa de oxigênio dissolvido. Comparando os dados de oxigênio dissolvido da figura (4.11) com os dados de produção de ácido acético e ácido láctico da figura (4.12) percebe-se que a produção destes ácidos começa a partir do momento que o percentual de oxigênio dissolvido chega a zero no meio de cultivo. A bactéria *E. coli* necessita de um elevado suprimento de oxigênio para suportar seu crescimento em elevadas concentrações, caso contrário, a bactéria utilizará vias anaeróbicas que irão resultar na produção de metabólitos ácidos, como ácido acético e ácido láctico (KORZ *et al.*, 1995; LEE, 1996). Estes metabólitos em elevadas concentrações são prejudiciais ao crescimento celular. Em 11 horas, o cultivo apresentava 2,0 g/L de ácido acético e 2,7 g/L de ácido láctico. Alguns autores afirmam que ocorre inibição do crescimento em valores em torno de 2 a 5 g/L de ácido acético (SHILOACH E FASS, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2009), valores muito próximos ao valor produzido nesta cinética de crescimento. Em seus estudos VÁZQUEZ *et al.* (2011) estudaram as concentrações de alguns ácidos orgânicos necessárias para reduzir em 50% a biomassa de *E. coli* produzida em um cultivo em relação à produzida por um controle no mesmo tempo. VÁZQUEZ *et al.* (2011) mostraram que tais concentrações necessárias para a redução da população em 50% foram: 1,5 g/L de ácido acético e 1,92 g/L de L-ácido láctico, sendo estes estudos realizados em pH acima do pKa dos ácidos, ou seja, os ácidos estavam na forma dissociada. Nos experimentos da cinética de crescimento, os ácidos orgânicos também estavam na forma dissociada, já que o pH foi mantido constante e acima do pKa dos referidos ácidos. Sendo assim é possível comparar os valores descritos por VÁZQUEZ *et al.* (2011) com as concentrações produzidas durante a cinética de crescimento e desta forma propor que os ácidos láctico e acético já estavam prejudicando o crescimento.

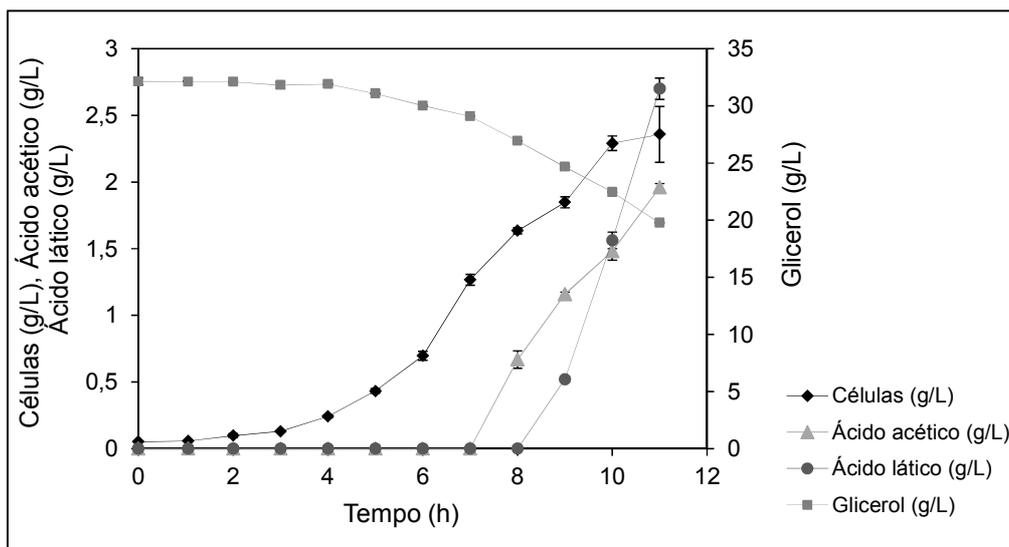


Figura 4.12 Gráfico das concentrações de glicerol, células, ácido acético e ácido láctico ao longo do tempo no experimento de cinética de crescimento celular da bactéria *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans em meio de cultura definido a 37°C, com pH mantido em 6,7 e agitação de 500rpm. Os dados são referentes à réplica **A** do experimento.

Ao final das 11 horas de crescimento foi possível obter 2,3 g/L de células. KORZ *et al.* (1995) obtiveram aproximadamente 1g/L de células (*E. coli* TG1) no mesmo tempo de cultivo, porém operando em temperatura menor (28°C) e consequentemente com velocidade específica de crescimento também menor. Além disso, KORZ *et al.* (1995) não produziram ácido acético durante a operação em batelada utilizando glicerol como fonte de carbono, isto porque a velocidade específica de crescimento apresentada durante esta fase foi baixa.

4.3.3.2 Planejamento de Experimentos utilizando biorreator com 0,4L de meio definido

Com o objetivo de analisar a influência de algumas variáveis do processo de expressão da proteína L-asparaginase, aumentar a produção da enzima e obter as condições a serem utilizadas para a obtenção de dados cinéticos em biorreatores de maior escala (1,5L e 3L), um plano fatorial fracionado a dois níveis com quatro variáveis (2^{4-1}) e quatro réplicas no ponto central foi utilizado como ferramenta de planejamento de experimentos. Com esta abordagem, foi possível obter os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis de resposta e se estes efeitos foram significativos, mas o plano empregado não permite analisar o efeito de interações entre as variáveis. As quatro variáveis independentes avaliadas foram: temperatura de expressão, concentração de canamicina, concentração de lactose (indutor) e fase do

crescimento na qual é realizada a indução (Abs_{600nm} de indução). Através deste planejamento foi avaliada a influência das variáveis independentes sobre o crescimento celular, a produção de L-asparaginase e a estabilidade plasmidial (variáveis de resposta). As variáveis de resposta foram analisadas depois de 4 e 16 horas de expressão, empregando meio de cultura definido descrito no capítulo de Metodologia, como é apresentado nas tabelas 4.4 e 4.5, respectivamente.

As condições empregadas em cada um dos experimentos do planejamento e suas variáveis de resposta ao final de 4 horas de expressão da L-asparaginase são mostradas na tabela 4.4. Os dados de crescimento celular e L-asparaginase aparecem divididos pelo tempo de processo, em termos de produtividade, e a segregação plasmidial é mostrada em valores absolutos. Os dados de crescimento celular e L-asparaginase em valores absolutos (g/L e UI/mL) são mostrados no apêndice C.

Tabela 4.4 Experimentos do planejamento fatorial fracionado e suas variáveis de resposta em 4 horas de indução, utilizando meio de cultura definido, com pH mantido em 6,7 e agitação de 500rpm. PC é o ponto central (condição intermediária entre os valores mínimo e máximo de cada variável).

Exp.	Temperatura de Expressão (°C)	Canamicina (µg/mL)	Lactose (g/L)	Abs_{600nm} de Indução	Células (g/L.h)	L-asparaginase (UI/mL.h)	F (fração de células com plasmídeo)
1	25 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,03	0,001	0,78
2	37 (+1)	25 (-1)	5 (-1)	4,6 (+1)	0,17	0,19	1,29
3	25 (-1)	75 (+1)	5 (-1)	4,6 (+1)	0,19	0,0002	0,34
4	37 (+1)	75 (+1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,16	0,004	0,88
5	25 (-1)	25 (-1)	15 (+1)	4,6 (+1)	0,29	0,001	0,78
6	37 (+1)	25 (-1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,19	0,005	1,50
7	25 (-1)	75 (+1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,05	0,0005	0,92
8	37 (+1)	75 (+1)	15 (+1)	4,6 (+1)	0,14	0,10	1,90
PC1	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,20	0,02	1,38
PC2	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,23	0,01	0,68
PC3	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,20	0,01	0,71
PC4	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,24	0,01	0,94

Em 4 horas de expressão os experimentos que apresentaram maior produção de L-asparaginase foram os experimento 2 e 8, ambos com temperatura de expressão

a 37°C e Abs600nm de indução de 4,6 (final da fase exponencial de crescimento). No experimento 2 obteve-se 2,24 UI/mL (0,190 UI/mL.h) de L-asparaginase, com rendimento de 1118,5 UI/g de célula. No experimento 8 obteve-se 1,24 UI/mL (0,101 UI/mL.h) de L-asparaginase, com rendimento de 709,7 UI/g de célula. Estes valores foram maiores que os apresentados ao final do cultivo em biorreator com meio de cultura complexo induzido com IPTG, onde obteve-se 172,7UI/g de célula e produtividade de 0,018 UI/mL.h (resultados apresentados na seção 4.3.2). Os valores de rendimento e produtividade dos experimentos 2 e 8, em 4 horas de expressão, também foram superiores aos obtidos no final dos cultivos em frascos agitados em meio de cultura complexo, quando induzido com lactose (com 2g/L de lactose), onde obteve-se 545,8 UI/g de célula e produtividade de 0,07 UI/mL.h, e quando induzido com IPTG, onde obteve-se 209,9 UI/g de célula e produtividade de 0,03 UI/mL.h. No entanto, os valores obtidos nos experimentos 2 e 8, em 4 horas de expressão em biorreator com 0,4L de meio de cultura definido não foram superiores aos obtidos em frascos agitados com meio de cultura complexo e induzidos por 10g/L de lactose, onde obteve-se 1503 UI/g de célula e 0,21 UI/mL.h.

Nos experimentos no ponto central (PC), em 4 horas de expressão, obteve-se média de $0,17 \pm 0,04$ UI/mL de L-asparaginase ($0,016 \pm 0,004$ UI/mL.h) com desvio padrão relativo de 26%. Obteve-se também média de $2,17 \pm 0,22$ g/L de células ($0,22 \pm 0,02$ g/L.h) com desvio padrão relativo de 9%. A fração de células com plasmídeo apresentou média de $0,9 \pm 0,3$ com desvio padrão relativo de 35%.

As condições empregadas em cada um dos experimentos do planejamento e suas variáveis de resposta ao final de 16 horas de expressão da L-asparaginase são mostradas na tabela 4.5. Os dados de crescimento celular e L-asparaginase aparecem divididos pelo tempo de processo, em termos de produtividade, e a segregação plasmidial é mostrada em valores absolutos. Os dados de crescimento celular e L-asparaginase em valores absolutos (g/L e UI/mL) são mostrados no apêndice C.

Tabela 4.5 Experimentos do planejamento fatorial fracionado e suas variáveis de resposta em 16 horas de indução, utilizando meio de cultura definido, com pH mantido em 6,7 e agitação de 500rpm. PC é o ponto central (condição intermediária entre os valores mínimo e máximo de cada variável).

Exp.	Temperatura de Expressão (°C)	Canamicina (µg/mL)	Lactose (g/L)	AbS _{600nm} de Indução	Células (g/L.h)	L-asparaginase (UI/mL.h)	F (fração de células com plasmídeo)
1	25 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,07	0,004	1,15
2	37 (+1)	25 (-1)	5 (-1)	4,6 (+1)	0,15	0,67	0,0004
3	25 (-1)	75 (+1)	5 (-1)	4,6 (+1)	0,19	0,07	0,05
4	37 (+1)	75 (+1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,15	0,38	0,009
5	25 (-1)	25 (-1)	15 (+1)	4,6 (+1)	0,23	0,09	0,21
6	37 (+1)	25 (-1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,14	0,40	0,03
7	25 (-1)	75 (+1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,07	0,005	0,54
8	37 (+1)	75 (+1)	15 (+1)	4,6 (+1)	0,09	0,38	0,0006
PC1	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,10	0,88	0,05
PC2	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,11	0,99	0,23*
PC3	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,10	0,85	0,06
PC4	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	0,14	0,97	0,05

*possível outlier

No experimento PC2 (réplica do ponto central), o valor de F em 16 horas de expressão (tabela 4.5) pode tratar-se de um *outlier*, pois mostra um valor aparentemente muito diferente da tendência dos demais valores de F dos outros três pontos centrais (réplicas). Segundo SCHWAAB E PINTO (2007), um ponto experimental que parece não se adequar a uma distribuição particular de probabilidades definida pela grande maioria dos demais pontos experimentais pode ser considerado um *outlier*. Uma das formas mais empregadas para determinação de um *outlier* é realizada através do cálculo do intervalo para 95% de confiança: $\mu \pm 2\cdot\sigma$, onde μ é a média no ponto central sem o possível *outlier* e σ é o desvio padrão sem o possível *outlier*. O intervalo calculado de F para os três valores dos pontos centrais, sem o PC2, está entre 0,033 e 0,071 com 95% de confiança, logo, o valor de F do experimento PC2 está fora do intervalo e este valor pode ser considerado um *outlier*. Sendo assim, o valor de F do experimento PC2 não será utilizado nos cálculos de média, desvio padrão, desvio padrão relativo e nem nas análises estatísticas.

Nos experimentos no ponto central (PC), em 16 horas de expressão obteve-se média de $20,4 \pm 1,5$ UI/mL de L-asparaginase ($0,92 \pm 0,07$ UI/mL.h) com desvio padrão relativo de 7,4%. Obteve-se também média de $2,5 \pm 0,5$ g/L de células ($0,112 \pm 0,02$ g/L.h) com desvio padrão relativo de 18,5%. A fração de células com plasmídeo apresentou média de $0,05 \pm 0,009$, com desvio padrão relativo de 18%. Os valores de produtividade de L-asparaginase alcançados em 16 horas de expressão nos experimentos do planejamento, com meio de cultura definido e indução por lactose, são superiores aos apresentados nos cultivos em biorreatores com meio de cultura complexo e indução por IPTG. No cultivo em meio de cultura complexo em biorreator, induzido por IPTG, obteve-se 0,018 UI/mL.h, enquanto nos cultivos do ponto central do planejamento obteve-se 0,92 UI/mL.h. Além disso, nos experimentos do ponto central, em 16 horas de indução, foram alcançados rendimentos com média de 8357 UI/g de célula.

Após analisar os valores de produtividade de proteína (UI/mL.h) é possível perceber que os valores com 16 horas de indução são superiores aos valores de produtividade obtidos em 4 horas de indução. Sendo assim, será utilizada a análise estatística dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes com 16 horas de expressão, para a avaliação das condições a serem utilizadas no experimento em biorreator em maior escala, uma vez que o objetivo principal é aumentar a produtividade da proteína produzida, e muitas vezes é interessante aumentar os tempos de cultivo tendo em vista o aumento da produção de proteína por hora de processo.

Na tabela 4.6 são apresentados os valores dos efeitos das variáveis e seus respectivos p -valores, para as respostas em 16 horas de expressão, considerando significativos os efeitos com $p < 0,1$ já que em bioprocessos existe uma grande variabilidade inerente envolvida (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Desta forma, é possível incluir fatores relevantes que não seriam incluídos em uma análise mais rigorosa (com $p < 0,05$) (MARINI, 2011), tornando a avaliação dos efeitos mais conservadora.

Em planejamentos fatoriais incompletos, como é o caso do planejamento utilizado neste trabalho, é importante a avaliação da curvatura. Analisando a tabela 4.5 percebe-se que os valores de produtividade de L-asparaginase são maiores no ponto central do que nos demais pontos do planejamento. Em casos como este, a curvatura pode ter significância estatística e a ausência da análise do efeito de tal curvatura

pode “mascarar” o efeito de algumas variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2009; MARINI, 2011).

Tabela 4.6 Efeitos das variáveis sobre o crescimento celular, produção de L-asparaginase e estabilidade plasmidial (*F*), com 90% de confiança, em 16 horas de indução, utilizando meio de cultura definido, com pH mantido em 6,7 e agitação de 500rpm. Em negrito estão indicados os *p*-valores < 0,1 (considerados estatisticamente significativos).

	Células (g/L.h)		L-asparaginase (UI/mL.h)		<i>F</i> (fração de células com plasmídeo)	
	Efeitos	<i>p</i> -valor	Efeitos	<i>p</i> -valor	Efeitos	<i>p</i> -valor
Média/Interação	0,14 ± 0,02	0,0004	0,25 ± 0,03	0,0001	0,25 ± 0,09	0,043
T (°C) de expressão	-0,01 ± 0,04	0,851	0,41 ± 0,05	0,0003	-0,48 ± 0,18	0,049
Canamicina (µg/mL)	-0,02 ± 0,04	0,565	-0,08 ± 0,05	0,195	-0,20 ± 0,18	0,329
Lactose (g/L)	-0,01 ± 0,04	0,894	-0,06 ± 0,05	0,299	-0,11 ± 0,18	0,587
Abs _{600nm} de indução	0,06 ± 0,04	0,179	0,11 ± 0,05	0,099	-0,37 ± 0,18	0,102
Curvatura	-0,05 ± 0,07	0,474	1,35 ± 0,09	<0,0001	-0,40 ± 0,35	0,314

Foram avaliados os efeitos da temperatura de expressão, da concentração canamicina, da concentração de lactose e da Abs_{600nm} de indução sobre o crescimento celular (tabela 4.6). Observa-se que nenhuma das quatro variáveis independentes estudadas apresentou efeito estatisticamente significativo sobre o crescimento celular, já que o *p*-valor apresentou valor maior que 0,1 para todas as variáveis independentes.

Já analisando o efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase pode-se inferir que a temperatura de expressão e a absorbância de indução têm efeito significativo positivo sobre esta variável, ou seja, o aumento das condições de Temperatura de expressão e Absorbância de indução levou ao aumento da expressão da proteína recombinante. A curvatura também apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produção da proteína, indicando que existe um efeito não linear sobre a produção de proteína. Entretanto, um planejamento fracionado não permite identificar a que variável este efeito está associado, mas somente permite identificar um efeito global não linear (representado pela curvatura do sistema). Este efeito não linear pode ser visualizado na tabela 4.5, já que os valores de produtividade de L-asparaginase (UI/mL.h) nos experimentos do ponto central são superiores a todos

os demais valores nos outros experimentos do planejamento. Estes resultados indicam que a melhor condição de expressão da proteína ocorreu quando as variáveis independentes estavam em valores intermediários dentro das faixas testadas e não em uma das extremidades, o que se esperaria se o efeito destas variáveis sobre a produção de proteína fosse linear. A concentração de lactose e a concentração de canamicina não apresentaram efeitos significativos sobre a produtividade de L-asparaginase, com 90% de confiança, dentro das faixas estudadas. Este dado revela que a concentração de lactose pode ser mantida no menor valor da faixa estudada (5 g/L), assim como a concentração de canamicina (25 µg/mL), que é a metade do valor utilizado habitualmente neste tipo de sistema (SAMBROOK E RUSSELL, 2001), sem prejudicar significativamente a produtividade de L-asparaginase, e desta forma, diminuindo os custos do processo.

A temperatura de expressão é comumente reportada na literatura como uma variável com efeito significativo sobre a produção de proteína recombinante (SWALLEY *et al.*, 2006; VOLONTÈ *et al.*, 2008; LARENTIS *et al.* 2011a; MOURA *et al.*, 2012; NOGUÈRE *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2014; PAPANEOPHYTOU e KONTOPIDIS, 2014;), isto porque a temperatura influencia diretamente na taxa de crescimento celular, e, conseqüentemente, na síntese de proteínas, no correto enovelamento destas proteína, na estabilidade plasmidial e na carga metabólica imposta à célula (LARENTIS *et al.*, 2006; EINSFELDT, 2010). Ao contrário dos resultados obtidos neste planejamento, em seus estudos, SWALLEY *et al.* (2006), VOLONTÈ *et al.* (2008), LARENTIS *et al.* (2011a) e MARINI *et al.* (2014) mostraram que a temperatura, estudada entre 20-25°C e 37°C, apresentava efeito negativo sobre a expressão de proteína solúvel. A redução da temperatura abaixo da temperatura ótima de crescimento de *E.coli* (37 C) é a estratégia mais empregada para aumentar os níveis de expressão de proteínas heterólogas, pela redução da taxa de crescimento e conseqüente redução do estresse metabólico na célula, permitindo o aumento de proteína produzida com enovelamento correto (HANNIG e MAKRIDES, 1998; VOLONTÈ *et al.*, 2008; LARENTIS *et al.*, 2011a; MOURA *et al.*, 2012; PAPANEOPHYTOU e KONTOPIDIS, 2014). O fato de a temperatura ter apresentado efeito positivo sobre a expressão da L-asparaginase neste trabalho pode ser explicado pela curvatura ser significativa, o que indica que pode haver outra temperatura, acima de 25°C e abaixo de 37°C, que pode ser próxima do ponto central (31°C), que poderia maximizar a produção de proteína dentro das faixas estudadas e que um plano facionado não permite identificar. Cabe ressaltar que todos os trabalhos da literatura citados acima são de expressão citoplasmática, o que poderia causar um estresse

maior à célula, em temperaturas maiores, pela grande quantidade de proteína formada e acumulada no citoplasma (MOURA *et al.*, 2012). Além disso, como já observado por diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa, estes resultados indicam que cada sistema recombinante responde de forma diferente, devendo ser avaliado em separado, estabelecendo as melhores condições para o processo em questão, e as ferramentas estatísticas de planejamento experimental mostraram-se as mais adequadas para esta avaliação (EINSFELDT *et al.*, 2011; LARENTIS *et al.*, 2011a; LARENTIS *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2012; MARINI *et al.*, 2014; LARENTIS *et al.*, submetido).

