

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA-BIOQUÍMICA**

VITÓRIA ALVES DA SILVA VAROLLO

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DE *E. coli* BL21
COM AMINOÁCIDOS PARA A PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO ANTI-
LEUCÊMICO L-ASPARAGINASE II**

**SÃO PAULO
2023**

VITÓRIA ALVES DA SILVA VAROLLO

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DE *E. coli* BL21
COM AMINOÁCIDOS PARA A PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO ANTI-
LEUCÊMICO L-ASPARAGINASE II**

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

SÃO PAULO

2023

Aos meus pais, que são a minha base e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por serem a fonte inesgotável de apoio e estímulo, nunca permitindo que eu desistisse em meio aos desafios.

À minha querida namorada, Laura Abrahão, por sua constante presença e apoio ao longo desta jornada.

Aos meus amigos - Guilherme Benevides, Gabriel Jorge, Vinicius Lima, Rafaela Andreoni, Caio Lourenço, Guilherme Manfré e Juliana Lopes - que tornaram essa trajetória mais leve e foram pilares fundamentais de apoio mútuo.

Às entidades estudantis que proporcionaram ambientes enriquecedores para convívio e experiências universitárias.

A todas as inspiradoras cientistas mulheres - Renata Bannitz, Flaviana Chaves, Vanessa Déssia, Thamara Reis e Larissa Brumano - e ao cientista Carlos Breyer que me motivaram a enxergar a vida acadêmica com uma nova perspectiva e um brilho nos olhos pela ciência.

Ao Sistema de Seleção Unificada (Sisu), cuja existência viabilizou minha aprovação na universidade pública, e a todos os programas de permanência estudantil que tornaram possível a conclusão do meu curso.

Por fim, ao professor Dr. Adalberto Pessoa Junior, minha gratidão pela orientação e pelas oportunidades oferecidas ao longo da minha trajetória acadêmica.

VAROLLO, VITÓRIA A. S. AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO DE *E. coli* BL21 COM AMINOÁCIDOS PARA A PRODUÇÃO DO BIOFÁRMACO ANTI-LEUCÊMICO L-ASPARAGINASE II. 2023. 46 p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

RESUMO

As leucemias, especialmente a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), representam uma parcela significativa dos casos de câncer, impactando tanto crianças quanto adultos jovens. A LLA é caracterizada por uma produção desordenada de células linfoides imaturas, resultando na supressão da produção de células sanguíneas funcionais e apresentando sintomas como fadiga e suscetibilidade a hematomas e infecções. O tratamento que é complexo visa a reduzir a carga de células tumorais e a alcançar a remissão completa. A L-asparaginase II, uma enzima crucial nesse tratamento, é frequentemente produzida utilizando a bactéria *Escherichia coli* em função de sua eficiência na expressão de proteínas recombinantes. Contudo, a dependência de importações para essa enzima no mercado brasileiro levanta preocupações de desabastecimento. A busca por uma produção independente e otimizada da L-Asparaginase, utilizando insumos nacionais, diminui essa dependência externa e assegura o controle de padrões de qualidade. A suplementação do meio de cultivo com aminoácidos emerge como uma alternativa promissora para otimizar a produção da L-Asparaginase II. Resultados indicam aumento significativo no crescimento celular e na atividade da L-Asparaginase II após a suplementação com aminoácidos, com maior eficiência na produção das biomoléculas com potencial para fortalecer a pesquisa biotecnológica nacional. A adição exógena de aminoácidos ao meio de cultivo se destacou como uma estratégia benéfica para essa otimização e contribuiu para o aumento da velocidade máxima específica de crescimento e da atividade específica da L-Asparaginase II, resultando em uma produção superior quando comparada ao cultivo não suplementado.

Palavras-chave: leucemia; LLA; asparaginase; bioprocesso; aminoácidos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura cristalina L-asparaginase ECII expressa por <i>E.coli</i>	11
Figura 2	Rota de síntese metabólica do aminoácido asparagina.....	13
Figura 3	Reação de hidrólise de asparagina catalisada pela enzima L-asparaginase II.....	14
Figura 4	Mecanismo de ação da L-asparaginase II que atua depletando a asparagina presente na corrente sanguínea, fazendo com que as células leucêmicas sofram apoptose pela carência do aminoácido (BRUMANO <i>et al.</i> , 2019).....	14
Figura 5	Curva padrão do teste de Nessler para determinação da atividade enzimática.....	29
Figura 6	Curva padrão do método de BCA para quantificação de proteínas.	30
Figura 7	Crescimento em função do consumo de glicose observado no cultivo A, que estava sem suplementação de aminoácidos.....	33
Figura 8	Crescimento em função do consumo de glicose observado no cultivo B, que estava com suplementação de aminoácidos.	33
Figura 9	Concentração celular em função da massa seca (g de célula).....	34
Figura 10	Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) calculada no período da fase exponencial do cultivo A (sem aminoácidos) considerando o tempo do início da fase Log (6 horas) até o final da fase (12 horas de cultivo).	35
Figura 11	Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) da fase exponencial do cultivo B (com aminoácidos) considerando o período inicial (4 horas) até o final da fase (12 horas de cultivo).	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes do meio de cultivo definido para a produção de L-Asparaginase II utilizando <i>E. coli</i> em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.....	22
Tabela 2	Componentes do meio de cultivo definido suplementado com aminoácidos para a produção de L-Asparaginase II utilizando <i>E. coli</i> em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.....	22
Tabela 3	Componentes utilizados no meio de alimentação para a produção de L-Asparaginase II utilizando <i>E. coli</i> em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.....	23
Tabela 4	Parâmetros selecionados para realização do cultivo em biorreator.	25
Tabela 5	Reagentes da reação enzimática para o protocolo de Nessler.....	28
Tabela 6	Reação colorimétrica para quantificação da atividade asparaginásica pelo protocolo de Nessler	28
Tabela 7	Atividade máxima específica de crescimento (μ_{\max}) dos cultivos A e B.	36
Tabela 8	Quantificação de proteínas totais e atividade asparaginásica no cultivo A (sem aminoácidos) para cálculo da atividade específica (U/mg).	37
Tabela 9	Quantificação de proteínas totais e atividade asparaginásica no cultivo B (com aminoácidos) para cálculo da atividade específica (U/mg).	38
Tabela 10	Comparação percentual da atividade específica do cultivo B (com aminoácidos) em relação ao cultivo A (sem aminoácidos).	38

LISTA DE ABREVIATURAS

% m/v	Porcentagem em massa/volume
%sat	Porcentagem de Saturação
µg/mL	Micrograma por mililitro
Acetil-CoA	Acetyl coenzima A
Ácido Aspártico	Asp
AEP	Asparagina Endopeptidase
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Asn	Asparagina
ASNase	L-asparaginase (forma abreviada)
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BL21(DE3)	<i>Escherichia coli</i> BL21
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTSB	<i>Cathepsin-B-like Proteases</i>
Cu ²⁺ /Cu ⁺	Íons de Cobre (I) e Íons de Cobre (II)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC1	L-asparaginase I de <i>Escherichia coli</i>
EC2	L-asparaginase II de <i>Escherichia coli</i>
g	Força da Gravidade (centrifugação)
g/L	gramas por Litro
HSC	Células-Tronco Hematopoiéticas
HSPC	Progenitores Multipotentes
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido
kDa	Kilo Dalton
L	Litro
LB	Ágar Luria Bertani
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto

mM	Milimolar
MO	Medula Óssea
mol/L	Mol por litro
mRNA	RNA mensageiro
MW	massa molecular
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₃	Amônia
NH ₄ ⁺	Íon amônio
nm	Nanômetro
OD	Oxigênio Dissolvido
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
Tris-HCl	Tampão ácido composto por Tris e Ácido clorídrico
U/mg	Atividade específica
U/mL	atividade enzimática em Unidades por mililitro
μM	Micrômetro
μ _{max}	Velocidade específica de crescimento celular (h ⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Leucemia Linfoide Aguda (LLA)	10
1.2	L-Asparaginase II e seu mecanismo de ação	11
1.3	Disponibilidade no mercado brasileiro	15
1.4	Tecnologia e microrganismo para a produção de L-Asparaginase II	16
1.5	Meio de cultivo e aminoácidos	17
2	OBJETIVO	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Banco de células	21
3.2	Meio de cultivo definido	21
3.3	Meio de cultivo definido suplementado com aminoácidos	22
3.4	Meio de Alimentação e Indução	23
3.5	Cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3) Δasna/Δasn ^b pET 28 ^{Asn}	24
3.5.1	Pré-inóculo.....	24
3.5.2	Cultivo em biorreator	24
3.6	Análise da Concentração de Glicose	26
3.7	Rompimento total por <i>Bugbuster MasterMix®</i> (Merck-Millipore)	26
3.8	Dessalinização.....	27
3.9	Quantificação da atividade enzimática da L-Asparaginase II.....	27
3.10	Quantificação de proteínas totais pelo método de BCA.....	29
3.11	Curva de massa seca (biomassa)	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

A medula óssea (MO) é o nicho hematopoiético onde ocorre o processo de renovação, produção e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (HSC) e progenitores multipotentes (HSPC) até que atinjam o estado de progenitores unipotentes, por meio das sinalizações celulares. Em seguida, ocorre o estágio de maturação e diferenciação de linhagem sanguínea, culminando no direcionamento para locais extramedulares^{1, 2}. A função desordenada do processo de hematopoiese prejudica a produção de células saudáveis, bem como sua função biológica, caracterizando alguns tipos de doenças, como, por exemplo, neoplasias linfoides e mieloides, dependendo da linhagem que é afetada^{2, 3}.

A leucemia linfoide aguda (LLA) é um tipo de neoplasia maligna do sistema hematopoiético que afeta crianças e adultos, com o pico de incidência ocorrendo na faixa etária de 2 a 4 anos^{3, 4}. Em sua maior parte surge em indivíduos saudáveis, sendo que os fatores de predisposição, como a suscetibilidade genética hereditária ou a exposição ambiental, foram notados em alguns pacientes. A neoplasia é caracterizada por anomalias cromossômicas e alterações genéticas envolvidas na diferenciação e proliferação de células precursoras linfoides⁵. Sendo assim, possui como característica principal a presença de células linfoides imaturas (blastos) na MO ocasionadas pela sua produção exacerbada e desordenada³.

Sua produção desenfreada e imatura, além de afetar a eficiência dos glóbulos brancos, afeta também a disponibilidade de outras células hematopoiéticas como plaquetas e glóbulos vermelhos. O impacto gerado pela supressão da produção das células sanguíneas é relevante, tendo em vista que as suas funções biológicas são comprometidas, o que resulta em sinais clínicos significativos⁴. Como um exemplo, no caso das células vermelhas, as atividades relacionadas ao transporte de oxigênio são afetadas, o que evidencia um dos sintomas característicos da doença como o cansaço e a fadiga. Outros sintomas recorrentes são o surgimento de hematomas e sangramentos^{4, 6}.

O tratamento da LLA pode durar anos e é dividido em três fases, sendo elas: indução, consolidação e manutenção. O objetivo geral de todas essas fases é

diminuir a carga de células tumorais de imediato para que as outras etapas permitam restabelecer a hematopoiese e produção de células sanguíneas viáveis. A remissão completa é a chave principal do processo⁴.

Após a conclusão de todas as etapas, os pacientes com LLA necessitam de tratamento de manutenção prolongado por 2 anos ou mais, dependendo do prognóstico⁷.

