UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MATHEUS FRANCISCO DE CARVALHO ROSA SOLER

Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras

Lorena - SP
2015

MATHEUS FRANCISCO DE CARVALHO ROSA SOLER

Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia
Industrial na área de conversão de biomassa

Orientador: Dr. Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soler, Matheus Francisco de Carvalho Rosa
Aspectos da produção de L-asparaginase por
leveduras / Matheus Francisco de Carvalho Rosa
Soler; orientador Silvio Silvério da Silva - ed.
reimp., corr. - Lorena, 2015.
119 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Seleção. 2. Leveduras. 3. L-asparaginase. 4.
Issatchenkia orientalis. 5. Rhodotorula glutinis. I.
Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

Aos meus pais, Giselle e Eduardo, e à minha irmã, Laura.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo agradecer ao prof. Dr. Silvio Silvério da Silva pela ideia inicial do trabalho e pelo apoio dado durante todo o desenvolvimento do mesmo. Agradeço a contínua orientação e amizade que recebi durante essa trajetória, assim como tudo que aprendi como seu aluno.

Ao prof. Dr. Adalberto Pessoa-Jr e todos os colegas envolvidos no projeto temático FAPESP-Asparaginase, pela ajuda fornecida nos momentos em que nada parecia dar certo.

Aos colegas de laboratório, com quem dividi o espaço de trabalho e experiências no decorrer do tempo que desenvolvi o trabalho experimental. Em especial, devo agradecer os alunos do grupo da L-asparaginase, Vinícius, Fulvia e Javier, por toda a ajuda recebida. Com certeza esse trabalho não teria sido possível sem vocês ao meu lado.

Aos meus amigos, Haron, Victor, Paulo e Matheus Yudi e à minha namorada Letícia. O apoio emocional que recebi de vocês foi fundamental para atingir meus objetivos. Espero ter vocês ao meu lado para sempre.

Agradeço, também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena pela estrutura fornecida para realização do trabalho.

Por fim, agradeço à minha família, principalmente minha mãe, Giselle, meu pai, Eduardo e minha irmã, Laura. Foi graças a vocês que alcancei meus objetivos. Obrigado por tudo.

Resumo

SOLER, M. F. C. R. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras**. 2015. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

A enzima L-asparaginase é responsável por converter o aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio. Esta enzima possui importantes aplicações, principalmente na indústria farmacêutica, onde é empregada como um fármaco antileucêmico e na indústria de alimentos, como uma forma de mitigar a formação de acrilamida, um composto altamente tóxico, formado em alguns alimentos processados a altas temperaturas. Leveduras destacam-se como micro-organismos importantes para a produção da L-asparaginase, uma vez que possivelmente produzem enzimas com menores efeitos colaterais para humanos e são, em geral, organismos GRAS, sem restrições de aplicação na indústria de alimentos. O presente trabalho avaliou metodologias de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase, selecionando aquelas capazes de produzir destacadas quantidades desta enzima a partir de um banco contendo 40 cepas e verificando aspectos da sua produção. Foram empregadas metodologias de seleção de leveduras em meio sólido e em meio líquido, avaliando-se a aplicabilidade da quantificação da atividade enzimática pelo método de Nessler e pelo método da hidroxilamina. A produção de L-asparaginase foi posteriormente confirmada por cromatografia em camada delgada. As leveduras selecionadas foram avaliadas quanto à influência dos aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina como indutores na produção de L-asparaginase e quanto à cinética de produção enzimática. De acordo com os resultados, nenhuma das leveduras foi capaz de produzir L-asparaginase extracelular. Entretanto, duas novas leveduras, até então não citadas na literatura pertinente como produtoras de L-asparaginase, foram capazes de produzir L-asparaginase periplasmática: *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*. Verificou-se, também, que a metodologia de *screening* em meio sólido não foi correlacionável com a produção de L-asparaginase em meio líquido por leveduras. Foi necessária a adição de moléculas indutoras ao meio de cultivo, como os aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina, para que houvesse produção de L-asparaginase pelas leveduras *I. orientalis* e *R. glutinis*. Verificou-se a maior produção de L-asparaginase periplasmática em meio suplementado com L-asparagina e nitrato de amônio para a levedura *I. orientalis* ($20,38 \pm 3,55 \text{ U.g}^{-1}$) e em meio suplementado com L-prolina para a levedura *R. glutinis* ($57,05 \pm 0,57 \text{ U.g}^{-1}$). Durante os ensaios de cinética, verificou-se que a produção da enzima ocorreu principalmente durante a fase logarítmica do crescimento microbiano, observando-se também estabilidade da atividade enzimática durante as 144 horas do cultivo. Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram verificar a viabilidade das metodologias de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase bem como selecionar, com sucesso, duas novas leveduras capazes de produzir a enzima L-asparaginase periplasmática, *I. orientalis* e *R. glutinis*, determinando aspectos importantes da sua produção em meio líquido.

Palavras-chave: Seleção. Leveduras. L-asparaginase. *Issatchenkia orientalis*. *Rhodotorula glutinis*.

Abstract

SOLER, M. F. C. R. **Aspects in the production of L-asparaginase from yeasts**. 2015. 119p. Dissertação (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015

L-asparaginase is the enzyme responsible for converting the amino acid L-asparagine into L-aspartic acid and ammonium. This enzyme has important applications, mainly in the pharmaceutical industry, where it is used as an antileukemic drug, and in the food industry, as a treatment for mitigating the formation of acrylamide, a highly toxic compound produced in some foods exposed to high temperatures. Yeasts are highlighted as important microorganisms for the production of L-asparaginase since they are capable of producing enzymes with fewer side effects for humans and are, in general, GRAS organisms, being applicable in the food industry without restrictions. This study evaluated screening methods for selecting new yeasts capable of producing L-asparaginase, selecting those capable of producing high amounts of this enzyme from a culture collection containing 40 strains, also verifying aspects of enzyme production. Methods for screening L-asparaginase producing organisms in solid and liquid medium were tested, evaluating the applicability of Nessler and hydroxylamine methods as means for enzyme activity quantification. The production of L-asparaginase was later confirmed through thin layer chromatography. The selected yeasts were evaluated to confirm the influence of the amino acids L-asparagine, L-proline and L-glutamine as inducers in the production of L-asparaginase, and the kinetics of L-asparaginase production were also evaluated. According to the results, none of the assessed yeasts were able to produce extracellular L-asparaginase. However, two novel yeasts, so far not cited in the pertinent literature as L-asparaginase producers, were able to produce periplasmic L-asparaginase: *Issatchenkia orientalis* and *Rhodotorula glutinis*. Tests also verified that the screening methods in solid medium did not correlate with the production of L-asparaginase in liquid medium by yeasts. It was necessary to add inducing molecules, such as the amino acids L-asparagine, L-proline and L-glutamine, to stimulate L-asparaginase production by the yeasts *I. orientalis* and *R. glutinis*. The highest production of periplasmic L-asparaginase was obtained in liquid medium supplemented with L-asparagine and ammonium nitrate for the yeast *I. orientalis* ($20,38 \pm 3,55 \text{ U.g}^{-1}$) and in medium supplemented with L-proline for the yeast *R. glutinis* ($57,05 \pm 0,57 \text{ U.g}^{-1}$). The production kinetics assay verified that the production of the enzyme took place mainly during the log phase of microbial growth, being stable after 144 hours of cultivation. The results presented in this study were able to confirm the viability of the methods for the screening of novel L-asparaginase producing yeasts as well as to select two novel yeasts able to produce this enzyme, *I. orientalis* and *R. glutinis*, determining some important aspects in L-asparaginase production in liquid medium.

Keywords: Screening. Yeasts. L-asparaginase. *Issatchenkia orientalis*. *Rhodotorula glutinis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Enzimas: considerações gerais.....	17
2.1.1 Uso terapêutico de enzimas.....	20
2.1.2 Uso de enzimas no processamento de alimentos.....	22
2.2 Características da enzima L-asparaginase.....	24
2.2.1 Técnicas de quantificação da enzima L-asparaginase.....	26
2.3 Aplicação terapêutica da L-asparaginase.....	27
2.3.1 Características bioquímicas e estruturais da L-asparaginase de <i>E. coli</i>	31
2.3.2 Características bioquímicas e estruturais da L-asparaginase de <i>E. chrysanthemi</i>	33
2.3.3 PEG-asparaginase.....	34
2.4 Aplicação da L-asparaginase na indústria de alimentos.....	35
2.4.1 Formação de acrilamida em alimentos processados e sua toxicidade.....	35
2.4.2 Uso da L-asparaginase para redução de acrilamida em alimentos.....	38
2.5 Considerações gerais sobre a produção microbiana de L-asparaginase.....	40
2.5.1 Aspectos da produção de L-asparaginase por bactérias.....	41
2.5.2 Produção de L-asparaginase por fungos.....	46
2.5.2.1 Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos.....	47
2.5.2.2 Produção de L-asparaginase por leveduras.....	50
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 Geral.....	53
3.2 Específicos.....	53
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 Material.....	55
4.1.1 Leveduras empregados no trabalho.....	55
4.1.2 Meios de cultivo empregados no trabalho.....	55
4.2 Métodos.....	58
4.2.1 Determinação da atividade enzimática extracelular pelo método de Nessler.....	58
4.2.2 Determinação da atividade enzimática periplasmática pelo método de Nessler.....	59
4.2.3 Determinação da atividade enzimática extracelular pelo método da hidroxilamina.....	60
4.2.4 Determinação da atividade enzimática periplasmática pelo método da hidroxilamina.....	62
4.2.5 Determinação da concentração celular.....	63

4.2.6 Cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação de atividade asparaginolítica periplasmática.....	64
4.3 Screening em meio líquido para seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase.....	65
4.4 Screening em meio sólido para seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase.....	66
4.5 Estudo da influência da adição de aminoácidos na produção de L-asparaginase das leveduras selecionadas.....	67
4.6 Cinética da produção de L-asparaginase pelas leveduras selecionadas.....	67
4.7 Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1 Seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase e avaliação de metodologias de quantificação da atividade enzimática.....	71
5.1.1 Avaliação da metodologia de Nessler para seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio líquido.....	71
5.1.2 Avaliação da metodologia da hidroxilamina para seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio líquido.....	74
5.1.3 Avaliação do processo de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido.....	80
5.2 Ensaio confirmatório para a produção de L-asparaginase pelas leveduras selecionadas.....	85
5.3 Influência de aminoácidos na produção de L-asparaginase por <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Rhodotorula glutinis</i>	88
5.4 Cinética da produção de L-asparaginase periplasmática por <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Rhodotorula glutinis</i> cultivadas em meio líquido.....	93
6. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101

1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) é a enzima responsável pela hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio. É uma enzima encontrada em plantas, alguns animais e micro-organismos, mas não em humanos. A L-asparaginase vem sendo aplicada há décadas como um biofármaco para tratamento de doenças hematopoiéticas, como leucemia linfoblástica aguda e linfossarcoma. A produção de L-asparaginase terapêutica disponível atualmente é feita exclusivamente de forma biotecnológica, empregando-se cultivo das enterobactérias *Escherichia coli* ou *Erwinia chrysanthemi*. Entretanto, a terapia com L-asparaginase de origem bacteriana resulta em diversos efeitos adversos ao paciente, principalmente devido à alta imunogenicidade dessas proteínas, causando reações de hipersensibilidade e inativação imunológica durante as terapias de reindução. Uma nova L-asparaginase que sofreu um processo de esterificação com polietilenoglicol (PEG) possui menor imunogenicidade maior tempo de residência no organismo, sem afetar a sua eficácia. Trata-se da L-asparaginase tida como terapia de escolha em diversos protocolos quimioterápicos, entretanto seu alto custo de produção acaba restringindo o uso desse fármaco (MÜLLER; BOOS, 1998; VAN DEN BERG, 2011; VERMA et al., 2007).

Atualmente observa-se uma crise de desabastecimento internacional da L-asparaginase como fármaco. O medicamento Elspar®, L-asparaginase de *E. coli*, registrado pela empresa dinamarquesa Lundbeck® foi, até o ano de 2012, a formulação de L-asparaginase mais comercializada mundialmente. Este medicamento era, também, o de menor custo do mercado e o único disponível no Brasil, onde era formulado pelo Laboratório Bagó a partir da matéria-prima importada. O Elspar® tem importância singular no Brasil, sendo incluso na Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME) por fazer parte de diversos protocolos de tratamentos oncológicos do Serviço Único de Saúde (SUS). Em agosto de 2012 a empresa Lundbeck® informou a suspensão na produção da matéria-prima contida no Elspar® por motivos técnicos e econômicos até o fim de 2012. Em seguida, o laboratório Bagó informou a suspensão na formulação,

deixando o país desabastecido de qualquer formulação de L-asparaginase e altamente dependente de importações (LOFTUS, 2012; SCHMIDT, 2012).

Além da importante aplicação como biofármaco antineoplásico, recentemente descobriu-se uma nova aplicação para essa enzima na indústria de alimentos. O uso da L-asparaginase é capaz de reduzir a formação de acrilamida, um composto potencialmente carcinogênico, formado em alimentos processados sob altas temperaturas, como pães e frituras (HENDRIKSEN et al., 2009; KUKUROVÁ et al., 2009; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008). A importância da L-asparaginase na indústria de alimentos é ressaltada pelo desenvolvimento de uma recente formulação de L-asparaginase fúngica exclusivamente voltada para alimentos (sob a marca Acrylaway®) pela empresa dinamarquesa Novozymes® (HENDRIKSEN et al., 2009; NOVOZYMES, 2014). Reportou-se que o uso de L-asparaginase é capaz de reduzir em até 97% os níveis de acrilamida em alimentos previamente tratados com essa enzima (MOHAN KUMAR et al., 2013).

Considerando as importantes aplicações da L-asparaginase, tanto na indústria farmacêutica quanto na indústria de alimentos, e o desabastecimento atual deste biofármaco, observa-se uma crescente busca por novas alternativas para a produção biotecnológica dessa enzima de singular importância.

A busca por novos micro-organismos produtores de L-asparaginase com características cinéticas e bioquímicas distintas tem sido foco de importantes estudos nos últimos anos, com destaque para fungos filamentosos e leveduras (ZUO et al., 2014). A L-asparaginase fúngica apresenta propriedades distintas das enzimas bacterianas, podendo, em alguns casos, levar a uma eficácia antitumoral ainda maior. Além disso, as enzimas fúngicas sofrem processos pós-traducionais que as tornam mais semelhantes às proteínas humanas, reduzindo assim sua imunogenicidade sem a necessidade de modificações químicas (como por exemplo a PEGilação) na estrutura da molécula (SARQUIS et al., 2004; MAHAJAN et al., 2013). No caso da L-asparaginase empregada na indústria de alimentos, o uso de fungos filamentosos e leveduras como potenciais produtores dessa enzima é visto como um fator positivo por se tratarem de micro-organismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e de fácil cultivo.