Além da temperatura de expressão, a absorvância de indução também apresentou efeito significativo positivo sobre a produtividade de L-asparaginase dentro da faixa estudada. Neste planejamento, a proteína foi induzida em três regiões da fase exponencial de crescimento: região inicial ($Abs_{600nm}=0,2$), região intermediária ($Abs_{600nm}=2,4$) e região final ($Abs_{600nm}=4,6$). Outros trabalhos na literatura demonstram que a absorvância de indução possui efeito significativo sobre a produção da proteína recombinante (SUNITHA *et al.*, 2000; CHUAN *et al.*, 2008; LARENTIS *et al.*, 2011b; MARINI *et al.*, 2014). Na expressão de uma fitase de *Bacillus* sp., utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3), a absorvância de indução também mostrou-se significativa sobre a expressão da proteína, no entanto, este efeito foi negativo, sendo o melhor momento para a indução o início da fase exponencial de crescimento (SUNITHA *et al.*, 2000). MANDERSON *et al.* (2006) mostraram em seus estudos que a fase de indução afeta a produção da proteína Eg95 de *Echinococcus granulosus*, sendo a melhor condição obtida com indução após 4 horas do inóculo e a pior condição quando a indução é realizada junto com o inóculo, ocorrendo uma diminuição drástica da produção da proteína, pois durante a expressão ocorre um elevado estresse metabólico na célula que está ainda em fase inicial do crescimento. Além disso, este estudo permitiu aos autores identificarem um comportamento não linear da produção da proteína em função da absorvância em que foi realizada a indução (MANDERSON *et al.*, 2006). LARENTIS *et al.* (no prelo, 2014) mostraram que a melhor etapa para indução de uma proteína de leptospira em *E. coli* foi no final da fase exponencial de crescimento. Em seus estudos, utilizando o vetor pET28 e a cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) para expressão de pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, MARINI *et al.* (2014) verificaram que o aumento da absorvância de indução de 0,8 para 2,0 causou um aumento significativo na atividade de pneumolisina, no entanto, não causou aumento significativo na produtividade da proteína. Já LARENTIS *et al.* (2011b) durante a expressão de três proteínas de *Pseudomonas stutzeri* em *E. coli* BL21-SI mostraram

que a absorvância de indução apresentou efeito significativo negativo para duas destas proteínas e efeito positivo para uma delas, reforçando a ideia de que cada sistema recombinante deve ser analisado particularmente.

Assim como realizado para o crescimento celular e produtividade de L-asparaginase, foram avaliados estatisticamente os efeitos das variáveis independentes sobre a fração de células com plasmídeo (F). A fração de células com plasmídeo também é referido como estabilidade plasmidial. A tabela 4.6 apresenta os valores dos efeitos das variáveis sobre F , juntamente com os respectivos p -valores. É possível afirmar que, dentro das faixas estudadas, as concentrações de canamicina e lactose não possuem efeito significativo sobre F , assim como a curvatura, indicando que as variáveis que são estatisticamente significativas neste sistema exercem um efeito linear sobre a estabilidade plasmidial. Cabe ressaltar que a canamicina é um antibiótico utilizado como pressão seletiva para manter as células com plasmídeo. No entanto, a concentração deste antibiótico não causou influência na estabilidade plasmidial. EINSFELDT *et al.* (2011) apresentaram resultado similar utilizando concentrações de antibiótico entre 0 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Dados apresentados por MARÍ *et al.* (1999), XU *et al.* (2006) e EINSFELDT *et al.* (2011) mostraram que a estabilidade plasmidial é muito mais dependente da indução da expressão em si do que da presença ou ausência de antibiótico no sistema. Todos estes dados foram obtidos sem avaliar a concentração de canamicina ao longo do cultivo, o que pode acarretar em uma avaliação errônea, já que ao final de um cultivo considera-se ter a quantidade inicial de canamicina utilizada, no entanto, pode-se ter uma quantidade bem menor do antibiótico. A concentração de canamicina não é rotineiramente avaliada em experimentos desta área, aliás, até onde se tem conhecimento não existe na literatura trabalhos que avaliem esta concentração ao longo da expressão de proteínas recombinantes. O vetor comercial utilizado neste trabalho, pET26b, possui um gene de resistência à canamicina, antibiótico da classe dos aminoglicosídeos (NAP *et al.*, 1992; NOVAGEN, 2005). No entanto, a empresa que produz o plasmídeo não revela qual é o gene, qual a proteína que ele codifica e qual a possível ação desta proteína sobre a molécula de canamicina. Através de uma busca no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), algoritmo que faz alinhamentos entre duas sequências buscando o máximo de similaridade ou conservação entre elas, buscou-se por domínios conservados na sequência do vetor pET26b/*ans* para tentar identificar possíveis genes de resistência à canamicina e assim, identificar possíveis ações sobre a molécula de canamicina. Com isso, foi possível observar domínios conservados referentes à família das fosfotransferases e colina quinases na sequência do vetor

pET26b/ans. Sabe-se que os principais agentes de resistência bacteriana à canamicina são as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: fosfotransferase, acetiltransferase e nucleotidil transferase (NAP *et al.*, 1992; ALMEIDA, 2011). A presença de domínios conservados da família das fosfotranferases é um indício de que o gene de resistência à canamicina presente no vetor codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeo. Sendo isso uma suposição verdadeira, a concentração de canamicina ativa no meio de cultivo diminuiria ao longo do cultivo.

Através das análises apresentadas na tabela 4.6, pode-se afirmar que a temperatura de expressão e a absorvância de indução possuem efeitos estatisticamente significativos negativos sobre a estabilidade plasmidial. Este resultado indica que o aumento das variáveis temperatura e absorvância de expressão causa uma diminuição significativa da estabilidade plasmidial, dentro das faixas estudadas, resultado oposto aos efeitos destas mesmas variáveis sobre a produção de L-asparaginase. Isto significa que quando a absorvância de indução e a temperatura de expressão são mantidas nos níveis mais elevados a perda de plasmídeo também é elevada, mas a produtividade da proteína ao final das 16 horas de expressão alcança um dos melhores valores dentro das condições estudadas. Na literatura altas temperaturas são referidas como prejudiciais para a estabilidade plasmidial, pois aumentam a taxa de crescimento celular, o que por sua vez aumenta a probabilidade de perda do plasmídeo (SHIN *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2005). Através da avaliação conjunta destes resultados, é possível inferir que a produção de proteína não alcançou valores maiores em virtude da elevada perda plasmidial atingida após o tempo total de processo.

Os próximos experimentos (aumento de escala para validação do planejamento de experimentos e para obtenção de dados cinéticos) foram realizados levando em consideração os resultados obtidos no planejamento. Um experimento para validação do planejamento foi realizado em biorreator utilizando 3 L de meio de cultivo e operando na melhor condição de produtividade de L-asparaginase do plano fatorial, que foram as condições empregadas no ponto central, em 16 horas de expressão. Como a escala de produção foi aumentada, uma condição de máxima produtividade e com as respostas previamente conhecidas pelo planejamento foi escolhida para possibilitar a comparação.

Para a realização do experimento de obtenção de dados cinéticos em biorreator com 1,5L de meio de cultura, para estudo do processo, comparação com o

modelo matemático proposto e estimação de parâmetros, não foram utilizados os dados da melhor produção de proteína, pois o modelo não prevê variação de temperatura. Como a temperatura de expressão e a absorbância de indução mostraram efeitos significativos positivos sobre a produtividade de proteína, no experimento para obtenção de dados cinéticos, estas variáveis foram fixadas nos níveis máximos estudados no planejamento (37°C e $\text{Abs}_{600\text{nm}} = 4,6$). Já as concentrações de canamicina e lactose não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a produtividade da proteína, sendo assim, foram mantidas nos níveis mínimos estudados (5 g/L de lactose e 25 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina).

4.3.3.3 Validação do planejamento em biorreator com 3L

Como a produtividade de L-asparaginase alcançou um ponto de máximo nos experimentos do ponto central do planejamento realizado em biorreatores com 0,4 L de meio de cultura definido, as condições do ponto central foram utilizadas no experimento de validação do planejamento em biorreator com 3 L de meio de cultivo. Para tanto, foi utilizada como variável de escalonamento a taxa de aeração (vvm), que foi mantida no mesmo valor da utilizada nos experimentos do planejamento. Neste experimento, o cultivo foi mantido a 37°C antes da expressão e, após a indução, a temperatura foi alterada para 31°C . Foi utilizada concentração de canamicina de 50 $\mu\text{g/mL}$ e a indução foi realizada com 10g/L de lactose quando a absorbância chegou a 2,24 (equivalente a 0,66 g/L de células). Os resultados deste experimento podem ser visualizados nos gráficos apresentados na figura 4.13.

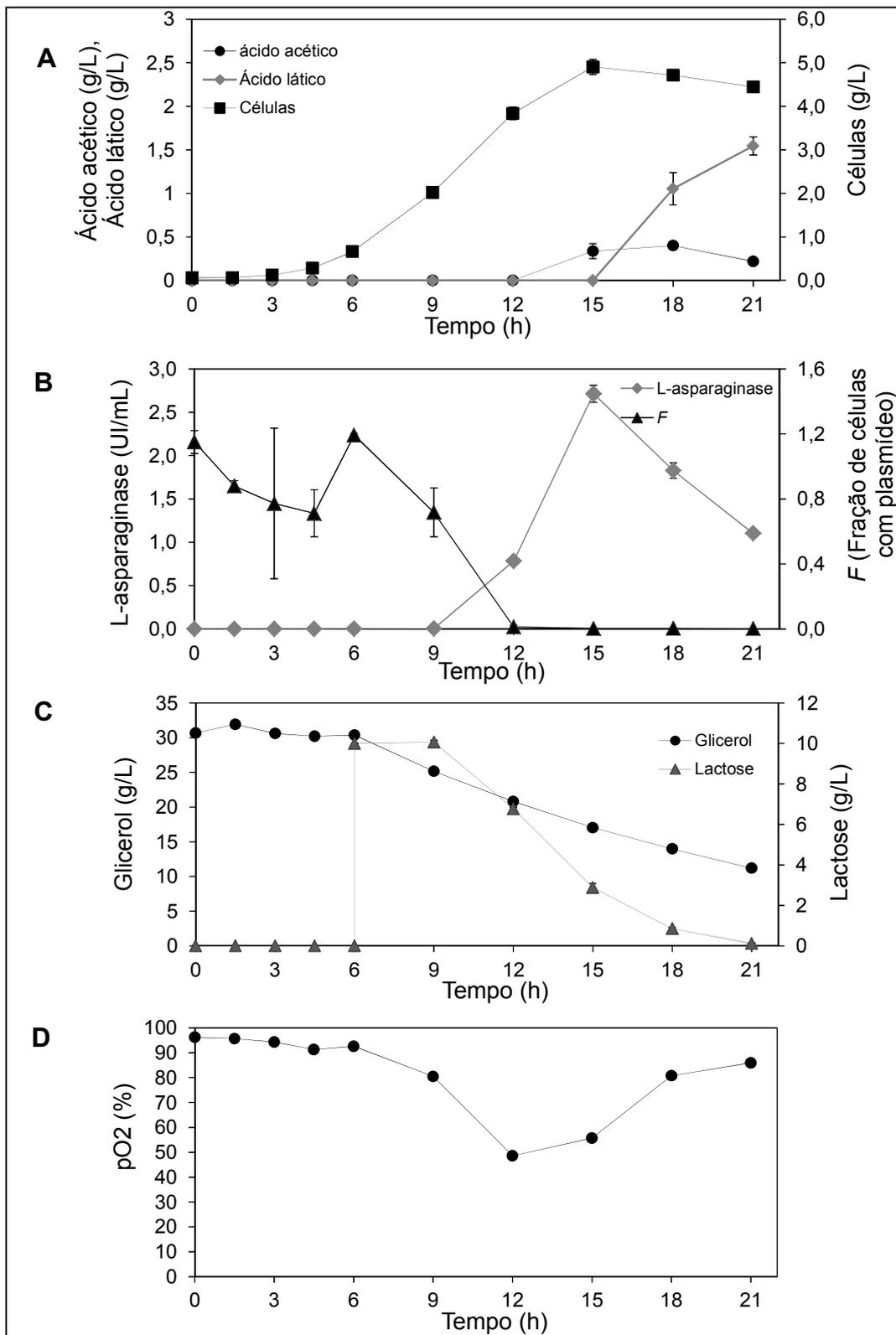


Figura 4.13 Resultados obtidos na produção de L-asparaginase em biorreator com 3L de meio de cultura definido, pH mantido em 6,7, agitação de 500rpm, Temperatura mantida em 37°C antes da indução e em 31°C depois da indução. **A**, Cinética do crescimento celular e da produção de ácido acético e ácido láctico. **B**, Cinética da produção de L-asparaginase e da fração de células com plasmídeo (*F*). **C**, Cinética do consumo de glicerol e lactose. **D**, Oxigênio dissolvido ao longo do cultivo.

Neste experimento obteve-se concentração celular máxima de 4,9 g/L em 15 horas de cultivo e produção de L-asparaginase de 2,7 UI/mL em 15 horas de cultivo (9 horas de expressão), alcançando produtividade máxima de 0,18 UI/mL.h (figura 4.13A e 4.13B). Após as 15 horas de expressão obteve-se 4,4 g/L de células e 1,1 UI/mL de L-asparaginase. Estes valores são bastante distantes dos obtidos nos experimentos do ponto central do planejamento. Obteve-se o dobro do crescimento celular no biorreator com 3L de cultivo e 10 vezes menos proteína. Esta diminuição na produção da proteína provavelmente deve-se ao fato da taxa de crescimento celular ter sido elevada. Na literatura é reportado que taxas de crescimento menores alcançam maiores produções de proteína (RIESENBERG *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2013). Segundo KORZ *et al.* (1995), existe uma taxa de crescimento crítica, acima da qual podem ser formados metabólitos tóxicos para a célula, como o ácido acético. No caso da *E. coli* TGI, utilizada no estudo, os autores afirmam que a velocidade de crescimento crítica é em torno de $0,17 \text{ h}^{-1}$ (KORZ *et al.*, 1995).

A aeração deste biorreator em particular foi realizada utilizando pedras porosas, diminuindo as bolhas de ar e aumentando a transferência de oxigênio para o líquido. Desta forma, como pode ser visualizado na figura 4.13D, o oxigênio dissolvido manteve níveis acima de 40% durante todo o cultivo. Esta estratégia foi ótima para o crescimento celular, no entanto como a taxa de crescimento e a concentração celular foram elevadas, a produção de L-asparaginase foi pequena, isso porque a sobrecarga metabólica imposta à célula durante a expressão é elevada, pois a célula precisa além das funções normais, manter e replicar o plasmídeo e ainda expressar a proteína recombinante (POPOV *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). Desta forma, com o metabolismo voltado para o crescimento celular, outras funções, como a expressão da proteína ou replicação do plasmídeo podem ficar prejudicadas. Além disso, segundo SCHMIDT (2005), o aumento de escala pode trazer alguns problemas ao processo, como a diminuição da qualidade de mistura dentro do vaso, o aumento da exposição das células ao estresse e a instabilidade plasmidial, sendo assim, as diferenças nos resultados dos dois biorreatores com tamanhos e volumes diferentes, em parte podem ser atribuídas a problemas referentes ao aumento de escala. Também é reportado na literatura que concentrações elevadas de oxigênio dissolvido podem ser prejudiciais para a célula, causando estresse oxidativo, danos em nucleotídeos e oxidação de proteínas (MANDERSON *et al.*, 2006), sendo assim, como os níveis de oxigênio dissolvido mantiveram-se acima de 40% isto pode ter influenciado na expressão da proteína.

A produção de ácidos, acético e láctico, não foi elevada (figura 4.13A), provavelmente devido ao elevado percentual de oxigênio dissolvido no cultivo. A figura 4.13A apresenta o gráfico dos valores de ácido acético e ácido láctico ao longo do cultivo no biorreator com 3L de meio. Os valores apresentados ao final do cultivo (em 21 horas total e 15 horas de expressão), 1,55 g/L de ácido láctico e 0,4 g/L de ácido acético, a princípio não seriam prejudiciais ao crescimento celular. Neste caso as células podem ter começado a morrer devido à perda do plasmídeo.

As concentrações de glicerol e de lactose são mostradas na figura 4.13C. Os dois compostos são consumidos ao mesmo tempo após a adição da lactose para indução (6 horas de cultivo) e a concentração de lactose chega à zero no final do processo, mesmo com 10 g/L. Já o glicerol não termina até o final do cultivo, sendo assim, as células não pararam de crescer devido à falta de substrato, uma vez que o crescimento celular se manteve por 9 horas após a indução (até 15 horas de cultivo, quando a fase de morte celular começa a ocorrer).

A estabilidade plasmidial neste experimento com 3 L de meio foi menor que no experimento do ponto central do planejamento. Através da análise da figura 4.13B é possível perceber que a estabilidade plasmidial atingiu valores próximos a zero após 12 horas de cultivo, sendo F igual a 0,003 (0,3%) no final de 15 horas de expressão, enquanto no experimento do planejamento na mesma condição, porém em 0,4 L, obteve-se F igual a 0,05 (5%) no final da expressão. Esta diferença pode ter ocorrido devido à velocidade de crescimento celular no biorreator com 3 L ter sido mais elevada (figura 4.16). A fração de células com plasmídeo chegou a valores próximos a zero 6 horas após a indução, o que pode ser visualizado na figura 4.13B. Este pode ter sido um dos motivos para a produção de L-asparaginase ser tão baixa quando comparada à produção nas mesmas condições no experimento do planejamento. A atividade enzimática aumentou até aproximadamente 15 horas de cultivo, mesmo com a fração de células com plasmídeo ser quase zero pelo menos 3 horas antes deste ponto. Este fenômeno também foi observado por outros autores (SUNITHA *et al.*, 2000; EINSFELDT *et al.*, 2011). SUNITHA *et al.* (2000), em seus estudos de expressão de uma fitase utilizando *E. coli* como hospedeiro, relataram que após a indução a produção da enzima passa de 0 à 800 U/L e a estabilidade plasmidial passa de 100% à 60% em 2 horas de expressão, e após 2,5 horas de expressão, a produção de fitase passa a 1000 U/L e a estabilidade plasmidial passa a ser 20%. Após este período, a atividade da enzima fitase começa a diminuir. EINSFELDT *et al.* (2011) também apresentaram resultados semelhantes na expressão da proteína ClpP utilizando o

vetor pET28 e *E. coli* BL21 Star (DE3) como hospedeiro. Em 4 horas de expressão da ClpP, a estabilidade plasmidial já havia diminuído para 47% mas a produção da proteína ainda estava aumentando (EINSFELDT *et al.*, 2011).

4.3.3.4 Aumento de escala para obtenção de dados cinéticos em biorreator com 1,5L

Com o objetivo de estudar o processo de produção de L-asparaginase, em meio de cultura definido ao longo do tempo e obter dados cinéticos para melhor entendimento do processo e para o desenvolvimento de um modelo, foi realizado cultivo em biorreator com 1,5 L de volume de trabalho, para a produção de L-asparaginase empregando as condições descritas no capítulo de Metodologia. Para tanto, foi utilizada como variável de escalonamento a taxa de aeração (vvm), que foi mantida no mesmo valor da utilizada nos experimentos do planejamento.

Como a temperatura de expressão e a absorbância de indução mostraram efeitos significativos positivos sobre a produção de proteína, neste experimento estas duas variáveis foram mantidas em 37°C e absorbância 4,6 (aproximadamente 1,3 g/L de células), que foram os máximos valores estudados no planejamento. A obtenção de dados cinéticos em biorreator com 1,5L foi realizada utilizando estas condições e não a condição do ponto central que apresentou maior produtividade, pois os dados obtidos neste experimento serão utilizados para a comprovação do modelo proposto e para a estimação de parâmetros. Como o modelo matemático desenvolvido não contempla alteração da temperatura após a indução, esta variável precisava ser mantida constante, o que não aconteceria nas condições do ponto central.

A concentração de canamicina e a concentração de lactose foram mantidas nos menores níveis estudados, 25 µg/mL e 5 g/L, respectivamente, isto porque estas variáveis não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre as respostas avaliadas. Sendo assim, a temperatura de expressão foi fixada em 37°C empregando 25 µg/mL de canamicina e a indução foi realizada quando a absorbância chegou a 4,6, com 5 g/L de lactose. Foram retiradas amostras a cada 2 horas antes da indução. Após a adição de lactose foram retiradas amostras a cada 3 horas durante 15 horas de indução. Os resultados deste experimento podem ser visualizados nos gráficos apresentados na figura 4.14 e serão utilizados para verificação do modelo matemático proposto e estimação de parâmetros.