1.2 L-Asparaginase II e seu mecanismo de ação

A L-asparaginase é uma enzima que tem a capacidade de converter a asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima pode ser produzida em duas isoformas de L-asparaginase: a L-asparaginase I (EC1), presente no citoplasma, e a L-asparaginase II (ECII), originada no periplasma (Figura 1). Apenas a segunda isoforma possui atividade anticancerígena⁸.

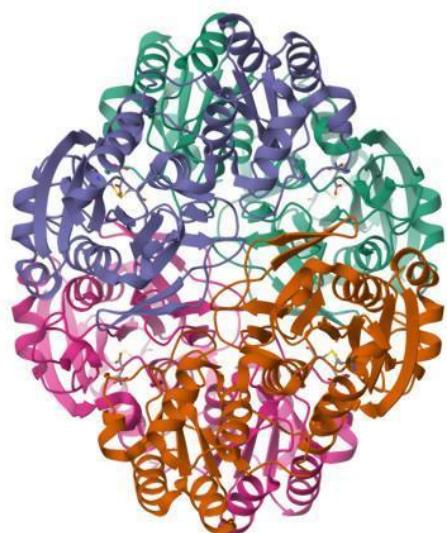


Figura 1 – Estrutura cristalina L-asparaginase ECII expressa por *E.coli*⁹.
(Adaptado de ARAUJO *et al.*, 2019).

A L-Asparaginase (EcA) II de *E.coli* é uma proteína ácida, com um ponto isoelétrico (pl) de 5,0. Sua faixa de pH ótima para atividade situa-se entre 7,0 e 8,0, sendo que a temperatura ideal é de 37 °C. Além disso, o monômero possui massa molecular (MW) de aproximadamente 35 kDa⁴.

A produção de proteínas por DNA recombinante em geral é dividida em processos, denominados *upstream* e *downstream*. Este mesmo modelo é seguido pela produção de ASNase¹⁰.

O processo de *upstream* consiste na fase de produção onde o substrato se torna produto e todo o caminho necessário para viabilizar a chegada até o produto final é selecionado nesta etapa. Nesta fase inclui a definição das condições do cultivo como a seleção do meio de cultura, a linhagem celular, condições físicas (pH, temperatura, agitação, aeração, dentre outros), definição do processo (descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo etc.) e suas devidas otimizações. O processo de *downstream* é a lapidação do produto obtido na etapa de *upstream*. Sendo assim, inclui os passos de purificação, recuperação, polimento, remoção de impurezas, adequação do tampão, formulação adequada etc^{11, 12}.

Tanto as células leucêmicas quanto as células normais dependem do aminoácido L-asparagina para atender às suas necessidades metabólicas. No caso das células normais, elas têm a capacidade de sintetizar a própria L-asparagina para sustentar seu crescimento. A rota metabólica para a síntese do aminoácido asparagina inicia-se com a ação da enzima transaminase, que converte o oxaloacetato em aspartato. Posteriormente, o aspartato transfere um grupo amino do glutamato de volta para o oxaloacetato, levando à produção de α -cetoglutarato e aspartato. Após a formação de α -cetoglutarato e aspartato na rota metabólica, o aspartato é transportado para o citoplasma da célula, onde ocorre a última etapa da síntese da asparagina. No citoplasma, o aspartato reage com o grupo amida da glutamina, com a ajuda da enzima asparagina sintetase. Essa reação resulta na formação de asparagina e regeneração de glutamato (Figura 2)¹³. Em resumo, em células saudáveis, o aspartato é convertido em asparagina pela enzima asparagina sintetase¹⁴.

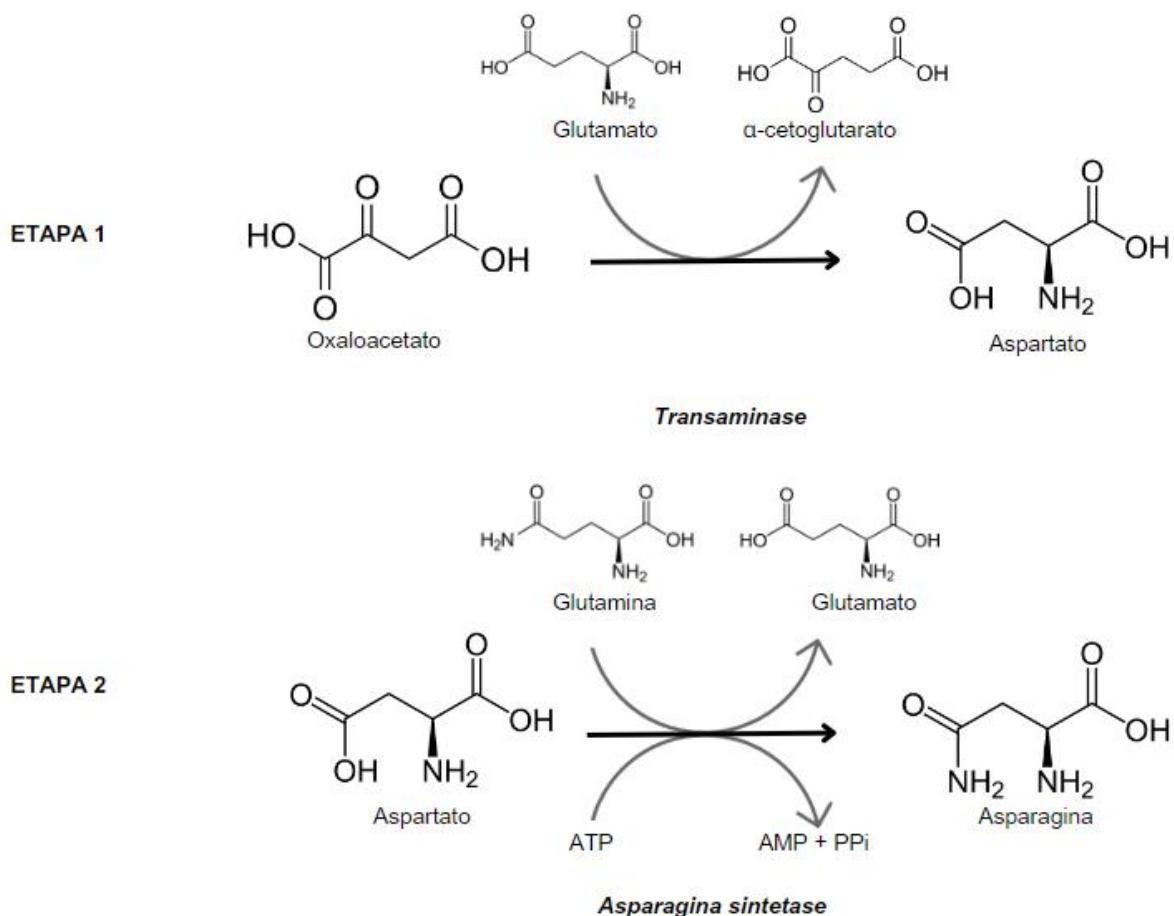


Figura 2 – Rota de síntese metabólica do aminoácido asparagina.

As células tumorais, quando comparadas às células saudáveis, possuem como desvantagem a ausência da enzima asparagina sintetase, o que as impede de concluir a produção do aminoácido L-Asparagina, que é um precursor de importância em seu metabolismo^{8, 14}. Portanto, dependem exclusivamente da L-Asparagina extracelular, proveniente da alimentação e circulante na corrente sanguínea. Como uma estratégia, a administração de ASNase leva à depleção da Asn da corrente sanguínea por hidrolisar a Asn em ácido aspártico (Asp) e amônia (NH_3) (Figura 3) e, com isso, impossibilita que as células tumorais tenham acesso ao aminoácido⁸.

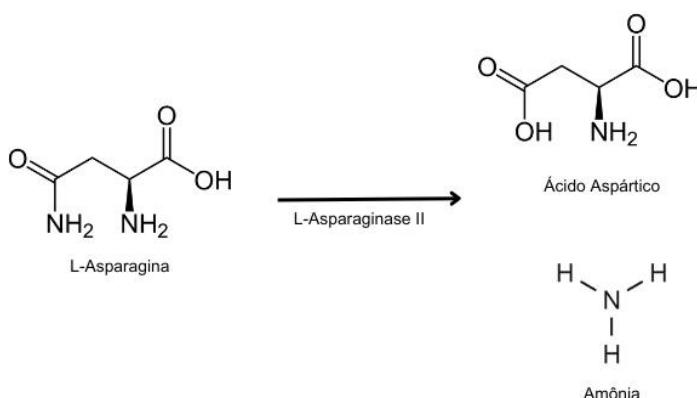


Figura 3 – Reação de hidrólise de asparagina catalisada pela enzima L-asparaginase II.

A indisponibilidade do aminoácido L-asparagina prejudica o metabolismo da célula tumoral, comprometendo suas funções celulares e levando-a a apoptose (Figura 4)⁸. O mecanismo de ação contra o câncer também está ligado à intervenção das vias de sinalização e à supressão da expressão de fatores de transcrição associados ao desenvolvimento de tumores¹¹. O biofármaco pode ser administrado por via intravenosa ou intramuscular, sendo que a farmacocinética varia de acordo com a formulação empregada⁴.

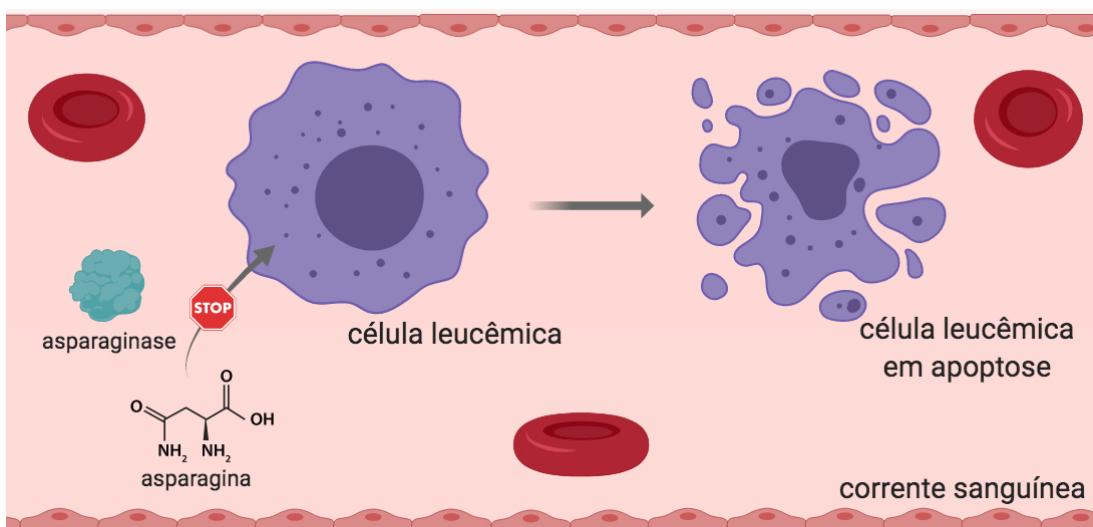


Figura 4 – Mecanismo de ação da L-asparaginase II que atua depletando a asparagina presente na corrente sanguínea, fazendo com que as células leucêmicas sofram apoptose pela carência do aminoácido (BRUMANO *et al.*, 2019).

Os efeitos adversos causados pela administração da ASNase são hipersensibilidade à enzima, erupções cutâneas, reações alérgicas e anafiláticas

leves, pancreatite, febre, insuficiência hepática e alterações de coagulação, sendo a hipersensibilidade a mais significativa^{4, 6}. Ocorre maior resposta imunológica quando a enzima é hidrolisada por proteases e gera resíduos imunogênicos, além de ser inativada. Como consequência, há diminuição do tempo de meia vida do medicamento¹⁵.