Tendo em vista a importância da L-asparaginase no cenário científico internacional, o presente trabalho visou selecionar novas leveduras produtoras de

L-asparaginase, bem como determinar importantes aspectos da sua produção biotecnológica, como a necessidade de moléculas indutoras no meio de cultivo e a cinética de produção enzimática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas: considerações gerais

As enzimas são definidas como os mediadores catalíticos de todas as reações que ocorrem em sistemas biológicos. Desde o século XVIII já eram conhecidas as funções das secreções do estômago e da saliva na hidrólise de proteínas e do amido, entretanto o mecanismo pelos quais ocorriam não eram estabelecidos. Considera-se que durante o século XIX ocorreram os principais avanços da enzimologia. Em 1833 a primeira enzima foi descoberta por Anselme Payen: a diastase, responsável por degradar o amido em maltose. Em 1897 o ganhador do prêmio Nobel Eduard Buchner publicou um artigo no qual comprovava a capacidade de fermentação alcoólica por extratos de células mortas, denominando "zimase" o *pool* de enzimas capaz de realizar essa fermentação. Entretanto, apesar dos avanços, somente em 1926 a natureza proteica das enzimas foi descoberta, quando James Sumner purificou e cristalizou a enzima urease e comprovou que se tratava de uma proteína. Sabe-se hoje que a maior parte das enzimas são proteínas, sendo exceções um pequeno grupo de moléculas formadas por RNA com poder catalítico (COPELAND, 2000; GURUNG et al., 2013; NELSON; COX, 2008; POULSEN; BUCHHOLZ, 2003). As enzimas são classificadas de acordo com a reação que catalisam e geralmente nomeadas acrescentando-se o sufixo "ase" à palavra que descreve seu substrato ou ação como, por exemplo, as enzimas urease e DNA polimerase. Para classificá-las, cada enzima recebe uma numeração de quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação que catalisa. Essa classificação é feita de acordo com a *Enzyme Commission* (E.C.) (GURUNG et al., 2013; NELSON; COX, 2008)

A estrutura proteica da enzima gera um ambiente específico para que ocorra uma reação bioquímica de maneira rápida. Esse ambiente é chamado de sítio ativo e a molécula que se liga a esse sítio ativo é chamada de substrato, sendo convertida em produto após o final da reação enzimática. Ao fim da reação, a enzima continua intacta e é capaz de catalisar outra reação. A enzima reduz a

energia de ativação necessária para que uma reação bioquímica ocorra e, dessa forma, a torna mais favorável. Devido à possibilidade de saturação das enzimas com substrato, as enzimas possuem velocidades máximas de atividade quando todos os sítios ativos de todas as enzimas presentes no meio reacional encontram-se preenchidos. Pode-se afirmar, portanto, que a velocidade de catálise enzimática é diretamente proporcional à concentração de substrato até que a cinética de saturação enzimática seja alcançada, no qual se obtém a velocidade máxima da reação (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; NELSON; COX, 2008). Define-se a constante de Michaelis (K_m) como sendo o principal parâmetro cinético de uma enzima. Essa constante é definida como a concentração de substrato necessária para se atingir 50% da velocidade máxima e representa de forma indireta a “afinidade” da enzima pelo seu substrato. Dessa forma, pode-se afirmar que, de um modo geral, quanto menor o K_m da enzima, maior sua afinidade pelo substrato, e vice-versa. A Figura 1 representa graficamente a influência do K_m e da afinidade dos substratos pela enzima na cinética de saturação enzimática (COPELAND, 2000; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Figura 1 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da atividade enzimática

Fonte: Champe; Harvey; Ferrier, 2006

São diversas as aplicações das enzimas em escala industrial. As enzimas que atuam sobre carboidratos (celulases e amilases), por exemplo, podem ser usadas para conversão de amido e de biomassa lignocelulósica em monômeros fermentescíveis. Outros exemplos incluem peptidases e lipases, que podem ser aplicadas na indústria de alimentos ou em síntese orgânica e enzimas que atuam nos ácidos nucleicos tem grande aplicação em técnicas de biologia molecular (BON et al., 2008).

Figura 2 - Mercado global de enzimas de aplicação industrial

Fonte: adaptado de Dewan, 2012

Devido à sua ampla aplicação industrial, o mercado global de enzimas cresceu significativamente nos últimos anos. Em 2009 o valor do mercado global de enzimas estava em torno de 3,1 bilhões de dólares, aumentando em 2011 para 3,9 bilhões de dólares. Estima-se que este valor chegará a 6 bilhões de dólares até o ano de 2016. As enzimas com aplicação no setor de alimentos e bebidas ocupam o maior espaço do mercado, com valor estimado em 1,3 bilhões de dólares em 2011 e com expectativa de crescimento para 2,1 bilhões de dólares até 2016. As enzimas técnicas são aquelas aplicadas nos setores de produção de detergentes, cosméticos, couro, têxtil e polpa celulósica e ocupam o segundo lugar no mercado global de enzimas, com faturamento estimado de 1,7 bilhões de dólares para 2016.

(DEWAN, 2012). As empresas Novozymes® e Danisco® lideram o mercado mundial de enzimas com 45% e 17% do total de vendas, respectivamente, seguidas pelas empresas DSM® e BASF® com 5% e 4% do mercado (FERNANDES, 2010).

2.1.1 Uso terapêutico de enzimas

As enzimas ligam-se a seus substratos com alta especificidade e afinidade, além de serem capazes de catalisar a reação de várias moléculas-alvo ao produto de interesse. Essas características das enzimas as tornam moléculas de grande interesse como potenciais biofármacos, uma vez que são capazes de atuar de maneira distinta das moléculas pequenas de fármacos convencionais (VELLARD, 2003).

O uso terapêutico de enzimas ocorre desde o final do século XIX, quando extratos brutos de enzimas pancreáticas eram utilizadas como auxiliares digestivos (CRUZ *et al.*, 2008). Em 1894 um preparado enzimático diastático obtido a partir de fermentação em estado sólido por *Aspergillus oryzae* foi desenvolvido por Jokichi Takamine e ainda é utilizado como auxiliar digestivo sob a marca de Takadiastase®. Em 1960 a primeira enzima terapêutica, invertase, foi utilizada como adjuvante no combate de uma doença genética, a doença de Pompe. Na década de 1980 surgiram as primeiras formulações com enzimas recombinantes, como por exemplo a enzima ativadora do fator de plasminogênio (Activase®) empregada no tratamento de infarto da artéria coronária (DESNICK; SCHUCHMAN, 2013; GURUNG *et al.*, 2013).

Com o tempo novas aplicações para as enzimas terapêuticas surgiram e, atualmente, são empregadas para diversas finalidades como, por exemplo, agentes oncolíticos, trombolíticos, anticoagulantes, anti-inflamatórios e antivirais. O uso das enzimas ainda é bastante restrito, principalmente devido ao seu elevado peso molecular que impede uma ampla distribuição nas células do organismo e, também, pela resposta imune gerada contra o fármaco, principalmente nas enzimas aplicadas por via parenteral. Uma das principais dificuldades encontradas durante a produção das enzimas terapêuticas ocorre durante o processo de purificação. As

enzimas aplicadas por via parenteral requerem alto grau de pureza, para evitar reações imunológicas no paciente que as recebe. Além disso, devem apresentar alta afinidade e especificidade pelo substrato em que atuam para que o tratamento seja eficaz mesmo em doses baixas da enzima em questão (AEHLE, 2007; CRUZ et al., 2008; GURUNG et al., 2013).

Gurung e colaboradores (2013) explicaram que, atualmente, a maior parte das enzimas terapêuticas são provenientes de micro-organismos ou de culturas de células animais, relacionando diretamente a engenharia bioquímica à produção desses biofármacos. A Tabela 1 apresenta exemplos de enzimas terapêuticas atualmente comercializadas e obtidas por vias biotecnológicas.

Tabela 1 – Exemplos de enzimas terapêuticas obtidas por via biotecnológica e suas respectivas fontes

Enzima	Classificação EC	Fonte	Nomes Comerciais	Aplicação Terapêutica
Colagenase	3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i>	Santyl Kollagenase	Tratamento de feridas de pele
Desoxirribonuclease	3.1.21.1	Células CHO recombinantes	Pulmozyme	Fibrose cística
Estreptoquinase	3.4.21.73	<i>Streptococcus</i> sp.	Streptase Kabikinase	Anticoagulante
Galactosidase	3.2.1.22	Células CHO recombinantes	Fabrazyme Replagal	Doença de Fabry
Glicocerebrosidase	3.2.1.45	Células CHO recombinantes	Cerezyme	Doença de Gaucher
L-asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Elspar Erwinase	Antileucêmico
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Surelac Lactaid	Intolerância à lactose
Serrapeptase	3.4.24.40	<i>Serratia</i> sp.	Danzen	Anti-inflamatório e mucolítico
Urato oxidase	1.7.3.3	<i>Aspergillus flavus</i>	Uricozyme	Gota

Fonte: adaptado de Zimmer et al., 2009

As enzimas terapêuticas possuem, em geral, um custo elevado de produção. Isso ocorre pois, além da baixa produtividade obtida nos cultivos em biorreatores, há um alto custo de purificação destas moléculas. Algumas enzimas, ainda, necessitam sofrer um processamento químico posterior para reduzir sua imunogenicidade ou aumentar sua atividade. Há, também, os custos de formulação da forma farmacêutica final a ser administrada ao paciente (CRUZ et al., 2008).

2.1.2 Uso de enzimas no processamento de alimentos

A indústria de alimentos e bebidas emprega a maior parte das enzimas utilizadas mundialmente. O processamento de alimentos por meio de agentes biológicos ocorre desde 6.000 a.C ou anteriormente com o uso de leveduras na fermentação de pães, vinhos e cervejas. A aplicação de preparados enzimáticos para fins alimentícios iniciou-se no final do século XIX, quando Christian Hansen utilizou o *rennet*, uma mistura de quimosina e tripsina obtida de estômago de mamíferos, para coagular o leite e produzir queijos. A partir de então novos usos para preparações enzimáticas foram encontrados, como o uso de pectinases para clarificação de sucos, invertase para produção de açúcar invertido e amilases para hidrolisar matérias-primas amiláceas (FERNANDES, 2010; POULSEN; BUCHHOLZ, 2003).

Fernandes (2010) justificou o amplo uso de enzimas durante o processamento de diversos alimentos devido à sua grande especificidade pelo substrato, além de serem capazes de atuar em condições amenas de temperatura, pH e pressão, apresentando alta atividade e taxa de conversão de substrato em produtos. Enzimas são biodegradáveis e aceitas, de maneira geral, como produtos naturais, condições essenciais para aplicação na indústria alimentícia.

Como exemplos de enzimas classicamente empregadas na indústria de alimentos podem ser citadas as amilases e glucanases na produção de cerveja, a tripsina para pré-digestão de alimentos para crianças e a pectinase para clarificação de sucos de frutas. A indústria de laticínios emprega diversas enzimas,

como a quimosina para produção de queijos e a lactase para produção de alimentos lácteos para intolerantes à lactose. Outras aplicações clássicas ainda englobam o uso de invertase para produção do xarope de açúcar invertido a partir de sacarose e a glicose isomerase para produção de glicose a partir de frutose. Na indústria de rações animais a enzima fitase, que hidrolisa o ácido fítico, é empregada para aumentar o teor de fósforo assimilável presente nas rações (FERNANDES, 2010; GURUNG et al., 2013; POUSEN; BUCHHOLZ, 2003).

Além das enzimas classicamente empregadas há décadas na indústria de alimentos, novas enzimas vêm sendo estudadas e/ou implementadas para obtenção de novas características nos produtos ou para redução de possíveis substâncias tóxicas (FERNANDES, 2010). Um exemplo é o uso de enzimas xilanolíticas para hidrólise de carboidratos não-amiláceos na indústria de panificação, melhorando as propriedades reológicas da massa e firmeza do miolo após processamento (BUTT et al., 2008). Zeeb, Fischer e Weiss (2014) descreveram o uso de enzimas para estabilização coloidal em alimentos nutracêuticos que incluem substâncias lábeis na sua composição. Nesse caso, enzimas oxidativas, como a glicose-oxidase, alteram a estrutura dos compostos presentes no alimento para aumentar as interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas que estabilizam as suspensões presentes no alimento.

A L-asparaginase é uma enzima que possui um novo emprego na indústria de alimentos, reduzindo a toxicidade de certos produtos. Pode-se empregar a L-asparaginase para reduzir a formação de acrilamida, um composto tóxico e potencialmente carcinogênico, formado durante o processamento a altas temperaturas de alimentos como pães, biscoitos e *snacks* extrusados (ANESE; QUARTA; FRIAS, 2011; KUKUROVÁ et al., 2009). Por exemplo, encontra-se no mercado um preparado enzimático contendo L-asparaginase fúngica comercializado pela Novozymes® sob a marca Acrylaway® com a proposta de reduzir os níveis de acrilamida em diversos alimentos industrializados (NOVOZYMES, 2014).

2.2 Características da enzima L-asparaginase

A L-asparaginase, ou L-asparagina amino-hidrolase (EC 3.5.1.1), é a enzima responsável por catalisar a hidrólise irreversível da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio (Figura 3). Trata-se de uma enzima encontrada em certas plantas, animais e micro-organismos, mas não em humanos (VAN DEN BERG, 2011; VERMA et al., 2007; ZALEWSKA-SZEWCZYK et al., 2007). A L-asparagina é um aminoácido proveniente da dieta humana, mas também é sintetizada pela enzima L-asparagina sintetase a partir de ácido L-aspártico, L-glutamina e ATP (PANOSYAN et al., 2004; VAN DEN BERG, 2011).

Figura 3 - Mecanismo de ação simplificado da L-asparaginase

Fonte: adaptado de Kumar e Sobha, 2012

O mecanismo genérico de ação da L-asparaginase é comparável ao mecanismo clássico das serina-proteases, cujas atividades dependem de um grupo de aminoácidos, tipicamente serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp), conhecidos como a tríade catalítica. Essa tríade é composta por um aminoácido nucleofílico (Ser), uma base (His) e um aminoácido com característica ácida (Asp), todos conectados através de pontes de hidrogênio. A reação é catalisada em duas

etapas, representadas na Figura 4. Na primeira, o resíduo nucleofílico da enzima, ativado por uma base forte, ataca o átomo de carbono amida do substrato, gerando um produto intermediário acil-enzima após passar por um intermediário tetraédrico. A segunda etapa da reação é similar, porém o ataque no carbono éster é feito por um nucleófilo ativado por uma molécula de água (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; VERMA et al., 2007).

Figura 4 – Mecanismo proposto para a reação da asparaginase

Fonte: adaptado de Michalska e Jaskolski, 2006

A hidrólise da L-glutamina é bastante similar à hidrólise da L-asparagina devido à semelhança estrutural entre ambos os aminoácidos (Figura 5). Assim, a maior parte das L-asparaginases microbianas apresentam reatividade glutaminolítica cruzada. Há, porém, enzimas que não apresentam atividade de L-glutaminase como, por exemplo, a L-asparaginase produzida pela bactéria

Wolinella succinogenes. As L-asparaginases bacterianas mais estudadas, pertencentes às bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, possuem apenas 5% de atividade glutaminolítica frente à atividade asparaginolítica. Outros micro-organismos sintetizam a L-asparaginase com igual função glutaminolítica, como *Pseudomonas sp.* e *Acinetobacter glutaminasificans*. Em alguns casos a atividade glutaminolítica da L-asparaginase só é percebida após conversão completa da L-asparagina presente em ácido aspártico quando então os sítios ativos da L-asparaginase passam a catalisar a reação de L-glutaminase (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001; MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006; VAN DEN BERG, 2011).

Figura 5 - Estrutura dos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina

Fonte: adaptado de Abbott, 2006

2.2.1 – Técnicas de quantificação da enzima L-asparaginase

Existem diversas técnicas de quantificação da enzima L-asparaginase. Métodos empregando análise cromatográfica de aminoácidos, reações colorimétricas com ninhidrina e fluorométricas quantificando a formação de 7-amino-4-metilcumarina foram desenvolvidas (VERMA et al., 2007). Entretanto, o método padrão para quantificação direta da enzima L-asparaginase ainda é o método de Nessler. Esse método se baseia na quantificação do amônio liberado durante a reação de asparaginólise através do reativo de Nessler, uma solução

alcalina de tetraiodomercurato de potássio $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$. A reação do amônio com o tetraiodomercurato de potássio gera coloração alaranjada, possível de ser lida em espectrofotômetro a 436 nm (WRISTON; YELLIN, 1973).

Outra metodologia eficaz para quantificação da atividade de L-asparaginase é a técnica da hidroxilamina. Ela se baseia na capacidade da L-asparaginase de converter o aminoácido L-asparagina em ácido β -hidroxil aspártico (AHA) quando em contato com cloridrato de hidroxilamina. Então o AHA reage com o FeCl_3 , formando uma coloração avermelhada possível de ser quantificada em espectrofotômetro a 500 nm (GROSSOWICZ et al., 1950; DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). Diversos autores empregaram essa metodologia para quantificação da atividade asparaginolítica em situações onde os interferentes acabam inviabilizando o método de Nessler (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; FERRARA et al., 2006; OLIVEIRA; CARVAJAL; BON, 1999; OLIVEIRA et al., 2003).