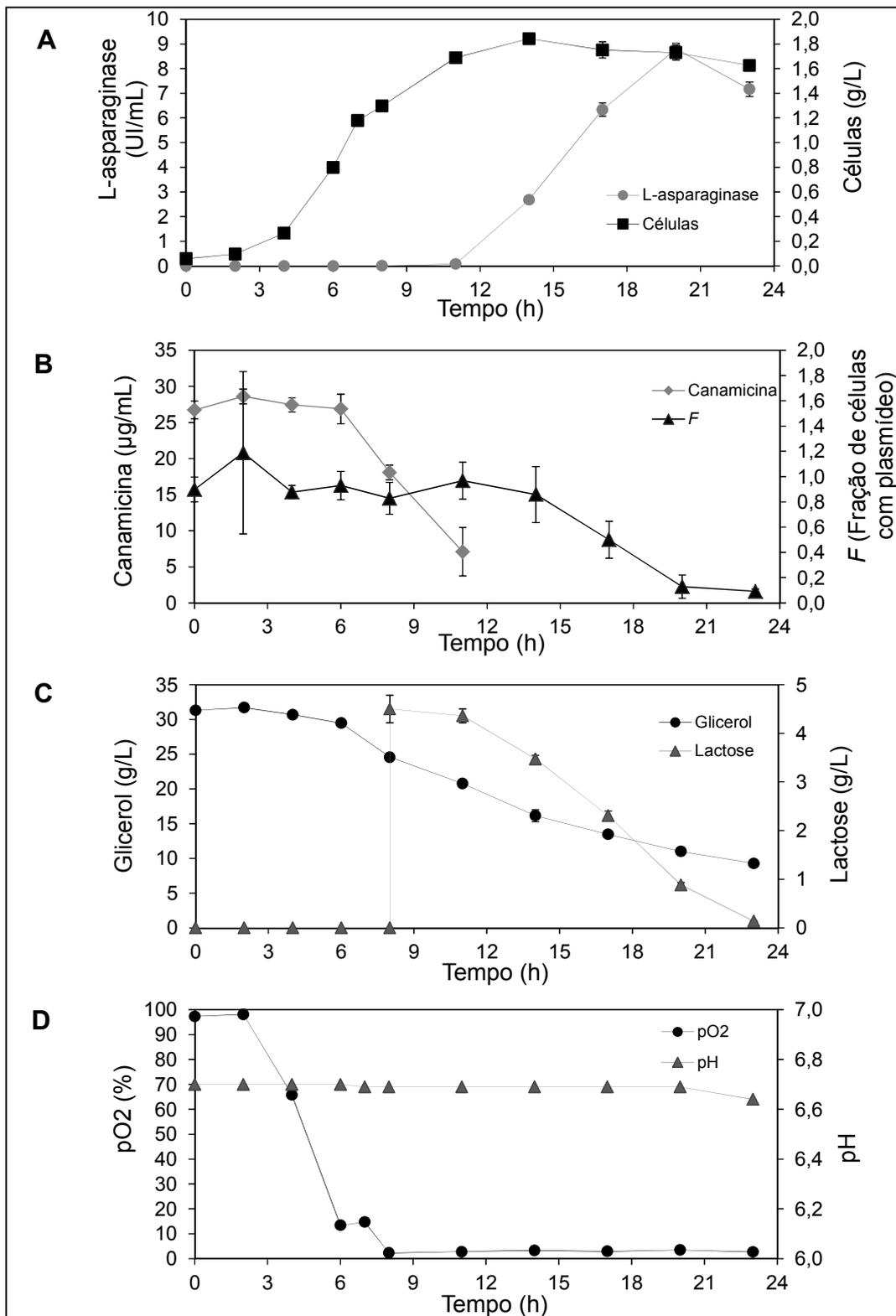


Figura 4.14 Resultados obtidos na produção de L-asparaginase em biorreator com 1,5 L de meio de cultura definido, pH mantido em 6,7, agitação de 500rpm e temperatura mantida em 37°C durante todo o cultivo. **A**, Cinética do crescimento celular e da produção de L-asparaginase. **B**, Cinética da concentração de canamicina e da fração de células com plasmídeo (*F*). **C**, Cinética do consumo de glicerol e lactose. **D**, Oxigênio dissolvido e pH ao longo do cultivo.

Neste experimento realizado em biorreator de 1,5 L obteve-se concentração celular máxima de 1,8 g/L em 14 horas de cultivo e produção de L-asparaginase de 8,8 UI/mL em 20 horas de cultivo (12 horas de expressão), alcançando produtividade máxima de 0,44 UI/mL.h (figura 4.14A). Estes valores são aproximadamente a metade dos obtidos no experimento 2 do planejamento de experimentos (3,4 g/L e 15,8 UI/mL). O experimento 2 do planejamento foi realizado na mesma condição deste experimento com exceção do volume de cultivo (0,4 L no planejamento e 1,5 L nesta cinética), e tamanho do vaso do biorreator (0,75 L no planejamento e 2,5 L nesta cinética). Assim como discutido anteriormente, o aumento de escala pode trazer alguns problemas, como a diminuição da qualidade de mistura dentro do vaso, o aumento da exposição das células ao estresse e a instabilidade plasmidial (SCHMIDT, 2005). Neste trabalho, a estabilidade plasmidial não diminuiu quando comparada à estabilidade obtida no experimento 2 do planejamento, como pode ser visualizado na figura 4.14B através da fração de células com plasmídeo, sendo a estabilidade plasmidial em 4 horas de expressão aproximadamente 100% no experimento 2 e neste experimento com 1,5 L. Como pode ser verificado na figura 4.14B, à medida que a concentração de canamicina diminuiu, a perda do plasmídeo aumentou, sendo que, quando a fração de células com plasmídeo atingiu valores abaixo de 0,5 (após 17 horas de cultivo), a taxa de produção da proteína diminuiu. Este resultado indica a importância da quantificação de canamicina e da manutenção da estabilidade plasmidial para a produção da proteína recombinante, questão que temos levantado em trabalhos do grupo e que é pouco analisada e valorizada na literatura (EINSFELDT et al., 2011; LARENTIS *et al.*, submetido). Nestes experimentos, os valores de concentração de canamicina só foram obtidos até 11 horas de cultivo, isto porque, após este período houve alguma interferência na análise, fazendo com que não ocorresse crescimento celular nas análises com amostras dos pontos a partir de 14 horas de cultivo. Foi neste tempo de cultivo, a partir de 11 horas, que a L-asparaginase começou a ser detectada no cultivo, o que poderia indicar que a própria proteína pode ser tóxica para as células, impedindo o crescimento de *E. coli* BL21(DE3) nas análises de concentração de canamicina. Além disso, em 11 horas de cultivo havia 2,87 g/L de ácido láctico, sendo que, em 14 horas de cultivo a concentração de ácido láctico já era 6,2 g/L, concentração muito acima da concentração de 1,92 g/L necessária para matar 50% de uma população de *Escherichia coli* segundo VÁZQUEZ *et al.* (2011).

É possível observar que antes da indução da expressão da L-asparaginase (feita pela adição de lactose em 8 horas de cultivo), o valor de F manteve-se em torno

de 1,0, ou seja, o cultivo manteve a estabilidade plasmidial. A partir da sexta hora de indução (14 h de cultivo), a estabilidade plasmidial começou a diminuir (86%), atingindo 9% de estabilidade no final de 15 horas de expressão (23 h de cultivo). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por XU *et al.* (2006), TOMAZETTO *et al.* (2007), GOYAL *et al.* (2009) e EINSFELDT *et al.* (2011), que mostraram que a indução diminui a estabilidade plasmidial. EINSFELDT *et al.* (2011), em experimentos em frascos agitados utilizando meio de cultura complexo, mostrou que a estabilidade plasmidial diminuiu de 100% na hora da indução para aproximadamente 45% ao final das 4 horas de indução para a produção da proteína ClpP em pET28. A diminuição da estabilidade com a indução da expressão pode ser atribuída à carga metabólica imposta à célula pela produção da proteína recombinante. Isto ocorre porque, para a manutenção e replicação dos plasmídeos, a célula já necessita mais energia que aquela gasta com suas funções metabólicas normais e a expressão da proteína recombinante causa um aumento ainda maior desta sobrecarga (PALOMARES *et al.*, 2004; POPOV *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). GOYAL *et al.* (2009) em seus estudos de expressão utilizando a cepa *E. coli* BL21 (DE3) e o plasmídeo pET23 em meio definido com glicose como substrato mostraram que o cultivo manteve a estabilidade plasmidial durante aproximadamente 9 horas de cultivo; no entanto, 3 horas após a indução, o cultivo apresentava 40% de estabilidade plasmidial e 4 horas após a indução, a estabilidade já apresentava valor próximo a zero.

Outro fator apontado por contribuir para a estabilidade plasmidial é a composição do meio de cultura. TOMAZETTO *et al.* (2007), em seus resultados utilizando um vetor pET e *E. coli* BL21(DE3), mostrou que cultivos em meio de cultura complexo apresentaram maior perda de plasmídeo que cultivos em meio definido utilizando glicose como substrato. O experimento em biorreator com 1,5L de meio definido apresentou níveis de estabilidade plasmidial muito menores que os valores de estabilidade observados por TOMAZETTO *et al.* (2007) em um meio definido. Entretanto é importante ressaltar que cada sistema tem características particulares, dependendo da proteína expressa e do hospedeiro e vetor utilizados (LARENTIS *et al.*, *in* *unmetido*).

As concentrações de glicerol e de lactose são mostradas na figura 4.14C. Os dois compostos foram consumidos ao mesmo tempo a partir da adição de lactose em 8 horas de cultivo para indução da proteína recombinante e a concentração de lactose chega à zero no final do processo. Já o glicerol não termina até o final do cultivo. Sendo assim, pode-se inferir que as células não pararam de crescer devido à falta de

substrato. O crescimento celular parou logo após a indução da expressão e isto pode ser atribuído à sobrecarga metabólica causada pela expressão da proteína (TOKSOY *et al.*, 2002) e também à escassez de oxigênio dissolvido no meio de cultura (figura 4.14D).

Outro dado importante neste experimento pode ser visualizado na figura 4.14D, que é o acompanhamento do oxigênio dissolvido durante o cultivo. Após 8 horas de cultivo, o percentual de oxigênio dissolvido chega à zero, o que contribui não só para a desaceleração do crescimento, como para a perda plasmidial e consequente diminuição da produção de proteína recombinante. Alguns autores afirmam que a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido leva a uma diminuição da estabilidade plasmidial (FRIEHS, 2004, SILVA *et al.*, 2012). Isto ocorre porque a redução da concentração de oxigênio diminui a geração de energia pelo catabolismo celular e pode afetar a replicação e partição do plasmídeo, já que a replicação e a transcrição de um plasmídeo com múltiplas cópias requer uma grande quantidade de energia (PALOMARES *et al.*, 2004; LARENTIS *et al.*, 2006). Uma possibilidade para melhorar o crescimento celular, diminuir a perda plasmidial e aumentar a produção de L-asparaginase seria controlar o biorreator em cascata, de modo a alterar alguns parâmetros durante o processo, como a agitação, com o intuito de manter um certo nível de oxigênio dissolvido no cultivo. Na figura 4.14D também são mostrados os valores de pH ao longo do cultivo. O pH foi mantido em 6,7. Sabe-se que o pH pode influenciar a estabilidade plasmidial e consequentemente a produção da proteína, já que meios de cultura com pH baixo causam estresse às células, contribuindo para a perda do plasmídeo (SILVA *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que em cultivos com o pH controlado em 7,0, a estabilidade plasmidial foi maior que em cultivos sem controle de pH (TOMAZETTO *et al.*, 2007).

O meio de cultivo deste experimento utilizou glicerol como substrato para a produção de L-asparaginase. A utilização deste substrato é relatada na literatura como uma opção para diminuir a produção de ácido acético no cultivo (TRIPATHI *et al.*, 2009). Na figura 4.15 é apresentado o gráfico com as concentrações de ácido acético e ácido láctico ao longo do cultivo. No final de 23 horas, o cultivo apresentou 1,7 g/L de ácido acético e 14,3 g/L de ácido láctico, sendo que a produção de ácido acético começou depois de 6 horas de cultivo, quando o percentual de oxigênio sofreu uma redução drástica e atingiu valores próximos à 15%. Já a produção de ácido láctico começou depois de 8 horas de cultivo, quando o oxigênio dissolvido já havia atingido valores próximos à zero. Como já discutido anteriormente, a redução do percentual de

oxigênio dissolvido tem influência direta sobre a produção destes metabólitos ácidos e prejudiciais para o crescimento celular (KORZ *et al.*, 1995; LEE, 1996; GUPTA *et al.*, 2001b). Segundo VAZQUEZ *et al.* (2011) seriam necessárias concentrações de 1,5 g/L de ácido acético e 1,92 g/L de L-ácido lático para reduzir uma população de *E. coli* em 50%. Sendo assim, a concentração de ácido acético (1,7 g/L) e a concentração de ácido lático (14,3 g/L) presentes no cultivo já estariam prejudicando o crescimento.

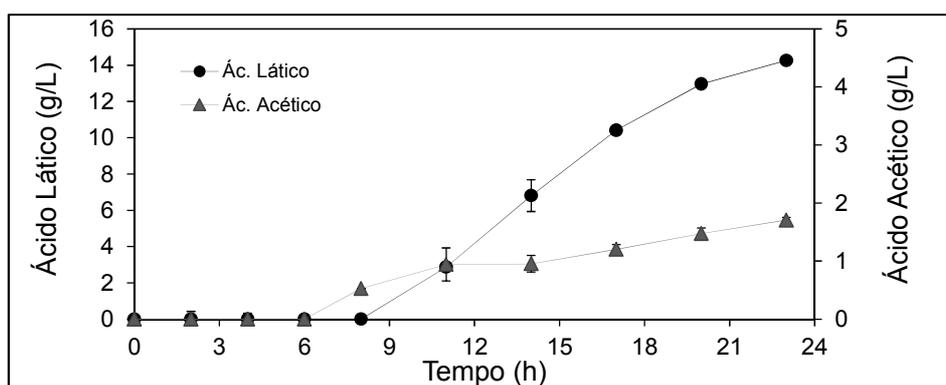


Figura 4.15 Concentrações de ácido acético e ácido lático durante o cultivo para produção de L-asparaginase em biorreator com 1,5L de meio de cultura definido, pH mantido em 6,7, agitação de 500rpm e temperatura mantida em 37°C durante todo o cultivo.

Como já mencionado anteriormente, neste cultivo com 1,5 L de meio a estabilidade plasmidial chegou a 12% em 12 horas de indução (20 horas de cultivo) e a 9% em 15 horas de indução, enquanto no experimento com 3 L de meio de cultivo a estabilidade plasmidial chegou a 1%, em apenas 6 horas de indução (12 horas de cultivo) (figura 4.13B). Esta grande perda plasmidial pode ter sido um dos motivos para a produção de L-asparaginase ser tão baixa no experimento com 3 L de meio de cultivo quando comparada à produção nas mesmas condições no experimento do planejamento e quando comparada à produção no biorreator com 1,5L.

Na figura 4.16 são apresentados os valores de logaritmo natural da concentração celular em função do tempo nos cultivos em 1,5L e 3L. Nesta figura são apresentadas os dados separados em duas etapas ao longo do cultivo, uma etapa na fase exponencial antes da indução da expressão e outra etapa nas primeiras 6 horas após a indução. Os coeficientes angulares das retas apresentadas nos gráficos representam as velocidades específicas de crescimento durante as etapas pré-indução e pós-indução. Pode-se observar que nas 6 primeiras horas após a indução da expressão, a velocidade de crescimento das células no biorreator com 3 L foi aproximadamente $0,29h^{-1}$, enquanto a velocidade de crescimento das células no

biorreator com 1,5 L foi bem menor, aproximadamente $0,06 \text{ h}^{-1}$. Esta diferença ocorreu provavelmente devido ao maior percentual de oxigênio dissolvido no meio, conforme discutido anteriormente. A taxa de crescimento maior, também causou uma maior perda de plasmídeo e assim ocorreu uma diminuição da proteína. Como discutido anteriormente, a sobrecarga metabólica imposta à célula durante a expressão é elevada, pois a célula precisa além das funções normais, manter e replicar o plasmídeo e ainda expressar uma proteína recombinante em níveis elevados (POPOV *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

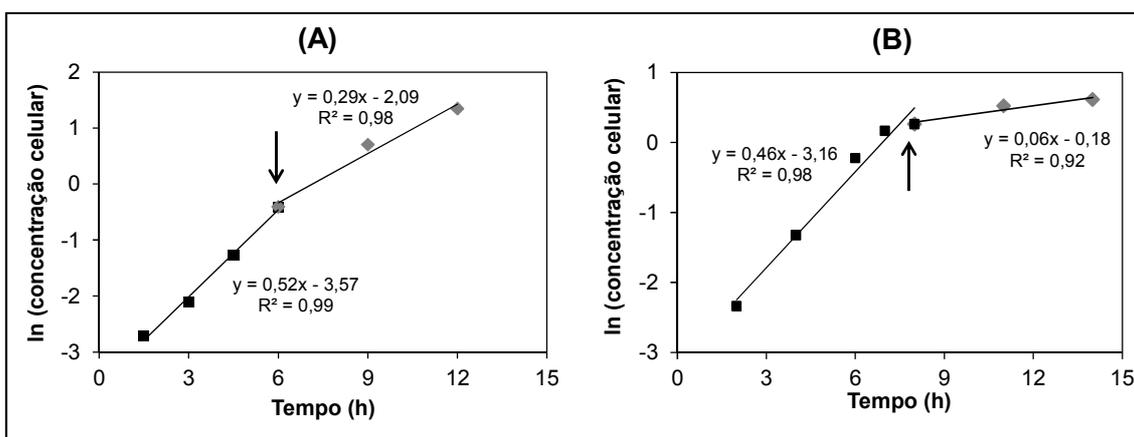


Figura 4.16 Logaritmo natural da concentração celular durante a fase exponencial antes da indução e no período de seis horas após a indução. (A) Dados referentes ao cultivo em 3 L de meio de cultivo definido. (B) Dados referentes ao cultivo em 1,5 L de meio de cultivo definido. Os quadrados pretos representam o período antes da indução e os losangos cinza representam o período de 6 horas após a indução. As setas indicam o momento da indução (adição de lactose).

4.4 Modelagem matemática e simulação do cultivo em modo batelada

Os dados que serão apresentados nesta parte do trabalho tiveram o objetivo de representar, através de um modelo matemático, o sistema de expressão de proteínas recombinantes utilizando plasmídeos não integrados ao genoma do hospedeiro.

4.4.1 Modelo matemático proposto

O modelo matemático proposto neste trabalho foi desenvolvido a partir de equações de balanço de massa. A modelagem utilizada para descrever este processo de células recombinantes foi baseada nos modelos propostos por IMANAKA E AIBA (1981), MIAO E KOMPALA (1992) e LARENTIS *et al.* (2006). Algumas hipóteses

foram seguidas para a formulação dos modelos apresentados a seguir: o reator foi considerado de mistura perfeita e a temperatura do sistema constante. O modelo matemático apresentado a seguir foi desenvolvido para operação do biorreator em batelada.

A modelagem foi desenvolvida utilizando lactose como indutor da expressão. Dois aspectos importantes da presença do indutor no cultivo de células recombinantes foram incorporados na modelagem. O primeiro efeito é que o indutor inibe o crescimento celular. Um termo de inibição foi incorporado às taxas específicas de crescimento celular. Além disso, como a lactose é utilizada como indutor, devem ser consideradas taxas específicas de crescimento referentes ao crescimento tanto devido ao primeiro substrato (glicerol) quanto devido à lactose.

O Balanço de massa para o crescimento celular é mostrado nas equações (4.3) e (4.4). Como o crescimento ocorre simultaneamente em glicerol e em lactose quando ambos estão presentes no meio, a contribuição de cada um dos substratos foi considerada para a formação de biomassa. Na equação (4.4), o último termo da equação se refere à morte de células sem plasmídeo dependente da concentração de antibiótico no meio. As equações de X^+ e X^- em função do tempo são apresentadas a seguir:

$$\frac{dX^+}{dt} = [(1-p) \cdot \mu_s^+ + (1-p) \cdot \mu_{le}^+] \cdot X^+ \quad (4.3)$$

$$\frac{dX^-}{dt} = [p \cdot \mu_s^+ + p \cdot \mu_{le}^+] \cdot X^+ + [\mu_s^- + \mu_{le}^-] \cdot X^- - f(A) \cdot X^- \quad (4.4)$$

onde t é o tempo de operação (h), X é a concentração de células (g/L), p é o coeficiente de segregação (adimensional), μ_s e μ_{le} são as taxas específicas de crescimento referentes ao glicerol e à lactose, respectivamente (h^{-1}), os sobrescritos + e - denotam células com e sem plasmídeo, respectivamente e $f(A)$ é a taxa específica de morte celular dependente da concentração de antibiótico no meio.