Apesar das desvantagens inerentes ao seu uso, a L-Asparaginase permanece como a terapia de escolha para a LLA há várias décadas. Isso sublinha a importância contínua da pesquisa e do aprimoramento das formulações dessa enzima, algumas das quais foram desenvolvidas ao longo do tempo como consequência dos efeitos colaterais, que podem exigir a retirada precoce da enzima em um protocolo de tratamento⁴.

1.3 Disponibilidade no mercado brasileiro

Em termos de mercado brasileiro, a ASNase que é empregada no tratamento de LLA é produzida no exterior e importada para o país¹⁶. Conforme informações da Advocacia-Geral Da União, Consultoria Jurídica do Ministério da Saúde (SIPAR nº 25000.041679/2013)⁵⁵, medidas estratégicas foram adotadas para evitar a escassez de L-Asparaginase no Brasil no ano de 2013. Foi necessária a aquisição direta do produto junto à empresa Bagó do Brasil S.A, mesmo esta não possuindo registro válido na Anvisa, o que foi autorizado mediante uma permissão especial concedida pela agência reguladora. Em 2017, o Brasil enfrentou novamente um desabastecimento e precisou adquirir o medicamento em caráter emergencial e de maneira excepcional. Com esse cenário, o Conselho Nacional de Saúde divulgou que durante o processo foram levantadas suspeitas sobre aquisições irregulares¹⁷.

Ainda nesta mesma nota, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) emitiu a seguinte nota:

Em virtude do risco de desabastecimento da L-Asparaginase no país e para atender a uma demanda emergencial de seis meses, o Ministério da Saúde realizou uma cotação internacional direta, sem participação de organismos internacionais, já que esta condição demandaria um tempo estimado de 180 dias para a aquisição do medicamento, deixando o país desabastecido. Vale ressaltar que não autorizar a importação seria deixar sem tratamento muitas crianças que sofrem com leucemia aguda¹⁷.

Ainda na mesma nota, a Anvisa mencionou que se um produtor ou importador de L-Asparaginase optar por registrar este medicamento no Brasil, será necessário cumprir todos os requisitos de garantia de segurança, qualidade e eficácia, da mesma forma que se aplica a qualquer medicamento ou produto para a saúde¹⁷.

A produção nacional de um biofármaco, como a L-Asparaginase, de maneira otimizada e com insumos nacionais pode resolver questões de dependência do mercado externo, além de garantir os padrões de qualidade exigidos pelas agências regulatórias, sem depender de processos de importação ou chegar a cenários de desabastecimento. Além disso, essa produção nacional seria mais uma vertente a colaborar com esse tipo de bioprodução para que o Brasil seja um dos países a deter esse tipo de biotecnologia.

1.4 Tecnologia e microrganismo para a produção de L-Asparaginase II

A tecnologia empregada para produção da proteína de interesse em microrganismo foi a de DNA recombinante. Esse campo engloba a manipulação do material genético, com o propósito de conferir características melhoradas e desejáveis a organismos vivos ou a seus produtos¹⁸. Esta abordagem implica na introdução de segmentos de DNA provenientes de fontes diversas, contendo sequências genéticas de interesse, mediante o uso de vetores apropriados. O vetor é subsequente à introdução em um organismo hospedeiro, o qual é submetido a um processo de cultivo a fim de promover a amplificação de múltiplas cópias do fragmento de DNA que foi incorporado na cultura¹⁹.

A bactéria *Escherichia coli* foi o primeiro microrganismo reportado como produtor de ASNase com atividade antitumoral, em 1964, e até hoje é o mais utilizado para sua produção por causa de sua capacidade em aumentar a expressão de proteínas recombinantes de maneira rápida e descomplicada^{20, 21}. Por conta disso, este microrganismo foi selecionado como vetor para a expressão da proteína de interesse. Essa bactéria apresenta várias características favoráveis à produção de proteínas recombinantes, tais como a capacidade de crescimento em meios de cultura simples e de baixo custo, a habilidade de proliferar em culturas de alta densidade²², uma fisiologia extensivamente pesquisada²³ e possui um amplo espectro de cepas disponíveis que exibem baixa atividade proteolítica²⁴. No entanto,

também apresenta algumas propriedades que podem não ser benéficas, como a incapacidade de realizar modificações pós-traducionais (por exemplo, glicosilação), a formação de corpos de inclusões insolúveis e a composição de sua membrana com lipopolissacarídeos, o que pode não ser desejável em aplicações terapêuticas devido ao aumento da imunogenicidade em hospedeiros humanos¹¹.

Além de escolher o microrganismo mais adequado, às condições de cultivo em que este será produzido também merece atenção, uma vez que são fatores ligados a um bom rendimento. Portanto, a determinação da composição ótima do meio de cultivo, a temperatura adequada, o equilíbrio de pH, os níveis de oxigênio e outros parâmetros de cultivo desempenham um papel de extrema relevância¹¹. Um dos principais desafios é o escalonamento do processo, uma vez que a produção em alta densidade celular pode criar condições estressantes que afetam o crescimento do microrganismo e a produtividade²⁵.

Portanto, o desenvolvimento de estratégias eficientes de bioprocessamento se torna essencial, uma vez que essas produções podem incorrer em custos elevados que podem não ser economicamente viáveis, considerando o investimento e os custos do processo produtivo^{22, 24}.

1.5 Meio de cultivo e aminoácidos

No contexto da utilização de bactérias na produção de proteínas recombinantes, extensivas pesquisas estão em curso com o objetivo de identificar um meio de cultivo otimizado, enriquecido com nutrientes essenciais. Essa abordagem visa assegurar que o microrganismo empregado esteja em sua condição ótima, resultando em uma produção com níveis mais elevados de produtividade²⁶.

Assim como todo tipo de microrganismo, a *Escherichia coli* possui uma condição ótima de cultivo que deve ser atendida para tornar possível a otimização do processo e aprimorar sua aplicabilidade. Cabe ressaltar que cada cepa e método de cultivo resulta em uma forma de expressão²⁷. Com isso, diversas variáveis devem ser consideradas para alcançar uma forma ideal de bioprocessos envolvendo o microrganismo *E. coli*, sendo elas: concentração de indutor; tipo de processo (batelada, batelada alimentada, contínuo, etc.); temperatura; pH; aeração; composição do meio de cultivo; equipamentos; entre outros^{22, 26, 28, 29, 30}. Por serem

variáveis preditoras de um bom processo produtivo, muitos estudos são realizados com o objetivo de otimizar essas condições para refletir em uma melhor produtividade do processo³¹.

A bactéria *E. coli* é extremamente versátil metabolicamente. Em condições naturais, em que a mesma está inserida, ocorrem diversas mudanças no fluxo de nutrientes e, para garantir a sua sobrevivência, esta bactéria é capaz de se adaptar rapidamente ao ambiente. Em cultivos que possuem uma composição complexa, como extrato de levedura e/ou peptona, torna-se difícil manter um fluxo controlado de nutrientes³², o que pode provocar alterações em seu metabolismo a fim de se adaptar às condições em que está inserida. A descompensação do fluxo metabólico de nutrientes somado ao aumento de densidade celular pode levar o microrganismo a sofrer algum tipo de estresse por carência de nutrientes ou formação de produtos ou subprodutos tóxicos, afetando o equilíbrio das taxas metabólicas. O equilíbrio das taxas metabólicas por sua vez é um fator importante tanto para o crescimento do microrganismo quanto para a expressão robusta e controlada de proteínas e, portanto, deve ser avaliado para garantir o sucesso do bioprocesso em estudo^{33, 34}.

A fim de melhorar cultivos de microrganismos que visam à produção de proteínas recombinantes, estudos com ênfase na adição de aminoácidos no meio de cultivo vêm sendo desenvolvidos objetivando a melhoria do aporte de nutrientes e, consequentemente, favorecendo o equilíbrio das taxas metabólicas do microrganismo. A escolha de aminoácidos para suplementação do meio de cultivo pode ser uma estratégia promissora uma vez que fontes de nitrogênio são essenciais para permitir e melhorar a síntese proteica^{34, 35, 36}.

Na busca por aprimorar o cultivo de células e a produção de proteínas de interesse, o estudo apresentado neste trabalho de TCC se baseia nos resultados promissores obtidos por Kumar e colaboradores (2020)³⁴ ao aplicar um modelo de suplementação de aminoácidos em cultivos conduzidos em biorreator. Este modelo demonstrou melhorias notáveis no crescimento celular e na produção de proteínas. A pesquisa visa estender essa abordagem para a L-Asparaginase II como proteína de interesse, conduzindo cultivos semelhantes em escala de bancada, utilizando um sistema controlado em biorreator. Os aminoácidos escolhidos para a suplementação do meio de cultivo incluem serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina, prolina, cisteína, metionina, leucina e alanina. A investigação tem como objetivo avaliar o impacto desses aminoácidos na produção da proteína L-Asparaginase II e na sua

atividade. Esta pesquisa visando a um meio de cultivo aprimorado apresenta importante potencial para aumento na produtividade, um fator relevante, sobretudo em bioprocessos que, por sua natureza, são intrinsecamente complexos, dispendiosos e requerem a aplicação de tecnologias avançadas. Além de aprimorar a eficiência do processo em si, esse avanço contribui para a expansão do conhecimento, podendo explorar perspectivas relevantes para o fortalecimento da produção nacional.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é realizar uma investigação experimental visando à determinação das condições ótimas de cultivo. Especificamente, buscou-se otimizar a produção de L-Asparaginase II resistente a proteases, utilizando a cepa de *E. coli* BL21(DE3) Δ asna/ Δ asnB contendo o plasmídeo pET 28^{Asn}. O foco principal reside na maximização da produtividade do processo e na melhoria da atividade da enzima a partir da otimização do meio de cultivo por meio de uma estratégia de suplementação com aminoácidos selecionados. Para que este objetivo seja alcançado, as seguintes etapas foram estabelecidas:

- Avaliar a influência da suplementação do meio de cultivo com aminoácidos das perspectivas de:
 - Biomassa;
 - Velocidade específica de crescimento celular;
 - Atividade enzimática;
 - Produção de proteínas totais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Banco de células

A linhagem utilizada neste trabalho foi *E. coli* BL21(DE3) (uma forma mutante da linhagem B, que produz pouco acetato) contendo deleções dos genes endógenos de asparaginase *E. coli* BL21(DE3) Δasna/ΔasnB contendo o plasmídeo pET 28^{Asn} que contém o gene da Asparaginase II com a sequência de exportação da para o espaço periplasmático e com gene de resistência à canamicina como marcador seletivo. A ASNase mutante produzida por essa cepa (obtida por meio da reação em cadeia da polimerase propensa a erro (epPCR) do gene ansB) possui atividade catalítica equivalente à ASNase II selvagem, porém com maior resistência à clivagem pelas proteases plasmáticas, como asparagina endopeptidase (AEP) e *Cathepsin-B-like proteases* (CTSB).