2.3 Aplicação terapêutica da L-asparaginase

Historicamente, o desenvolvimento da L-asparaginase com o propósito de medicamento se iniciou em 1953, quando Kidd observou que a injeção intraperitoneal do soro de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) em camundongos portadores de linfomas subcutâneos era capaz de causar regressão no crescimento desses tumores. Em 1956, verificou-se a necessidade metabólica de células cancerosas do tipo Walker carcinosarcoma 256 por L-asparagina e L-glutamina (NEUMAN; McCOY, 1956). Após uma vários estudos, Broome (1961) definiu que a atividade antitumoral do soro de porquinho-da-índia era devido à enzima L-asparaginase contida nesse soro. Postulou-se, assim, que a atividade antitumoral da L-asparaginase advém da sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina, reduzindo a concentração plasmática desse aminoácido que é essencial para o crescimento de certas células tumorais.

A importância da L-asparaginase como agente antitumoral despertou a atenção dos pesquisadores, levando à busca de novas formas de produção dessa enzima. Mashburn e Wriston (1964) comprovaram a atividade antitumoral da L-asparaginase obtida por cultivo de *Escherichia coli*. Esse estudo culminou com a aprovação, em 1978, do uso da L-asparaginase de *E. coli* para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e linfosarcomas pelo órgão de vigilância sanitária norte-americano *Food and Drug Administration* (FDA) (NAGARETHINAM et al., 2012). A L-asparaginase obtida a partir do cultivo de *Erwinia chrysanthemi* também foi extensivamente estudada desde a década de 1960, entretanto só foi aprovada para uso nos EUA em 2011 (WADE; CAMMACK, 1969; SALZER et al., 2012). A PEG-asparaginase (Oncaspar®) é outro medicamento utilizado no tratamento das leucemias linfoblásticas. Difere dos outros medicamentos pela conjugação da L-asparaginase com PEG (polietilenoglicol), reduzindo assim sua imunogenicidade (MÜLLER et al., 2000). Enzimas de outros micro-organismos foram extensivamente estudadas desde a década de 1960, porém nenhuma outra L-asparaginase teve ação antitumoral comprovada e aprovada para uso em humanos desde então (VAN DEN BERG, 2011). As únicas formulações de L-asparaginase aprovadas para tratamento de leucemias são, portanto, produzidas pelas enterobactérias *E. coli* e *E. chrysanthemi* (VERMA et al., 2007).

Atualmente a L-asparaginase é empregada como um fármaco para tratamento de certos tumores hematopoiéticos, uma vez que reduz os níveis plasmáticos de L-asparagina nos pacientes. Como os linfoblastos requerem grandes quantidades de L-asparagina para manter seu crescimento rápido e maligno e não são capazes de sintetizá-la, o tratamento com L-asparaginase induzem estas células a sofrerem apoptose p53-dependente devido à inibição na biossíntese proteica. Com a apoptose das células cancerosas, o tumor é significativamente controlado. Por outro lado, as células saudáveis possuem a enzima L-asparagina sintetase que converte novamente o ácido L-aspártico em L-asparagina, sendo pouco afetadas pelo tratamento com a L-asparaginase (Figura 6). Ressalta-se, porém, que células tumorais que também possuem a enzima L-asparagina sintetase são resistentes ao tratamento com L-asparaginase, uma vez que convertem o ácido L-aspártico em L-asparagina e não sofrem com a ausência deste aminoácido. Atualmente o uso da L-asparaginase como fármaco é

padronizado apenas para o tratamento de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda (ALL) e para alguns tipos de linfomas não-Hodgkin, uma vez que as células tumorais dessas leucemias são as mais susceptíveis ao tratamento com esta enzima (PANOSYAN et al., 2004; VAN DEN BERG, 2011; VERMA et al., 2007). Apesar de aplicada há anos em diversos protocolos oncológicos, ainda há muito debate a respeito da formulação ideal e dosagem para o tratamento com L-asparaginase. O foco da terapia é atingir depleção total nos níveis séricos de L-asparagina, porém ainda não foi estabelecida uma concentração mínima crucial para a eficácia completa do tratamento (PIETERS et al., 2011).

Figura 6 - Visão esquemática da atividade antitumoral da L-asparaginase em células saudáveis e em células tumorais

Fonte: adaptado de Van den Berg, 2011

Outro problema decorrente da terapia com L-asparaginase se deve aos severos efeitos adversos causados para o paciente. Os efeitos adversos da terapia com L-asparaginase ocorrem por duas causas principais. A primeira delas é que a queda nos níveis de L-asparagina no sangue reduz a síntese protéica do

organismo, reduzindo assim os níveis séricos de albumina, insulina, fatores de coagulação e lipoproteínas. A queda nessas proteínas leva a distúrbios como *diabetes mellitus*, hemorragias e dislipidemias. Ainda podem ocorrer distúrbios como febre, calafrios, dores de cabeça, depressão, espasmos, tontura e disfunções de órgãos como pâncreas, rins e fígado. A segunda causa dos efeitos adversos com o tratamento da L-asparaginase ocorre pelas reações de hipersensibilidade imunológica causada pela natureza microbiana da enzima aplicada de forma parenteral (MÜLLER; BOOS, 1998; PIETERS et al., 2011; VAN DEN BERG, 2011).

Müller e Boos (1998) postularam que as reações de hipersensibilidade são causadas pelo acúmulo de anticorpos contra a enzima e ocorrem quase que exclusivamente durante os tratamentos de intensificação ou de reindução, que são feitos semanas após o tratamento inicial. Isso ocorre pela demora natural do organismo ao criar os anticorpos contra a enzima: em uma primeira administração não haverá efeitos adversos, porém conforme há a formação dos anticorpos, reações de hipersensibilidade podem ocorrer quando o indivíduo recebe novamente a medicação. Adultos são mais susceptíveis às reações de hipersensibilidade em comparação a pacientes pediátricos. Os anticorpos produzidos em resposta à administração da L-asparaginase nem sempre levam a reações de hipersensibilidade, mas podem causar o fenômeno de “hipersensibilidade silenciosa”, em que os anticorpos causam uma rápida inativação da enzima, reduzindo consideravelmente seu tempo de meia-vida, mesmo sem causar efeitos adversos significativos. Geralmente o paciente que apresenta elevada taxa de anticorpos contra um tipo específico de L-asparaginase tem seu tratamento alterado para outra formulação para evitar as reações de hipersensibilidade. Pacientes que utilizam a L-asparaginase também são tratados com medicamentos corticóides para evitar as reações imunológicas contra a enzima. Entretanto, esse tratamento pode inibir ainda mais o frágil sistema imune do paciente, fazendo-o sofrer de infecções recorrentes (MÜLLER; BOOS, 1998; NAGARETHINAM et al., 2012; PIETERS et al., 2011; VAN DEN BERG, 2011).

Além da inativação enzimática pelos anticorpos, observa-se também o fenômeno de resistência à L-asparaginase. Essa resistência é devida principalmente à desrepressão espontânea do gene que codifica a enzima L-

asparagina sintetase, que foi observada nas células tumorais de diversos pacientes com leucemia linfoblástica aguda resistentes à droga. Nesses casos em que o tumor se torna resistente à droga, o tratamento com L-asparaginase deve ser descontinuado e o protocolo de quimioterapia deve ser alterado (NAGARETHINAM et al., 2012).

2.3.1 Características bioquímicas e estruturais da L-asparaginase de *E coli*

A L-asparaginase obtida por via biotecnológica a partir de cepas recombinantes de *E. coli* hiperprodutoras dessa enzima é o biofármaco padrão empregado para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda e linfosarcomas mundialmente. A L-asparaginase de *E. coli* possui K_M aparente de 10 μM e tempo de meia-vida de $1,24 \pm 0,17$ dias. Existe, porém, uma grande diferença entre as várias formulações, principalmente em termos de tempo de meia-vida da enzima (MÜLLER; BOOS, 1998; VAN DEN BERG, 2011).

A bactéria *E. coli* produz duas L-asparaginases distintas, denominadas de EcA-1 e EcA-2. Estudos revelam que a L-asparaginase EcA-2 encontra-se no espaço periplasmático e somente esta possui atividade antitumoral. Estima-se que o K_M da EcA-2 seja em torno de 10 μM , caracterizando uma alta afinidade pelo substrato, e que a sua massa molar seja em torno de 141 kDa (KUMAR et SOBHA, 2012). Estruturalmente, a EcA-2 é um tetrâmero composto por dois dímeros intimamente ligados. Cada um dos monômeros é idêntico nos seus 326 aminoácidos constituintes. Cada monômero possui um sítio ativo da enzima, que realiza a ligação enzima-substrato com as moléculas da L-asparagina. O sítio ativo só é formado pela interação íntima dos monômeros, que ocorre pelos dois resíduos de treonina, sendo um desses resíduos o nucleófilo que ataca o átomo de carbono da ligação amida. Outra característica da EcA-2 é que seu sítio ativo só é “montado” quando em contato com o substrato, já que seus elementos centrais fazem parte de um *loop* altamente flexível. A Figura 7 representa a estrutura quaternária da EcA-2, em que os pares verde-vermelho e cinza-azul representam os dímeros íntimos (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006).

Figura 7 – Representação da estrutura quaternária da EcA-2

Fonte: Michalska; Jaskolski, 2006

Em contraste com a enzima EcA-2 periplasmática, a EcA-1 é uma enzima citossólica que possui menor afinidade pelo substrato e é ineficaz ao inibir o crescimento tumoral (VERMA et al., 2007). Apesar de as enzimas catalisarem uma reação idêntica, estas podem ser diferenciadas a partir da sua solubilidade em sulfato de amônio e pela sua sensibilidade à inativação térmica (MICHALSKA; JASKOLSKI, 2006). Acredita-se que a EcA-1 seja constitutiva e que a EcA-2 seja secretada sob resposta de privação de nitrogênio (VERMA et al., 2007).

2.3.2 Características bioquímicas e estruturais da L-asparaginase de *E. chrysanthemi*

A bactéria *Erwinia chrysanthemi* possui diversas sinonímias, como *Erwinia carotovora*, *Pectobacterium chrysanthemi* e, mais recentemente, seu nome foi alterado para *Dickeya dadantii* (SAMSON et al., 2005). Trata-se de uma bactéria bacilar gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* e que atua como fitopatógeno em diversas plantas (GRENIER et al., 2006).

A L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (ErA) é, como as demais L-asparaginases periplasmáticas bacterianas, um tetrâmero com 330 aminoácidos em cada monômero, com massa molecular entre 140 e 150 kDa. Apesar da semelhança estrutural da ErA e da EcA, ambas apresentam afinidades diferentes por seus substratos, sendo a atividade glutaminolítica da ErA muito maior que a atividade glutaminolítica da EcA. A Figura 8 representa a estrutura de cada monômero da ErA (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001).

A ErA é empregada para tratar pacientes alérgicos à EcA. Possui K_M de 12 μM e tempo de meia vida de $0,65 \pm 0,13$ dias. Em função do baixo tempo de meia-vida, precisa ser administrada aos pacientes com maior frequência quando comparado à EcA (MÜLLER; BOOS, 1998; VAN DEN BERG, 2011). Relatou-se na literatura, porém, uma menor eficácia da ErA, que causa redução nos níveis séricos de L-asparagina menor que a EcA. Quando indicado, o tratamento com ErA deve ser feito com, no mínimo, o dobro da dosagem recomendada para o tratamento padrão. Outro problema decorre do fato de pelo menos um terço dos pacientes com alergia à EcA também serem alérgicos à ErA por imunogenicidade cruzada. Acredita-se, também, que a ErA cause menores efeitos colaterais que a EcA (PIETERS et al., 2011; VAN DEN BERG, 2011).

Figura 7 - Estrutura monomérica da L-asparaginase de *E. chrysanthemi* (ErA)

Fonte: adaptado de Aghaiypour, Wlodawer e Lubkowski, 2001

2.3.3 PEG-asparaginase

Atualmente há um grande interesse no desenvolvimento de drogas com estrutura polipeptídica e proteica. Graças às técnicas de DNA recombinante, é possível produzir drogas peptídicas em grande escala. Apesar de sua importante aplicação em diversas áreas da medicina, há também muitas desvantagens no uso dessas drogas, a saber: susceptibilidade à proteólise por enzimas do organismo, reduzindo seu tempo de meia-vida; baixa solubilidade; baixo tempo de prateleira; rápido *clearance* hepático; e propensão de gerar anticorpos que podem causar reações de hipersensibilidade e/ou inativação do fármaco. Dentre as diversas formas estudadas para se contornar esses problemas, a mais promissora foi a esterificação de cadeias de polietilenoglicol (PEG) aos polipeptídeos. As vantagens

da conjugação com o PEG incluem o aumento do tempo de meia vida e redução da imunogenicidade dos peptídeos (HARRIS; CHESS, 2003).

O PEG foi conjugado à L-asparaginase de *E. coli* por meio de reação de esterificação para redução das reações de hipersensibilidade e aumento do tempo de meia-vida da enzima após administração. Uma das suas vantagens é a possibilidade de se administrar a droga em pacientes com hipersensibilidade à L-asparaginase de *E. coli*, tornando-se uma droga útil para tratamentos de reindução. A PEG-asparaginase comercialmente disponível é o Oncaspar®. Na Europa a PEG-asparaginase é empregada apenas em casos em que o paciente apresenta hipersensibilidade à L-asparaginase nativa de *E. coli*, porém nos EUA os protocolos de tratamento permitem o uso da PEG-asparaginase como primeira opção. O tempo de meia-vida da PEG-asparaginase é de $5,73 \pm 3,24$ dias, quase 5 vezes superior ao tempo de meia-vida da L-asparaginase nativa de *E. coli*. Dessa forma, ao contrário da L-asparaginase de *E. coli* que necessita ser administrada de 2 a 3 vezes por semana, a PEG-asparaginase só precisa ser administrada quinzenalmente (GRAHAM, 2003; VAN DEN BERG, 2011). Apesar de o tempo de meia vida ser superior ao da EcA e da ErA, seu K_M pela L-asparagina é em torno de 10 μM , semelhante aos 12 μM encontrado para a EcA e ErA (GRAHAM, 2003).

2.4 Aplicação da L-asparaginase na indústria de alimentos

2.4.1 Formação de acrilamida em alimentos processados e sua toxicidade

A acrilamida (2-propenamida) é um sólido cristalino inodoro e incolor com temperatura de liquefação de 84,5 °C cuja fórmula molecular encontra-se representada na Figura 8. Possui massa molecular de 71,08 g.mol⁻¹ e é produzida por síntese orgânica a partir da hidratação da acrilonitrila. A acrilamida é utilizada na síntese de polímeros de poliácrlamida, empregados nas indústrias de papel, têxtil e como floculantes no tratamento de efluentes (FRIEDMAN, 2003).

Apesar de amplamente empregada há décadas, sabe-se do potencial tóxico da acrilamida desde 1964, quando modelos animais indicaram irritações na pele e olhos quando em contato com esse composto, além de efeitos neurotóxicos sob exposição prolongada (MCCOLLISTER; OYEN; ROWE, 1964). Durante anos seu potencial carcinogênico também foi investigado quando finalmente, em 1994, a *International Agency for Research Cancer*, associada à Organização Mundial da Saúde, acrescentou a acrilamida à sua lista de agentes potencialmente carcinogênicos para humanos (IARC, 1994).

Figura 8 - Estrutura química da acrilamida

Fonte: IARC, 1994

Em estudo realizado na Suécia em 1998, identificou-se que, em média, os adultos estavam expostos a 100 µg de acrilamida por dia, um valor não negligenciável em termos de risco de câncer. Porém a população analisada não se encontrava exposta de forma ocupacional a esse composto. Posteriormente, no ano 2000, comprovou-se que a exposição à acrilamida ocorria pelo consumo de certos alimentos fritos. Estudos recentes comprovam, entretanto, que a formação de acrilamida ocorre tanto em alimentos fritos quanto assados, mas não em alimentos cozidos (KERAMAT et al., 2010; TAREKE et al., 2000, 2002). Arribas-Lorenzo, Fogliano e Morales (2009) citaram as batatas fritas, *snacks* extrusados, café, biscoitos e pães como os principais alimentos responsáveis pela alta exposição humana à acrilamida.