As expressões de taxas específicas de crescimento são mostradas nas equações (4.5), (4.6), (4.7) e (4.8):

$$\mu_s^+ = \frac{\mu_{\max,s}^+ \cdot S \cdot C_L}{(k_s + S) \cdot (K_{o,s} + C_L)} \left(1 - \frac{k_1^+ I}{k_i + I} \right) \quad (4.5)$$

$$\mu_s^- = \frac{\mu_{\max,s}^- \cdot S \cdot C_L}{(k_s + S) \cdot (K_{o,s} + C_L)} \left(1 - \frac{k_1^- I}{k_i + I} \right) \quad (4.6)$$

$$\mu_{le}^+ = \frac{\mu_{\max,le}^+ \cdot le \cdot C_L}{(k_{le} + le) \cdot (k_{o,le} + C_L)} \left(1 - \frac{k_1^+ I}{k_i + I} \right) \quad (4.7)$$

$$\mu_{le}^- = \frac{\mu_{\max,le}^- \cdot le \cdot C_L}{(k_{le} + le) \cdot (k_{o,le} + C_L)} \left(1 - \frac{k_1^- I}{k_i + I} \right) \quad (4.8)$$

onde le e I denotam a concentração extracelular e intracelular do indutor (lactose) (g/L), respectivamente, S é a concentração de glicerol (g/L), μ_{\max} é a taxa específica de crescimento máxima (h^{-1}), k_s e k_{le} são constantes de saturação (g/L), k_i representa uma constante de inibição (g/L), k_1 representa a constante que reflete a extensão máxima do declínio da taxa específica de crescimento devido ao uso do indutor (adimensional), os subscritos S e le são referentes ao glicerol e à lactose, respectivamente, C_L é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida (g/L), $k_{o,le}$ e $k_{o,s}$ representam parâmetros cinéticos do modelo (g/L).

Os balanços de massa para glicerol e lactose (indutor) são mostrados nas equações (4.9), (4.10) e (4.11). A concentração intracelular do indutor é baseada no transporte deste para o interior das células e segue a equação (4.11) proposta por MIAO E KOMPALA (1992):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/S}^+} \cdot \mu_s^+ X^+ - \frac{1}{Y_{x/S}^-} \cdot \mu_s^- X^- \quad (4.9)$$

$$\frac{dle}{dt} = \frac{F_{le}}{V_L} - a \left(\frac{le}{b + le} \right) \cdot \left(\frac{\mu_{apa}}{K_\mu + \mu_{apa}} \right) - \frac{1}{Y_{x/le}^+} \cdot \mu_{le}^+ X^+ - \frac{1}{Y_{x/le}^-} \cdot \mu_{le}^- X^- \quad (4.10)$$

$$\frac{dI}{dt} = a \cdot \left(\frac{le}{b + le} \right) \left(\frac{\mu_{apa}}{K_\mu + \mu_{apa}} \right) - \mu I \quad (4.11)$$

onde S é a concentração de glicerol (g/L), $Y_{x/S}$ é o coeficiente de rendimento de S em X , $Y_{x/le}$ é o coeficiente de rendimento de le em X , os sobrescritos $+$ e $-$ denotam células com e sem plasmídeo, respectivamente, F_{le} é a vazão mássica de lactose adicionada no biorreator (g/h), V_L é o volume de líquido no biorreator (L), a e b são

constantes do modelo, k_{μ} é uma constante de saturação e μ_{apa} é a taxa de crescimento específico aparente representada pela equação (4.12). Esta equação é definida como:

$$\mu_{\text{apa}} = \frac{\mu^+ \cdot X^+ + \mu^- \cdot X^-}{X} \quad (4.12)$$

sendo $X = X^+ + X^-$, $\mu^+ = \mu_s^+ + \mu_i^+$ e $\mu^- = \mu_s^- + \mu_i^-$

O Balanço de massa para a proteína produzida é mostrado na equação (4.13) e é baseado no modelo proposto por LEE (1988):

$$\frac{dPr}{dt} = f(\mu) \cdot X^+ - K_p \cdot Pr \quad (4.13)$$

onde P_r é a concentração da proteína (UI/L), $f(\mu)$ é a taxa específica de produção de proteína recombinante (UI/g cél.h) e K_p é a constante de decaimento da proteína (h^{-1}).

A expressão para a taxa específica de produção de proteína recombinante foi baseada no modelo de Ludeking e Piret e é mostrada na equação (4.14):

$$f(\mu) = \left(1 + \frac{k_2 I}{k_{ii} + I}\right) \cdot K_0 [(1-p)\mu^+ + \beta] \quad (4.14)$$

onde k_2 representa a amplificação máxima da proteína recombinante devido à indução, K_0 é um parâmetro do modelo (UI/g), β é um parâmetro do modelo que representa a produção da proteína independente do crescimento celular (h^{-1}).

A fração de células com plasmídeo será utilizada para descrever a influência da segregação plasmidial na dinâmica das duas populações de células. Desta forma, a fração de células com plasmídeo é definida como:

$$F = \frac{X^+}{X^+ + X^-} \quad (4.15)$$

O balanço de massa para o antibiótico no sistema é mostrado na equação (4.16) e a taxa específica de morte celular dependente da concentração de antibiótico no meio é mostrada na equação (4.17):

$$\frac{dA}{dt} = -K_{di} \cdot A \cdot X^+ \quad (4.16)$$

$$f(A) = K_m(1 - e^{-K_3 \cdot A}) \quad (4.17)$$

onde A é a concentração do antibiótico (g/L), k_{di} é a constante de taxa de degradação (L / g célula.h), K_m é a constante de taxa de morte celular e K_3 é uma constante.

As equações de balanço de oxigênio dissolvido na fase líquida e na fase gás foram baseadas no modelo descrito por LONGHI *et al.* (2004). O balanço de massa para oxigênio dissolvido na fase líquida é apresentado na equação (4.18):

$$\frac{dC_L}{dt} = KLa \cdot (C_{Le} - C_L) - \left(\frac{\Phi_{O/S}}{Y_{X/S}^+} \cdot \mu_s^+ + \frac{\Phi_{O/le}}{Y_{X/le}^+} \cdot \mu_{le}^+ \right) X^+ - \left(\frac{\Phi_{O/S}}{Y_{X/S}^-} \cdot \mu_s^- + \frac{\Phi_{O/le}}{Y_{X/le}^-} \cdot \mu_{le}^- \right) X^- \quad (4.18)$$

onde KLa é o coeficiente de transferência de massa gás-líquido, C_L é a concentração de oxigênio na fase líquida (g/L), C_{Le} é a concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com o gás (g/L), $\Phi_{O/S}$ é o coeficiente estequiométrico relativo entre oxigênio e glicerol e $\Phi_{O/le}$ é o coeficiente estequiométrico relativo entre oxigênio e lactose.

O balanço de massa para oxigênio dissolvido na fase gás é mostrado na equação (4.19):

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{F_{ar}}{V_G} \cdot (C_{GO} - C_G) - KLa \cdot (C_{Le} - C_L) \cdot \frac{V_L}{V_G} \quad (4.19)$$

onde C_G é a concentração de oxigênio na fase gás (g/L), F_{ar} é a vazão de ar injetado no biorreator (L/h), V_G é o volume interno de gás no biorreator (L), V_L é o volume de líquido do biorreator (L) e C_{GO} é a concentração de oxigênio no ar de alimentação (g/L).

A concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com a fase gás pode ser representada pela equação (4.20):

$$C_{Le} = K \cdot C_G \quad (4.20)$$

onde K é o coeficiente de equilíbrio (adimensional) dado por:

$$K = \frac{C_m}{C_{GO}} \quad (4.21)$$

onde C_m é a concentração de saturação do oxigênio na fase líquida (g/L), que pode ser escrita em função da temperatura através de uma equação obtida por regressão dos dados experimentais reportados na literatura (PERRY E CHILTON, 1980; LONGHI *et al.*, 2004) para água em pressão atmosférica:

$$C_m = 3.62 \cdot 10^{-6} \cdot T^2 - 3.312 \cdot 10^{-4} \cdot T + 0.01466217 \quad (4.22)$$

onde T é a temperatura do biorreator ($^{\circ}\text{C}$).

A concentração de oxigênio no gás de alimentação é obtida pela seguinte equação:

$$C_{GO} = \frac{P \cdot \bar{M} \cdot x_{O_2}}{R(T + 273.15)} \quad (4.23)$$

onde x_{O_2} é a fração molar de oxigênio no gás de alimentação (adimensional), P é a pressão no biorreator (bar), \bar{M} é a massa molecular de oxigênio (g g mol^{-1}) e R é a constante universal do gases ($\text{bar L g mol}^{-1} \text{K}^{-1}$).

O percentual de oxigênio dissolvido é representado por:

$$p_{O_2} = 100 \cdot \frac{C_L}{C_m} \quad (4.24)$$

O conjunto de equações apresentadas (de 4.3 a 4.24) compõe o modelo matemático proposto para a produção da proteína recombinante. A expressão da proteína é induzida através da alimentação de lactose através de uma entrada em pulso no sistema. Como mencionado anteriormente, a solução do sistema de equações do modelo descreve como cada espécie varia com o tempo de operação do biorreator. Sendo assim, foi realizada simulação do processo operando o biorreator em batelada utilizando o modelo desenvolvido.

4.4.2 Simulação e estimação de parâmetros

Primeiramente foi realizada a estimação de alguns parâmetros utilizando os dados da cinética de crescimento apresentada no item 4.3.3.1 deste trabalho (biorreator com 1,5 L de meio definido). Para tal estimação foi utilizado um modelo simplificado composto pelas equações (4.25), (4.26), (4.27), (4.28) apresentadas a

seguir e pelas equações (4.19), (4.20), (4.21), (4.22), (4.23), (4.24) apresentadas anteriormente no item 4.5.1.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_s \cdot X \quad (4.25)$$

$$\mu_s = \frac{\mu_{\max,s} \cdot S \cdot C_L}{(k_s + S) \cdot (K_{o,s} + C_L)} \quad (4.26)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_s \cdot X \quad (4.27)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = KLa \cdot (C_{Le} - C_L) - \frac{\Phi_{O/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu_s \cdot X \quad (4.28)$$

Neste conjunto de equações, t é o tempo de operação (h), X é a concentração de células (g/L), μ_s é a taxa específica de crescimento referente ao glicerol (h^{-1}), S é a concentração de glicerol (g/L), $\mu_{\max,s}$ é a taxa específica de crescimento máxima (h^{-1}), k_s é constante de saturação (g/L), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de S em X , C_L é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida (g/L), KLa é o coeficiente de transferência de massa gás-líquido, C_{Le} é a concentração de oxigênio na fase líquida em equilíbrio com o gás (g/L), $\Phi_{O/S}$ é o coeficiente estequiométrico relativo entre oxigênio e glicerol, $k_{o,s}$ representa um parâmetro cinético do modelo (g/L).

Os parâmetros estimados do modelo que representa os experimentos de cinética do crescimento são apresentados na tabela 4.11. A tabela 4.12 mostra a matriz de correlação entre os parâmetros. A figura 4.17 ilustra os perfis obtidos na simulação das equações do modelo para a cinética de crescimento com os parâmetros estimados. Os demais parâmetros mantidos constantes e utilizados na estimação são mostrados no apêndice D.

Tabela 4.11 Valores dos parâmetros estimados no modelo de cinética do crescimento.

Parâmetro	Unidade	Valor	Intervalo de confiança	Significância
$\mu_{\max,s}$	h^{-1}	0,4099	0,347	0,973
K_S	g/L	0,3790	28,107	0,025
$K_{O,S}$	g/L	4,2E-06	1,98E-05	0,371
$Y_{X/S}$	g_x/g_s	0,2324	0,036	1
$\phi_{O/S}$	-	0,1372	0,019	1

O valor de $\mu_{\text{máx,S}}$ obtido pela estimação de parâmetros foi $0,41 \text{ h}^{-1}$ (tabela 4.11). Este valor é um pouco diferente do valor calculado experimentalmente, $0,47 \text{ h}^{-1}$, e mostrado no item 4.3.3.1. Esta diferença entre o valor estimado e calculado pode ocorrer devido ao acoplamento dos parâmetros do modelo.

Tabela 4.12 Matriz de correlação dos parâmetros estimados no modelo de cinética do crescimento celular.

	$\mu_{\text{máx,S}}$	K_S	$K_{O,S}$	$Y_{X/S}$	$\phi_{O/S}$
$\mu_{\text{máx,S}}$	1	0,983	-0,807	-0,009	-0,132
K_S	0,983	1	-0,688	-0,020	-0,182
$K_{O,S}$	-0,807	-0,688	1	0,008	-0,007
$Y_{X/S}$	-0,009	-0,020	0,008	1	0,108
$\phi_{O/S}$	-0,132	-0,182	-0,007	0,108	1

Através da análise da matriz de correlação dos parâmetros (tabela 4.12) é possível afirmar que existe uma forte correlação entre os parâmetros $\mu_{\text{máx,S}}$ e K_S , bem como entre $\mu_{\text{máx,S}}$ e $K_{O,S}$, pois os valores de correlação estão próximos a 1. Segundo SCHWAAB E PINTO (2007), quanto mais próximos do valor 1, em módulo, estiverem os coeficientes de correlação, mais correlacionados estarão os parâmetros, e mais serão afetados quando houver qualquer mudança no outro parâmetro correlacionado. A correlação calculada entre $\mu_{\text{máx,S}}$ e K_S foi de 0,983, no entanto, a significância de $\mu_{\text{máx,S}}$ foi bastante elevada, apresentada na tabela (4.11), com valor de 97,3%. A elevada correlação entre estes parâmetros ocorre porque os fenômenos biológicos de crescimento, de consumo de substrato e de consumo de oxigênio são correlacionados, ou seja, funcionam em conjunto. Esta correlação é bastante frequente em modelos tipo Monod, pelos motivos mencionados acima, sendo muito difícil diminuir a correlação destes dois parâmetros (FERREIRA, 2013).

A simulação realizada com os parâmetros estimados é mostrada nos gráficos da figura 4.17. Nos gráficos apresentados é possível perceber que o modelo, juntamente com os parâmetros estimados, consegue prever de maneira satisfatória o comportamento desta cinética de crescimento. Apenas a fase final do crescimento celular não está bem representada na simulação. A simulação também não mostrou a queda tão abrupta do oxigênio dissolvido. De posse destes resultados, os parâmetros estimados $\mu_{\text{máx,S}}$, K_S , $K_{O,S}$, $Y_{X/S}$ e Φ_S foram utilizados para a estimação de parâmetros do modelo apresentado no item 4.4.1, utilizando os dados do cultivo com expressão da proteína em 1,5 L de meio de cultivo.

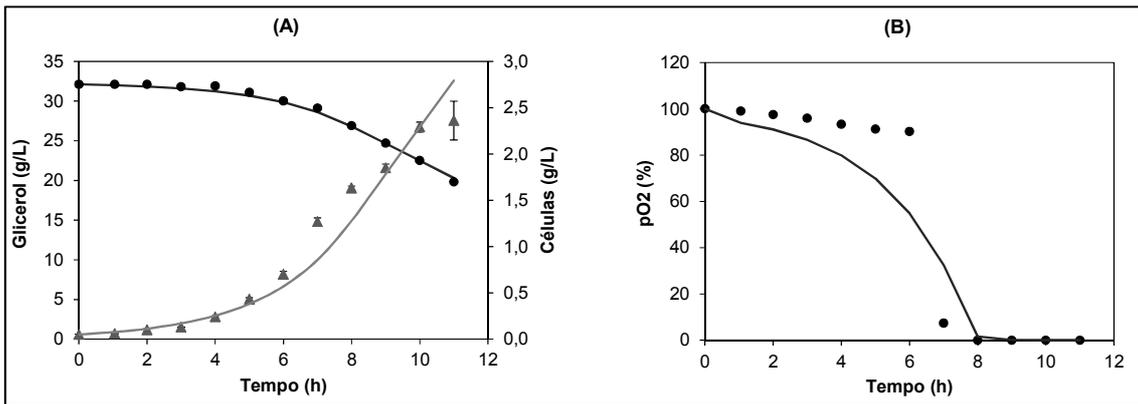


Figura 4.17 Resultados da simulação do modelo para a cinética do crescimento celular, usando os parâmetros estimados no software EMSO. (A) Concentração de glicerol (preto) e células (cinza) ao longo do tempo, sendo os pontos os valores experimentais e as linhas contínuas os valores simulados. Os triângulos representam as células e os círculos representam o glicerol. (B) Percentual de oxigênio dissolvido ao longo do tempo, sendo os pontos os valores experimentais e a linha contínua os valores simulados.

Para a estimação de parâmetros do modelo apresentado no item 4.5.1, primeiramente foram utilizados alguns parâmetros da literatura, alguns calculados experimentalmente e outros ajustados. A estimação foi realizada utilizando os dados experimentais obtidos no cultivo com expressão da proteína em 1,5 L de meio de cultivo, dados que foram apresentados no item 4.3.3.3 deste trabalho. Os parâmetros estimados são apresentados na tabela 4.13, sendo a matriz de correlação entre os parâmetros apresentada na tabela 4.14. Os demais parâmetros, mantidos constantes, utilizados nesta estimação, são mostrados no apêndice D. A simulação, utilizando os parâmetros estimados, e os dados experimentais são apresentados na figura 4.18. Esta primeira estimação foi realizada no tempo total de cultivo (23 horas), sem utilizar os dados de concentração de antibiótico, já que tais dados foram obtidos apenas até 11 horas de cultivo.

Tabela 4.13 Valores dos parâmetros estimados no modelo proposto.

Parâmetro	Unidade	Valor
$\mu^+_{\text{máx,le}}$	h^{-1}	0,001
$\mu^-_{\text{máx,le}}$	h^{-1}	0,056
ρ	-	2,1E-01
k_0	$\text{U/g}_{\text{cél.}}$	26,188
k_p	h^{-1}	0,709
k_i	g/L	0,493
k_{ii}	g/L	2,990
k_2	-	65,722
k_{μ}	h^{-1}	0,159

Tabela 4.14 Matriz de correlação dos parâmetros estimados para o modelo proposto sem considerar os dados da concentração de antibiótico.

	$\mu^+_{\text{máx,le}}$	$\mu^-_{\text{máx,le}}$	ρ	k_0	k_p	k_i	k_{ii}	k_2	k_{μ}
$\mu^+_{\text{máx,le}}$	1								
$\mu^-_{\text{máx,le}}$	-0,830	1							
ρ	-0,797	0,707	1						
k_0	-0,184	0,068	0,092	1					
k_p	-0,506	0,036	0,098	0,165	1				
k_i	-0,822	0,972	0,797	0,054	-0,039	1			
k_{ii}	-0,229	-0,262	-0,141	0,326	0,895	-0,339	1		
k_2	-0,206	-0,160	-0,074	-0,492	0,758	-0,217	0,639	1	
k_{μ}	0,044	-0,049	0,111	-0,002	-0,015	0,053	-0,053	-0,020	1

Na Tabela 4.14 é apresentada a matriz de correlação dos parâmetros. Através da análise desta tabela percebe-se que existe uma forte correlação entre vários parâmetros. Como mencionado anteriormente, quanto mais correlacionados os parâmetros estiverem, mais próximo de 1 será o valor da correlação. Alguns parâmetros apresentaram valores muito elevados de correlação, como a correlação entre $\mu^-_{\text{máx,le}}$ e K_i que apresentou valor de 0,972, sendo que a significância destes dois parâmetros foi muito baixa, 18% para $\mu^-_{\text{máx,le}}$ e 1% para K_i . Com estes valores seria necessário avaliar a real necessidade destes parâmetros no modelo, no entanto, como o objetivo aqui é propor um modelo matemático inicial e um conjunto de parâmetros capaz de prever o comportamento do conjunto de dados testados, estes parâmetros não foram eliminados neste momento. Além disso, o processo de construção de um modelo matemático capaz de prever muito bem um sistema é um processo iterativo e interativo, que pode envolver várias reformulações do modelo e várias estimativas de parâmetros, sempre acompanhados de novos conjuntos de dados. Cabe ressaltar

ainda que o modelo proposto neste trabalho é composto por muitas equações e muitos parâmetros, e o conjunto de dados experimentais é limitado, o que também limita a precisão da estimação de parâmetros. Para uma melhor estimação dos parâmetros, seria necessário um conjunto muito maior de experimentos.