O banco de células foi criado a partir de uma colônia isolada obtida de cultivo em ágar Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, ágar 1,5 % m/v) e suplementado com canamicina (100 µg/mL); incubado à 37 °C por 12 h. Esta colônia foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio (LB) contendo canamicina (100 µg/mL), à 37 °C em shaker a 250 rpm por 12 horas. Após esse período, esta cultura foi centrifugada a 10.000 g, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio LB contendo 8% v/v de glicerol sob condições estéreis e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

3.2 Meio de cultivo definido

O meio de cultivo utilizado foi o definido, seguindo as concentrações mencionadas na Tabela 1. O pH do meio foi ajustado para 6,8 e a solução foi autoclavada a 121°C. A Canamicina foi adicionada na concentração de 50 mg/mL e a tiamina em 4,5 mg/mL e ambas foram esterilizadas por filtro de seringa (0,22µM) e adicionadas posteriormente ao início do cultivo.

Tabela 1 – Componentes do meio de cultivo definido para a produção de L-Asparaginase II utilizando *E. coli* em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.

Componente	Concentração
Glicose	10,0 g/L
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0 g/L
Ácido cítrico	1,7 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 g/L
Canamicina	50 mg/mL
Tiamina	4,5 mg/mL

3.3 Meio de cultivo definido suplementado com aminoácidos

O meio de cultivo utilizado foi o definido, seguindo as concentrações mencionadas na Tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 6,8 e todos os componentes em solução, exceto os aminoácidos, foram autoclavados. A solução contendo os aminoácidos foi esterilizada utilizando um sistema de filtragem a vácuo (Stericup®). A canamicina a 50 mg/mL e a tiamina 4,5 mg/mL foram esterilizadas por filtro de seringa (0,22µM). Ao final das esterilizações, os componentes foram reunidos e homogeneizados.

Tabela 2 – Componentes do meio de cultivo definido suplementado com aminoácidos para a produção de L-Asparaginase II utilizando *E. coli* em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.

Componente	Concentração
Glicose	10,0 g/L
KH ₂ PO ₄	13,3 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0 g/L
Ácido cítrico	1,7 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 g/L
Serina	2,5 mol/L

Componente	Concentração
Ácido Aspártico	2,5 mol/L
Ácido Glutâmico	2,5 mol/L
Treonina	2,5 mol/L
Prolína	2,5 mol/L
Cisteína	2,5 mol/L
Metionina	2,5 mol/L
Leucina	2,5 mol/L
Alanina	2,5 mol/L
Canamicina	50 mg/mL
Tiamina	4,5 mg/mL

3.4 Meio de Alimentação e Indução

A solução de alimentação continha uma concentração de glicose elevada e estava suplementada seguindo as especificações da Tabela 3.

Tabela 3 – Componentes utilizados no meio de alimentação para a produção de L-Asparaginase II utilizando *E. coli* em pH 6,8, a 120 rpm a 37°C.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	20,0
EDTA	0,813
Citrato de Ferro (III)	0,04
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,004
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0235
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0023
H ₃ BO ₃	0,0047

Componente	Concentração (g/L)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,004
Zn(CH ₃ COOH)2.2H ₂ O	0,0016

Para a solução de indução, foram utilizados 50 mL da solução de alimentação com a adição de IPTG estéril por filtro de seringa (0,22µM) para obter a concentração final de 0,0025 mol/L.

3.5 Cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Δasna/Δasnb pET 28^{Asn}

3.5.1 Pré-inóculo

Foram feitos dois pré-inóculos de 50 mL a partir de 100 µL do banco mestre de *E. coli* BL21(DE3) Δasna/Δasnb contendo o plasmídeo pET 28^{Asn}; ambos em Erlenmeyer chanfrados de 250 mL. O pré-inóculo foi incubado em agitador orbital a 37°C com 250 rpm por aproximadamente 14-16h.

Após esse intervalo, a incubação foi interrompida e os Erlenmeyers foram armazenados em geladeira até o momento do cultivo em biorreator. Aproximadamente 30 minutos antes de iniciar o cultivo, os pré-inóculos foram incubados de maneira breve em estufa para equilibrar a temperatura ambiente. A DO_{600nm} dos pré inóculos foi mensurada para calcular o volume necessário para iniciar o cultivo com uma DO_{600nm} igual a 0,1.

3.5.2 Cultivo em biorreator

Os biorreatores representam reatores bioquímicos nos quais uma série de reações químicas é catalisada por "biocatalisadores", os quais podem incluir células vivas (animais, vegetais e microbianas) ou enzimas. Estes reatores podem ser classificados levando em consideração a forma de agitação, a configuração do biocatalisador e seu tipo. A escolha do biorreator a ser utilizado é norteada pelo perfil do produto desejado e pelo tipo de biocatalisador a ser aplicado. Além da

seleção do tipo de biorreator, é fundamental determinar a abordagem para conduzir o cultivo microbiano, que pode ser descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo³⁷.

Para este cultivo, adotou-se o modelo descontínuo alimentado ("fed batch"). Nesse modelo, o inóculo é inicialmente introduzido e, conforme o crescimento é estimulado por uma alimentação controlada, o volume do biorreator aumenta progressivamente. Ao final do cultivo, retira-se o caldo fermentado para a purificação do produto desejado³⁷.

O biorreator de bancada de 5L do fabricante ENGCO® foi utilizado para o cultivo, sendo que este possui sistemas de medição e controle de pH, oxigênio dissolvido, concentração de CO₂, concentração celular, pressão, temperatura do cultivo, vazão de alimentação, agitação, dentre outros.

O equipamento foi montado seguindo as especificações do fabricante e o meio de cultivo já preparado foi inicialmente adicionado à dorna e, posteriormente, foi autoclavado (121°C por 20 minutos). Após retirada do equipamento da autoclave, as soluções que foram esterilizadas por filtração foram adicionadas através da válvula de entrada sólido/líquido na presença de um bico de Bunsen em proximidade para garantir um perímetro estéril durante a adição destes compostos no meio. O volume final do cultivo foi de 3L.

Com todo aparato montado e as soluções apropriadas de cada cultivo já inseridas, o volume do pré-inóculo foi calculado para iniciar com a DO_{600nm} de 0,1.

Os *setpoint* das condições do cultivo estão mostrados na Tabela 4. Os parâmetros de CO₂ pressão não foram empregados devido a ausência de sensores no biorreator.

Tabela 4 – Parâmetros selecionados para realização do cultivo em biorreator.

Parâmetro	SetPoint	Unidade
Agitação	950-999	rpm
Temperatura	37,0	°C
pH	6,8	pH
OD	20,0	%sat
CO ₂	<i>Desativado</i>	

Parâmetro	SetPoint	Unidade
Fluxo	Ativado (Manualmente)	
Sensor de Espuma	Ativado	
Pressão	Desativado	

Após iniciar o cultivo, a cada período de 2 horas era retirada uma amostra para fazer todas as análises de: quantificação de glicose; eletroforese em gel; quantificação da atividade enzimática; e concentração de proteínas totais.

3.6 Análise da Concentração de Glicose

A determinação da concentração de glicose das amostras retiradas durante o cultivo foi feita utilizando o kit GOD-PAP, seguindo as orientações do fabricante. As amostras retiradas foram centrifugadas (10.000 g) em microtubos e, para a reação em microplacas, 3 µL da amostra foram adicionados com 300 µL do reagente. Após homogeneização, foi incubado à 37°C por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro calibrado a 505 nm.

3.7 Rompimento total por *Bugbuster MasterMix®* (Merck-Millipore)

Amostras de 2 mL foram aliquotadas e centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos para obtenção do *pellet*. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta. O *pellet* foi ressuspandido utilizando 2 mL de NaCl 8,5 g/L. Em seguida, foi realizado o cálculo para padronizar a concentração celular a 5 DOs para que o rompimento fosse realizado. As amostras com essa concentração padronizada foram centrifugadas para separação do *pellet* do sobrenadante. Com isso, foram adicionados 500 µL do reagente Bugbuster MasterMix® (Merck-Millipore) em cada tubo e incubados em agitador rotativo por 20 min em velocidade 2.000 g A seguir, os tubos foram novamente centrifugados a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante (fração solúvel) foi armazenado e dessalinizado para seguir com as análises de atividade L-asparaginásica e quantificação da concentração de proteínas totais.

3.8 Dessalinização

A fim de apropiar a enzima em seu tampão adequado, o produto do rompimento foi dessalinizado utilizando uma coluna PD-10, que é empacotada com o meio Sephadex® G-25 e permite a separação rápida de substâncias de alta massa molecular das substâncias de baixa massa molecular. Moléculas pequenas, como sal, etiquetas livres e outras impurezas, são separadas de forma eficaz das substâncias de alta massa molecular de interesse. A técnica cromatográfica utilizada é a filtração em gel, onde as moléculas são separadas com base em diferenças de tamanho³⁸.

A coluna foi equilibrada com 5 volumes de água Milli-Q e 5 volumes do tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8 e NaCl 20 mM. Com a coluna já equilibrada, foram aplicados 2 mL da amostra e 0,5 mL do tampão, tendo como 2,5 o volume final de amostra aplicada. Depois que todo o volume inserido sair, foram aplicados 3,5 mL do tampão e o eluído de interesse foi coletado nessa etapa. O eluído foi utilizado para quantificação da atividade asparaginásica (etapa 3.9) e quantificação de proteínas totais (3.10).

3.9 Quantificação da atividade enzimática da L-Asparaginase II

ASNase cliva a asparagina e o produto da reação é o ácido aspártico (Asp) e amônia (NH_3). Sendo assim, a amônia foi mensurada pelo método de Nessler, que é responsável por quantificar a amônia numa proporção de 1:1. A determinação da atividade enzimática da fração solúvel dessalinizada resultante do rompimento total das células foi realizada com o reagente de Nessler® (Merck-Millipore), em que foi mensurada a concentração de amônia produzida na reação de hidrólise da L-asparagina (Sigma Aldrich®/USA) catalisada pela L-Asparaginase, também seguindo as orientações do fabricante. O meio reacional (etapa 1) foi esquematizado conforme mostrado na Tabela 5. A reação foi incubada na microplaca a 37°C por 30 minutos. Ao concluir o tempo de reação, ela foi interrompida utilizando 16 μL de TCA a 1,5 M.

Tabela 5 – Reagentes da reação enzimática para o protocolo de Nessler.

Reagente	Branco amostra (μL)	Amostra (μL)	Branco padrão (μL)
Água destilada	128	128	128
Tris-HCl	160	160	160
L-asparagina	-	32	32
Solução enzimática (amostra)	16	16	-

Ao concluir a etapa de reação enzimática, a reação colorimétrica foi preparada seguindo as quantidades mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Reação colorimétrica para quantificação da atividade asparaginásica pelo protocolo de Nessler.

Reagente	Amostras e Brancos (μL)
Água destilada	280
Reagente de Nessler	35
Sobrenadante da etapa 1	35
Total (μL)	350

O sobrenadante da etapa 1 foi adicionado no meio de reação colorimétrica e, após aguardar 10 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em um espectrofotômetro a 436 nm. Também foi realizado, sob as mesmas condições, o branco das amostras e um branco padrão. A curva padrão (Figura 5) foi construída utilizando gradiente de sulfato de amônio (0-20 μmol/mL).