O mecanismo de formação da acrilamida nesses alimentos envolve a reação de alguns aminoácidos livres com açúcares redutores sob altas temperaturas, sendo a L-asparagina o aminoácido de maior importância. Zyzak et al. (2009) detectaram que a cadeia amida presente na acrilamida provém da L-asparagina.

Neste mesmo estudo, ainda, os autores comprovaram que o uso da L-asparaginase antes do processamento reduzia em 88% a presença de L-asparagina na massa e em mais de 99% os níveis de acrilamida no produto final processado. Surdyk et al. (2004) observaram que o acréscimo de L-asparagina à massa antes do processamento aumentou drasticamente os níveis de acrilamida no alimento, comprovando-se assim que a L-asparagina é o aminoácido responsável pela formação de acrilamida nos alimentos processados sob altas temperaturas.

12º

Figura 9 - Mecanismo de formação da acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas

Fonte: adaptado de Skog, 2007

Propõe-se que o mecanismo de formação da acrilamida derive da reação de Maillard, ou seja, a reação entre um aminoácido livre (no caso a L-asparagina) com açúcares redutores. Essa reação é essencial para formação da coloração e sabores desejados em alimentos assados e fritos, mas quando a L-asparagina é o aminoácido livre em questão, há a formação da acrilamida. O mecanismo envolvido na formação da acrilamida (Figura 9) inclui a formação de uma base de Schiff a

partir da reação da carbonila reativa do açúcar redutor com a L-asparagina. A descarboxilação da base de Schiff, em uma reação do tipo Strecker, produz um intermediário instável que é hidrolisado em 3-aminopropanoamida. A eliminação posterior de uma molécula de amônio gera a acrilamida (SKOG et al., 2007).

Uma rota secundária para a formação de acrilamida em alimentos ocorre a partir da oxidação de lipídeos. O glicerol, formado a partir da hidrólise dos triacilgliceróis, pode ser termodegradado à acroleína, um importante precursor na síntese da acrilamida. Trata-se de uma rota secundária, mas com destacada importância em alimentos gordurosos e/ou fritos (ARRIBAS-LORENZO; FOGLIANO; MORALES, 2009; KERAMAT et al., 2010).

2.4.2 Uso da L-asparaginase para redução de acrilamida em alimentos

Foram estudados diversos métodos para redução dos níveis de acrilamida em alimentos, mas a maior parte deles acaba inibindo a reação de Maillard, afetando negativamente as propriedades sensoriais dos produtos finais. A reação de Maillard, apesar de produzir acrilamida, também é responsável pela produção das melanoidinas que dão cor e sabor característicos dos alimentos assados e fritos. A vantagem de se aplicar a L-asparaginase no alimento previamente ao cozimento é o de reduzir especificamente a reação de Maillard da L-asparagina com os açúcares redutores que vão produzir a acrilamida, mas sem inibir a formação das melanoidinas que darão características sensoriais desejáveis aos alimentos (AHRNÉ et al., 2007; FRIEDMAN; LEVIN, 2008; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008; KERAMAT et al., 2010; KUKUROVÁ et al., 2009, 2013; MEDEIROS VINCI et al., 2011; MOHAN KUMAR et al., 2013; PEDRESCHI et al., 2011).

Sendo assim, uma formulação de L-asparaginase fúngica específica para aplicação em alimentos foi desenvolvida por um grupo de pesquisadores na Novozymes da Suíça (HENDRIKSEN et al., 2009). Esse grupo foi capaz de clonar a L-asparaginase extracelular pertencente ao fungo *Aspergillus oryzae*, obtendo-se

uma enzima de simples purificação. A enzima foi testada em diversos alimentos, como biscoitos e batatas fritas. O tratamento enzimático foi capaz de reduzir os níveis de acrilamida em todos os produtos testados. Dentre as diversas conclusões do trabalho, os autores determinaram que o branqueamento térmico é um processo essencial para eficácia da L-asparaginase durante o tratamento de batatas fritas. A formulação desenvolvida pelo grupo é comercializada, atualmente, sob o nome de Acrylaway (NOVOZYMES, 2014).

Batatas fritas e *snacks* de batata são fontes importantes para exposição humana à acrilamida (MEDEIROS VINCI et al., 2011). Pedreschi e colaboradores (2011) foram capazes de reduzir os níveis de acrilamida em batatas fritas de 2047 µg/kg para 158 µg/kg após aplicar a L-asparaginase de *A. oryzae* desenvolvida no estudo anterior em conjunto com tratamento de branqueamento térmico. Os autores concluíram, nesse caso, que o branqueamento provoca mudanças estruturais no tecido da batata permitindo uma melhor difusão da L-asparaginase e, conseqüentemente, uma melhor atividade enzimática. Em outro estudo, amostras de batatas fritas tiveram seus níveis de acrilamida reduzidos abaixo dos limites de detecção (12,5 µg/kg) sem alterar nenhuma propriedade sensorial do produto final (MEDEIROS VINCI et al., 2011).

Kukurová e colaboradores (2009) também testaram a L-asparaginase de *A. oryzae* na massa de *rosquillas* espanholas para mitigação dos níveis de acrilamida. Os autores foram capazes de reduzir os níveis de acrilamida de 215 µg/kg (controle) para níveis menores que o limite de detecção (20 µg/kg) ao testar diferentes concentrações da enzima na massa. Parâmetros como cor e sabor do produto final também não foram alterados após o tratamento com L-asparaginase. Em outro estudo mais recente, Kukurová e colaboradores (2013) determinaram que agentes empregados para crescimento da massa influenciam expressivamente na atividade de L-asparaginase ao alterar o pH final da massa. Nesse caso, o pH ótimo para máxima atividade asparaginolítica foi de 6,8.

Ao estudar a influência da L-asparaginase de *A. oryzae* na mitigação de acrilamida em biscoitos gordurosos, determinou-se que a concentração da enzima, tempo e temperatura de incubação são fatores importantes na atividade final da enzima. A composição da massa também é um fator importante, uma vez que o

teor de água e de gordura da massa afetam as interações da enzima com a L-asparagina e da L-asparagina com os açúcares redutores (ANESE et al., 2011).

Apesar de a maior parte dos estudos de L-asparaginase para alimentos aplicarem a enzima produzida por *A. oryzae*, enzimas obtidas a partir do cultivo de outros micro-organismos também têm sido testadas para aplicações alimentícias. Mohan Kumar e Manonmani (2013) produziram, purificaram e caracterizaram uma nova L-asparaginase do fungo *Cladosporium sp.*, que foi capaz de reduzir em até 96% os níveis de acrilamida em *snacks* de batatas. A mesma enzima foi testada para reduzir os níveis de acrilamida em pães de forma, sendo capaz de reduzir em até 97% os níveis desse composto na crosta do pão, onde a reação de Maillard ocorre com maior proeminência (MOHAN KUMAR et al., 2013). Outra L-asparaginase, obtida a partir da clonagem de genes de *Rhizomucor miehei* CAU432 em *E. coli*, também obteve atividade de mitigação de acrilamida semelhante ao produto comercial (HUANG et al., 2014). Por fim, uma enzima bacteriana obtida a partir da clonagem de uma cepa não patogênica de *Bacillus subtilis* também foi capaz de reduzir a acrilamida em batatas fritas (JIA et al., 2013).

2.5 Considerações gerais sobre a produção microbiana de L-asparaginase

As principais fontes microbianas para a produção de L-asparaginase são bactérias, fungos filamentosos e leveduras. No início dos estudos sobre a capacidade antitumoral da L-asparaginase microbiana, Broome (1968) identificou que enzimas de diferentes fontes têm grande variação na sua capacidade de inibir o crescimento de tumores, sendo a L-asparaginase de *E. coli* a enzima que apresentou melhores resultados. Postulou, então, que essa alta capacidade de inibição tumoral foi devida a 3 principais fatores: 1) alta afinidade da enzima pela L-asparagina, traduzida em uma baixa constante de Michaelis-Menten (K_M), o que permite que a enzima mantenha sua atividade mesmo sob as baixas concentrações de L-asparagina encontradas fisiologicamente no sangue; 2) a L-asparaginase de *E. coli* continua altamente ativa mesmo após sua retirada do sangue, possivelmente por sequestro pelas células do fígado; e 3) a meia-vida da enzima é aumentada

quando células de linfoma são implantadas em cobaias. Desde então diversos micro-organismos foram avaliados para obtenção de uma L-asparaginase com maior atividade antitumoral em relação àquela produzida por *E. coli* e que fosse produzida de forma economicamente viável. Considera-se que as novas L-asparaginases a serem utilizadas como medicamento devem possuir atividade farmacológica causando o mínimo de efeitos colaterais. Dessa forma, espera-se que apresentem uma alta afinidade pelo substrato, tempo de meia-vida suficiente para evitar administração de várias doses, baixa imunogenicidade e alta estabilidade. Também postulou-se que uma baixa atividade glutaminolítica cruzada seja importante para evitar o excesso de efeitos colaterais do tratamento com a enzima (NAGARETHINAM et al., 2012).

2.5.1 Aspectos da produção de L-asparaginase por bactérias

As enzimas produzidas pelas enterobactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são as únicas empregadas atualmente nas terapias antileucêmicas com L-asparaginase. Durante os primeiros estudos sobre micro-organismos produtores de L-asparaginase, foram identificadas como produtoras as bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Tetrahymena pyriformis* e *Thermus aquaticus*, uma bactéria termofílica (VERMA et al., 2007). Sabe-se que, em geral, as propriedades bioquímicas e cinéticas das enzimas produzidas por diferentes gêneros de bactérias variam significativamente entre si (PRAKASHAM et al., 2007). Ainda hoje bactérias são os micro-organismos mais estudados para a produção de L-asparaginase, uma vez que são organismos que vem sendo estudados para esse fim há muito tempo. A seguir são citados os principais avanços na área de produção bacteriana de L-asparaginase nos últimos anos e algumas conclusões obtidas nos estudos.

Especula-se ainda hoje quais as principais condições de cultivo que influenciam na produção de L-asparaginase por bactérias e os mecanismos pelos quais isso ocorre. Relatou-se que a síntese de L-asparaginase por *E. coli* foi

suprimida quando ao se acrescentar 0,5% de glicose ao meio. Concluiu-se, nesse caso, que a glicose causou repressão catabólica dos componentes envolvidos no transporte de lactato, sendo o lactato um fator que estimula a síntese de L-asparaginase (VERMA et al., 2007). Geckil e colaboradores (2006) propuseram que bactérias fermentativas, em geral, têm a síntese de L-asparaginase reprimida por concentrações elevadas de glicose devido à formação de ácidos, que reduzem o pH de cultivo, e devido à repressão catabólica, principalmente ao reduzir os níveis de AMPc intracelular. Acredita-se que a L-asparaginase seja sintetizada em anaerobiose em *E. coli* devido à indução da proteína redutora de fumarato e nitrato e regulação positiva pela proteína receptora de AMPc. Verma e colaboradores (2007) citaram que ácidos orgânicos e os aminoácidos L-leucina e L-metionina aumentaram a síntese de L-asparaginase por *E. coli*. O mecanismo de regulação da produção de L-asparaginase por *Staphylococcus aureus* foi estudado por Rozalska e Mickucki (1992), em que fontes de carbono como sacarose, maltose, galactose, lactose, manitol e manose inibiram a produção de L-asparaginase. Por outro lado, a sua produção foi estimulada quando o meio foi suplementado com AMPc exógeno.

Uma cepa de *Enterobacter aerogenes* recombinante capaz de expressar hemoglobina de *Vitreoscilla sp.* (VHb) apresentou produção de L-asparaginase reduzida em dez vezes em comparação com a cepa selvagem. Nesse estudo a concentração de glicose superior a 1% causou inibição quase completa da produção da enzima (GECKIL; GENCER, 2004). Ao contrário da *E. aerogenes*, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* recombinante expressando o VHb foi capaz de produzir mais L-asparaginase do que a cepa selvagem e a glicose tornou-se um indutor da produção ao invés de inibidor. Os autores concluíram que, possivelmente, bactérias com metabolismo aeróbico não sofrem as mesmas repressões catabólicas na síntese de L-asparaginase que as bactérias com metabolismo anaeróbico, como *E. coli* e *E. aerogenes* (GECKIL et al., 2006).

A suplementação do meio de cultivo com 6% de n-dodecano foi capaz de manter a concentração de O₂ dissolvido acima de 80% durante todo o processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *E. coli*. Obteve-se, assim, aumento da concentração celular em 12,7% e aumento da produção de L-

asparaginase em 21%, chegando-se a 60,8 U.mL⁻¹ (WEI; LIU, 1998). Nawaz e colaboradores (1998) utilizaram meios contendo L-asparagina como única fonte de nitrogênio para isolar bactérias capazes de sintetizar L-asparaginase. Neste estudo, um dos isolados, identificado como sendo da espécie *Enterobacter cloacae*, foi capaz de produzir 35 U.mg⁻¹ de L-asparaginase em meio de cultivo contendo 0,4% de frutose e suplementado com L-asparagina como única fonte de nitrogênio. Os autores ressaltaram, também, a capacidade do *E. cloacae* em produzir L-asparaginase sem o uso da L-asparagina como indutor.

Uma bactéria pertencente ao gênero *Erwinia sp.* foi isolada na Índia e testada frente à sua capacidade de produção de L-asparaginase. Após os estudos, obteve-se uma enzima com pH ótimo de atividade entre 8 e 9, K_M de 0,22 mM e temperatura ótima de atividade de 40 °C. A produção de L-asparaginase foi superior empregando-se manitol como única fonte de carbono e com os aminoácidos L-asparagina, L-glutamina, L-arginina e L-alanina como indutores (BORKOTAKY; BEZBARUAH, 2002). Em outro trabalho, Prakasham e colaboradores (2007) utilizaram o desenho experimental de Taguchi para obter um aumento de 9 vezes na produção de L-asparaginase por uma cepa de *Staphylococcus sp.* Identificou-se a temperatura de incubação, concentração de inóculo, pH inicial, concentração de glicose e de cloreto de amônio como sendo os principais fatores que influenciam a produção de L-asparaginase. Outros estudos mais recentes de seleção e otimização da produção de L-asparaginase periplasmática sob fermentação submersa por bactérias encontram-se reportados na Tabela 2.

Em outros estudos, alguns autores empregaram a técnica de fermentação em estado sólido (FES) para produção de L-asparaginase por bactérias. Abdel-Fattah e Olama (2002) empregaram a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para produção da enzima e, como substrato sólido, o farelo de soja. A produção enzimática foi otimizada a partir dos planejamentos fatoriais de Plackett-Burman e Box-Behnken. Obteve-se a atividade enzimática máxima (142,8 U) nas condições de pH inicial de 7,9, utilizando hidrolisado de caseína e milhocina nas concentrações de 3,11% e 3,68%, respectivamente. El-Bessoumy, Sarhan e Mansour (2003) foram capazes de produzir e purificar a L-asparaginase de *Pseudomonas aeruginosa* sob fermentação em estado sólido, obtendo-se uma

enzima purificada com atividade específica de 1900 U.mg⁻¹. Os autores ainda concluíram que esta L-asparaginase apresentou peso molecular de 160 kDa e K_M de 0,147 mM. Recentemente, a produção de L-asparaginase por *Serratia marcescens* sob FES utilizando resíduos da produção de óleo de gergelim como único substrato alcançou rendimento de 110,8 U por grama de substrato seco (VUDDARAJU et al., 2010). Em outro estudo empregando *Serratia marcescens*. Hymavathi et al. (2009) testaram diversos substratos sólidos para produção de L-asparaginase por *Bacillus circulans* sob FES. A casca de feijão-guandu gerou os melhores resultados, alcançando rendimento de 2322 U por grama de substrato seco sob condições otimizadas.