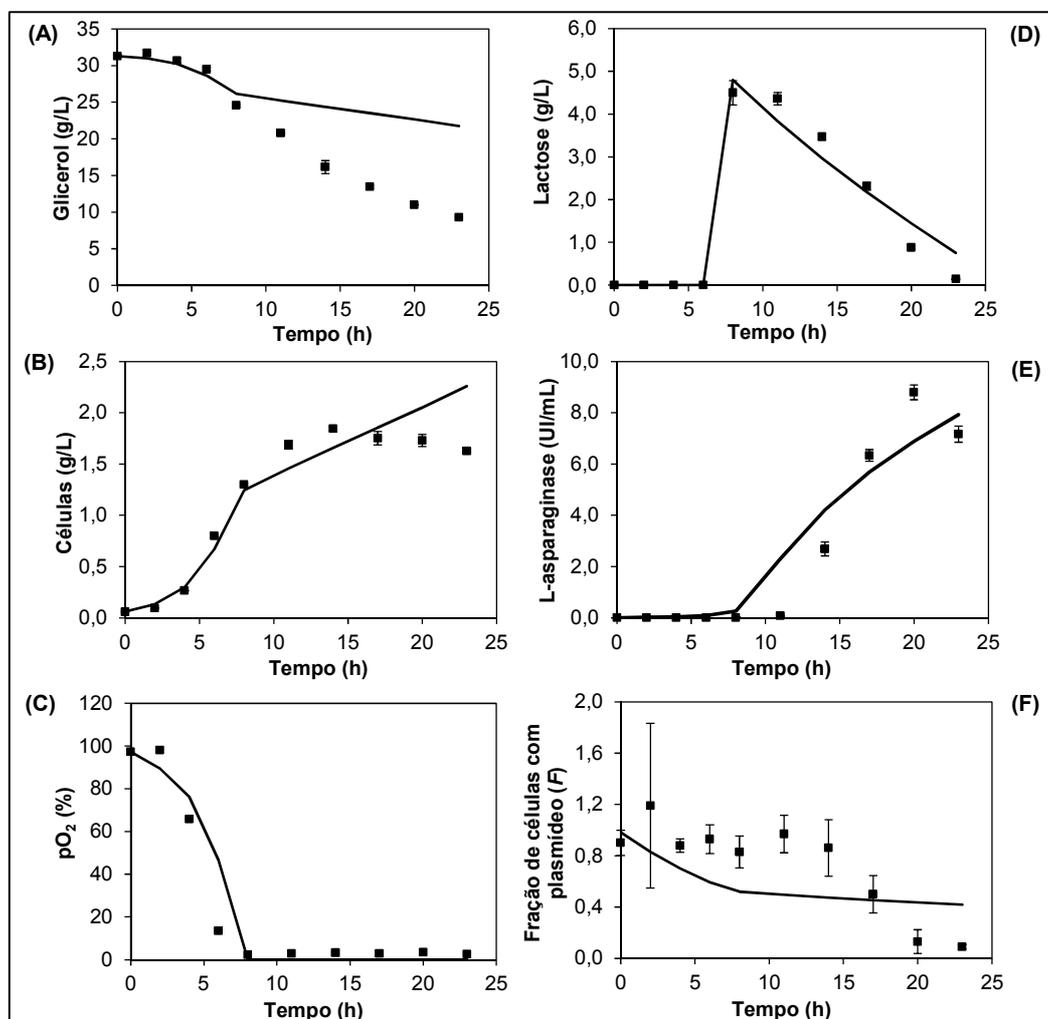


Figura 4.18 Resultados da simulação do modelo proposto utilizando os parâmetros estimados sem considerar os dados de concentração de antibiótico. Os quadrados representam os dados experimentais, as barras verticais representam os desvios padrão dos dados e as linhas contínuas os valores obtidos na simulação. (A) Concentração de glicerol ao longo do tempo. (B) Concentração de células ao longo do tempo. (C) Percentual de oxigênio dissolvido ao longo do tempo. (D) Concentração de lactose ao longo do tempo. (E) Atividade de L-asparaginase ao longo do tempo. (F) Fração de células com plasmídeo ao longo do tempo.

É possível perceber através das simulações apresentadas na figura 4.18 que o modelo já é capaz de prever várias características do sistema. A simulação de consumo de lactose, por exemplo, representada pela linha contínua no gráfico (D), consegue representar bem os dados experimentais representados pelos pontos no

gráfico, assim como ocorre com o consumo de oxigênio dissolvido (gráfico (C)). No entanto, a simulação não foi capaz de prever o decaimento da proteína no final do cultivo.

De posse dos parâmetros estimados, apresentados na tabela 4.13, foi realizada a estimação utilizando o conjunto de dados juntamente com os valores de concentração de antibiótico até 11 horas de cultivo. Nesta nova estimação, os parâmetros já estimados foram mantidos constantes, assim como os parâmetros já mantidos constantes na estimação anterior. Foram estimados os parâmetros relativos às equações que envolvem concentração de antibiótico. Os parâmetros estimados são apresentados na tabela 4.15. Na Tabela 4.16 é apresentada a matriz de correlação dos parâmetros.

Tabela 4.15 Valores dos parâmetros estimados no modelo proposto considerando os dados da concentração de antibiótico até 11 horas de cultivo.

Parâmetro	Unidade	Valor
K_3	L/g	7,46E-06
K_m	h^{-1}	0,529
K_{di}	l/g.h	0,146

Tabela 4.16 Matriz de correlação dos parâmetros estimados para o modelo proposto considerando os dados da concentração de antibiótico até 11 horas de cultivo.

	K_3	K_m	K_{di}
K_3	1		
K_m	-1	1	
K_{di}	-0,059	0,059	1

Através da análise da tabela 4.16 é possível perceber uma forte correlação entre os parâmetros K_3 e K_m . Estes dois parâmetros também apresentaram uma significância muito baixa. No entanto, assim como discutido anteriormente, estes parâmetros não foram eliminados neste momento, pois objetivo aqui é propor um modelo matemático inicial e um conjunto de parâmetros capaz de prever o comportamento do conjunto de dados testados.

Com os parâmetros estimados, apresentados nas tabelas 4.13 e 4.15, foi realizada simulação do processo com 23 horas de cultivo. Os perfis obtidos das espécies envolvidas são mostrados na figura 4.19. Através da análise dos gráficos

mostrados nesta figura, percebe-se que o modelo foi capaz de prever satisfatoriamente o comportamento do sistema. A simulação da concentração de antibiótico, lactose e pO_2 conseguiu prever bem os dados experimentais. No entanto, ocorreram alguns problemas. A simulação da fração de células com plasmídeo não consegue prever a queda dos dados experimentais a quase zero nos pontos finais do experimento (dados mostrados na figura 4.19F). Como mencionado anteriormente, a simulação não mostra a degradação da proteína no final do cultivo, apesar de possuir um termo de degradação acoplado ao balanço de massa de proteína. Uma alternativa, para melhorias futuras do modelo, seria a mudança deste termo por algum termo acoplado ao crescimento celular, já que no final do cultivo pode estar ocorrendo morte celular, com lise das células e consequente liberação de proteases no meio de cultivo e, com isso, a degradação da proteína de interesse.

Outra observação interessante é o comportamento dos valores simulados de glicerol e células. Ambos se distanciam dos pontos experimentais em um mesmo instante de tempo. Este distanciamento ocorre quando as células estão saindo da fase exponencial de crescimento, parando de crescer, e quando ocorre a indução da expressão da proteína através da adição de lactose no sistema. Este fato sugere que ocorre o consumo de glicerol independente do crescimento. A célula consome glicerol nesta fase para sua manutenção. Desta forma, seria interessante adicionar um termo de consumo de glicerol desacoplado do crescimento na equação de balanço de massa do glicerol, modificando o modelo proposto.

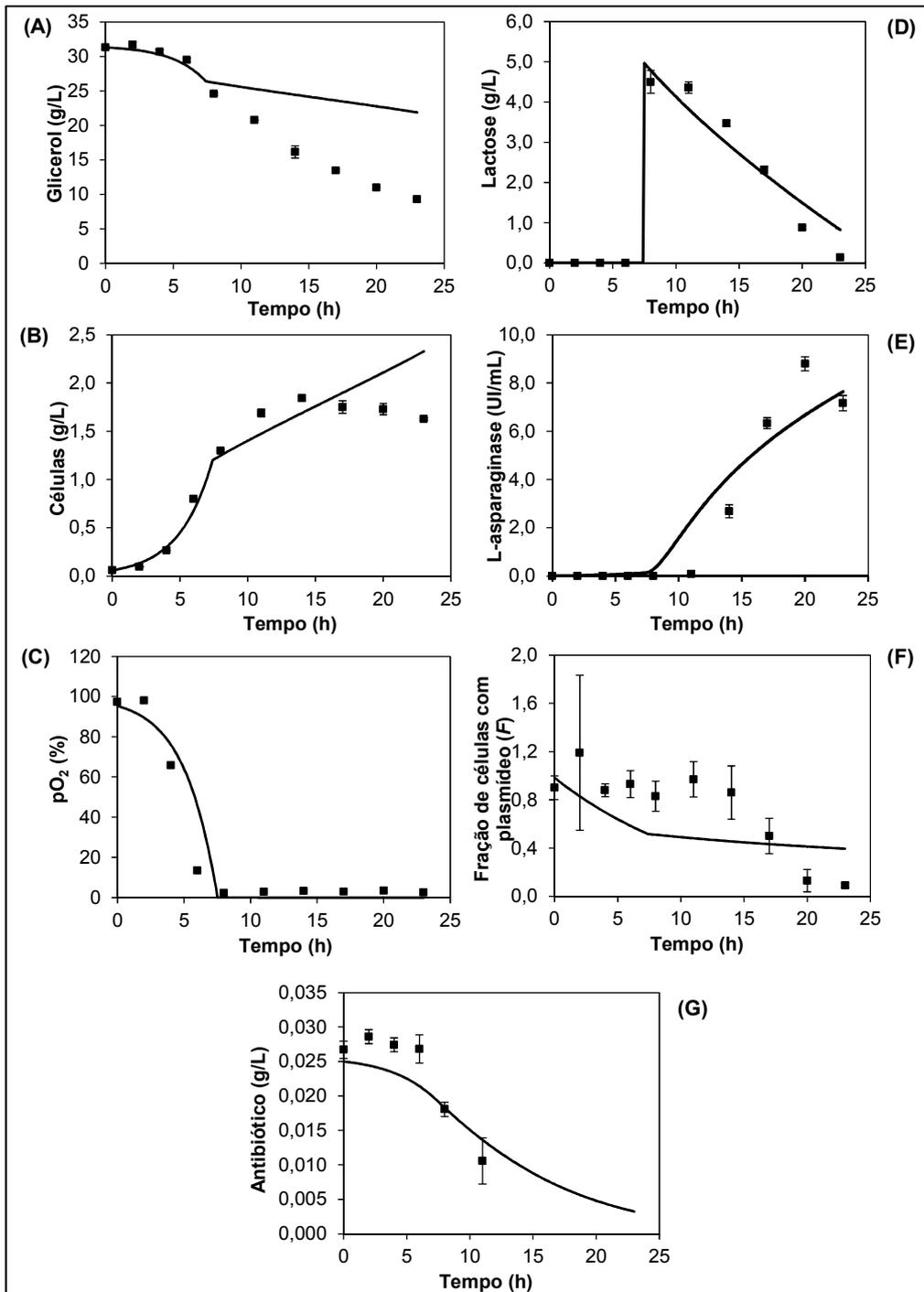


Figura 4.19 Resultados da simulação do modelo proposto utilizando os parâmetros estimados considerando os dados de concentração de antibiótico. Os quadrados representam dados experimentais, as barras verticais representam desvios padrão dos dados e as linhas contínuas valores obtidos na simulação. (A) Concentração de glicerol ao longo do tempo. (B) Concentração de células ao longo do tempo. (C) Oxigênio dissolvido ao longo do tempo. (D) Concentração de lactose ao longo do tempo. (E) Atividade de L-asparaginase ao longo do tempo. (F) Fração de células com plasmídeo ao longo do tempo. (G) Concentração de antibiótico ao longo do tempo.

4.4.3 Modificação do modelo matemático proposto

Como analisado no item anterior, foi verificada a necessidade da adição de um termo de consumo de glicerol desacoplado do crescimento na equação de balanço de massa do glicerol. Sendo assim o modelo proposto será modificado, sendo a equação (4.9) substituída pela equação adicionada (4.29). Também será adicionada ao modelo matemático a equação (4.30) mostrada a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}^+} \cdot \mu_s^+ X^+ - \frac{1}{Y_{x/s}^-} \cdot \mu_s^- X^- - m \cdot X \quad (4.29)$$

$$m = \frac{m_o \cdot S}{K_{m_o} + S} \quad (4.30)$$

sendo m a taxa específica de consumo do substrato desacoplada do crescimento (1/h), m_o taxa máxima específica de consumo de substrato desacoplada do crescimento (1/h) e K_{m_o} parâmetro do modelo (g/L).

De posse deste novo conjunto de equações do modelo proposto modificado, o parâmetro m_o foi estimado e a simulação foi realizada. O parâmetro m_o foi estimado com valor de $0,497 \text{ h}^{-1}$. As simulações são apresentadas na figura 4.20. Analisando os gráficos contidos nesta figura é possível perceber que a adição do termo na equação de consumo de glicerol melhorou a capacidade do modelo de prever os dados experimentais. No gráfico de consumo de glicerol ao longo do tempo, a linha contínua (dados simulados) coincide com os dados experimentais. O restante dos perfis continuou apresentando o mesmo comportamento.

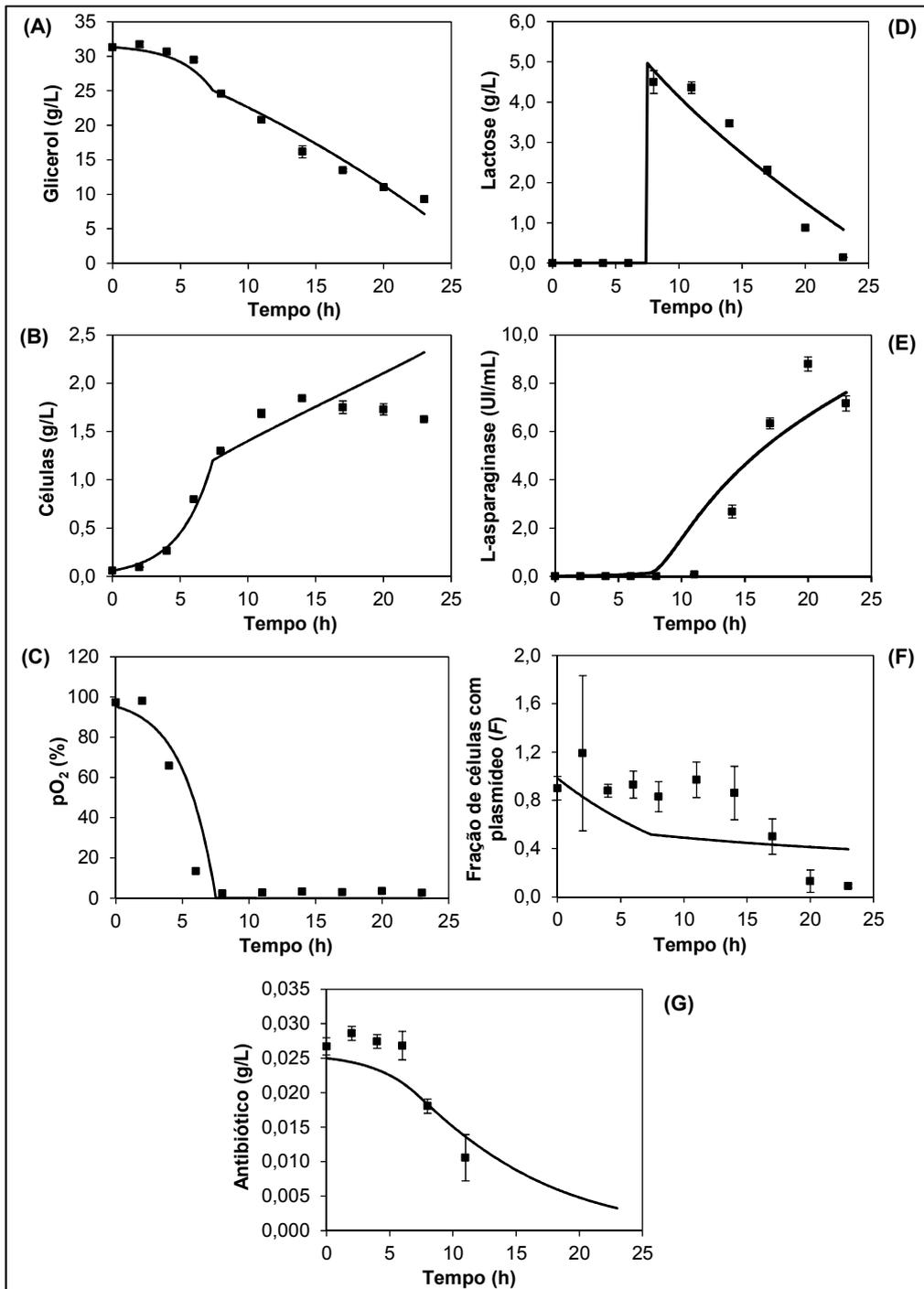


Figura 4.20 Resultados da simulação do modelo proposto modificado utilizando os parâmetros estimados. Os quadrados representam os dados experimentais, as barras verticais representam os desvios padrão dos dados e as linhas contínuas os valores obtidos na simulação. (A) Concentração de glicerol ao longo do tempo. (B) Concentração de células ao longo do tempo. (C) Percentual de oxigênio dissolvido ao longo do tempo. (D) Concentração de lactose ao longo do tempo. (E) Atividade de L-asparaginase ao longo do tempo. (F) Fração de células com plasmídeo ao longo do tempo. (G) Concentração de antibiótico ao longo do tempo.

Após os resultados obtidos, é possível avaliar que modelagem matemática proposta mostrou-se promissora na previsão do comportamento deste tipo de sistema, sendo capaz de descrever satisfatoriamente bem os dados de produção da proteína recombinante em biorreator operando em modo batelada. Os problemas apresentados na estimação de parâmetros e simulação podem ser superados com a realização de mais experimentos e melhorias no modelo em um processo iterativo e interativo, como mencionado anteriormente.

4.5 Ensaio de estabilidade da L-asparaginase recombinante

Ensaio de estabilidade da enzima L-asparaginase recombinante foram realizados utilizando manitol e sorbitol como agentes de preservação, e também utilizando tampão fosfato de sódio como solvente padrão a fim de comparação. As tabelas 4.17, 4.18 e 4.19 mostram os dados de atividade da enzima e do percentual de atividade conservada ao longo de 92 dias em duas temperaturas de armazenamento. Observando a tabela 4.17, que mostra os dados do armazenamento da enzima em sorbitol e manitol a 4°C, pode-se perceber que tanto em sorbitol quanto em manitol a atividade enzimática sofre uma queda no primeiro dia de armazenamento. A partir do segundo dia as atividades se estabilizam. Quando armazenada em manitol a 4°C, a enzima manteve 96% de sua atividade ao final de 92 dias, já quando armazenada em sorbitol a 4°C a enzima manteve 86% de sua atividade neste mesmo período. A tabela 4.19 apresenta os dados observados com a amostra armazenada na condição padrão em tampão fosfato, sendo que a enzima em tampão fosfato armazenada por 69 dias a 4°C manteve 90% da atividade inicial. Estes valores indicam que tanto sorbitol, manitol ou tampão fosfato podem ser utilizados como agentes de preservação no armazenamento a 4°C, dentro do período estudado.

Tabela 4.17 Dados de atividade de L-asparaginase durante ensaios de estabilidade da enzima armazenada a 4°C

Tempo (dias)	Manitol 4°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)	Sorbitol 4°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)
0	0,258 ± 0,008	-	0,346 ± 0,015	-
1	0,202 ± 0,035	78	0,272 ± 0,027	81
2	0,253 ± 0,053	98	0,291 ± 0,031	87
6	0,254 ± 0,005	99	0,287 ± 0,005	85
92,0	0,248 ± 0,003	96	0,289 ± 0,007	86

A tabela 4.18 mostra os dados do armazenamento da enzima em sorbitol e manitol a -20°C. Assim como observado nas amostras armazenadas a 4°C, pode-se perceber que tanto em sorbitol quanto em manitol a atividade enzimática sofre uma queda nos primeiros dias de armazenamento a -20°C. Com armazenamento em período mais longo, a atividade se estabiliza. Quando a L-asparaginase recombinante foi armazenada em manitol a -20°C, a enzima manteve 98% de sua atividade ao final de 92 dias, já quando armazenada em sorbitol a -20°C a enzima manteve 88% de sua atividade neste mesmo período. Quando a enzima foi armazenada no solvente padrão (tampão fosfato) por 69 dias a -20°C manteve apenas 63% da atividade inicial. Estes valores indicam que quando a enzima é armazenada a -20°C o uso de manitol e sorbitol poderiam ajudar na estabilidade da enzima. Existem muito poucos trabalhos na literatura que avaliam a estabilidade de proteínas recombinantes (LARENTIS *et al.*, 2011a). Um destes estudos mostra que foi possível manter a enzima recombinante PsaA de *Streptococcus pneumoniae* preservada por 36 meses sendo armazenada tanto em 4°C quanto em -70°C, utilizando o tampão PBS (tampão fosfato-salino) como solvente(LARENTIS *et al.*, 2011a). Além disso, este estudo mostrou que não havia diferença significativa entre armazenar a proteína apenas em PBS ou em PBS com adição de 10% de crioprotetores (agentes de preservação): glicerol e sacarose (LARENTIS *et al.*, 2011a).