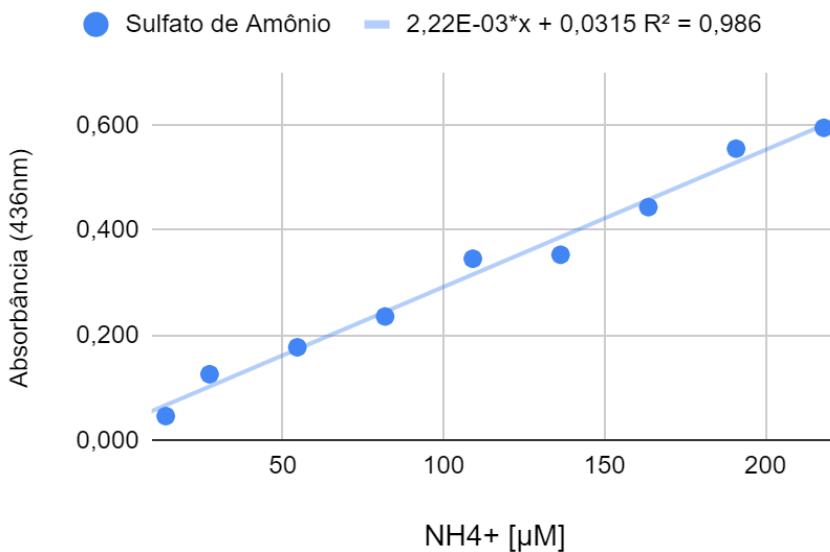


Figura 5 – Curva padrão do teste de Nessler para determinação da atividade enzimática.

A atividade específica (U/mg^{-1}) foi determinada mediante a aplicação da Equação 1, que estabelece a relação entre a quantificação das proteínas totais e a atividade enzimática.

$$\text{Atividade Específica (U/mg)} = \frac{\text{Atividade Enzimática (U/mL)}}{\text{Concentração de Proteínas Totais (mg/mL)}} \quad (1)$$

3.10 Quantificação de proteínas totais pelo método de BCA

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de BCA (Sigma-Aldrich[®]), que se baseia na formação de um complexo entre o cobre contido no reagente e as proteínas presentes na amostra. Em um ambiente alcalino, ocorre a redução do cobre no reagente, possibilitando sua interação com o ácido bicinchonínico (BCA). A reação torna a coloração arroxeada com um espectro visível a 562 nm, e a intensidade dessa coloração é diretamente proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. Obs: as especificações do fabricante instruem a utilizar uma mistura de BCA junto a uma solução 4% de sulfato de cobre (III), em uma proporção de 50:1.

Em seguida, foram adicionados 300 μL dessa mistura a 15 μL da amostra dessalinizada obtida do lisado, em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada a

37°C por 30 minutos e, posteriormente, a absorbância da solução foi medida em um espectrofotômetro ajustado para 562 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando uma curva padrão construída com a utilização de albumina sérica bovina (BSA) como referência (Figura 6).

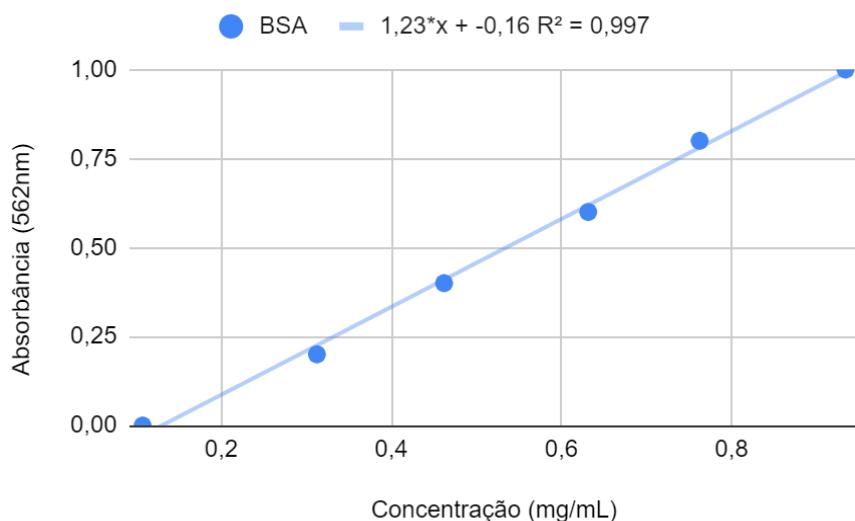


Figura 6 – Curva padrão do método de BCA para quantificação de proteínas.

3.11 Curva de massa seca (biomassa)

A curva de massa seca representa a relação entre a massa seca de um material biológico, como células, e um parâmetro mensurado, como a densidade óptica (DO). Para sua construção, microtubos de centrífuga foram pesados vazios e, após adição do meio de cultivo e centrifugação para remover o sobrenadante, os pellets foram secos em estufa a 37°C. A massa de células nos pontos de coleta do cultivo foi então determinada pelo peso dos tubos com os pellets, estabelecendo a correlação entre a massa seca e a DO para análises posteriores.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é amplamente estudada e reconhecida por ser um dos microrganismos mais utilizados na produção de proteínas recombinantes^{24, 39, 40}.

A maioria das proteínas é expressa, nesta bactéria, intracelularmente e não é secretada para o meio extracelular, o que também complica a purificação do produto, além de aumentar os custos do processo^{22, 24, 41}.

A L-Asparaginase encontrada majoritariamente em bactérias Gram-negativas pode ser classificada em dois principais tipos, sendo L-asparaginase tipo I e tipo II. A do tipo I é expressa em maior quantidade e apresenta atividade enzimática tanto para L-glutamina quanto L-asparagina. Em contraste, a L-Asparaginase tipo II demonstra uma alta atividade específica voltada exclusivamente para a L-asparagina, o que direciona a sua eficiência em depletar o aminoácido quando comparado com a isoforma tipo I^{14, 42}.

Neste estudo, nos concentrarmos na fase inicial do processo de produção, conhecida como fase de *upstream*. O objetivo foi avaliar como a suplementação do meio de cultivo da cepa *E. coli* BL21(DE3) ΔasnA/ΔasnB contendo o plasmídeo pET 28^{Asn}, utilizando aminoácidos, afetaria a produção da enzima L-ASNase. Dois cultivos distintos foram realizados para comparação: no primeiro (cultivo A), o meio de cultivo não foi suplementado com aminoácidos, enquanto no segundo (cultivo B), os seguintes aminoácidos foram adicionados: serina; ácido aspártico; ácido glutâmico; treonina; prolina; cisteína; metionina; leucina e alanina.

Ambos os cultivos foram conduzidos em modo descontínuo alimentado, começando com um volume inicial de 3 litros de meio de cultivo definido (tabela 2). A única distinção entre as duas condições foi a suplementação de aminoácidos no Cultivo B. A densidade óptica inicial (DO_{600nm}) foi ajustada para 0,1, com base em resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior.

Após evoluir pelas fases de crescimento celular (fases *lag* e *log*), o cultivo atingiu a fase estacionária, em que foi realizada a indução com IPTG. O sistema de expressão utilizado foi o *operon*, que possui como mecanismo a regulação da transcrição (reprimindo ou ativando-a), respondendo a alterações nas condições nutricionais e ambientais que o organismo enfrenta¹².

As células de *Escherichia coli* possuem uma predileção pela glicose como fonte de energia. Logo, a produção do RNA mensageiro (mRNA) associado ao operon *lac*, que desempenha um papel crucial no metabolismo da lactose, ocorre em situações em que a glicose é escassa ou presente em baixas concentrações, enquanto a lactose está disponível no ambiente⁴³.

O isopropiltio-β-galactosídeo (IPTG) é um análogo sintético da lactose e por conta disso é utilizado como composto para induzir a expressão. De forma geral, o IPTG se liga ao repressor da transcrição gênica e o inativa, possibilitando que ocorra a ativação do operon *lac* e a indução de transcrição dos genes⁴³.

Sendo assim, quando um pico de oxigênio foi detectado devido ao não consumo de glicose por conta de seu esgotamento, a indução foi iniciada. Desta forma, é possível garantir que não haverá repressão da transcrição pela glicose.

Ao término da indução, a bomba de alimentação foi acionada em uma vazão constante de 0,5 mL/min para que o processo de batelada descontínua recebesse a alimentação até que o cultivo fosse interrompido.

Durante todo o cultivo, incluindo o ponto inicial, amostras foram retiradas a cada 2h para se construir a curva de crescimento do microrganismo, além de utilizar essas amostras para as análises de atividade enzimática e proteínas totais. O cultivo foi encerrado após 8h de pós-indução e todas as amostras coletadas foram centrifugadas para separar a massa celular do sobrenadante.

A análise das concentrações de glicose e da densidade óptica (DO) em um cultivo de células desempenha um papel crucial na compreensão do crescimento e do metabolismo dessas células ao longo do tempo. Por meio da análise desses parâmetros, foi possível obter a representação visual dessas dinâmicas (Figuras 7 e 8) de ambos os cultivos (A e B).

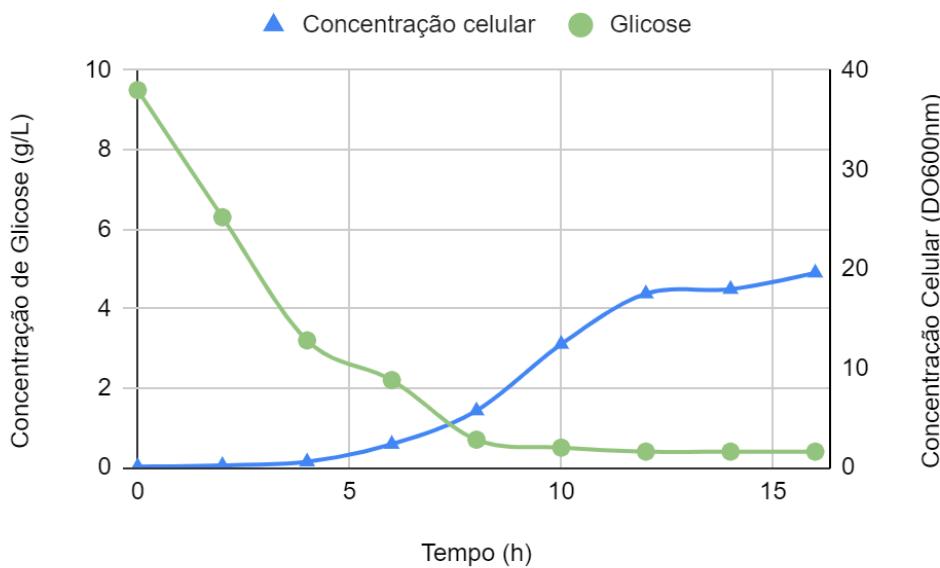


Figura 7 – Crescimento em função do consumo de glicose observado no cultivo A, que estava **sem** suplementação de aminoácidos.

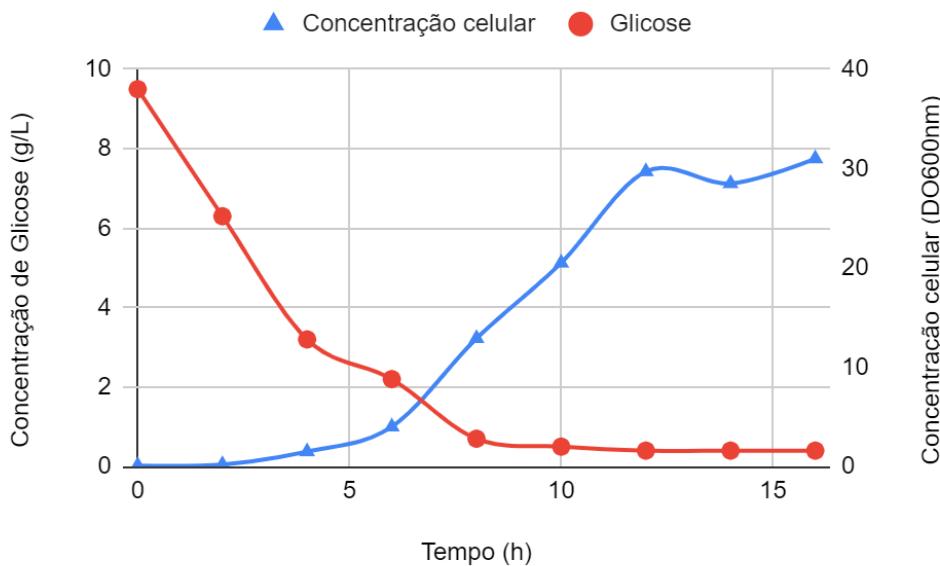


Figura 8 – Crescimento em função do consumo de glicose observado no cultivo B, que estava **com** suplementação de aminoácidos.