Tabela 2 – Produção de L-asparaginase por bactérias em meio líquido

Espécie de Bactéria	Atividade máxima de L-asparaginase obtida	Referência
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	27,88 U.mg ⁻¹	(KUMAR; PAKSHIRAJAN; VENKATA DASU, 2009)
<i>Serratia marcescens</i> SB08	256,91 U.mL ⁻¹	(VENIL; NANTHAKUMAR; KARTHIKEYAN, 2009)
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	2,282 U.mL ⁻¹	(ARRIVUKKARASAN et al., 2010)
<i>Bacillus circulans</i>	85 U.mL ⁻¹	(PRAKASHAM et al., 2010)
<i>Serratia marcescens</i> SK07	29,89 U.mg ⁻¹	(AGARWAL; KUMAR; VEERANKI, 2011)
<i>Streptomyces noursei</i> MTCC 10469	0,803 U.mg ⁻¹	(DHARMARAJ, 2011)
<i>Bacillus</i> sp. BCCS 034	1,64 U.mL ⁻¹	(EBRAHIMINEZHAD; RASOUL-AMINI; GHASEMI, 2011)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC 1428	35,24 U.mg ⁻¹	(KUMAR; VEERANKI; PAKSHIRAJAN, 2011)
<i>Streptomyces parvulus</i> KUA106	146 U.mL ⁻¹	(USHA et al., 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> hswx88	23,8 U.mL ⁻¹	(PRADHAN; DASH; SAHOO, 2013)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf1 UV60 (mutante)	168,4 U.mL ⁻¹	(PREMA; NARMADHA DEVI; ALAGUMANIKUMARAN, 2013)
<i>Streptomyces ginsengisoli</i>	3,32 U.mL ⁻¹	(DESHPANDE; CHOUBEY; AGASHE, 2014)

Fonte: arquivo pessoal

Apesar de relativamente semelhantes em sua estrutura, as diversas L-asparaginases produzidas por diferentes bactérias variam nas suas propriedades cinéticas e termodinâmicas (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001). A Tabela 3 reúne alguns dados sobre a caracterização de algumas L-asparaginases bacterianas.

Tabela 3 - Propriedades bioquímicas de algumas L-asparaginases bacterianas

Espécie de Bactéria	Km (mM)	pH_{ótimo}	T_{ótima} (°C)	Referência
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	8,5	37 - 42	(NAWAZ et al., 1998)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0,01	-	-	(AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001)
<i>Erwinia sp.</i>	-	8,5	40	(BORKOTAKY; BEZBARUAH, 2002)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 50071	0,147	9,0	37	(EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	12	9,0	85	(BANSAL et al., 2010)
<i>Streptomyces thermoluteus</i> NBRC 14270	1,83	8,0 - 9,0	63,6	(HATANAKA et al., 2011)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0,017	8,0	60	(POKROVSKII et al., 2012)
Enterobactéria termotolerante	0,89	6,0 - 7,0	37	(VIDYA; PANDEY, 2012)
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	5,5	9,2	85	(CHOHAN; RASHID, 2013)
<i>Bacillus aryabhatai</i> ITBHU02	0,257	8,5	40	(SINGH et al., 2013)

Fonte: arquivo pessoal

Apesar de amplamente estudadas, ainda há muita discrepância sobre os fatores capazes de induzir ou inibir a produção de L-asparaginase por bactérias. Nesse caso, as diferentes formas de conduzir o processo e, principalmente, o gênero e espécie das bactérias estudadas fornecem resultados bastante

divergentes. Por fim, sabe-se que técnicas de biologia molecular são essenciais para aumentar a produtividade dessa enzima, bem como facilitar sua purificação.

2.5.2 Produção de L-asparaginase por fungos

Atualmente todas as L-asparaginases comerciais empregadas como antileucêmicos são de origem bacteriana. Entretanto, existem diversas vantagens ao se aplicar a L-asparaginase de origem fúngica como fármaco, tanto aquelas obtidas por cultivo de fungos filamentosos quanto de leveduras, tornando-as alvo de grande interesse de pesquisa para fins terapêuticos. Por ser produzida por um micro-organismo eucariótico, a L-asparaginase fúngica tem menor imunogenicidade devido às mudanças pós-traducionais que sofrem, sendo mais semelhantes às proteínas humanas. Também, apesar de haver discussão entre a natureza periplasmática ou extracelular da L-asparaginase fúngica, muitos autores acreditam que a enzima é produzida de forma extracelular, facilitando os processos de purificação posteriores (HOSAMANI; KALIWAL, 2011; VAN DEN BERG, 2011; VERMA et al., 2007).

Baseado nessas considerações, as pesquisas atuais fortalecem a importância da L-asparaginase de origem fúngica, inclusive em produtos comerciais como o Acrylaway®. Por serem micro-organismos GRAS e de fácil cultivo, as L-asparaginases de fungos (leveduras e fungos filamentosos) podem ser amplamente aplicadas na indústria alimentícia. Na área farmacêutica, estudos indicam, ainda, a potencialidade da enzima L-asparaginase de *Saccharomyces cerevisiae* ao ser aplicada como biofármaco (FERRARA et al., 2004, 2006, 2010).

2.5.2.1 Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos

Durante os primeiros estudos para se obter L-asparaginases microbianas, Imada e colaboradores (1973) realizaram um amplo *screening* de fungos filamentosos dentre outros micro-organismos, detectando-se a produção de L-asparaginase nos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Tilachlidum*, *Verticillium*, *Hypomyces* e *Nectria*. Detectaram, também, que fungos basidiomicetos e ficomicetos apresentam baixa ou nenhuma produção de L-asparaginase. O primeiro fungo basidiomiceto produtor de L-asparaginase foi descrito por Eisele e colaboradores (2011), o *Flammulina velutipes*, obtendo atividades enzimáticas de 16 U.mL⁻¹ em cultivo submerso. A enzima do *F. velutipes* apresentou atividade asparaginolítica cinco vezes superior à atividade glutaminolítica. O pH ótimo de atividade dessa enzima foi de 7,0 e a temperatura ótima de 40 °C.

Sarquis e colaboradores (2004) avaliaram a produção de L-asparaginase por duas espécies de fungos filamentosos, *Aspergillus tamaraii* e *Aspergillus terreus*, em fermentação submersa. Durante esse estudo, os autores obtiveram uma produção de L-asparaginase por *A. terreus* de 58,8 U.L⁻¹ e de 38 U.L⁻¹ por *A. tamaraii* e foram capazes de concluir que a produção da enzima está sob regulação direta da fonte de nitrogênio. Shrivastava e colaboradores (2010) realizaram um *screening* para identificar novos fungos produtores de L-asparaginase. Foram testadas trezentas cepas isoladas de diversas frutas e vegetais, sendo selecionada uma cepa de *Fusarium sp.*, isolada de pimentões verdes, capaz de produzir a maior atividade específica de L-asparaginase (273 U.mg⁻¹). Outras espécies como *Aspergillus flavus*, *Absidia sp.*, *Penicilium sp.* e *Mucor sp.* também foram identificados como produtores da enzima. Em outro estudo de *screening* de fungos produtores de L-asparaginase, selecionou-se uma cepa de *Aspergillus terreus* capaz de produzir 9,3 U.mL⁻¹ de L-asparaginase (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012).

Estudos de otimização da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos também foram realizados. Gurunathan e Sahadevan (2012)

otimizaram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* sob fermentação submersa, obtendo-se concentração enzimática de 44,38 U.mL⁻¹. Em outro estudo de otimização de produção de L-asparaginase, dessa vez por *Aspergillus niger*, obteve-se em uma produção de 2,83 U.mL⁻¹ através de fermentação submersa. Concluiu-se que o uso de glicose acima da concentração de 1% inibiu a produção da enzima (ZIA et al., 2013).

A fermentação em estado sólido (FES) é uma promissora estratégia para o cultivo de fungos filamentosos, uma vez que permite a produção da enzima em altas concentrações, sob baixo custo, com meios de fermentação simples e baixo emprego de água. Também, a FES simula de maneira melhor o *habitat* natural dos fungos filamentosos e o substrato sólido serve como ancoragem para suas hifas (PANDEY, 2003). Mishra (2006) empregou o fungo filamentoso *Aspergillus niger* sob FES utilizando casca de feijão-guandu como substrato sólido, obtendo-se rendimento de 40,9 U por grama de substrato seco. Por outro lado, o fungo *Fusarium equiseti* produziu 8,51 U por grama de substrato sólido em condições otimizadas, utilizando o farelo de soja como substrato para FES (HOSAMANI; KALIWAL, 2011). Em estudo recente, Mohan Kumar, Ramasamy e Manonmani (2013) empregaram o fungo filamentoso *Cladosporium sp.* em FES utilizando farelo de trigo como substrato, obtendo-se o rendimento de 3,74 U por grama de substrato seco sob condições otimizadas. Em um *screening* de cepas de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase realizado por Rani, Sundaram e Vasantha (2012), foi selecionada uma cepa de *Penicillium sp.* como melhor produtora dessa enzima. Estes autores reportaram, também, rendimento de 70,67 U por grama de substrato seco ao empregar essa cepa em FES utilizando a casca de laranja como substrato. O emprego de reatores para FES foi avaliado por Uppuluri et al. (2013). Nesse caso empregou-se um reator de coluna e, como substrato, resíduos da produção do óleo de gergelim. Após otimização do processo, obteve-se rendimento de L-asparaginase de 310 U por grama de substrato seco.

Em geral as enzimas fúngicas possuem uma menor afinidade pela L-asparagina quando comparadas às enzimas bacterianas. Sabe-se que as enzimas bacterianas com atividade antileucêmica possuem K_M na ordem de 10^{-5} M. As enzimas fúngicas possuem K_M bastante variável, mas em geral encontram-se na

ordem de 10^{-1} a 10^{-3} M, valores muito superiores àqueles das enzimas de *E. coli* e de *E. chrysanthemi* (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001; MOHAN KUMAR; SOBHA, 2012; VAN DEN BERG, 2011; VERMA et al., 2007). Mohan Kumar e Sobha (2012) reportaram a necessidade por uma alta afinidade pela L-asparagina para que a L-asparaginase possua função antitumoral, mas Van den Berg (2011) e Müller e Boos (1998) reforçaram que a afinidade pelo substrato é apenas parte dos requisitos para atividade antitumoral, sendo o tempo de meia-vida no organismo outro fator importante para que essa enzima possua ação terapêutica.

A caracterização bioquímica de algumas L-asparaginases de fungos filamentosos foi realizada (ELSHAFEI et al., 2010; ELZAINY; ALI, 2006; ITO; MATSUSHIMA; KOYAMA, 2012; MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013; SCHEETZ; WHELAN, WRISTON, 1971). A enzima L-asparaginase produzida pelo fungo *Fusarium tricinctum* apresentou a maior afinidade pela L-asparagina reportada até o momento para fungos filamentosos, com K_M na ordem de $5,2 \cdot 10^{-5}$ M. Entretanto, mesmo com alta afinidade, essa enzima não foi capaz de inibir o desenvolvimento de tumores implantados em cobaias (SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971). Elzainy e Ali (2006) caracterizaram a L-asparaginase produzida por *Aspergillus niger*, observando um K_M de $2,57 \cdot 10^{-3}$ M para a L-asparagina. A enzima também apresentou 70% de atividade glutaminolítica em comparação com a atividade asparaginolítica. Elshafei e colaboradores (2010) reportaram um K_M de $1,05 \cdot 10^{-3}$ para a L-asparaginase de *Penicillium brevicompactum*, bem como pH ótimo de atividade 8,0 e temperatura ótima de 37 °C. Uma nova L-asparaginase de *Aspergillus sojae* foi recentemente caracterizada, apresentando atividade asparaginolítica na mesma ordem de grandeza que a atividade glutaminolítica. O K_M para a L-asparagina foi de $8,03 \cdot 10^{-3}$ M e o K_M para a L-glutamina foi de $5,22 \cdot 10^{-3}$ M (ITO; MATSUSHIMA; KOYAMA, 2012). Mohan Kumar e Manonmani (2013) caracterizaram a L-asparaginase de *Cladosporium sp.*, observando-se um K_M de 100 mM, pH ótimo de atividade 6,3 e temperatura ótima de 30 °C.

2.5.2.2 Produção de L-asparaginase por leveduras

Leveduras são importantes candidatas à produção de novas L-asparaginases, entretanto poucas enzimas de leveduras foram estudadas e caracterizadas em detalhes (VERMA et al., 2007). Durante os primeiros estudos da inibição tumoral por L-asparaginases microbianas, a enzima de *Saccharomyces cerevisiae* foi testada juntamente com enzimas de diversos micro-organismos. Entretanto, verificou-se que as enzimas de *S. cerevisiae* foram incapazes de inibir o crescimento de linfomas em cobaias. A ineficácia dessa enzima, segundo o autor, foi devida ao rápido *clearance* hepático que sofreu, ao contrário da enzima de *E. coli*, que permaneceu ativa no sangue das cobaias por diversos dias (BROOME, 1965). Imada e colaboradores (1973) realizaram um amplo *screening* de bactérias, fungos e leveduras para determinar quais micro-organismos seriam capazes produzir altas quantidades de L-asparaginase. Dentre as 1326 leveduras testadas, cerca de 12% demonstraram atividade asparaginolítica extracelular. As principais leveduras produtoras pertenciam às espécies *Candida utilis*, *Hansenula jadinii*, *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus albidus* e *Sporobolomyces roseus*. Estes autores não testaram a produção de L-asparaginase periplasmática nos micro-organismos avaliados.

A levedura *Torula* (*Candida utilis*) é bastante empregada como suplemento alimentar animal devido ao seu rápido crescimento em substratos de baixo custo e seu alto valor nutricional (OLVERA-NOVOA; MARTÍNEZ-PALACIOS; OLIVERA-CASTILLO, 2002). O interesse pela L-asparaginase da *C. utilis* iniciou-se quando Arima e colaboradores (1972) detectaram produção de L-asparaginase extracelular na concentração de 53 U.mL⁻¹ por uma cepa dessa levedura. Por sua vez, Sakamoto e colaboradores (1977) identificaram uma L-asparaginase periplasmática produzida por *C. utilis*. Em seguida, purificaram, caracterizaram e avaliaram a sua atividade antitumoral. A enzima apresentou uma massa molecular estimada de 480 kDa e K_M de 7,7.10⁻⁵ M, mas foi pouco eficaz ao inibir o crescimento de tumores de cobaias, sendo seu *clearance* hepático muito mais rápido que o controle (L-asparaginase de *E. coli*). Uma técnica para extração eficaz da L-asparaginase presente no espaço periplasmático da *C. utilis* foi estabelecida

por Kil, Kim e Park (1995) utilizando-se solução de 2-mercaptoetanol, obtendo-se 82% de recuperação da enzima.

As leveduras do gênero *Rhodotorula* são organismos basidiomicetos presentes naturalmente no solo. A maior parte das espécies pertencentes ao gênero não é patogênica, mas a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* já foi isolada de diversas infecções humanas (BISWAS et al., 2001). Foda, Zedan e Hashem (1980) reportaram a produção de L-asparaginase periplasmática por *Rhodotorula rubra*. Estes autores concluíram que há indução da produção da L-asparaginase pelos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina e inibição por certas fontes de carbono como glicose, sacarose e lactose. A enzima apresentou K_m de $1,37 \cdot 10^{-2}$ M para a L-asparagina e 65% de atividade glutaminolítica. A levedura *Rhodospiridium toruloides* é um basidiomiceto oleaginoso isolado da madeira de coníferas. Essa levedura produziu uma L-asparaginase com K_m para L-asparagina de $1,43 \cdot 10^{-3}$ M e de $6,45 \cdot 10^{-3}$ M para L-glutamina. O pH e a temperatura ótimos da enzima foram 6,35 e 37 °C, respectivamente (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui dois tipos de L-asparaginase, uma intracelular (L-asparaginase I) e outra periplasmática (L-asparaginase-II). A L-asparaginase I tem expressão constitutiva e é codificada pelo gene *ASP1*. A L-asparaginase II é codificada pelo gene *ASP3* e sua produção é regulada através das fontes de nitrogênio disponíveis. A L-asparaginase II possui maior viabilidade para aplicação em medicamentos devido ao seu baixo K_M ($3,5 \cdot 10^{-4}$) e estabilidade, além de atividade mais próxima do pH fisiológico. Essa enzima possui 362 resíduos de aminoácidos e apresenta massa molecular de 38 kDa (FERRARA, 2004). A produção de L-asparaginase II de *S. cerevisiae* alcançou apenas $115 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, portanto realizou-se a clonagem do gene *ASP3* em *Pichia pastoris* para uma maior produção enzimática. Nesse caso alcançou-se a produção de $800 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ em cultivo de alta densidade celular. A extração dessa enzima, presente no espaço periplasmático da levedura *Pichia pastoris*, também foi realizada com sucesso (FERRARA et al., 2004, 2006, 2010).