Tabela 4.18 Dados de atividade de L-asparaginase durante ensaios de estabilidade da enzima armazenada a -20°C

Tempo (dias)	Manitol -20°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)	Sorbitol -20°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)
0	0,258 ± 0,008	-	0,335 ± 0,015	-
1	0,178 ± 0,029	69	0,254 ± 0,048	76
2	0,207 ± 0,008	80	0,261 ± 0,027	78
6	0,211 ± 0,019	82	0,287 ± 0,019	85
92	0,253	98	0,294	88

Tabela 4.19 Dados de atividade de L-asparaginase durante ensaios de estabilidade utilizando tampão fosfato de sódio como solvente

Tempo (dias)	Tampão fosfato -20°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)	Tampão fosfato 4°C (UI/mL)	Atividade Conservada (%)
0	1,87 ± 0,34	-	1,87 ± 0,34	-
6	1,26 ± 0,08	68	1,77 ± 0,06	95
69	1,18 ± 0,03	63	1,68 ± 0,07	90

Os dados obtidos em 92 dias de armazenamento utilizando sorbitol e manitol como agentes de preservação foram analisados através de um planejamento de experimentos (fatorial completo – 2²). As variáveis independentes estudadas foram: agente de preservação e temperatura de armazenamento. Foram analisados os efeitos das duas variáveis independentes sobre o percentual de atividade enzimática preservada (mantida) após 92 dias de armazenamento. Os experimentos do planejamento fatorial são mostrados na tabela 4.20, juntamente com sua variável de resposta.

Tabela 4.20 Experimentos do planejamento fatorial e o sua variável de resposta depois de 92 dias de armazenamento

Experimento	Agente de preservação	Temperatura (°C)	Percentual de atividade mantida (%)
1	Sorbitol (-1)	-20 (-1)	87,5
2	Manitol (+1)	-20 (-1)	98,0
3	Sorbitol (-1)	4 (+1)	84,7
4	Sorbitol (-1)	4 (+1)	87,5
5	Manitol (+1)	4 (+1)	97,1
6	Manitol (+1)	4 (+1)	95,2

Na tabela 4.21 são apresentados os valores dos efeitos das variáveis e seus respectivos *p*-valor, considerando significativos os efeitos com *p* < 0,1.

Tabela 4.21 Efeitos das variáveis sobre o percentual de atividade enzimática mantida após 92 dias de armazenamento

	Percentual de atividade mantida (%)	
	Efeitos	p-valor
Média/Interação	91,9±0,74	<0,001
(A) Agente de preservação	10,2±1,48	0,02
(B) Temperatura de armazenamento (°C)	-1,65±1,48	0,38
Interação entre (A) e (B)	-0,22±1,48	0,90

Através das análises apresentadas na tabela 4.21 é possível afirmar que o agente de preservação tem efeito significativo sobre a preservação da atividade da enzima estocada por 92 dias. Já a temperatura de armazenamento e a interação entre as duas variáveis não apresentaram efeitos significativos. Sendo assim, como o efeito do agente de preservação é positivo, o manitol é capaz de conservar melhor a atividade da enzima independente da temperatura de armazenamento (4°C ou -20°C). O manitol é o excipiente utilizado no medicamento comercial Elspar (L-asparaginase nativa de *E. coli*). Estes ensaios auxiliam na preservação da enzima por um período maior, indicando um possível agente para ser utilizado durante o processo de liofilização, de modo a facilitar possíveis estudos de atividade antileucêmica.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho o gene de L-asparaginase de *Z. mobilis* foi estudado empregando ferramentas de bioinformática, otimizado e sintetizado. Este gene otimizado foi clonado e expresso em *E. coli* BL21 (DE3). Foram obtidos dois clones para obtenção da proteína em compartimentos distintos da bactéria, citoplasma e meio extracelular.

Através de análises de bioinformática foi possível afirmar que os primeiros 29 aminoácidos da proteína têm elevada probabilidade de fazer parte de um peptídeo sinal, corroborando os resultados de ABUD (2005) que mostrou que esta L-asparaginase é periplasmática. Através de alinhamentos com outras sequências de L-asparaginase foi possível observar que a sequência da proteína de *Z. mobilis* possui elevada identidade (em torno de 40%) com a sequência de L-asparaginase tipo II de *E. coli*, que possui comprovada atividade antileucêmica. Além disso, foi possível observar que os aminoácidos do sítio ativo da L-asparaginase de *Z. mobilis* são altamente conservados e alinhados com os aminoácidos da L-asparaginase tipo II de *E. coli*. Estes dados forneceram fortes indícios de que a L-asparaginase de *Z. mobilis* apresenta atividade antileucêmica e poderia ser utilizada no futuro como biofármaco no tratamento de LLA. Desta forma, o emprego de DNA recombinante é a ferramenta ideal para produzir esta enzima em altas quantidades para estudos e testes de atividade antileucêmica.

O gene otimizado da L-asparaginase de *Z. mobilis* foi clonado em *E. coli* utilizando os vetores pET26b e pET28a. Foram obtidos dois clones: *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans e *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans. Através do clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans foi possível expressar a enzima L-asparaginase recombinante, obtendo-a no meio extracelular e apresentando atividade enzimática. Utilizando o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans também foi possível expressar a enzima L-asparaginase apresentando atividade enzimática, no entanto, a enzima foi obtida no citoplasma. É importante ressaltar que esta é a primeira vez que a enzima L-asparaginase de *Z. mobilis* foi produzida em outro micro-organismo, de forma recombinante e, devido ao seu potencial de inovação tecnológica, uma patente foi depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) (EINSFELDT *et al.*, 2014).

Em 4 horas de expressão em frascos agitados, utilizando meio de cultura complexo (LB) e IPTG como indutor, obteve-se 0,19 UI/mL de L-asparaginase utilizando o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans, e 7,6 UI/mL de L-asparaginase utilizando o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans. Quando o cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans, em frascos agitados com meio de cultivo LB, foi induzido com 2 g/L de lactose, obteve-se 2,5 vezes mais L-asparaginase do que quando comparado ao mesmo cultivo induzido por IPTG. Quando foi utilizado 10 g/L de lactose, obteve-se 7 vezes mais L-asparaginase do que quando induzido por IPTG.

No cultivo em biorreator da cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans utilizando 0,4 L de meio de cultura complexo (LB), obteve-se 0,13 UI/mL da enzima extracelular e rendimento de 172,7 UI/g de célula. Cabe ressaltar que a proteína pode ter ficado retida no periplasma, já que o peptídeo sinal faz o direcionamento para este compartimento em *E. coli*, e acredita-se que a proteína passe para o meio extracelular por transporte passivo através das estruturas da membrana desestabilizadas (SORENSEN E MORTENSEN, 2005). Em trabalhos futuros poderiam ser adicionadas substâncias para aumentar a permeabilidade da membrana, como glicina (TRIPATHI *et al.*, 2009), e assim aumentar a quantidade de proteína no meio extracelular.

Já no cultivo da cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pET28a/ans em biorreator utilizando meio de cultura complexo, em 4 horas de indução com IPTG, obteve-se 3,57 UI/mL de L-asparaginase (enzima intracelular) e rendimento de 5185 UI/g de célula. Os valores de produção de L-asparaginase apresentados neste trabalho são superiores aos apresentados pelo micro-organismo nativo desta L-asparaginase (*Z. mobilis*). Estudos realizados no laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ mostraram que cultivos de *Z. mobilis*, realizados em frascos agitados, produziam atividade de 37,79 UI/g de célula em 33 horas (ABUD *et al.*, 2004). Através da produção da L-asparaginase recombinante foi possível obter aproximadamente 4 vezes mais UI/g de célula da enzima extracelular e 135 vezes mais UI/g de célula da enzima intracelular, em um tempo 4 vezes menor, nos biorreatores com meio de cultura complexo. A baixa produtividade da enzima L-asparaginase por *Z. mobilis* era um obstáculo para o estudo e produção da enzima a partir deste micro-organismo, sendo assim, foi possível produzir a partir dos clones obtidos neste trabalho, tanto em frascos agitados quanto em biorreatores, quantidade suficiente de L-asparaginase para possibilitar a realização de estudos da atividade antileucêmica.

Apesar da concentração de proteína obtida de forma intracelular ser maior que a de proteína obtida de forma extracelular, tanto em frascos agitados quanto em biorreatores com meio de cultura complexo, os valores de atividade específica (L-asparaginase expressa em relação à quantidade de proteína total) são similares. Isto indica que a amostra de proteína extracelular apresentou menos contaminantes, o que facilita muito a sua purificação e exclui a etapa de rompimento celular, diminuindo tempo e custos de processo. Sendo assim, o clone *E. coli* BL21 (DE3)/pET26b/ans (expressão extracelular) foi escolhido para ser utilizado nas etapas com meio de cultura definido.

Através do planejamento de experimentos empregado foi possível analisar a influência de algumas variáveis do processo de expressão da proteína L-asparaginase, aumentar a produção da enzima e obter as condições a serem utilizadas para a obtenção de dados cinéticos. Nestes experimentos, foram avaliadas as influências da temperatura de expressão, da concentração de canamicina, da concentração de lactose e da absorbância de indução sobre o crescimento celular, produtividade de proteína e estabilidade plasmidial. Através dos dados em 4 horas e 16 horas de expressão foi possível inferir que o aumento no tempo de expressão de 4 h para 16 h proporcionou maior produtividade de proteína, sendo assim, as análises dos efeitos foram realizadas com os dados de 16 horas de expressão. Em 16 horas de expressão, nos experimentos do ponto central obteve-se média de $2,5 \pm 0,5$ g/L de células, a fração de células com plasmídeo apresentou média de $0,05 \pm 0,009$ e a produção de L-asparaginase alcançou $20,4 \pm 1,5$ UI/mL. Nenhuma das variáveis avaliadas apresentou efeito significativo sobre o crescimento celular. A temperatura de expressão, a absorbância de indução e a curvatura apresentaram efeitos positivos sobre a produtividade de L-asparaginase. Já a concentração de canamicina e a concentração de lactose não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a produtividade de L-asparaginase nem sobre a fração de células com plasmídeo. No entanto, a temperatura de expressão e a absorbância de indução apresentaram efeitos significativos negativos sobre a estabilidade plasmidial, resultado oposto ao efeito destas mesmas variáveis sobre a produtividade de L-asparaginase, ou seja, o aumento destas variáveis resultou em aumento na L-asparaginase mas também levou à maior perda plasmidial.

Os valores de produtividade de L-asparaginase extracelular alcançados em 16 horas de expressão nos experimentos do planejamento, em meio de cultura definido e induzidos por lactose, foram superiores aos apresentados nos cultivos em biorreatores

com meio de cultura complexo e indução por IPTG. Quando comparamos os valores obtidos no cultivo em meio de cultura complexo, em biorreator, com os valores dos cultivos do ponto central do planejamento pode-se afirmar que a produtividade foi aumentada em 50 vezes. Além disso, nos experimentos do ponto central, em 16 horas de indução, foi alcançado rendimento médio de 8357 UI/g de célula, muito superior ao rendimento apresentado na produção da L-asparaginase nativa por *Z. mobilis* (ABUD *et al.*, 2004).

Foi realizado um aumento de escala e validação do planejamento de experimentos em biorreator de 3L. Neste experimento obteve-se 2,7UI/mL em 9 horas de expressão e 1,1 UI/mL em 15 horas de expressão. Os valores de proteína obtidos em 3L foram dez vezes menores que os obtidos no mesmo experimento do planejamento em 0,4 L. No entanto, a concentração celular atingiu o dobro do valor alcançado no planejamento experimental. Na literatura é reportado que taxas de crescimento menores alcançam maiores produções de proteína (RIESENBERG *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2013), fato que foi constatado neste experimento, pois a célula cresceu mais, diminuiu a estabilidade plasmidial e produziu menos proteína.

Para a obtenção dos dados cinéticos que foram utilizados para avaliação do modelo proposto neste trabalho foi realizado um experimento em biorreator de 1,5L. Neste experimento foram utilizadas as mesmas condições do experimento 2 do planejamento (temperatura de expressão igual a 37°C, Abs_{600nm} de indução igual a 4,6, 5 g/L de lactose e 25 µg/mL de canamicina), o qual apresentou a melhor produtividade de proteína entre os experimentos com temperatura constante, já que o modelo não prevê alteração de temperatura. Obteve-se concentração celular máxima de 1,8 g/L em 14 horas de cultivo e produção de L-asparaginase de 8,8 UI/mL em 20 horas de cultivo (12 horas de expressão). Pode-se perceber o consumo simultâneo de glicerol e lactose neste cultivo após a indução. Além disso, a concentração de canamicina foi quantificada até 11h de cultivo, mostrando uma diminuição da sua concentração. A estabilidade plasmidial começou a diminuir a partir da sexta hora de indução (14 h de cultivo), atingindo 9% de estabilidade no final de 15 horas de expressão (23 h de cultivo). Sabe-se que a diminuição da estabilidade com a indução da expressão pode ser atribuída à carga metabólica imposta à célula (POPOV *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). É importante ressaltar que poucos são os trabalhos da literatura que avaliam a estabilidade plasmidial, pois é uma metodologia bastante trabalhosa e com erros altos, mas sem isso não é possível avaliar corretamente um processo de produção de proteína recombinante (FRIEHS, 2004). Além disso, a dosagem de antibiótico também

não é comum e este talvez seja um dos poucos trabalhos que façam isso, apesar das limitações apresentadas.

A fim de representar o processo de expressão de proteínas recombinantes utilizando plasmídeos não integrados ao genoma do hospedeiro e permitir um melhor entendimento do mesmo, um modelo matemático foi proposto. Através dos resultados obtidos é possível avaliar que a modelagem matemática proposta mostrou-se promissora na previsão do comportamento deste tipo de sistema, sendo capaz de descrever satisfatoriamente os dados de produção da proteína recombinante em biorreator operando em modo batelada. Os problemas apresentados na estimação de parâmetros e simulação podem ser diminuídos ou até mesmo superados com a realização de mais experimentos e melhorias no modelo em um processo iterativo e interativo, tornando a simulação do processo mais precisa.

Testes de estabilidade da proteína foram realizados em duas temperaturas (4°C e -20°C), utilizando dois agentes de preservação (sorbitol e manitol), empregando ferramenta de planejamento de experimentos para avaliação destes efeitos. Estes experimentos mostraram que em 92 dias de armazenamento a temperatura não apresentou influência significativa sobre o percentual de atividade mantida nas condições testadas. No entanto, o agente de preservação apresentou efeito significativo, sendo o manitol o agente que apresentou a melhor preservação de atividade da proteína. Na literatura são encontrados poucos trabalhos que avaliam a estabilidade de proteínas recombinantes (LARENTIS *et al.*, 2011a). Estes ensaios auxiliam na preservação da enzima por um período maior, de modo a facilitar possíveis estudos de atividade antileucêmica.

Por fim, é importante ressaltar, que a enzima produzida neste trabalho foi testada em células leucêmicas de pacientes, apresentando resultados promissores (efeitos citotóxicos e citostáticos) e compatíveis com a enzima de *Escherichia coli* disponível no mercado (BAPTISTA, 2013), comprovando seu potencial de inovação. Desta forma, além da enorme importância para área da saúde, esta tese traz contribuições significativas para a pesquisa na área de produção de proteínas utilizando células recombinantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A.K.S., 2005, **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis***. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ABUD, A.K.S., ALVES, T.L.M., PINTO, J.C.C.S. **Processo de produção de asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis* e uso do caldo fermentativo e/ou da enzima purificada no tratamento de doenças**. Coordenação dos programas de pós-graduação de engenharia da Universidade federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ (Rio de Janeiro, RJ). BR n. PI0404952-7, 10 nov. 2004.
- ALMEIDA, R.O., 2011, **Avaliação de sistema de remoção de gene marcador de seleção por recombinação sítio específica em *Passiflora edulis* spp, embriogênese somática e organogênese direta em *Saccharum officinarum* L.** Tese de D.Sc., UFLA, Lavras, MG, Brasil.
- ALVES, T.L.M., 1993, **Estudo da Produção de Etanol por *Zymomonas mobilis***. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ARISTIDOU, A.A., SAN, K.Y., BENNETT, G.N., 1995, "Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction", **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 4, pp. 475-478.
- BAHERI, H.R., HILL, G.A., ROESLER W.J., 2001, "Modelling plasmid instability in batch and continuous fermentors", **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.45-50.
- BANEYX, F., 1999, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-421.
- BANSAL, S., GNANESWARI, D., MISHRA, P. *et al.*, 2010, "Structural Stability and Functional Analysis of L-Asparaginase from *Pyrococcus furiosus*", **Biochemistry (Moscow)**, v.75, n.3, p.375-381.

- BANSAL, S., SRIVASTAVA, A., MUKHERJEE, G., *et al.*, 2012, "Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action", **The FASEB Journal**, v. 26, pp. 1161-1171.
- BAPTISTA, I.C., 2013, **Avaliação da atividade antileucêmica de L-Asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis***. Dissertação de M.Sc., Clínica Médica/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BELLÃO, C., 2006, **Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21(DE3)**. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- BENDTSEN, J.D., NIELSEN, H., VON HEIJNE, G. *et al.*, 2004, "Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0", **Journal of Molecular Biology**, v. 340, pp. 783-795.
- BENNETT, M.J., BRADEY, C.E., 1984, "Simpler Liquid-Chromatographic Screening for Organic Acid Disorders", **Clinical Chemistry**, v.30, n.4, p.542-546.
- BENTLEY, W.E., KOMPALA, D.S., 1989, "A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures", **Biotechnology and Bioengineering**, v33, p.49-61.
- BENTLEY, W.E., KOMPALA, D.S., 1990, "Plasmid instability in batch cultures of recombinant bacteria", **Chemical Engineering Education**, p.168-172.
- BRADFORD, M. M., 1976, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding", **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248-554.
- CALAZANS, G.M.T., LOPES, C.E., LIMA, R.M.O.C., *et al.*, 1997, "Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains", **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 1, pp. 19-21.

- CALAZANS, G.M.T., LIMA R.C., FRANÇA F.P., *et al.*, 2000, "Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans", **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, pp.245–247.
- CAO, Y., XIA, Q., FANG, B. *et al.*, 2006, "Optimization of expression of *dhaT* gene encoding 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumonia* in *Escherichia coli* using the methods of uniform design and regression analysis", **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.109-112.
- CAPPELLETTI, D., CHIARELLI L.R., PASQUETTO, M.V. *et al.*, 2008, "Helicobacter pylori L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.377, p.1222–1226.
- CASCAVAL, D., GALACTION, A.I., CAMARUT, S. *et al.*, 2011, "Scale-up of Aerobic Stirred Bioreactors Using the Mixing Time Criteria 1. Simulated Broths", **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.25, n.1, p.43–54.
- CHUAN, YP, LUA, LHL, MIDDELBERG, APJ., 2008, "High-level expression of soluble viral structural protein in *Escherichia coli*". **Journal of Biotechnology**, v.134, pp.64-71.
- CORCHERO, J.L., VILLAVERDE A., 1998, "Plasmid Maintenance in *Escherichia coli* Recombinant Cultures is Dramatically, Steadily, and Specifically Influenced by Features of the Encoded Proteins", **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, n.6, p.625-632.
- DEMAIN, A.L., VAISHNAV, P., 2009, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms", **Biotechnology Advances**, v.27, p.297–306.
- DUNLOP, P.C., MEYER, G.M., BAN, D. *et al.*, 1978, "Characterization of Two Forms of Asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*", **The Journal of Biological Chemistry**, v.253. n. 4, p.1297-1304.