Ambos os cultivos foram interrompidos após 16 horas totais de cultivo. Observou-se que o cultivo B, que recebia suplementação com aminoácidos, alcançou uma concentração celular mais elevada, atingindo uma DO_{600nm} de 31. Por outro lado, o cultivo A apresentou uma DO_{600nm} de 19,6.

Além disso, uma curva padrão (Figura 9) foi elaborada para definir a biomassa (g de célula) alcançada ao final dos cultivos.

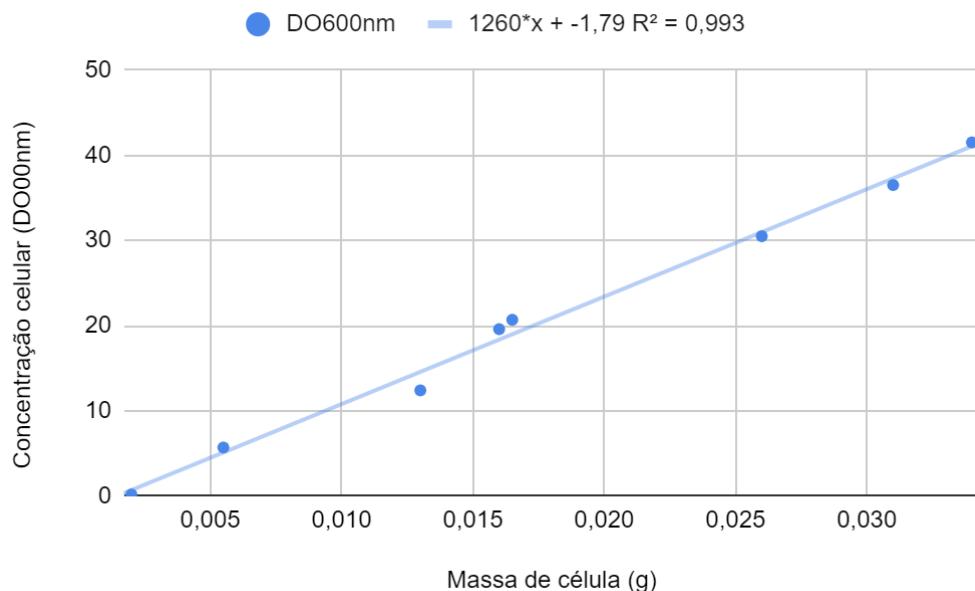


Figura 9 – Concentração celular em função da massa seca (g de célula).

Com base nas densidades ópticas (DOs) obtidas ao final dos cultivos, nota-se que no cultivo A, que foi encerrado às 16h de cultivo, a DO600 foi de 19,6 e a massa seca foi de 0,016 g de célula. No cultivo B, que também foi encerrado às 16h de cultivo, a DO foi de 36,2, e a massa seca atingiu 0,030 g de célula. O cultivo suplementado obteve uma biomassa aproximadamente 85,2% maior do que no cultivo A.

Em relação à curva de crescimento, esta é dividida em fases e evidencia o comportamento de concentração celular do microrganismo frente às condições a qual está inserido⁴⁴.

A fase 1 é denominada fase “lag”, também dita como fase de latência e que se dá imediatamente após a inoculação do microrganismo. É descrito como um período de adaptação onde a célula inoculada sintetiza enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio de cultivo⁴⁴. Na figura 7, a fase lag está compreendida entre o tempo 0h e 4h. Já na figura 8, a fase lag está entre o tempo 0h e 02h.

A fase 2 é uma fase de transição onde a célula passa de seu estado de latência para uma fase de reprodução microbiana, demonstrando crescimento gradual⁴⁴. Na figura 7 a fase de transição está compreendida entre o tempo 04h e 06h. Na figura 8, está compreendida entre o tempo 02h e o tempo 04h.

Na fase 3 (logarítmica ou exponencial), a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) é constante e máxima. Nessa circunstância, essa fase nos permite concluir que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional e deve resultar em reta logarítmica (concentração celular em função do tempo de cultivo)⁴⁴. Na figura 7 a fase exponencial está compreendida entre o tempo 06h e o tempo 12h. Na figura 8, está entre o tempo 04h a 12h. Finalmente, a fase 4 é conhecida como a fase linear de crescimento, por apresentar a velocidade de reprodução constante⁴⁴. A fase linear de crescimento nas figuras 7 e 8 está compreendida entre o tempo 12h a 16h. Com base nos parâmetros evidenciados nas figuras 7 e 8 obtidos a partir dos dados da concentração celular em função do tempo, foi possível calcular a velocidade máxima específica de crescimento. A velocidade máxima específica de crescimento (μ_{\max}) foi determinada a partir da linearização dos pontos referentes à fase exponencial de crescimento celular (Figura 10 e 11). O coeficiente angular dessa linearização representa o valor da velocidade específica máxima.

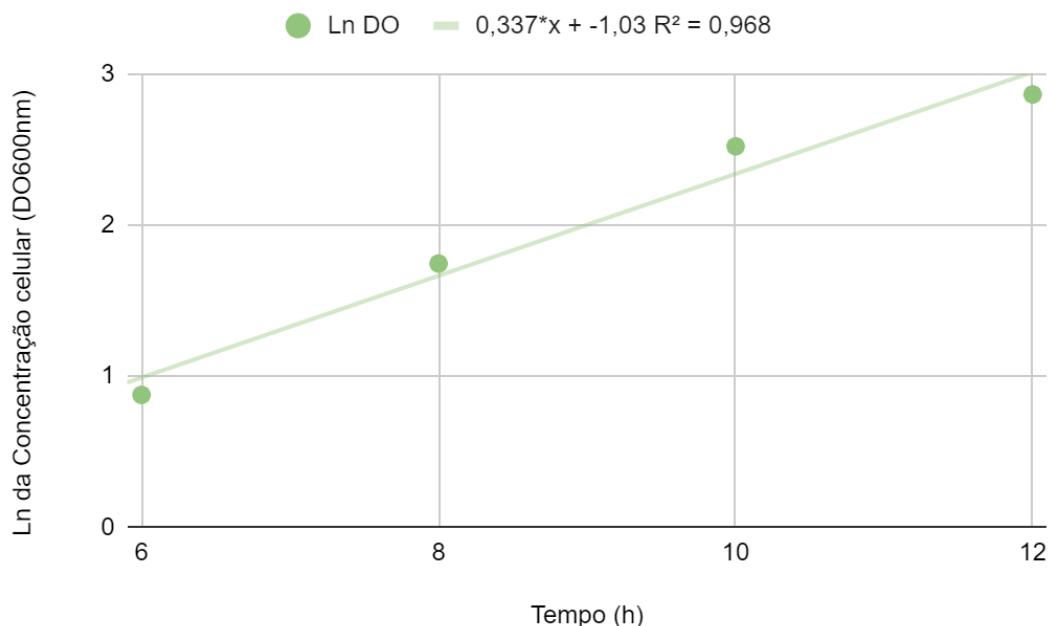


Figura 10 – Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) calculada no período da fase exponencial do cultivo A (sem aminoácidos) considerando o tempo do início da fase Log (6 horas) até o final da fase (12 horas de cultivo).

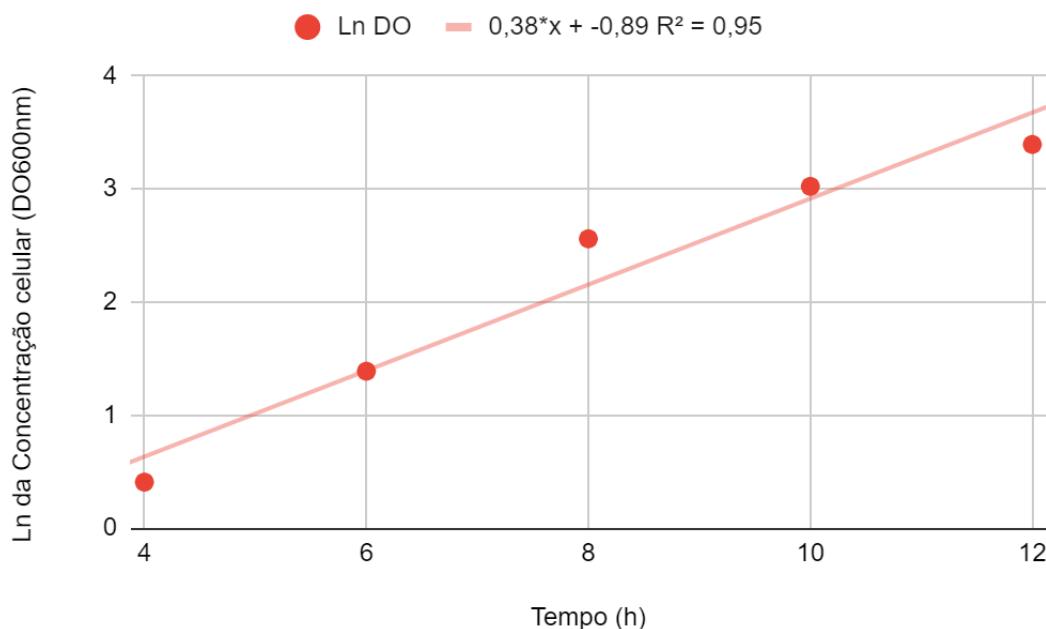


Figura 11 – Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da fase exponencial do cultivo B (com aminoácidos) considerando o período inicial (4 horas) até o final da fase (12 horas de cultivo).

A determinação experimental de $\mu_{\text{máx}}$ é fundamental para compreender a cinética de crescimento de um organismo em diferentes condições e para comparar várias cepas, espécies microbianas ou meios de cultivo em relação às suas capacidades de crescimento⁴⁴.

Ao comparar as $\mu_{\text{máx}}$ de ambos os cultivos (tabela 7), observa-se que o cultivo B, suplementado com aminoácidos, apresentou um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,380 \text{ h}^{-1}$ enquanto que o A demonstrou $0,337 \text{ h}^{-1}$. Portanto, o cultivo B apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento 12,8% superior à população do cultivo A. Esse resultado sugere que o cultivo B, beneficiado pela suplementação de aminoácidos, foi mais eficaz em sua reprodução em um ambiente favorável em comparação ao cultivo A.

Tabela 7 – Velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) dos cultivos A e B.

Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$
A (sem aminoácidos)	$0,337 \text{ h}^{-1}$
B (com aminoácidos)	$0,380 \text{ h}^{-1}$

O observado acima foi descrito em um estudo conduzido por Peebo e seus colaboradores⁵⁷ onde foi investigado o crescimento de *E. coli* em meio contendo glicose e aminoácidos, analisando o proteoma. Os resultados revelaram que o metabolismo e o transporte de aminoácidos representavam um custo metabólico considerável para as células. Intrigantemente, a suplementação com aminoácidos reduziu esse custo, resultando em um aumento da velocidade específica de crescimento (μ).