Considerando as potencialidades da aplicação da L-asparaginase e da sua produção por micro-organismos eucarióticos, como as leveduras, este trabalho descreve processos de seleção de novas leveduras produtoras desta enzima, bem

como aspectos importantes durante sua produção, como cinética e indução da produção por aminoácidos. A literatura consultada mostrou-se ainda restrita em relação aos estudos sobre a produção de L-asparaginase por leveduras, sendo este, portanto, um trabalho importante para o desenvolvimento dessa área de pesquisa.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar métodos de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase, selecionando aquelas com destacada produção da enzima e determinar aspectos importantes da sua produção.

3.2 Específicos

- Avaliar a aplicabilidade dos métodos de Nessler e da hidroxilamina para a determinação da atividade de L-asparaginase periplasmática e extracelular;
- Avaliar a produção de L-asparaginase de natureza periplasmática e extracelular em leveduras cultivadas sob fermentação submersa para selecioná-las para estudos posteriores;
- Avaliar a metodologia de *screening* em meio sólido empregando placas de Petri com meios sólidos diferenciais, comparando sua viabilidade frente ao *screening* quantitativo em meio líquido ao apontar micro-organismos potencialmente produtores de L-asparaginase;
- Verificar a influência dos aminoácidos L-asparagina, L-glutamina e L-prolina na indução da produção de L-asparaginase por leveduras selecionadas;
- Verificar a cinética de produção da L-asparaginase periplasmática durante 144 horas empregando as leveduras selecionadas em meio contendo L-asparagina como indutor da produção enzimática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Leveduras empregados no trabalho

Para os ensaios de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase, foram empregadas 40 cepas pertencentes ao banco de leveduras do laboratório do prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, devidamente codificadas de acordo com a Tabela 4. As leveduras foram conservadas em placas de Petri contendo o meio YMA sólido em geladeira a 4 °C, sendo feitos repiques semestrais para manter a viabilidade dos micro-organismos. A ativação das leveduras previamente aos cultivos foi realizada em meio YMA líquido.

4.1.2 Meios de cultivo empregados no trabalho

Os meios de cultivo descritos na Tabela 5 foram empregados para manutenção dos micro-organismos (meio YMA e PDA sólidos), ativação dos micro-organismos (meio YMA líquido), seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido (meios ABRA e ABRC) e ensaios de seleção de micro-organismos em meio líquido, bem como ensaios de influência da adição de aminoácidos e cinética de produção de L-asparaginase (meios CDR, CDP e derivados). Nos ensaios para verificar a influência de diferentes aminoácidos na produção de L-asparaginase, o meio CDR foi alterado, substituindo-se a L-asparagina da sua composição pelos aminoácidos L-glutamina e L-prolina a serem testados. A composição dos meios empregados nesse ensaio estão descritos com na Tabela 6. A esterilização de todos os meios de cultivo foi realizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos, sendo separada a fração contendo glicose das demais para evitar reações de degradação dos componentes do meio.

Tabela 4 - Leveduras empregados no processo de seleção no presente trabalho

Código	Nome da levedura
SSS01	<i>Candida shehateae</i>
SSS02	<i>Trichosporon mucoides</i>
SSS03	<i>Trichosporon mucoides</i>
SSS04	<i>Trichosporon moniliiforme</i>
SSS05	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
SSS06	<i>Issatchenkia orientalis</i>
SSS07	<i>Candida sp.</i>
SSS08	<i>Issatchenkia orientalis</i>
SSS10	<i>Pichia ofunaensis</i>
SSS11	<i>Trichosporon mucoides</i>
SSS12	<i>Candida guilliermondii</i>
SSS13	<i>Candida shehateae</i>
SSS14	<i>Spathaspora arborarie sp.</i>
SSS15	<i>Candida shehateae</i>
SSS16	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
SSS17	<i>Candida shehateae</i>
SSS18	<i>Pichia stipitis</i>
SSS19	<i>Issatchenkia occidentalis sp.</i>
SSS20	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
SSS21	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
SSS22	<i>Spathaspora sp.</i>
SSS23	<i>Spathaspora sp.</i>
SSS24	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
SSS25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSS26	<i>Spathaspora sp.</i>
SSS27	<i>Spathaspora sp.</i>
SSS28	<i>Candida shehateae</i>
SSS29	<i>Pichia stipitis</i>
SSS30	<i>Trichosporon mucoides</i>
SSS31	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
SSS32	<i>Candida utilis</i>
SSS33	<i>Aureobasidium sp.</i>
SSS34	<i>Aureobasidium sp.</i>
SSS37	<i>Pichia kudriavzevii</i>
SSS38	<i>Pichia kudriavzevii</i>
SSS39	<i>Pichia kudriavzevii</i>
SSS40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSS41	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSS42	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSS43	<i>Rhodotorula glutinis</i>

Fonte: arquivo pessoal

Tabela 5 – Meios de cultivo empregados nos processos de manutenção e ativação dos micro-organismos e nos ensaios para seleção e produção de L-asparaginase

	YMA sólido	YMA líquido	PDA	ABRA	ABRC	CDR	CDP
Glicose	1%	1%	2%	2%	2%	2%	0,2%
Extrato de malte	0,3%	0,3%	-	-	-	-	-
Extrato de levedura	0,3%	0,3%	-	-	-	-	-
Peptona	0,5%	0,5%	-	-	-	-	-
Extrato de batata	-	-	0,4%	-	-	-	-
L-asparagina	-	-	-	2%	-	1%	1%
KH ₂ PO ₄	-	-	-	0,2%	0,2%	0,052%	0,052%
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	0,6%	0,6%	-	-
NaCl	-	-	-	0,05%	0,05%	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	0,02%	0,02%	0,052%	0,052%
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	-	5.10 ⁻⁴ %	5.10 ⁻⁴ %	-	-
Azul de bromotimol	-	-	-	0,007%	0,007%	-	-
KCl	-	-	-	-	-	0,052%	0,052%
ZnSO ₄	-	-	-	-	-	1.10 ⁻⁴ %	1.10 ⁻⁴ %
NH ₄ NO ₃	-	-	-	-	-	0,4%	-
Ágar	2%	-	1,5%	2%	2%	-	-
pH final	5,0	5,0	5,5	5,5	5,5	6,5	6,5

Fonte: arquivo pessoal

Tabela 6 – Composição dos meios empregados no ensaio de influência de aminoácidos na produção de L-asparaginase

	Glicose	L-asparagina	L-glutamina	L-prolina	KH₂PO₄ KCl MgSO₄	NH₄NO₃	ZnSO₄
CDAsp	2%	1%	-	-	0,052%	-	1.10 ⁻⁴ %
CDAspN	2%	1%	-	-	0,052%	0,4%	1.10 ⁻⁴ %
CDGlut	2%	-	1%	-	0,052%	-	1.10 ⁻⁴ %
CDGlutN	2%	-	1%	-	0,052%	0,4%	1.10 ⁻⁴ %
CDProl	2%	-	-	1%	0,052%	-	1.10 ⁻⁴ %
CDProlN	2%	-	-	1%	0,052%	0,4%	1.10 ⁻⁴ %
CDN	2%	-	-	-	0,052%	0,4%	1.10 ⁻⁴ %

Fonte: arquivo pessoal

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da atividade enzimática extracelular pelo método de Nessler

A metodologia empregada nos ensaios de atividade de L-asparaginase empregando-se o reativo de Nessler foi proposta pela Sigma-Aldrich (1997). Os reativos utilizados para a reação foram: tampão Tris-HCl (50 mM) com pH 8,6; solução de L-asparagina (189 mM); solução padrão de sulfato de amônio (6 mM); ácido tricloroacético (1,5 M); e reativo de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato de potássio). Foram separados os tubos teste e o tubo branco. Em seguida foram pipetados 1 mL de tampão Tris-HCl, 100 µL de solução de L-asparagina e 900 µL de água deionizada em cada um dos tubos. Os tubos foram então estabilizados a 37 °C em banho-maria e 100 µL do extrato enzimático foi acrescentado nos tubos de teste. Após 30 minutos, a reação nos tubos foi interrompida com a solução de ácido tricloroacético e, então, o extrato enzimático foi acrescentado ao tubo branco. Caso houvesse formação de precipitado durante a reação, os tubos eram centrifugados a 2.000 x g por 15 minutos. A seguir, 200 µL do sobrenadante foram diluídos em 4,3 mL de água deionizada. Por fim acrescentou-se 500 µL do reativo de Nessler e procedeu-se à leitura imediata em espectrofotômetro no comprimento de onda de 436 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata.

A curva de calibração foi feita a cada vez que se realizou o ensaio de atividade enzimática. Foram separados, em triplicata, os tubos P1, P2, P3 e PB. Em cada um deles foi acrescentado 1 mL do tampão Tris. Acrescentou-se a eles, então, 250, 500 e 1000 µL da solução de sulfato de amônio, respectivamente, nos tubos P1, P2 e P3. No tubo PB não se acrescentou solução de sulfato de amônio. Então 850, 650, 100 µL e 1100 µL de água deionizada foi adicionada aos tubos P1, P2, P3 e PB, respectivamente. Por fim, 200 µL de cada um dos tubos foram diluídos em 4,3 mL de água deionizada e adicionou-se 500 µL do reativo de Nessler.

Procedeu-se, então, à leitura imediata em espectrofotômetro a 436 nm. Os tubos P1, P2 e P3 contém, respectivamente, 0,27, 0,55 e 1,1 μmol de amônio.

Correlacionou-se a curva padrão com a absorbância obtida nos testes, obtendo-se assim a quantidade de amônio (em μmol) liberada nos ensaios. A partir desse valor, procedeu-se o cálculo de atividade enzimática (em U.mL^{-1}) de acordo com a Equação 1. Definiu-se 1 unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de NH_4^+ por minuto de ensaio.

$$\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{)} = \mu\text{mol NH}_4^+ \times 3,66 \quad (1)$$

4.2.2 Determinação da atividade enzimática periplasmática pelo método de Nessler

A atividade asparaginolítica periplasmática foi feita adaptando-se a metodologia empregada por Ferrara (2004) para o uso do reativo de Nessler (item 4.2.1). As células retiradas do cultivo foram lavadas com tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,0) e diluídas até obtenção de concentração celular aproximada 0,5 mg.mL^{-1} de acordo com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 600 nm). Então 4 mL da suspensão celular foram incubados em 1 mL de solução de L-asparagina (50 mM). Após 30 minutos de incubação, os tubos foram centrifugados (2.000 x g por 15 minutos) e acrescentados ao sobrenadante 500 μL do reativo de Nessler. A leitura em espectrofotômetro foi realizada imediatamente sob comprimento de onda de 436 nm, utilizando-se como branco apenas o tampão fosfato de potássio 20 mM. A curva padrão utilizada foi a mesma descrita no item 4.2.1.

A equação para cálculo da atividade enzimática periplasmática (em U.mg^{-1}) é descrita pela Equação 2, sendo $F_{\text{Diluição}}$ o número de vezes que a suspensão celular foi diluída do obtido inicialmente para obtenção da concentração celular

$C_{\text{células}}$ (em mg/mL). Define-se 1 U como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de NH_4^+ por minuto de ensaio.

$$\text{Atividade (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\mu\text{mol NH}_3 \times F_{\text{Diluição}}}{0,046 \times C_{\text{Células}}} \quad (2)$$

4.2.3 Determinação da atividade enzimática extracelular pelo método da hidroxilamina

O protocolo de atividade enzimática pelo método da hidroxilamina adotado para a realização desse trabalho foi adaptado de Drainas, Kinghorn e Pateman (1977). Os reagentes necessários para a atividade enzimática pelo método da hidroxilamina foram: tampão Tris HCl 20 mM (pH 8,6), solução 100 mM de L-asparagina, solução 1 M de hidroxilamina (pH 7,0) e solução de cor, composta por 5% de FeCl_3 e 2,5% de ácido tricloroacético.

Para realização do ensaio, primeiramente foram separados tubos de ensaio “teste” e tubos de ensaio “branco”. Nos tubos “teste”, foram adicionados 0,3 mL de tampão Tris HCl 20 mM, 0,1 mL de solução L-asparagina 100 mM, 0,1 mL da solução de hidroxilamina 1 M e 0,5 mL do extrato enzimático para determinação da atividade enzimática. Em seguida, os tubos “teste” foram incubados a 37 °C por 30 minutos em banho-maria. A reação foi então interrompida com 0,25 mL da solução de cor. Finalmente, os tubos foram lidos em espectrofotômetro a 500 nm contra os tubos “brancos”. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Os tubos “brancos” foram preparados adicionando-se a estes 0,3 mL de tampão Tris HCl 20 mM, 0,1 mL de solução de L-asparagina 100 mM e 0,1 mL da solução de hidroxilamina 1 M. Após incubação a 37 °C por 30 minutos, acrescentou-se a estes tubos 0,25 mL da solução de cor e, então, 0,5 mL da amostra de extrato enzimático. A leitura dos tubos “branco” foram realizadas a 500 nm e subtraídas dos tubos teste para se obter o resultado final da concentração de AHA, obtendo-se assim a atividade enzimática.

A curva de calibração para a metodologia foi feita a partir de diluições de solução padrão de ácido β -hidroxil aspártico (AHA) 5 mM de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 – Preparo das soluções padrão para calibração do ensaio de atividade de L-asparaginase pelo método da hidroxilamina

Soluções	μmol de AHA	Volume de padrão AHA 5 mM (μL)	Volume de tampão Tris HCl 20 mM (mL)	Volume da solução de cor (mL)
Branco	0,0	0	2,000	0,50
Padrão 1	0,1	20	1,980	0,50
Padrão 2	0,25	50	1,950	0,50
Padrão 3	0,50	100	1,900	0,50
Padrão 4	0,75	150	1,850	0,50
Padrão 5	1,0	200	1,800	0,50
Padrão 6	1,5	300	1,700	0,50
Padrão 7	2,0	400	1,600	0,50
Padrão 8	3,0	600	1,400	0,50

Fonte: arquivo pessoal

A quantificação da atividade de L-asparaginase extracelular foi calculada de acordo com a Equação 3. Definiu-se 1 unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima capaz de catalisar 1 μmol de AHA por minuto de ensaio.

$$\text{Atividade (U.mL}^{-1}\text{)} = \mu\text{mol AHA} \times 0,083 \quad (3)$$

4.2.4 Determinação da atividade enzimática periplasmática pelo método da hidroxilamina

A atividade enzimática periplasmática é usada para quantificar as enzimas que estão ligadas às células intactas e que não foram secretadas para o meio extracelular. A metodologia empregada para este ensaio foi adaptada a partir da metodologia de atividade de L-asparaginase extracelular descrita no item 4.2.3. O ensaio foi realizado com suspensão de células intactas previamente lavadas em tampão fosfato pH 7,0 e diluídas até obtenção da concentração aproximada de 0,5 mg/mL. Assim como no ensaio de asparaginase extracelular, empregaram-se como reagentes o tampão Tris HCl 20 mM (pH 8,6), solução 100 mM de L-asparagina, solução 1 M de hidroxilamina (pH 7,0) e solução de cor, composta por 5% de FeCl_3 e 2,5% de ácido tricloroacético. Foram divididas duas séries de tubos: “teste” e “branco”. Nos tubos “teste”, acrescentou-se 0,6 mL de tampão Tris HCl 20 mM, 0,2 mL da solução de L-asparagina 100 mM, 0,2 mL da solução de hidroxilamina 1 M e 1,0 mL da suspensão de células. Então, a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, então, 0,5 mL da solução de cor foi acrescentada aos tubos. Em seguida os tubos foram centrifugados ($2.000 \times g$ – 15 minutos) e as leituras dos sobrenadantes foram realizadas em espectrofotômetro (500 nm) frente ao branco. Nos tubos “branco”, acrescentou-se 0,6 mL de tampão Tris HCl 20 mM, 0,2 mL de solução de L-asparagina 100 mM e 0,2 mL da solução de hidroxilamina 1 M. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e, então, acrescentou-se 0,5 mL da solução de cor e 1,0 mL da suspensão de células. Então, os tubos “branco” foram centrifugados ($2.000 \times g$ – 15 minutos) e subtraídos dos tubos “teste” para se obter o resultado de atividade final. Os ensaios foram feitos em triplicata.