- DUNLOP, P.C., MEYER, G.M., ROON, R.J., 1980, "Reactions of Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis", **The Journal of Biological Chemistry**, v.255, n.4, p.1542-1546.
- DUVAL, M., SUCIU, S., FERSTER, A., *et al.*, 2002., "Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial", **Blood**, v. 99, n.8, pp. 2734-2739.
- EINSFELDT, K., 2010, **Seleção, clonagem e expressão de uma proteína associada à virulência de *Streptococcus pneumoniae***. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- EINSFELDT, K., SEVERO JUNIOR, J.B., ARGONDIZZO, A.P.C. *et al.*, 2011, "Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability", **Vaccine**, v. 29, n.41, p. 7136-7143
- EINSFELDT, K., BAPTISTA, I.C., ALVES, T.L.M., *et al.* **L-asparaginase recombinante de *Zymomonas***. Coordenação dos programas de pós-graduação de engenharia da Universidade federal do Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ (Rio de Janeiro, RJ). BR 102014000585-4, 10 jan. 2014.
- FERRAZ, H.C., 1999, **Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico Utilizando Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* e Separação Simultânea dos Produtos por Eletrodialise**. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FERREIRA, T.A., 2013, **Controle ótimo da produção de poli((r)-3-hidróxi-butirato) a partir da bactéria *bacillus sp.* em biorreator**. Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- FOÀ, R., CHIARETTI, S., GUARINI, A., *et al.*, 2009, “Adult acute lymphoblastic leukemia”, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, pp.41-47.
- FONSECA, E.F., 2003, **Modelagem da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em Reator Tipo Cesta Agitada**. Tese de D.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FONTANI, S., NICCOLAI, A., KAPAT, A., *et al.*, 2003, “Studies on the maximization of recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein production in *Escherichia coli*: application of Taguchi robust design and response surface methodology for process optimization”, **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, pp.711-717.
- FRIEHS, K., 2004, “Plasmid Copy Number and Plasmid Stability”, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.86, p.47–82.
- GANDURI, V.S.R.K., GHOSH, S., PATNAIK, P.R., 2005, “Optimal mixing to improve the performance of batch and continuous fermentations with recombinant *Escherichia coli*”, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p.361–370.
- GARCÍA-ARRAZOLA, R., DAWSON, P., BUCHANAN, I., *et al.*, 2005, “Evaluation of the effects and interactions of mixing and oxygen transfer on the production of Fab’ antibody fragments in *Escherichia coli* fermentation with gas blending”, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.27, p.365–374.
- GARCIA-OCHOA, F., GOMEZ, E., 2009, “Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview”, **Biotechnology Advances**, v.27, p.153–176.
- GONÇALVES DE LIMA, O., ARAÚJO, J. M., SCHUMACHER, I. E., *et al.*, 1970, “Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife”. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 10, p. 3-15.

- GOPAL, G.J., KUMAR, A., 2013, "Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*", **Protein J**, v.32, n.6, pp.419-425.
- GOYAL, D., SAHNI, G., SAHOO, D.K., 2009, "Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture", *Bioresource Technology*, v.100, pp.4468–4474.
- GRANGE, D.C., HAAN, R., ZYL, W.H., 2010, "Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.87, p.1195–1208.
- GREENE, J.J., "Host Cell Compatibility in Protein Expression". In: Balbas, P., Lorence, A. (eds.), **Recombinant Gene Expression: Review and Protocols**, 2 ed., Capítulo 1, New Jersey, USA, Humana Press, 2004.
- GUO, Q.L., WU, M.S., CHEN, Z., 2002, "Comparison of antitumor effect of recombinant L-asparaginase with wild type one *in vitro* and *in vivo*", **Acta Pharmacologica Sinica**, v.23, n.10, p.946-951.
- GUPTA, R., SHARMA, P., VYAS, V.V., 1995, "Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*", **Journal of Biotechnology**, v.41, p.29-37.
- GUPTA, J.C., PANDEY, G., MUKHERJEE, K.J., 2001a, "Two-stage cultivation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to enhance plasmid stability under non-selective conditions: experimental study and modeling", **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.89–99.
- GUPTA, P., SAHAI, V., BHATNAGAR, R., 2001b, "Enhanced Expression of the Recombinant Lethal Factor of *Bacillus anthracis* by Fed-Batch Culture", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.285, n.4, p.1025–1033.

- HANNING, G., MAKRIDES, S. C., 1998, "Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*", **Trends in Biotechnology**, v.16, p.54-60.
- HORTACSU, A., RYU, D.D., 1991, "Optimization of a two-stage recombinant fermentation process: The dilution rate effect", **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p.831-837.
- ILZARBE, L., ÁLVAREZ, M.J., VILES, E., *et al.*, 2008, "Practical applications of design of experiments in the field of engineering: a bibliographical review". **Quality and Reliability Engineering International**, v.24, pp.417-28.
- IMANAKA, T. e AIBA, S., 1981, "A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid", **Annals of New York Academy of Science**, v.369, p.1-14.
- INCA (Instituto Nacional de Câncer), 2014, "Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil", **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em: 20 de fev. de 2014.
- ISLAM, R.S., TISI, D., LEVY, M.S. *et al.*, 2007, "Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design", **Biotechnology Progress**, v. 23, p.785-793.
- JALES, S.T.L., SOARES-SOBRINHO, J.L., NUNES, L.C.C., *et al.*, 2007, "Formulation Technology of a Probiotic (*Zymomonas mobilis*) in Gelatinous Capsules", **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.4, p.553-557.
- JANA, S., DEB, J. K., 2005, "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p. 289-298.
- KHUSHOO, A., PAL Y., SINGH B.N. *et al.*, 2004 "Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II", **Protein Expression and Purification**, v.38, p.29-36.

- KHUSHOO, A., PAL, Y., MUKHERJEE K. J., 2005, "Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.189–197.
- KORZ, D.J., RINAS, U., HELLMUTH, K., *et al.*, 1995, "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*", **Journal of Biotechnology**, v.39, p.59-65.
- KOTZIA, G.A. E LABROU, N.E., 2005, "Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* l-asparaginase. **Journal of Biotechnology**, v.119, p.309–323.
- KOTZIA, G.A. E LABROU, N.E., 2007, "L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, expression and characterization", **Journal of Biotechnology**, v.127, p. 657–669.
- KOZAK, M., JASKÓLSKI, M., RÖHM, K.H., 2000, "Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic *Escherichia coli* L-asparaginase", **Acta Biochimica Polonica**, v.47, n.3, p.807–814.
- KURTZBERG, 2000, "L-asparaginase", In: **Holland-Frei Cancer Medicine**, 5 ed., Editora Hamilton (ON): BC Decker.
- LAEMMLI, U. K., 1970, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", **Nature**, v. 193, pp. 680-685.
- LARENTIS, A. L., ALMEIDA, R. V., MARTINS, O. B. *et al.*, 2006, **Engenharia de Bioprocessos Recombinantes**. Escola Piloto Virtual do Programa de Engenharia Química/COPPE.
- LARENTIS, A.L., ARGONDIZZO A.P.C., ESTEVES G.S. *et al*, 2011a, "Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage", **Protein Expression and Purification**., v.78, n.1, p.38-47.

- LARENTIS, A.L., SAMPAIO, H.C.C., MARTINS, O.B., *et al.*, 2011b, "Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from *Pseudomonas stutzeri* in recombinant *Escherichia coli* using experimental design", **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.1045–1054.
- LARENTIS AL, NICOLAU, JFMQ, ARGONDISSO APC, *et al.*, 2012, "Optimization of medium formulation and seed conditions for expression of mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) in *Escherichia coli* using a sequential experimental design strategy and response surface methodology". **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.39, pp.897-908.
- LARENTIS AL, NICOLAU, JFMQ, ESTEVES GS, *et al.*, "Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor". **BMC Research Notes**, No prelo 2014.
- LARENTIS, A.L., EINSFELDT, K., MARINI, G., *et al.* "State-of-the-art in statistical experimental design for the evaluation of heterologous protein expression in *Escherichia coli*", (under review in **Microbial Cell Factories**, Manuscript ID: 1541443930125662).
- LEE, S. B., RYU, D. D. Y., SEIGEL, R. E PARK, S. H., 1988, "Performance of recombinant fermentation and evaluation of gene expression efficiency for gene product in two-stage continuous culture", **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.805-820.
- LEE, S.M., WROBLE, M.H., ROSS, J.T., 1989, "L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. An improved recovery and purification process using affinity chromatography", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.22, n.1, p.1–11.
- LEE, S.Y., 1996, "High cell-density culture of *Escherichia coli*", **Trends in Biotechnology**, v.14, p.98-105.

- LEÓN, A.D., ISLÁS, H.J., CUEVAS, M.G. *et al.*, 2004, "Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum ech42* gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology", **Process Biochemistry**, v.39, p.2173-2178.
- LO, P.K., HASSAN, O., AHMAD, A. *et al.*, 2007, "Excretory over-expression of *Bacillus* sp. G1 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in *Escherichia coli*: Optimization of the cultivation conditions by response surface methodology", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1256-1263.
- LONGHI, L.G.S., LUVIZETTO, D.J., FERREIRA, L.S., *et al.*, 2004, "A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate", **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.35-40.
- LOPES C.A.C., GONÇALVES DE LIMA, O., SILVA FILHO, A.A., *et al.*, 1980, "Efeitos obtidos com o emprego de cultura de *Zymomonas mobilis* variedade *recifenses* em pacientes portadores de enterocolites bacterianas", **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.20, p.69-77.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; *et al.*, 2010, **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre, Artmed.
- MAKRIDES, S.C., 1996, "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*", **Microbiological Reviews**, v.60, n.3, p.512-538.
- MALDONADO, L.M.T.P., HERNÁNDEZ, V.E.B., RIVERO, E.M. *et al.*, 2007, "Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta", **Biomolecular Engineering**, v.24, p.217-222.
- MANDENIUS, C.F., BRUNDIN, A., 2008, "Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology", **Biotechnology Progress**, v.24, p.1191-203.

- MANDERSON D, DEMPSTER R, CHISTI Y., 2006, "A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*". **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.173-182.
- MARÍ, Y.M., ESPINOSA, A.E.S., UBIETA, R. *et al.*, 1999, "Effect of the Selection Marker on the Viability and Plasmid Stability of Two Human Proteins with Neurotrophic Action Expressed in *Escherichia coli*", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.258, p. 29–31.
- MARINI G, 2011, "**Avaliação por planejamento de experimentos dos efeitos da composição do meio de cultura e das variáveis de indução na expressão de pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli***". Dissertação de M.Sc. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MARINI G, LUCHESE MD, ARGONDIZZO APC, *et al.*, 2014, "Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process", **BMC Biotechnology**, v.14:1.
- MATHUR, A., CHAND, S., 2009, "Model-based evaluation of plasmid segregational instability in repeated batch culture with recombinant *Escherichia coli*", **Chemical Engineering Journal**, v.153, p.227–230.
- MDIC (Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio), 2014, "Análise das Informações de Comércio Exterior (AliceWeb)", Disponível em: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>. Acesso em: 20 de fev. de 2014.
- MERGULHÃO, F.J.M., SUMMERS, D.K., MONTEIRO, G.A., 2005, "Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*", **Biotechnology Advances**, v.23, p.177–202.
- MIAO, F. e KOMPALA, D. S., 1992, "Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling", **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.787-796.

- MICHALSKA,K., JASKOLSKI, M., 2006, "Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations", **Acta Biochimica Polonica**, v 53, n. 4, p.627–640.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, "**Saúde garante medicamento contra leucemia infantil**", Disponível em: <http://www2.planalto.gov.br/excluir-historico-nao-sera-migrado/saude-garante-medicamento-contra-leucemia-infantil-para-estados-e-distrito-federal>. Acesso em: 3 de maio de 2014.
- MOSRATI, R., NANCIB, N., BOUDRANT, J., 1993, "Variation and Modeling of the Probability of Plasmid Loss as a Function of Growth Rate of Plasmid-Bearing Cells of *Escherichia coli* During Continuous Cultures", **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.395-404.
- MOURA, M.V.H., DOBLER, L., GUTARRA, M.L.E., et al., 2012, "Studying the expression of a lipase from *Pyrococcus furiosus* using response surfaces" **Protein Expression and Purification**, v.88, p.26-32.
- NAP, J.P., BIJVOET, J., STIEKEMA, W.J., 1992, "Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants", **Transgenic Research**, v.1, p.239-249.
- NARTA, U.K., KANWAR, S.S., AZMI W., 2007, "Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.61, p.208–221.
- NARTA, U., ROY, S., KANWAR, S.S., *et al.*, 2011, "Improved production of L-asparaginase by *Bacillus brevis* cultivated in the presence of oxygen-vectors", **Bioresource Technology**, v.102, p.2083–2085.
- NCCLS, 2003, "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard", 6 ed. NCCLS document M7-A6., Pennsylvania, USA.
- NELDER, J. A.; MEAD, R.; 1965, "A Simplex Method for Function Minimization", **The Computer Journal**, v. 7, n. 4, pp. 308-313

- NETO, D.C., BUZATO, J.B., BORSATO, D., 2006, "L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design", **Acta Scientiarum Technology**, v. 28, n. 2, p. 151-153.
- NETO, A.M., 2012, **Aprimoramento da anotação N-terminal de proteínas através da predição de peptídeo sinal em proteínas ortólogas e desenvolvimento de uma ferramenta automática para a identificação de grupos ortólogos contendo erros de anotação**. Tese de D.Sc., Biologia Molecular e Celular/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- NICCOLAI A, FONTANI S, KAPAT A, *et al.*, 2003, "Maximization of recombinant *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein production in *Escherichia coli*: improvement of a chemically defined medium using response surface methodology", **FEMS Microbiology Letters**, v.221, p.257-262.
- NIKAREL, I.E., TOKSOY, E., KIRDAR, B. *et al.*, 2005, "Optimizing medium composition for TaqI endonuclease production by recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology", **Process Biochemistry**, v.40, p1633-1639.
- NIKAREL, I.E., ÖNER, E., KIRDAR, B. *et al.*, 2006, "Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology", **Biochemical Engineering Journal**, v.32, p.1-6.
- NOGUÈRE C, LARSSON AM, GUYOT JC, *et al.*, 2012, "Fractional factorial approach combining 4 *Escherichia coli* strains, 3 culture media, 3 expression temperatures and 5 N-terminal fusion tags for screening the soluble expression of recombinant proteins", **Protein Expression and Purification**, v.84, n.2, p.204-213.
- NOVAGEN, 2005, "pET System Manual", 10 ed., Darmstadt, Alemanha.
- OHNUMA, T., HOLLAND, J.F., FREEMAN A., *et al.*, 1970, "Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man", **Cancer Research**, v30, p.2297-2305.

- OMS (Organização Mundial da Saúde), 2008, "Cancer Site by Site", **World Cancer Report**, Lyon, França, editora WHO Press. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
- ORTEGA, J.A., NESBIT JR., M.E., DONALDSON, M.H. *et al.*, 1977, "L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. **Cancer Research**. v.37, p.535–540.
- ORTLUND, E., LACOUNT, M.W., LEWINSKI K., *et al.*, 2000, "Reactions of Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase with Diazo Analogues of Glutamine and Asparagine Result in Unexpected Covalent Inhibitions and Suggests an Unusual Catalytic Triad Thr-Tyr-Glu", **Biochemistry**, v.39, p.1199-1204.
- PALM, G.J., LUBKOWSKI J., DERST, C., *et al.*, 1996, "A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant", **FEBS Letters**, v.390, p.211-216.
- PALOMARES, L.A., ESTRADA-MONDACA, S., RAMÍREZ, O.T., 2004, "Production of recombinant proteins: challenges and solutions", **Methods in Molecular Biology**, v.267, p.15-52.
- PAN, H., XIE, Z., BAO, W., *et al.*, 2008, "Optimisation of culture conditions to enhance cis-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology", **Biochemical Engineering Journal**, v.42, p.133-138.
- PAPANEOPHYTOU, C.P., KONTOPIDIS, G., 2014, "Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review", **Protein Expression and Purification**, v.94, p.22-32.
- PASUT E VERONESE, 2009, "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview". **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.61, p.1177–1188.

- PERRY, RH, CHILTON, C.H., 1980, **Chemical engineers' handbook**. 5 ed. McGraw-Hill, New York.
- PETI, W., PAGE, R., 2007, "Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost", **Protein Expression and Purification**, v.51, p.1–10.
- PIETERS, R., APPEL, I., KUEHNEL, H.J., *et al.*, 2008, "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial", **Blood**, v.112, p.4832-4838.
- PIETERS, R., HUNGER S.P., BOOS, J. *et al.*, 2011, "L-Asparaginase Treatment in Acute Lymphoblastic Leukemia", **Cancer**, v.117,p.238–249.
- PINHEIRO, I. O., 2001, **Fermentações de *Zymomonas mobilis* em Meio Mínimo Usando Asparagina como Fonte de Nitrogênio**. Tese de D.Sc., COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- POKROVSKY, V., Anisimova, N.Y., Pokrovskaya, M.V., *et al.*, 2012, "*Yersinia Pseudotuberculosis* L-asparaginase – a Promising New Chemotherapeutic Agent", **European Journal of Cancer**, v.48, suppl. 5, p.S25–S288.
- POPOV, M., PETROV, S., NACHEVA, G., *et al.*, 2011 Effects of a recombinant gene expression on ColE1-like plasmid segregation in *Escherichia coli*", **BMC Biotechnology**, v.11, p.1-12.
- REN, X., YU, D., HAN, S. *et al.*, 2006, "Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology", **Bioresource Technology**, v. 97, p.2345-2349.
- RIESENBERG, D., SCHULZ, V., KNORRE W.A., *et al.*, 1991, "High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate", **Journal of Biotechnology**, v.20, p.17-28.

- RIZZARI *et al.*, 2013, "Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia", **Curr Opin Oncol**, v. 25, Suppl 1, p.S1-9.
- RODRIGUES, M.L.T., 2008, **Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida***. Dissertação de M.Sc. Biociências Aplicadas à Farmácia/USP. Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- RODRIGUES E IEMMA, 2005, **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos**, 1ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão.
- RODRIGUES E IEMMA, 2009, **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos**, 2ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão.
- ROTH, G., NUNES, J. E. S., ROSADO, L. A., *et al.*, 2013, "Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures", **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n.02, p. 245 – 256.
- RYTTING, M.E., 2012, "Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients", *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, v.2, p.117–124.
- SAMBROOK. J., RUSSELL, D. W., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ed., Nova York, Estados Unidos de America, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANCHES, M., ALEXANDRE J., BARBOSA R. G., *et al.*, 2003 Structural comparison of *Escherichia coli* L-asparaginase in two monoclinic space groups", **Acta Cryst.**, v. D59, p.416-422.
- SANCHES, M., KRAUCHENCO, S., POLIKARPOV, I., *et al.*, 2007 Structure, Substrate Complexation and Reaction Mechanism of Bacterial Asparaginases", **Current Chemical Biology**, v.1, p.75-86.

- SANTOS, J.F.M., VASCONCELOS, J., SOUZA, J.R., *et al.*, 2004 “The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection”, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, n.6, p.502-504.
- SAVITRI, ASTHANA, AZMI, 2003, “Microbial l-asparaginase: a potent antitumor enzyme”, **Indian J Biotechnol**, v.2, p.184–194.
- SCHLEGEL, S., LÖFBLOM J., LEE, C., *et al.*, 2012, “Optimizing Membrane Protein Overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3)”, **Journal of Molecular Biology**, 423, 648–659.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.2, 2001.
- SCHMIDT, 2005 “Optimization and scale up of industrial fermentation processes”, **Appl Microbiol Biotechnol**, v.68, p.425–435.
- SCHRAPPE, M., REITER A., LUDWIG W.D. *et al.*, 2000, “Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German- Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group”, **Blood**, v.95, p.3310–3322.
- SCHUMANN, W., FERREIRA, L. C. S., 2004, “Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*”, **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.442-453.
- SCHWAAB, M., PINTO, J.C., 2007, **Análise de Dados Experimentais, I: fundamentos de estatística e estimação de parâmetros**. 1ed. Rio de Janeiro, e-papers.
- SECCHI, A. R., 2008, User's Manual - Version 3.5. Pacote computacional para a solução de sistemas de equações algébrico-diferenciais. Disponível em: <<http://www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric/numeric.html>>.

- SELVAMANI, R.S.V., TELAAR M., FRIEHS, K., *et al.*, 2014, “Antibiotic-free segregational plasmid stabilization in *Escherichia coli* owing to the knockout of triosephosphate isomerase (*tpiA*)”, **Microbial Cell Factories**, v.13, p.1-12.
- SEVERO JÚNIOR, J.B., 2008, **Síntese Biocatalítica do Sorbitol e Ácido Lactobiônico com Separação Simultânea por Eletrodialise**. Dissertação de M.Sc.. COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SEZONOV, G., JOSELEAU-PETIT, D., D’ARI, R., *et al.*, 2007, “*Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth”, **Journal of Bacteriology** , v. 189, n. 23, p. 8746–8749.
- SHENE, C., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A., 2003 “Study of recombinant micro-organism populations characterized by their plasmid content per cell using a segregated model”, **Bioprocess Biosyst Eng.**, v.25, n.6, p.333-340.
- SHILOACH, J., FASS, R., 2005, “Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development”, **Biotechnology Advances**, v.23, p.345–357.
- SHIN, C. S., HONG, M. S., BAE, C. S., *et al.*, 1997, “Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET-3aT2M2]”, **Biotechnology Progress**, v. 13, p. 249-257.
- SHOKRI, A. SANDEN, A.M. LARSSON, G., 2003, “Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*”, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.60, p654–664.
- SILVA, F., QUEIROZ, J.A. DOMINGUES., F.C., 2012, “Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*”, **Biotechnology Advances**, v.30, p.691–708.