Em relação aos ensaios bioquímicos, a L-Asparaginase II, por ser uma proteína de origem periplasmática⁸, o rompimento da membrana plasmática é necessário para obter a proteína de interesse. Neste caso, o protocolo de rompimento total foi empregado e o produto obtido desse lisado foi submetido aos testes de proteínas totais (BCA) e atividade asparaginásica (Nessler).

A outra porção da amostra obtida do lisado foi submetida ao protocolo de quantificação de proteínas totais pelo método de BCA. O ensaio de proteínas BCA integra a redução do Cu²⁺ a Cu⁺ por proteínas em meio alcalino, conhecida como reação de biureto, com a detecção colorimétrica de cor púrpura forte, com a maior intensidade de cor sendo observada em 562 nm. Como a formação de Cu⁺ neste teste depende da quantidade de proteína e do tempo em que fica incubada⁴⁵. A curva padrão foi construída utilizando albumina como proteína padronizada.

A partir da obtenção dos valores de atividade enzimática e proteínas totais, foi possível calcular a atividade específica (Tabela 8 e 9) e comparar os resultados obtidos com o meio suplementado e sem suplementação (Tabela 10).

Tabela 8 – Quantificação de proteínas totais e atividade asparaginásica no cultivo A (sem aminoácidos) para cálculo da atividade específica (U/mg).

Cultivo A (sem aminoácidos)				
Tempo pós-indução (h)	NH4 ⁺ [μM]	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
2	33,9	0,2	0,3	0,9
4	123,4	0,3	0,2	1,8
6	55,4	0,4	0,3	1,2
8	18,6	0,1	0,3	0,5

Tabela 9 – Quantificação de proteínas totais e atividade asparaginásica no cultivo B (com aminoácidos) para cálculo da atividade específica (U/mg).

Cultivo B (com aminoácidos)				
Tempo pós-indução (h)	NH4 ⁺ [μM]	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
2	378,2	2,8	0,3	10,7
4	274,2	2,0	0,5	4,4
6	101,9	0,7	0,4	2,0
8	33,6	0,2	0,3	0,8

Observou-se no cultivo A que a maior atividade específica atingida foi de 1,8 U/mg após 4 horas da indução da expressão de proteínas no microrganismo. No cultivo B, a atividade específica máxima foi de 10,7 U/mg após 2 horas de indução. Além disso, o cultivo B demonstrou uma atividade específica superior em todos os pontos, variando de 51,8% a 496,9%, comparado ao cultivo A (tabela 10).

Tabela 10 – Comparaçāo percentual da atividade específica do cultivo B (com aminoácidos) em relação ao cultivo A (sem aminoácidos).

Comparação percentual (%)	
Tempo	Aumento da atividade específica do cultivo B
2h	496,9%
4h	379,3%
6h	71,9%
8h	51,8%

Na análise dos resultados, o ponto que demonstrou uma maior atividade específica do cultivo A foi de 4h pós-indução que atingiu 1,8 U/mg. No cultivo B, o ponto de maior atividade foi de 2h pós-indução que obteve 10,7 U/mg de atividade.

Comparando os pontos com maiores resultados obtidos entre os dois cultivos, o cultivo B apresentou uma atividade 5,9x maior do que o cultivo A.

Para compreender a diferença entre os resultados superiores observados no cultivo suplementado, corrobora-se a hipótese da influência positiva da utilização da suplementação com aminoácidos.

A expressão de proteínas recombinantes impõe uma carga metabólica do microrganismo hospedeiro devido à drenagem de precursores biológicos, ao aumento do gasto energético e às consequentes repercussões fisiológicas. Este fenômeno resulta em respostas de estresse, manifestadas pela redução no crescimento da biomassa e na produção das proteínas recombinantes^{46, 47}. Um exemplo de carga metabólica recebe o termo de *metabolic burden*⁴⁸.

A carga metabólica, também conhecida como "metabolic burden", representa a fração dos recursos de uma célula hospedeira, como moléculas de energia (como ATP) e blocos de construção de carbono (como Acetil-CoA), que são utilizados para construir e operar vias metabólicas modificadas. A alocação desses recursos celulares, normalmente destinados à manutenção e divisão celular, para a superexpressão de vias, manutenção de plasmídeos e síntese de produtos (como proteínas), pode perturbar os processos celulares normais⁴⁸, desencadeando respostas de estresse. Vários fatores como a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, podem afetar a carga metabólica. Em situações estressantes, essas alterações são acompanhadas por respostas metabólicas, como a diminuição na velocidade de crescimento celular, aumento da lise, ativação de proteases e expressão de genes de estresse, que podem impactar negativamente o rendimento em bioprocessos⁴⁷.

No contexto da produção de proteínas recombinantes, o desequilíbrio no metabolismo do hospedeiro, combinado com a biossíntese dessas proteínas, prejudica a eficiência desses bioprocessos. Associado ao "metabolic burden", há outro fenômeno metabólico conhecido como "fome de aminoácidos", caracterizado pelo consumo abrupto desses aminoácidos pelo microrganismo, resultando na diminuição dos níveis disponíveis desses precursores, interrompendo o crescimento celular e a síntese proteica durante a tradução de proteínas por falta deles³⁴. Além disso, a escassez de aminoácidos leva o microrganismo a realizar a biossíntese desses, resultando em gasto energético e desvios de intermediários de diferentes pontos do metabolismo central, influenciando a carga metabólica e prejudicando a

produção de proteínas recombinantes superexpressas, já que esse processo envolve um alto consumo energético⁴⁷. O consumo destes aminoácidos tem sido associado à produção de energia ou síntese de outros aminoácidos e demonstra os desafios de decifrar a utilização de aminoácidos em misturas complexas⁵⁶.

Assim, a depleção de precursores biológicos, o gasto energético e as consequências fisiológicas da produção de proteínas recombinantes causam sobrecarga ao metabolismo da bactéria. Isso desencadeia uma série de respostas de estresse, reduzindo o crescimento da biomassa e a produção da proteína recombinante^{47, 49}.

Nesse sentido, uma das alternativas para evitar esses estresses causados pela superexpressão de proteínas é ajustar a composição do meio de cultivo, suplementando-o com aminoácidos de acordo com as necessidades do metabolismo em questão, visando reduzir as respostas de estresse, como o *metabolic burden* e a "fome de aminoácidos". Dessa forma, a produtividade do bioprocesso será ampliada, favorecendo seu sucesso e viabilidade econômica^{29, 30, 50}. Consideravelmente, os estudos que visam a utilização de aminoácidos no meio de cultivo têm como objetivo geral melhorar a produtividade do processo, podendo ser através da influência na produção de biomassa ou pela intervenção na produção de proteínas^{32, 34, 36}. A disponibilidade de nutrientes combinados com o fornecimento de oxigênio influencia diretamente o crescimento celular e a expressão de proteínas. O equilíbrio e fornecimento destes parâmetros precisa ser bem controlado para seguir um caminho com eficiência energética e, consequentemente, obter um crescimento celular satisfatório e uma robusta expressão proteica^{33, 51}.

Embora a amônia seja a principal fonte de nitrogênio preferida por *E. coli*⁵², os aminoácidos também desempenham um papel significativo em bioprocessos como fonte de nitrogênio⁵¹. Isso, por sua vez, contribui para mitigar condições metabólicas estressantes resultantes da escassez de nitrogênio, uma vez que este composto é essencial para a produção de proteínas em microrganismos^{34, 35, 36}.

Para elucidar as respostas de estresse desencadeadas pela escassez de suprimentos, o estudo de Hauryliuk e sua equipe⁵⁴ propõe que, em situações estressantes, como aumento de temperatura ou escassez de suprimentos, ocorre um aumento de um mediador de resposta estrita, desencadeando mudanças fisiológicas na bactéria. Os pesquisadores também demonstraram que durante a privação de aminoácidos, esse mediador inibe a transcrição de RNA e ativa a

transcrição de promotores da via biossintética de aminoácidos, direcionando a produção para rotas essenciais para o microrganismo.

De acordo com Kumar e colaboradores³⁴, a produção de proteínas recombinantes (PPR) por *E. coli* impõe uma carga metabólica prejudicial à produtividade. Uma das razões para isso é que o microrganismo entra em um estado conhecido como "fome de aminoácidos", resultando na interrupção do crescimento celular e da síntese proteica durante a tradução das proteínas. A ausência de aminoácidos desencadeia um estresse na bactéria, também denominado resposta estrita, desencadeando uma série de eventos que aumentam o mediador de resposta estrita, inibem a transcrição de RNAs estáveis e direcionam a bactéria para a biossíntese de aminoácidos, compensando a situação de "fome de aminoácidos" e permitindo a adaptação do microrganismo. De forma interessante, a adição externa de aminoácidos resultou em um aumento de 40% na produção da proteína pramlintida em biorreator, destacando que o acréscimo de aminoácidos no meio de cultivo reduziu o estresse celular e aprimorou a produtividade do processo.

Conforme Maser e colegas³⁶ relataram, ao suplementar o meio de cultivo de *E. coli* com aminoácidos, 72% da fonte de carbono para o crescimento da biomassa derivou dos aminoácidos e 28% da glicose. Eles demonstraram que evitar a depleção de aminoácidos reduz as quedas perceptíveis no crescimento celular, favorecendo o crescimento exponencial contínuo e diminuindo os custos celulares ao fornecer energia ao bioprocesso. Os pesquisadores também destacaram a serina como o aminoácido mais consumido, representando 41% do consumo total de aminoácidos. No entanto, salientaram que, quando usada isoladamente, a serina possui efeitos tóxicos, enfatizando a necessidade de suplementação combinada de vários aminoácidos.

Esses estudos reforçam a hipótese de que a produção de proteínas recombinantes em processos fermentativos está associada a uma carga metabólica elevada, o que pode impactar negativamente o bioprocesso, diminuindo a velocidade de crescimento celular. Uma abordagem que pode ser explorada para mitigar as cargas metabólicas resultantes da expressão dessas proteínas é adaptar a composição do meio de cultura. Nesse contexto, a suplementação com aminoácidos emerge como uma alternativa viável, alinhada às exigências metabólicas. Essa suplementação visa mitigar as respostas de estresse, proporcionando um ambiente mais propício para o crescimento e a produção de

proteínas no âmbito do bioprocesso. Assim, a suplementação com aminoácidos se mostra uma estratégia promissora para otimizar a produtividade em bioprocessos.

Apesar dos resultados demonstrados e das pesquisas na literatura, não foram encontradas descrições ou sugestões sobre como a bactéria *E. coli* metaboliza ou utiliza esses aminoácidos suplementares adicionados ao meio de cultura. Até o momento, apenas os efeitos finais desses aminoácidos no cultivo foram abordados, sem uma explicação detalhada sobre seu processamento e integração no metabolismo da bactéria.

5 CONCLUSÃO

A adição exógena de aminoácidos ao meio de cultura de *E. coli* se destaca como uma estratégia benéfica para a otimização do cultivo, visando tanto ao crescimento celular quanto à produção da proteína de interesse, a L-Asparaginase II.

O cultivo suplementado com aminoácidos apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento 12,8% superior à população do cultivo A e atividade específica 5,9x mais elevada no ponto em que se obteve a maior atividade, sendo no tempo de 2h pós-indução, atingindo 10,7 U/mg. Ainda no cultivo que levou a suplementação, este apresentou uma biomassa 85,2% maior em seu ponto final, comparado ao cultivo não suplementado, ambos com duração de 16 horas.