A curva de calibração empregada para o método de atividade enzimática periplasmática foi a mesma descrita no item 4.2.3. O cálculo da atividade enzimática periplasmática (em U.mg de células⁻¹) é descrita na equação 4, sendo $F_{\text{Diluição}}$ o número de vezes que as células foram diluídas para obtenção da concentração celular da suspensão empregada no ensaio e $C_{\text{Células}}$ a concentração celular em mg/mL da suspensão de células empregada no ensaio. Define-se 1 U como a quantidade de enzima capaz de catalisar 1 μmol de AHA por minuto de ensaio.

$$\text{Atividade (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\mu\text{mol AHA} \times F_{\text{Diluição}} \times 0,083}{C_{\text{Células}}} \quad (4)$$

4.2.5 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada a partir do método do peso seco correlacionado à absorbância em 600 nm em espectrofotômetro. As leveduras testadas foram cultivadas em meio YMA por 72 horas em agitador orbital (200 rpm – 30 °C). Após o cultivo, a biomassa resultante foi suspensa em solução salina (NaCl 0,9%) e dividida em 4 partes iguais. Três delas foram colocadas em cadinhos, previamente tarados, para secagem. A secagem foi feita em estufa a 60 °C até obtenção de peso constante das amostras. A quarta parte resultante foi empregada para realizar diluições seriadas em balões volumétricos de 25 mL em salina de acordo com a Tabela 9.

Tabela 8 – Diluições da suspensão celular para leitura em espectrofotômetro

Volume da suspensão inicial	Volume de solução salina
10 mL	15 mL
8 mL	17 mL
6 mL	19 mL
4 mL	21 mL
2 mL	23 mL
1 mL	24 mL
0,5 mL	24,5 mL
0,25 mL	24,75 mL

Fonte: arquivo pessoal

As leituras da absorbância da suspensões diluídas foram realizadas em espectrofotômetro (600 nm) e usadas para traçar a curva de calibração da concentração de biomassa (mg/mL) por absorbância. As análises de crescimento celular e biomassa aplicadas em todos os ensaios foram usadas adotando essa curva padrão.

4.2.6 Cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação de atividade asparaginolítica periplasmática

Empregou-se a cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmar a atividade enzimática de L-asparaginase. O ensaio foi adaptado do descrito por Hendriksen e colaboradores (2007). Para confirmação da atividade periplasmática, previamente à aplicação na placa de CCD, foram colocados em tubos de ensaio 0,5 mL de tampão fosfato (pH 7,0), 0,2 mL de solução de L-asparagina 100 mM e 0,5 mL de suspensão de células (concentração estimada de 0,5 mg/mL) para determinação da atividade asparaginolítica. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e centrifugados (2.000 x g por 15 minutos) e o sobrenadante foi aplicado na placa cromatográfica.

Para a atividade enzimática extracelular e para o extrato enzimático comercial, foram colocados nos tubos de ensaio 0,9 mL de tampão fosfato, 0,2 mL de solução de L-asparagina e 100 µL do extrato enzimático para determinação da atividade enzimática de L-asparaginase. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos em banho-maria e, então, o líquido resultante foi aplicado nas placas cromatográficas.

Empregou-se solução de isopropanol 70% como fase móvel da corrida. Todas as corridas foram feitas com aplicações de padrões de L-asparagina (solução 100 mM) e ácido L-aspártico (solução 100 mM) como controle. O tempo de corrida para separação dos picos foi de 6 horas, em que ocorria a subida de aproximadamente 12 cm do eluente na placa. A corrida foi realizada sob temperatura ambiente.

As placas de CCD empregadas, comercializadas pela empresa alemã Macherey-Nagel, foram construídas em alumínio, com 5x20 cm com 0,20 mm de espessura de sílica gel. Previamente à aplicação, as placas foram ativadas em estufa (100 °C por 1 hora) e os pontos de aplicação foram marcados 2 cm acima da base da placa. Os pontos de aplicação foram feitos com 3 µL das soluções teste. Após aplicação, as placas foram acondicionadas em cubas cromatográficas previamente saturadas por 15 minutos contendo 10 mL da fase móvel. Ao final da corrida, as placas foram secas a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e, então, borrifadas com solução reveladora (ninhidrina 0,2%). Após os

borrifos, as placas foram alocadas em estufa a 100 °C por 5 minutos para revelação. Foram avaliados qualitativamente a presença de picos de ácido L-aspártico e de L-asparagina para confirmar a produção de L-asparaginase pelos extratos de cultivo e células testadas. A presença de picos de ácido L-aspártico nas corridas teste, indicou a produção de L-asparaginase, uma vez que houve conversão da L-asparagina contida. A presença de picos de L-asparagina indica que esta não foi convertida em ácido L-aspártico, sendo o teste negativo, portanto, para quanto à produção de L-asparaginase.

4.3 *Screening* em meio líquido para seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase

O *screening* para detecção de novas leveduras com potencial para produção de L-asparaginase foi realizado empregando-se as leveduras descritas na Tabela 4. Para este ensaio, o inóculo foi preparado propagando-se as leveduras em tubos de ensaio com rosca contendo 2,5 mL do meio YMA líquido em agitador incubador a 250 rpm, 30 °C por 48 horas. A seguir, os tubos de ensaio foram centrifugados (2.000 x g – 15 minutos) e as células foram suspensas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) até obtenção da faixa de absorbância de 0,700-0,900 em leituras em espectrofotômetro a 600 nm.

Em seguida, utilizou-se 200 µL deste inóculo foi acrescentado a tubos (em duplicata) contendo 2,3 mL do meio CDR. Os tubos foram cultivados por 72 horas em agitador incubador orbital, com temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm controladas. Ao fim do cultivo, os tubos foram centrifugados novamente por 15 minutos a 2.000 x g. O sobrenadante foi empregado para os testes de atividade enzimática extracelular pelo método de Nessler e pelo método da hidroxilamina (itens 4.2.1 e 4.2.3). As células precipitadas foram suspensas em solução salina e empregadas para testes de atividade enzimática periplasmática, também empregando os métodos de Nessler e da hidroxilamina (itens 4.2.2 e 4.2.4).

4.4 *Screening* em meio sólido para seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase

Além do ensaio quantitativo para selecionar novas leveduras produtoras de L-asparaginase, também foi empregado o ensaio qualitativo em meio sólido, utilizando a metodologia proposta por Mahajan e colaboradores (2013). Este ensaio baseia-se no fato de que, durante o cultivo dos micro-organismos nas placas, há a degradação da L-asparagina presente no meio em ácido L-aspártico e amônio pela L-asparaginase, elevando-se assim o pH do meio. O indicador de pH azul de bromotimol torna o meio azulado ao redor das colônias produtoras de L-asparaginase devido à elevação do pH. O meio empregado para seleção é o ABRA e o controle negativo dos cultivos é feito no meio de controle ABRC, que não possui L-asparagina como possível indutor e substrato da reação enzimática (Tabela 5). O *screening* em meio sólido foi realizado a fim de comparar seus resultados com o *screening* quantitativo em meio líquido apresentado no item 4.3.

As leveduras descritas na Tabela 4 foram testadas para produção de L-asparaginase em meio sólido. Primeiramente, essas foram ativadas em tubos com rosca contendo 2,5 mL do meio YPD líquido, sendo cultivadas em agitador incubador orbital a 30 °C e agitação de 250 rpm por 48 horas. Após o cultivo, as células foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e diluídas até obtenção de absorbância de 0,700-0,900 em espectrofotômetro (600 nm).

Após a obtenção do inóculo em solução salina, 10 µL deste foi inoculado nas placas contendo os meios ABRA e ABRC com alça de platina calibrada. Os inóculos foram realizados em duplicata em placas divididas ao meio. As placas foram cultivadas em estufa a 30 °C por 72 horas. Após o final do cultivo, as placas foram fotografadas e analisadas qualitativamente para produção de L-asparaginase de acordo com a presença ou ausência de halo azulado ao redor das colônias. A presença do halo azulado no meio ABRA e ausência em meio ABRC indicaram a produção de L-asparaginase. Os resultados foram então comparados com aqueles obtidos durante o *screening* em meio líquido.

Para confirmar os resultados obtidos no ensaio, as leveduras que apresentaram resultados positivos durante o cultivo nos meios ABRC sólido, foram então cultivadas no meio ABRC líquido. Para tal, empregou-se a mesma técnica adotada no item 4.3, substituindo o meio CDR pelo meio ABRC líquido.

4.5 Estudo da influência da adição de aminoácidos na produção de L-asparaginase das leveduras selecionadas

As leveduras SSS08 e SSS43 (*Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*) foram testadas quanto à influência dos aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina na produção de L-asparaginase. Para tal, ambas foram ativadas em tubos com rosca contendo o meio YMA líquido e cultivadas a 30 °C em mesa agitadora orbital sob agitação de 250 rpm por 48 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados (2.000 x g por 15 minutos) e, então, as células foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e diluídas até obtenção de concentração celular aproximada de 0,5 mg.mL⁻¹.

Em seguida, 800 µL deste inóculo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo 9,2 mL dos meios Czapek-Dox modificados descritos na Tabela 6. Os cultivos foram todos realizados em triplicata. Os frascos foram cultivados em mesa agitadora orbital nas condições de cultivo: 30 °C, 200 rpm por 72 horas. Após o final da fermentação, o conteúdo dos frascos foi transferido para Tubos do tipo Falcon de 15 mL de capacidade e centrifugado a 2.000 x g por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado para ensaio da atividade enzimática extracelular e as células suspensas em solução salina para ensaio da atividade enzimática periplasmática, ambos empregando o método da hidroxilamina.

4.6 Cinética da produção de L-asparaginase pelas leveduras selecionadas

Verificou-se a cinética de produção de L-asparaginase periplasmática pelas leveduras SSS08 e SSS43 (*Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*). Estas foram previamente ativadas em tubo com rosca contendo 2,5 mL de meio YMA

líquido em mesa agitadora orbital sob 200 rpm e 30 °C por 48 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados e as células lavadas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) até obtenção de concentração celular aproximada de 0,5 mg.mL⁻¹. Em seguida, 800 µL deste inóculo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo 9,2 mL de meio CDR (Tabela 5). Para cada levedura cultivada, foram separados 39 frascos Erlenmeyer. O cultivo foi feito em agitador incubador orbital com temperatura controlada de 30 °C e agitação de 250 rpm. Os três primeiros frascos Erlenmeyer foram considerados como tempo inicial (0h) e não foram incubados para cultivo. A intervalos de 12 horas, três frascos foram retirados do cultivo como pontos amostrais. Após serem retirados do cultivo, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de centrífuga do tipo Falcon e centrifugados (2.000 x g – 15 minutos). As células precipitadas foram suspensas em 10 mL de solução salina para posterior determinação da atividade enzimática periplasmática pelo método da hidroxilamina e concentração celular para avaliação do crescimento celular.

Após 72 horas de cultivo, os 15 frascos Erlenmeyer que restaram ainda sendo cultivados tiveram seus conteúdos transferidos para tubos de centrífuga do tipo Falcon estéreis e, então, foram centrifugados (2.000 x g – 15 minutos) e as células foram suspensas em meio CDP (Tabela 5) estéril. Em seguida, as células suspensas no meio CDP foram colocadas novamente em frascos Erlenmeyer estéreis e incubadas em agitador incubador orbital sob as mesmas condições. De forma semelhante, novos pontos amostrais foram retirados em intervalos de 12 horas conforme previamente descrito.

4.7 Fluxograma das atividades realizadas no presente trabalho

As atividades experimentais realizadas no decorrer do presente trabalho foram esquematizadas na forma de um fluxograma representado na Figura 10.

Figura 10 – Fluxograma geral das atividades experimentais realizadas no decorrer do presente trabalho

Fonte: arquivo pessoal

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase e avaliação de metodologias de quantificação da atividade enzimática

A seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase empregando como base o banco de leveduras dos laboratórios do professor Silvio Silvério da Silva (Tabela 4) foi feita inicialmente em meios sólidos e líquidos empregando-se os métodos de Nessler e o método da hidroxilamina para quantificação da atividade enzimática. As leveduras empregadas no processo de seleção pertenceram ao grupo dos basidiomicetos e dos ascomicetos, sendo isoladas de diversos biomas. Por não haver relatos na literatura consultada de grupos específicos de leveduras com potencialidade para produção de L-asparaginase, optou-se por um *screening* mais amplo entre diversas leveduras. Os ensaios visaram a seleção de novas leveduras com destacada produção de L-asparaginase e também a avaliação da efetividade de duas diferentes metodologias de quantificação da atividade enzimática durante esse processo. A comparação e a correlação entre esses métodos foi realizada empregando os ensaios em meio líquido e em meio sólido.

5.1.1 Avaliação da metodologia de Nessler para seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio líquido

De acordo com os resultados encontrados, nenhuma das 40 cepas de leveduras avaliadas para produção de L-asparaginase extracelular apresentaram atividades enzimáticas detectáveis ao se empregar o método de Nessler para sua quantificação. Percebeu-se, porém, que em algumas leveduras testadas, o tubo “branco” apresentou intensa coloração após reagir com o tetraiodomercurato de potássio, principal reagente da metodologia de Nessler. Tal comportamento impediu a quantificação da atividade asparaginolítica dessas cepas, uma vez que a coloração do tubo “teste” foi idêntica à do “branco” quando analisada em espectrofotômetro a 436 nm. As leveduras que apresentaram tal comportamento

foram: *Issatchenkia orientalis* (SSS08), *Pichia ofunaensis* (SSS10), *Spathaspora arborarie* sp. (SSS14), *Issatchenkia occidentalis* sp. (SSS19), *Spathaspora* sp. (SSS23), *Saccharomyces cerevisiae* (SSS25) e *Trichosporon mucoides* (SSS30). A Figura 11 ilustra este comportamento após uma análise de atividade de L-asparaginase extracelular empregando-se o método de Nessler para um dos cultivos da cepa de levedura SSS14 (*Spathaspora arborarie* sp.). No primeiro tubo da esquerda, apresenta-se um “branco” empregando-se água destilada ao invés da amostra e o segundo tubo, um “branco” contendo o extrato de cultivo. Em seguida apresentam-se os tubos teste para determinação da atividade enzimática. De acordo com a Figura 11 houve uma semelhança da coloração dos tubos “branco” com amostra e dos tubos “teste”. Ao se analisar a intensidade de coloração em espectrofotômetro a 436 nm, não foi possível detectar diferença do “branco” com amostra dos tubos “teste”, tornando os ensaios negativos para atividade de L-asparaginase.

Figura 11 – Tubos após a reação de Nessler para quantificação da atividade de L-asparaginase extracelular do cultivo da levedura SSS14 (*Spathaspora arborarie* sp.)

Fonte: arquivo pessoal

Esse comportamento pode ser explicado por uma possível produção de compostos amoniacaais ou contaminantes durante o processo de crescimento das leveduras. Ao se empregar o extrato de cultivo como extrato enzimático para o ensaio de Nessler, o tetraiodomercurato de potássio reagiu com esses contaminantes ao invés do amônio formado durante a reação enzimática, tornando os tubos “brancos” da mesma cor que os tubos “teste”. Portanto, o método de Nessler não foi capaz de detectar nenhuma cepa de levedura produtora de L-asparaginase extracelular nas condições experimentais testadas.