- SILVA M.R., SEVERO, M.G., DELABONA, P.S., *et al.*, 2013, “High cell density co-culture for production of recombinant hydrolases”, **Biochemical Engineering Journal**, v.71, p.38–46.
- SINGH, Y., GUNDAMPATI, R.K., JAGANNADHAM M. V., *et al.*, 2013, “Extracellular L-Asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of Antineoplastic Activity *in Vitro*”, **Appl Biochem Biotechnol**, v.171, p.1759–1774.
- SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R.; 2003, “EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimization”, *Computer Aided Chemical Engineering*, v. 14, n. C, pp. 947-952.
- SØRENSEN, H.P., MORTENSEN, K.K., 2005, “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*”, **Journal of Biotechnology**, v.115, p.113–128.
- STECHER A.L., DEUS M. P., POLIKARPOV I. *et al.*, 1999, “Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. v.74, p.1-9.
- STUDIER, F.W., 2005, “Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures”, **Protein Expression and Purification**, v.41, p.207–234.
- SUNITHA, K., KIM, Y., LEE, J. *et al.*, 2000, “Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*”, **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p.51-56.
- SWAIN, A.L., JASKOLSKI, M., HOUSSET, D. *et al.*, 1993, “Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy” **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.90, p.1474-1478.

- SWALLEY, S.E., FULGHUM J.R., CHAMBERS, S.P., 2006, "Screening factors effecting a response in soluble protein expression: Formalized approach using design of experiments", **Analytical Biochemistry**, v.351, p.122–127.
- SWINGS, J., DE LEY, J., 1977, "The Biology of *Zymomonas*", **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-46.
- TABACCO, A., MEIATTINI, F., MODA, E., *et al.*, 1979, "Simplified Enzymic/Colorimetric Serum Urea Nitrogen Determination", **Clinical Chemistry**, v.25,n. 2, p.366-367.
- TERPE, K., 2006, "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p.211-222.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J., 1994, "Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighing, Position-Specific Gap Penalties and Weigth Matrix Choice", **Nucleic Acids Research**, v. 22, p.4673-4680.
- TOKSOY, E., ÖNSAN, Z.Í., KIRDAR, B., 2002, "High-level production of TaqI restriction endonuclease by three different expression systems in *Escherichia coli* cells using the T7 phage promoter", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.239-245.
- TOMA, M.M., KALNENIEKS, U., BERZINS, A. *et al.*, 2003, "The Effect of Mixing on Glucose Fermentation by *Zymomonas mobilis* Continuous Culture", *Process Biochemistry*, v. 38, pp. 1347-1350.
- TOMAZETTO, G., MULINARI, F., STANISQUASKI, F. *et al.*, 2007, "Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E. coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity", **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.821-827.
- VAN DEN BERG, 2011, "Asparaginase revisited", **Leukemia & Lymphoma**, v.52, n.2, p.168–178.

- VÁZQUEZ, J. A., DURÁN A., RODRÍGUEZ-AMADO I. *et al.*, 2011, "Evaluation of toxic effects of several carboxylic acids on bacterial growth by toxicodynamic modeling", **Microbial Cell Factories**, v.10, p.1-10.
- VERMA, N. *et al.*, 2007, "L-Asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent", **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, p.45-62.
- VOLONTÈ, F., MARINELLI, F., GASTALDO, L., *et al.*, 2008, "Optimization of glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expression in *E. coli*", **Protein Expression and Purification**, v.61, p.131-137.
- VON HEIJNE, G., 1990, "The Signal Peptide", **J. Membrane Biol.**, v.115, p.195-201.
- VROOMAN, L.M., STEVENSON, K.E., SUPKO J.G., *et al.*, 2013, "Postinduction Dexamethasone and Individualized Dosing of Escherichia Coli L-Asparaginase Each Improve Outcome of Children and Adolescents With Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From a Randomized Study—Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01", **Journal of Clinical Oncology**, v.31, n.9, p.1202-1210.
- WANG, Y., QIAN, S., MENG, G., *et al.*, 1999, "Cloning and Expression of L-Asparaginase Gene in *Escherichia coli*", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.95, p.93-101.
- WANG, Y.H., JING, C.F., YANG, B. *et al.*, 2005, "Production of a new sea anemone neurotoxin by recombinant *Escherichia coli*: Optimization of culture conditions using response surface methodology", **Process Biochemistry**, v.40, p.2721–2728.
- WANIK, M.C., SILVA, E.C., 1971, "Novas observações sobre o emprego de *Zymomonas mobilis* var. *recifenses* em infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* e *Trichomonas vaginalis*", *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.11, n.2, p.69-71.

- WILBERG, K.Q., 1996, **Estudo da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico Utilizando Células Permeabilizadas de *Zymomonas mobilis***. Tese de Mestrado, Programa de Engenharia Química/COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- WINK, P.L., **BOGDAWA, H.M., RENARD, G., et al.**, 2010, “Comparison between Two *Erwinia carotovora* L-Asparaginase II Constructions: cloning, Heterologous Expression, Purification, and Kinetic Characterization”, **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v.2, n.1, p.13-19.
- XU, J., LI, W., WU, J. *et al.*, 2006, “Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*”, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.780–788.
- YUN *et al.*, 2007, “Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I”, **J. Mol. Biol.** v.369, p.794–811.
- ZHANG, X., LI, Y., ZHUGE, B. *et al.*, 2006, “Optimization of 1,3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology”, **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, v.81, p.1075-1078.

APÊNDICE A

Apêndice A.1 – Alinhamento global da sequência de aminoácidos de L-asparaginase tipo I (ans A) e tipo II (ans B) de *Escherichia coli*

	10	20	30	40	50	60
ansAxx0	-----M Q K K S I Y V A Y T G G T I G M Q -----R S E Q Q Y I P V S G H L Q R Q L A L M P -----E F H					
ansBxx1	M E F F K K T A L A A L V M G F S G A A L A L P N I T I L A T G G T I A G G G D S A T K S N Y T V G K V G V E N L V N A					
Prim.cons.	MEFFKK2222222222G222222NITI2222G2I222G2222222222GKVGVENL222					
	70	80	90	100	110	120
ansAxx0	R P E M P D F T -- I H E Y T P L M D S S D M T P E D W Q H I A E D I K A H Y D D Y D G F V I L H G T D T M A Y T A S A					
ansBxx1	V P Q L K D I A N V K G E Q V N I G S Q D M N D N V W L T L A K K I N T D C D K T D G F V I T H C T D T M E E T A Y F					
Prim.cons.	2P222D22NV22E222222S2DM222W222A22I2222D22DGFVI2HGTDTM22TA22					
	130	140	150	160	170	180
ansAxx0	L S F M L E N L G K P V I V T G S Q I P L A E L R S D G Q I N L L N A L Y V A A N Y P I N -- E V T L F F N N R L Y R G					
ansBxx1	L D L T V K - C D K P V M V G A M R P S T S M S A D G P F N L Y N A V V T A A D K A S A N R G V L V M N D T V L D G					
Prim.cons.	L2222N22KP222G222P222222DG22NL2NA222AA2222NR2V2222N22222G					
	190	200	210	220	230	240
ansAxx0	N R T T K A H A D G F D A F A S P N L P L L E A G - I H I R R L N T P P A P H G - E G E L I V H P I T P Q P - I G V V					
ansBxx1	R D V T T N T T D V A T F K S V N Y G P L G Y I H N G K I D Y Q R T P A R K H T S D T P F D V S K L N E L P K V G I V					
Prim.cons.	222TK2222222F2S2N22PL2222N22I2222TP222H2S22222V222222PK2G2V					
	250	260	270	280	290	300
ansAxx0	T I Y P G I S A D V V R N F L R Q P V K A L I L R S Y G V G N A P Q N K A F L Q E L Q E A S D R G I V V V N L T Q C M S					
ansBxx1	Y N Y A N A S D L P A K A L V D A G Y D G I V S -- A G V G N G N L Y K S V F D T L A T A A K T G T A V V R S S R V P T					
Prim.cons.	22Y222S22222222222222222222RS2GVGN2222K22222L22A222G22V22222222					
	310	320	330	340	350	360
ansAxx0	G K V N M G Y A T G N A L A H A G V I G G A D M T V E A T L T K L H Y L L S Q E L D T E T I R K A M S Q N L R G E L T					
ansBxx1	G A T T Q D A E V D D --- A K Y G F V A S G T L N P Q K A R V L L Q L A L T Q T K D P Q Q I Q Q I F N Q Y -----					
Prim.cons.	G2222222222NALA22G222222222222222L222L2Q22D222I22222Q2LRGELT					
ansAxx0	PDD					
ansBxx1	---					
Prim.cons.	PDD					

Apêndice A.2 - Alinhamento global da sequência de aminoácidos de L-asparaginase tipo II (ans B) de *Erwinia chrysanthemi* e de L-asparaginase tipo II (ans B) de *Escherichia coli*

```

                10      20      30      40      50      60
                |      |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi MERWFKSLFVLVLFVFTASAADKLPNIVILATGGTIAGSAATGTQTGYKAGALGVDTL
ansB_E_coli ME-FFKKTALAALVMGFSG-AALALPNIITILATGGTIAGGGDSATKSN-YTVGKVGVENL
                * * : * * : : * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons. MER2FK22222L222F22SAA22LPNI2ILATGGTIAG2222T222GY22G22GV22L

                70      80      90      100     110     120
                |      |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi INAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKLSQRVNELLARDDVDGVVITHGTDTVE
ansB_E_coli VNAVPLKDIANVKGEQVNVIGSQDMNDNVWLTLAKKIN--TDCDKTDGFFVITHGTDTME
                : * * * * * : * : * * * * * : * * : * * : * * : * * : * * * * * * *
Prim.cons. 2NAV22K22ANVKGEQ22N2S2S2M22V2L2L2222NEL22D22DG2VITHGTD2E

                130     140     150     160     170     180
                |      |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi ESAYFLHLTVKSDKPVVFAAMRPATAISADGPMNLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVLNDR
ansB_E_coli ETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAAMRPSTMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLVVMNDT
                * : * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons. E2AYFL2LTVK2DKPV2V2AMRP2T22SADGP2NL22AV22A2DK2S22RGV2VV2ND2

                190     200     210     220     230     240
                |      |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi IGSARYITKTNASTLDTFKANEELGVIIGNRIYQNRIDKLTHTSRVFDVRLTSLPK
ansB_E_coli VLDGRDVTITNTDVAIFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTFARKHTSDTFDVSKLNELPK
                : . . * : * * * * : : * * * : * * * . . : * * : : * * * * . * * *
Prim.cons. 2222R22TKTN2222TFK2222G2LG2I2222I2YQ22222HT2222FDV22L22LPK

                250     260     270     280     290     300
                |      |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi VDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKIVYAGMGAGSVSVRGIAGMRKAMEKGVVIRSTRT
ansB_E_coli VGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGVISAGVGNGLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSRV
                * . * . * * : . : * * : * . * * * * * * . : : : * * : * * * * * *
Prim.cons. V2I2Y2Y22222222A2222G22GIV2AG2G2G22222222222A222G22V2RS2R2

                310     320     330     340     350
                |      |      |      |      |
AnsB_erwinia_chrysanthemi GNGIVPPDEELPG-----LVSDSLNPAHARILLMLALTRTSDPKVIOEYFHTY
ansB_E_coli PTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPKARVLLQLALTQTKDPQQIQQIFNQY
                * . . . * * : . . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Prim.cons. 22G2222D2E222AKYGF2S22LNP22AR2LL2LALT2T2DP22IQ22F22Y

```

Apêndice A.3 - Alinhamento global da sequência de aminoácidos de L-asparaginase tipo II (ans B) de *Zymomonas mobilis* e de L-asparaginase tipo II (ans B) de *Escherichia coli*

```

                10      20      30      40      50      60
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    MEFKKTALAA-----LVMGFS-----GAALALPNITILATGGTIAGGGDSAT
tipoII_Z_mobilis_ZM4 MMIFKIPVKASSAAALAICMMMGATPAISMNNQVHSIQTLPRILVLATGGTISGKKNGMS
* : * . . * : : * * : : * . * : * * * * * : * . . :
Prim.cons.    M22FK2222A2SAAALAIC22MG22PAISMNNQV22222LP2I22LATGGTI2G222222

                70      80      90      100     110     120
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    KSNYTVGKVGVENLVNAVPEQLKDIANVKGEQVVNIGSQDMNDNVWLTLLAKKIN--TDCDK
tipoII_Z_mobilis_ZM4 EIGYNAGGVTKQLVEDFPELAKLAEINVEQIANIGSQDMNDAIWLRLLAKRIQDAVAHNE
: . * . * * : * * : * * : * * : * * : * * * * * : * * * * * : . :
Prim.cons.    222Y22G2V2222LV222P2L222A2222EQ22NIGSQDMND22WL2LAK2I2DA22222

                130     140     150     160     170     180
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    TDGFVITHGTDTMEETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNVAVVTAADK
tipoII_Z_mobilis_ZM4 ADGIVITHGTDTMEETAFFLDLTVIRTDKPIILTGAMRPSTAIADGPPANLYEAEIIVAATP
: * : * * * * * * * * * * * : * * : * * : * * * * * : * * * * * : * *
Prim.cons.    2DG2VITHGTDTMEETA2FLD2222DKP2222GAMRPST222ADGPP2NLY2A222AA22

                190     200     210     220     230     240
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    ASANRGVLLVMNDTVLDGRDVTXTNNTDVAATFKSVNYGPIGYIHNGKIDYQRTPARKKHTS
tipoII_Z_mobilis_ZM4 KAKDHGVMIVMNDTIHAARWASKTHHTTAVETFQSINAGPIGYVDPASVRFIEP---KKQP
: : * * : * * * * : * . : * * * * * * * * * * * : . . : . . * : .
Prim.cons.    22222GV22VMNDT2222R222KT2TT2V2TF2S2N2GP2GY22222222222PARK222

                250     260     270     280     290     300
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    DTPFDVSKLNELPKVGIVYNYANASDLPAKALVDAGYDGIIVSAGVGNGLYKSVFDTLAT
tipoII_Z_mobilis_ZM4 VPSYGLPTTAPLPAVEILYAHSMGASIIINDLIKTGVKGIILAGVGDGNSSKEAMAALNL
. . . . . * * * * * : . . : * : * * * * * : * * * * * : * * : *
Prim.cons.    22222222222LP2V2I2Y2222222222222222222222G22GI22AGVG2GN22K22222L22

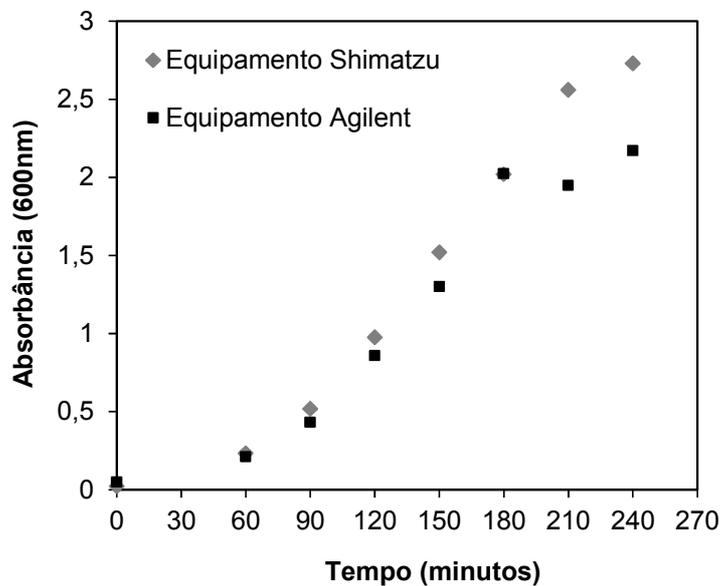
                310     320     330     340     350     360
                |      |      |      |      |      |
ansB_E_coli    AAKTGTAVVRRSRVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPKARVLLQLALTQTKD-PQQ
tipoII_Z_mobilis_ZM4 AVKQGVIVVRRSRTGSGFVNRNVEVNDDKNDVVSYDLSFPQKARILLQILIANGKNKLS
* . * . * * * * . : * . . . : * * * * * * . * . * * . * * * * * : : : * : . :
Prim.cons.    A2K2G22VVRSSR222G222222EV2D2K22FV2S22L2PQKAR2LLQ222222K2K222

ansB_E_coli    IQQIFNQY-
tipoII_Z_mobilis_ZM4 IQSAFEAGF
* * . * :
Prim.cons.    IQ22F222F

```


APÊNDICE B

Apêndice B.1 – Cinética de crescimento da cepa *E. coli* BL21(DE3)/pET26b/ans em frascos agitados.



APÊNDICE C

Apêndice C.1 – Experimentos do planejamento fatorial fracionado e suas variáveis de resposta em valores absolutos em 4 horas de indução.

Exp.	Temperatura de Expressão (°C)	Canamicina (µg/mL)	Lactose (g/L)	Abs _{600nm} de Indução	Células (g/L)	L-asparaginase (UI/mL)
1	25 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,134	0,003
2	37 (+1)	25 (-1)	5 (-1)	4,6 (+1)	2,003	2,241
3	25 (-1)	75 (+1)	5 (-1)	4,6 (+1)	2,435	0,003
4	37 (+1)	75 (+1)	5 (-1)	0,2 (-1)	0,657	0,014
5	25 (-1)	25 (-1)	15 (+1)	4,6 (+1)	3,026	0,015
6	37 (+1)	25 (-1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,776	0,020
7	25 (-1)	75 (+1)	15 (+1)	0,2 (-1)	0,220	0,002
8	37 (+1)	75 (+1)	15 (+1)	4,6 (+1)	1,747	1,240
PC1	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,013	0,232
PC2	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,308	0,143
PC3	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	1,968	0,147
PC4	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,407	0,143

Apêndice C.2 – Experimentos do planejamento fatorial fracionado e suas variáveis de resposta em valores absolutos em 16 horas de indução.

Exp.	Temperatura de Expressão (°C)	Canamicina (µg/mL)	Lactose (g/L)	Abs _{600nm} de Indução	Células (g/L)	L-asparaginase (UI/mL)
1	25 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,2 (-1)	1,147	0,071
2	37 (+1)	25 (-1)	5 (-1)	4,6 (+1)	3,454	15,809
3	25 (-1)	75 (+1)	5 (-1)	4,6 (+1)	4,715	1,747
4	37 (+1)	75 (+1)	5 (-1)	0,2 (-1)	2,428	6,067
5	25 (-1)	25 (-1)	15 (+1)	4,6 (+1)	5,265	2,021
6	37 (+1)	25 (-1)	15 (+1)	0,2 (-1)	2,309	6,322
7	25 (-1)	75 (+1)	15 (+1)	0,2 (-1)	1,064	0,083
8	37 (+1)	75 (+1)	15 (+1)	4,6 (+1)	2,273	9,266
PC1	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,197	19,388
PC2	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,458	21,842
PC3	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	2,128	18,836
PC4	31 (0)	50 (0)	10 (0)	2,4 (0)	3,139	21,539

APÊNDICE D

Apêndice D.1 – Condições iniciais utilizadas na estimação e simulação do modelo para a cinética do crescimento celular

Variável	Unidade	Valor
Células	g/L	0,05
Glicerol	g/L	32,10
pO ₂	%	100

Apêndice D.2 – Parâmetros mantidos constantes e utilizados na estimação e simulação do modelo para a cinética do crescimento celular

Parâmetro	Unidade	Valor
F _{ar}	L/h	24,000
V _G	L	0,350
V _L	L	0,400
P	atm	1,000
M	kg/kmol	32,000
xo ₂	-	0,210
R	kJ/kmol/K	8,314
K _{la}	1/h	41,300
T	°C	37,000

Apêndice D.4 – Condições iniciais utilizadas na estimação e simulação do modelo proposto sem considerar os dados de concentração de antibiótico.

Variável	Unidade	Valor
X ⁺	g/L	0,058
X	g/L	0,001
S	g/L	31,31
pO ₂	%	97,3
le	g/L	0
Pr	UI/mL	0
A	g/L	0,025

Apêndice D.3 – Parâmetros mantidos constantes e utilizados na estimação e simulação do modelo proposto sem considerar os dados de concentração de antibiótico

Parâmetro	Unidade	Valor
$\mu^+_{\text{máx,S}}$	h^{-1}	0,4099
$\mu^-_{\text{máx,S}}$	h^{-1}	0,4199
K_S	g/L	0,379
K_{le}	g/L	0,3
$K_{O,S}$	g/L	4,2E-06
$K_{O,le}$	g/L	4,2E-06
$Y^+_{X/S}$	g_x/g_S	0,2324
$Y^-_{X/S}$	g_x/g_S	0,2324
$Y^+_{X/le}$	g_x/g_{le}	0,076
$Y^-_{X/le}$	g_x/g_{le}	0,076
β	h^{-1}	8,0438
K_{di}	L/g.h	0,05
K_m	h^{-1}	0,38
K^+_1	-	0,4672
K^-_1	-	0,046
a	g/L.h	1
b	g/L	0,12
K_3	L/g	1
$\phi_{O/S}$		0,1372
$\phi_{O/le}$		3,7842
Far	L/h	90
VG	L	1
VL	L	1,5
P	atm	1
M	kg/kmol	32
xo2	-	0,21
R	kJ/kmol/K	8,314
Kla	1/h	41,3
T	$^{\circ}\text{C}$	37