Dessa forma, ao comparar os cultivos realizados sob condições idênticas (temperatura, tempo, agitação, pH etc.) e diferindo apenas na suplementação com aminoácidos específicos - serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina, prolina, cisteína, metionina, leucina e alanina - observou-se que o cultivo suplementado apresentou uma atividade máxima específica de crescimento, atividade enzimática específica e produção de biomassa superiores em relação ao cultivo não suplementado.

A suplementação do meio de cultivo com aminoácidos oferece uma oportunidade para implementar estratégias que aprimoram o crescimento celular e/ou a síntese de produtos específicos pela *E. coli*. Esta abordagem desempenha um papel crucial na busca pela consecução dos objetivos almejados nos bioprocessos, contribuindo para a eficiência e eficácia na produção de biomoléculas de interesse.

O incremento na velocidade específica máxima de crescimento e o aprimoramento da atividade específica da L-asparaginase II evidenciam um impulso para uma produção mais ágil, otimização eficaz dos recursos e melhoria da eficiência nos processos industriais.

REFERÊNCIAS

1. MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, vol. 505, n. 7483, p. 327–334, jan. 2014.
2. LUCAS, D. Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. **Current opinion in hematology**, vol. 28, n. 1, p. 36–42, jan. 2021.
3. CAVALCANTE, M. S.; SANTANA ROSA, I. S.; TORRES, F. Leucemia linfoide aguda e seus principais conceitos. Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, [S. I.], v. 8, n. 2, p. 151–164, 2017. Disponível em: <https://revista.faema.edu.br/index.php/Revista-FAEMA/article/view/578>. Acesso em: 6 set. 2023.
4. TOSTA-PÉREZ, M.; HERRERA-BELÉN, L.; LETELIER, P. et al. L-Asparaginase as the gold standard in the treatment of acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review. **Medical oncology** (Northwood, London, England), vol. 40, n. 5, p. 150, abr. 2023.
5. MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet** (London, England), vol. 395, n. 10230, p. 1146–1162.
6. ONCIU M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, vol. 23, n. 4, p. 655–674, ago. 2009.
7. MATLOUB, Y.; STORK, L.; ASSELIN, B. et al. Outcome of Children with Standard-Risk T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia--Comparison among Different Treatment Strategies. **Pediatric blood & cancer**, vol. 63, n. 2, p. 255–261, out. 2016.
8. CACHUMBA, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, dez. 2016.
9. ARAUJO, T.S.; ALMEIDA, M.S.; LIMA, L.M.T.R. **RCSB PDB - 3ECA: CRYSTAL STRUCTURE OF *ESCHERICHIA COLI* L-ASPARAGINASE, AN ENZYME USED IN CANCER THERAPY (ELSPAR)**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/6UOG?assembly_id=2>. Acesso em: 06 out. 2023.
10. BIELSER, J. M.; WOLF, M.; SOUQUET, J. et al. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing - A critical review. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1328–1340, jul. 2018.
11. BRUMANO, L. P.; DA SILVA, F. V. S.; COSTA-SILVA, T. A. et al. Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, vol. 6, n. 212, 10 jan. 2019.

12. BROWNING, D. F.; GODFREY, R. E.; RICHARDS, K. L. et al. Exploitation of the *Escherichia coli lac* operon promoter for controlled recombinant protein production. **Biochemical Society transactions**, vol. 47, n. 2, p. 755–763, abr. 2019.
13. TABE, Y.; LORENZI, P. L.; KONOPLIEVA, M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. **Blood**, vol. 134, n. 13, p. 1014–1023, 26 set. 2019.
14. BATOOL, T.; MAKKY, E. A.; JALAL, M. et al. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, mar. 2016.
15. OFFMAN, M. N.; KROL, M.; PATEL, N. et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood**, vol. 117, n. 5, p. 1614–1621, fev. 2011.
16. BRASIL. Ministério da Saúde. **Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde**. ENCAMINHAMENTOS DA 6^a REUNIÃO ORDINÁRIA DA COMISSÃO INTERGESTORES TRIPARTITE. 22 jun. 2017.
17. ANVISA - Importação de Medicamentos. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/nota-autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase>>. Acesso em: 27 de setembro de 2023.
18. PHAM, P. V. Medical Biotechnology: Techniques and Applications - Chapter 19: **Oomics Technologies and Bio-Engineering**, Academic Press. Vienta, 2018. p. 449-469.
19. KHAN, S.; ULLAH, M. W.; SIDDIQUE, R. et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **International journal of genomics**, vol. 2016, n. 2405954, dez. 2016.
20. MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 105, p. 450–452, mai. 1964.
21. EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapyapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62–71, jun. 2016.
22. ZHOU, Y.; LU, Z.; WANG, X. et al. Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, vol. 102, n. 4, p. 1545–1556, fev. 2018.
23. TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, vol. 7, n. 420, dez. 2019.

24. FERREIRA, R. D. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β-glucosidase. **Biotechnology for biofuels**, vol. 11, n. 81, mar. 2018.
25. NEGRETE, A.; SHILOACH, J. Improving *E. coli* growth performance by manipulating small RNA expression. **Microbial cell factories**, vol. 16, n. 1, p. 198, 14 nov. 2017.
26. JOZALA, A. F.; GERALDES, D. C.; TUNDISI, L. L. et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian journal of microbiology**: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], vol. 47, n. 1, p. 51–63, out. 2016.
27. NI, Y.; CHEN, R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. **Biotechnology letters**, vol. 31, n. 11, p. 1661–1670, 31 nov. 2009.
28. GAGLIONE, R.; PANE, K.; DELL'OLMO, E. et al. Cost-effective production of recombinant peptides in *Escherichia coli*. **New biotechnology**, vol. 51, p. 39–48, jul. 2019.
29. ELBING, K. L.; BRENT, R. Recipes and Tools for Culture of *Escherichia coli*. **Current protocols in molecular biology**, vol. 125, n. 1, e. 83, jan. 2019.
30. KRAM, K. E.; FINKEL, S. E. Rich Medium Composition Affects *Escherichia coli* Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture. **Applied and environmental microbiology**, vol. 81, n. 13, p. 4442–4450, jul. 2015.
31. BIVONA, L.; ZOU, Z.; STUTZMAN, N. et al. Influence of the second amino acid on recombinant protein expression. **Protein expression and purification**, v. 74, n. 2, p. 248–256, jun. 2010.
32. ZAMPIERI, M.; HÖRL, M.; HOTZ, F. et al. Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. **Nature communications**, vol. 10, n. 1, p. 3354, jul. 2019.
33. KRAUSE, M.; NEUBAUER, A.; NEUBAUER P. The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, vol. 15, n. 1, p. 110, 17 jun. 2016.
34. KUMAR, J.; CHAUHAN, A. S.; SHAH, R. L. et al. Amino acid supplementation for enhancing recombinant protein production in *E. coli*. **Biotechnology and bioengineering**, vol. 117 n. 8, p. 2420–2433, ago. 2020.
35. BONNET, M.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D. et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New microbes and new infections**, v. 34, n.100622, 30 nov. 2019.

36. MASER, A.; PEEBO, K.; VILU, R. *et al.* Amino acids are key substrates to *Escherichia coli* BW25113 for achieving high specific growth rate. **Research in microbiology**, vol. 171, n. 5-6, p. 185–193, jul./set. 2020.
37. SCHMIDELL, W.; FACCIOOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blücher, São Paulo, p. 179-192, 2001.
38. GELLER, C.; FONTANAY, S.; FINANCE, C. *et al.* A new Sephadex-based method for removing microbicidal and cytotoxic residues when testing antiseptics against viruses: Experiments with a human coronavirus as a model. **Journal of virological methods**, vol. 159, n. 2, p. 217–226, ago. 2009.
39. NIEß, A.; SIEMANN-HERZBERG, M.; TAKORS, R. Protein production in *Escherichia coli* is guided by the trade-off between intracellular substrate availability and energy cost. **Microbial cell factories**, vol. 18, n. 8, 17 jan. 2019.
40. SELVARASU, S.; OW, D. S.; LEE, S. Y. *et al.* Characterizing *Escherichia coli* DH5alpha growth and metabolism in a complex medium using genome-scale flux analysis. **Biotechnology and bioengineering**, vol. 102, n. 3, p. 923–934, fev. 2009.
41. CHEN R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology advances**, vol. 30, n. 5, p. 1102–1107, set./out. 2012.
42. SANCHES, M.; KRAUCHENCO, S.; POLIKARPOV, I. Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. **Current Chemical Biology**, vol. 1, n. 1, p. 75-86, jan. 2007.
43. FRANCO, V. C. **Expressão de fosfatase alcalina em *Escherichia coli* sob o controle do sistema de regulação do operon lac**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5332>.
44. HISS, H. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blücher, São Paulo, 2001. p. 93-121.
45. WALKER JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), vol. 32, p. 5–8, 1994.
46. BONOMO, J.; GILL, R. T. Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response. **Biotechnology and bioengineering**, vol. 90, n. 1, p. 116–126, abr. 2005.
47. ZHANG, Z. X.; NONG, F. T.; WANG, Y. Z. *et al.* Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. **Microbial cell factories**, vol. 21, n. 1, p. 191, set. 2022.

48. WU, G.; YAN, Q.; JONES, J. A. *et al.* Metabolic Burden: Cornerstones in Synthetic Biology and Metabolic Engineering Applications. **Trends in biotechnology**, vol. 34, n. 8, p. 652–664, ago. 2016.
49. MAHISHI, L.H.; RAWAL, S. K. Effect of amino acid supplementation on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by recombinant phaSa+ *Escherichia coli*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 18, p. 805-810, jul. 2002.
50. KISHISHITA, S.; KATAYAMA, S.; KODAIRA, K. *et al.* Optimization of chemically defined feed media for monoclonal antibody production in Chinese hamster ovary cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, vol. 120, n. 1, p. 78–84, jul. 2015.
51. KALETÀ, C.; SCHÄUBLE, S.; RINAS, U. *et al.* Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*. **Biotechnology journal**, vol. 8, n. 9, p. 1105–1114, set. 2013.
52. BIZIOR, A.; WILLIAMSON, G.; HARRIS, T. *et al.* Prokaryotic ammonium transporters: what has three decades of research revealed?. **Microbiology** (Reading, England), vol. 169, n. 7, p. 001360, jul. 2023.
53. YANG, Y.; POLLARD A. M.; HÖFLER, C. *et al.* Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. **Molecular microbiology**, vol. 96, n. 6, p. 1272–1282, jun. 2015.
54. HAURYLIUK, V.; ATKINSON, G. C.; MURAKAMI, K. S. *et al.* Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. **Nature reviews. Microbiology**, vol. 13, n. 5, p. 298–309, mai. 2015.
55. ANVISA. Nota de Autorização para Importação da L-Asparaginase em 2017 (Nota Técnica nº 020/2017/DAF/SCTIE/MS). Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/Nota-autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase>>. Acesso em: 09 de setembro de 2023
56. MASER, A.; PEEBO, K.; NAHKU R. Avoiding amino acid depletion in a complex medium results in improved *Escherichia coli* BW25113 growth. **Microbiology** (Reading, England), vol. 165, n. 1, p. 37–46, jan. 2019.
57. PEEBO, K.; VALGEPEA, K.; MASER, A. *et al.* Proteome reallocation in *Escherichia coli* with increasing specific growth rate. **Molecular BioSystems**, vol. 11, n. 4, p. 1184-1193.

Assinatura do(a) Aluno(a)

Assinatura do(a) Professor(a)