O principal trabalho empregado como base para a determinação da atividade enzimática pelo método de Nessler é aquele descrito por Wriston e Yellin (1973). Estes autores especificaram o preparo dos tubos “branco” empregando amostra ao invés de água destilada. Dessa forma, os tubos “branco” e “teste” apresentam a mesma concentração inicial de compostos amoniacaais, sendo a diferença entre eles correspondente à atividade asparaginolítica da amostra em teste. Entretanto, percebeu-se na literatura consultada que diversos autores omitiram a maneira de preparo das amostras e dos “brancos” durante o ensaio de Nessler em seus trabalhos sobre seleção ou otimização da produção de L-asparaginase por diversos micro-organismos (KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012; SONIYAMBI et al., 2011; GUPTA; DASH; BASAK, 2009; TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012; BASKAR; RENGANATHAN, 2011). Os resultados apresentados por esses autores podem não refletir a atividade enzimática real das amostras, considerando a possibilidade de estarem superestimando a atividade de L-asparaginase extracelular com um possível erro no preparo do tubo “branco” com água destilada ao invés da amostra. Dessa forma, é necessária atenção ao adotar a técnica, considerando o comportamento descrito e a possibilidade de falsos positivos durante o ensaio de Nessler ao se empregar amostras contendo contaminantes.

Além de se verificar a atividade de L-asparaginase extracelular pelo método de Nessler a partir do extrato de cultivo, também foram empregadas células intactas para verificar a produção de L-asparaginase periplasmática. O espaço periplasmático é definido como uma camada fina (35-45 Å) associada à parede celular onde ficam armazenadas proteínas que não conseguem permear a parede celular para o espaço extracelular (FELDMANN, 2012). Sabe-se que em leveduras e alguns fungos a enzima L-asparaginase não é secretada para o espaço

extracelular, ficando armazenada no espaço periplasmático das mesmas (FODA, ZEDAN, HASHEM, 1980; KIL; KIM; PARK, 1995; FERRARA, 2004).

De forma semelhante ao observado para a L-asparaginase extracelular, nenhuma das 40 leveduras testadas para a produção de L-asparaginase periplasmática apresentou atividade asparaginolítica detectável ao se empregar o método de Nessler. Embora essa metodologia seja amplamente empregada para ensaios envolvendo a enzima L-asparaginase pura, no presente trabalho essa técnica não foi eficaz para detectar nenhuma cepa produtora da enzima em questão. Trata-se de uma técnica de confiabilidade questionável em ensaios de seleção de novos organismos produtores de L-asparaginase, considerando as restrições apresentadas ao aplicá-la com extratos enzimáticos impuros. Sendo assim, optou-se por avaliar uma outra metodologia para quantificação da atividade enzimática.

5.1.2 Avaliação da metodologia da hidroxilamina para seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio líquido

O método de quantificação da atividade de L-asparaginase pela hidroxilamina foi adotado para quantificação da atividade asparaginolítica após as considerações observadas no método de Nessler. A Tabela 9 apresenta os resultados finais obtidos de biomassa e atividade enzimática periplasmática e extracelular durante o processo de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase com atividade enzimática quantificada pelo método da hidroxilamina. Os resultados de biomassa final foram expressos em unidades de absorbância a 600 nm (após multiplicar o fator de diluição), correlacionando a opacidade das células em salina com seu crescimento em biomassa. A atividade enzimática extracelular foi correlacionada ao volume de extrato enzimático empregado na reação (unidade adotada de U.mL^{-1}) e a atividade enzimática periplasmática foi correlacionada à concentração celular empregada durante o ensaio enzimático (unidade adotada de U/unidade de absorbância a 600 nm). A concentração de AHA liberado no ensaio enzimático empregando hidroxilamina foi determinada a partir de leitura no espectrofotômetro Biospectro SP-220 empregando-se a curva de calibração apresentada no Apêndice A.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 9), percebeu-se que, exceto o cultivo 1 da levedura SSS39 (*Pichia kudriavzevii*) e o cultivo 2 da levedura SSS40 (*Saccharomyces cerevisiae*), todas as demais foram capazes de crescer em quantidades significativas de biomassa no meio CDR. Entretanto, observou-se também que nenhuma das cepas avaliadas foi capaz de produzir quantidades detectáveis de L-asparaginase extracelular após 72 horas de cultivo. Este fato pode ter ocorrido devido à degradação enzimática após recuperação do extrato de cultivo, atividade enzimática abaixo do limite de detecção do método ou, mais provavelmente, por ausência de produção de L-asparaginase extracelular pelas cepas testadas nas condições avaliadas. Leveduras, em geral, produzem L-asparaginases de natureza periplasmática, ao invés de excretarem-na para o espaço extracelular (FERRARA, 2004). Sendo assim, foi feito o teste de atividade de L-asparaginase periplasmática nas cepas avaliadas, empregando-se as células intactas como fonte da enzima. Nesse ensaio, percebeu-se que, de todas as cepas avaliadas, apenas as cepas SSS08 (*Issatchenkia orientalis*) e SSS43 (*Rhodotorula glutinis*) foram capazes de produzir quantidades detectáveis de L-asparaginase periplasmática quantificadas pelo método da hidroxilamina (Tabela 9). A levedura *Issatchenkia orientalis* produziu 0,012 U/unidade de absorbância e 0,005 U/unidade de absorbância nos cultivos realizados em duplicata. Por outro lado, a levedura *Rhodotorula glutinis* se destacou, uma vez que foi capaz de produzir quantidades mais expressivas de L-asparaginase periplasmática (0,098 U/unidade de absorbância e 0,194 U/unidade de absorbância) em relação às demais. A Figura 12 ilustra a coloração final das soluções empregadas no teste de atividade enzimática pelo método da hidroxilamina nos cultivos SSS08-1 e SSS43-2.

Tabela 9 – Resultados obtidos durante o processo de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio líquido pelo método da hidroxilamina

Código Levedura	Rep	Biomassa Final (Abs 600 nm)	Ativ. Enzim. Extra (U/mL)	Ativ. Enzim. Peri (U/Abs)	Código Levedura	Rep	Biomassa Final (Abs 600 nm)	Ativ. Enzim. Extra (U/mL)	Ativ. Enzim. Peri (U/Abs)
SSS01	1	3,5	n.d.	n.d.	SSS22	1	7,29	n.d.	n.d.
	2	4,5	n.d.	n.d.		2	8,13	n.d.	n.d.
SSS02	1	7,94	n.d.	n.d.	SSS23	1	0,564	n.d.	n.d.
	2	19,88	n.d.	n.d.		2	0,79	n.d.	n.d.
SSS03	1	7,06	n.d.	n.d.	SSS24	1	0,47	n.d.	n.d.
	2	5,1	n.d.	n.d.		2	0,532	n.d.	n.d.
SSS04	1	6,75	n.d.	n.d.	SSS25	1	5,98	n.d.	n.d.
	2	8,68	n.d.	n.d.		2	5,06	n.d.	n.d.
SSS05	1	6,27	n.d.	n.d.	SSS26	1	1,71	n.d.	n.d.
	2	9,64	n.d.	n.d.		2	2,39	n.d.	n.d.
SSS06	1	10,42	n.d.	n.d.	SSS27	1	1,59	n.d.	n.d.
	2	8,86	n.d.	n.d.		2	6,54	n.d.	n.d.
SSS07	1	4,2	n.d.	n.d.	SSS28	1	0,397	n.d.	n.d.
	2	3,9	n.d.	n.d.		2	6,35	n.d.	n.d.
SSS08	1	7,23	n.d.	0,012	SSS29	1	0,233	n.d.	n.d.
	2	11,46	n.d.	0,005		2	0,275	n.d.	n.d.
SSS10	1	3,77	n.d.	n.d.	SSS30	1	0,109	n.d.	n.d.
	2	1,37	n.d.	n.d.		2	1,27	n.d.	n.d.
SSS11	1	8,46	n.d.	n.d.	SSS31	1	0,327	n.d.	n.d.
	2	10,2	n.d.	n.d.		2	0,448	n.d.	n.d.
SSS12	1	9	n.d.	n.d.	SSS32	1	8,75	n.d.	n.d.
	2	11,62	n.d.	n.d.		2	6,5	n.d.	n.d.
SSS13	1	3,82	n.d.	n.d.	SSS33	1	5,42	n.d.	n.d.
	2	1,47	n.d.	n.d.		2	2,8	n.d.	n.d.
SSS14	1	1,92	n.d.	n.d.	SSS34	1	0,423	n.d.	n.d.
	2	0,997	n.d.	n.d.		2	0,271	n.d.	n.d.
SSS15	1	3,66	n.d.	n.d.	SSS37	1	6,44	n.d.	n.d.
	2	2,53	n.d.	n.d.		2	6,79	n.d.	n.d.
SSS16	1	0,677	n.d.	n.d.	SSS38	1	0,208	n.d.	n.d.
	2	11,3	n.d.	n.d.		2	0,320	n.d.	n.d.
SSS17	1	4,23	n.d.	n.d.	SSS39	1	0	n.d.	n.d.
	2	4,75	n.d.	n.d.		2	0,55	n.d.	n.d.
SSS18	1	2,02	n.d.	n.d.	SSS40	1	0,209	n.d.	n.d.
	2	2,02	n.d.	n.d.		2	0	n.d.	n.d.
SSS19	1	2,5	n.d.	n.d.	SSS41	1	0,214	n.d.	n.d.
	2	1,067	n.d.	n.d.		2	0,26	n.d.	n.d.
SSS20	1	4,0	n.d.	n.d.	SSS42	1	0,317	n.d.	n.d.
	2	5,75	n.d.	n.d.		2	5,94	n.d.	n.d.
SSS21	1	0,469	n.d.	n.d.	SSS43	1	3,66	n.d.	0,098
	2	0,313	n.d.	n.d.		2	2,55	n.d.	0,194

Fonte: arquivo pessoal. n.d – atividade enzimática não detectável. Rep – replicata das fermentações. Ativ. Enzim. Extra – atividade enzimática extracelular. Ativ. Enzim. Peri – atividade enzimática periplasmática.

Figura 12 – Coloração das soluções utilizadas para ensaio da atividade enzimática periplasmática pelo método da hidroxilamina nos cultivos SSS08-1 e SSS43-2

Fonte: arquivo pessoal

Figura 13 – Fotografia das placas de cultivo e microfotografia em aumento de 1200 vezes das leveduras SSS08 (*Issatchenkia orientalis*) e SSS43 (*Rhodotorula glutinis*)

Fonte: arquivo pessoal

De acordo com a literatura consultada, verificou-se que a produção de L-asparaginase por leveduras ainda é pouco explorada, sendo priorizados os estudos de produção desta enzima por fungos filamentosos e bactérias. Nesse cenário, ambas as leveduras identificadas como produtoras da enzima L-asparaginase no presente trabalho (*Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*) ainda não foram reportadas na literatura para produção de L-asparaginase. Destaca-se que a levedura *Issatchenkia orientalis*, anteriormente conhecida como *Candida krusei*, é uma levedura ascomiceto termotolerante conhecida por causar fermentação espontânea de alguns frutos como cacau e uva (CLEMENTE-JIMENEZ et al., 2004; JESPERSEN et al., 2005). Trata-se de um patógeno oportunista naturalmente resistente ao fluconazol, infectando principalmente pacientes imunodeprimidos e transplantados (PFALLER et al., 2008). Suas potenciais aplicações em biotecnologia já são bastante conhecidas, principalmente na área de biorremediação, na produção de ácido succínico e no processo de SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) para produção de etanol (KITAGAWA et al., 2010; KWON; WANG; LIU, 2011; TONDEE; SIRIANUNTAPIBOON; OHMOMO, 2008; XIAO et al., 2014). Entretanto, até o presente momento não foi encontrado nenhum trabalho sobre a produção de L-asparaginase por essa levedura.

Por outro lado, a levedura *Rhodotorula glutinis* é uma levedura oleaginosa pigmentada que pertence ao grupo dos basidiomicetos. É conhecidamente produtora do pigmento β -caroteno e capaz de acumular até 72% de biomassa em óleo, tendo portanto grande interesse biotecnológico para a produção de biodiesel. (HERNÁNDEZ-ALMANZA et al., 2014; JESPERSEN et al., 2005; MALISORN; SUNTORNSUK, 2009; TAO et al., 2010; YEN; YANG, 2012). Apesar da ampla aplicação na indústria biotecnológica, principalmente na área de alimentos e biocombustíveis, não há relatos da produção de L-asparaginase por *Rhodotorula glutinis*. Entretanto, em 1980, Foda, Zedan e Hashem identificaram uma nova L-asparaginase periplasmática produzida pela levedura *Rhodotorula rubra* UCD-C46A, pertencente ao mesmo gênero que a levedura aqui reportada. Esses autores não identificaram a presença de L-asparaginase extracelular para a mesma levedura. Apesar dos resultados apresentados, não é possível compará-los com os resultados do presente trabalho, já que os autores empregaram uma técnica analítica de quantificação de L-asparaginase periplasmática pelo método de

Nessler, mas sem informar a concentração celular empregada nas análises, impedindo assim, que seja quantificada a produção de enzima em relação à biomassa empregada no ensaio. Não se observou outro relato na literatura consultada sobre a produção de L-asparaginase por outras leveduras do gênero *Rhodotorula*. A Figura 13 contém fotografias das placas de cultivo e microscopia com aumento de 1200 vezes para as leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*.

Outras leveduras descritas na literatura como produtoras de L-asparaginase e testadas no presente trabalho, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*, foram negativas para produção de L-asparaginase tanto de forma extracelular quanto periplasmática. Ferrara (2004) descreveu a produção de L-asparaginase periplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração máxima de 115 U/g de massa seca de células em condições otimizadas. Nenhuma das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* testadas no presente ensaio (SSS25, SSS40, SSS41 e SSS42), no entanto, tiveram atividade asparaginolítica detectada. Possivelmente a concentração de L-asparaginase produzida foi inferior ao limite de detecção do método, ou as condições de cultivo não propiciaram a produção da enzima por essas cepas. Da mesma forma, a L-asparaginase periplasmática de *Candida utilis*, previamente descrita por Kil, Kim e Park (1995) e por Sakamoto e colaboradores (1977) não foi detectada nesse ensaio ao se empregar a cepa SSS32 para os ensaios. É possível que, de forma análoga ao ocorrido com as cepas testadas de *Saccharomyces cerevisiae*, a produção de L-asparaginase de *Candida utilis* tenha sido inferior ao limite de detecção nas condições testadas.

De maneira geral, o método da hidroxilamina para quantificação da atividade enzimática de L-asparaginase permitiu além da identificação de novas leveduras produtoras de L-asparaginase, a quantificação da enzima produzida de forma confiável e rápida. São várias as técnicas atualmente disponíveis para quantificação da atividade asparaginolítica, nem sempre sendo fácil selecionar a melhor (VERMA et al., 2007). Dessa forma, adotou-se esta metodologia para quantificação da atividade de L-asparaginase para a continuação do presente trabalho.

5.1.3 Avaliação do processo de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido

A fim de simplificar o processo de seleção de micro-organismos produtores de L-asparaginase, Gulati, Saxena e Gupta (1997) propuseram uma técnica de *screening* em meio placas de Petri. Durante o crescimento das leveduras em meio contendo L-asparagina, aquelas capazes de produzir L-asparaginase degradariam este aminoácido em ácido L-aspártico e amônio, elevando assim o pH do meio e alterando a coloração devido à presença do indicador de pH vermelho de fenol. Mahajan e colaboradores (2013) empregaram o indicador de pH azul de bromotimol ao invés do vermelho de fenol e concluíram que essa mudança permitiu uma visualização mais nítida da mudança de cor formada durante o cultivo dos micro-organismos produtores de L-asparaginase.

O ensaio de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido foi também realizado a fim de verificar se as metodologias de seleção de micro-organismos em meio sólido e em meio líquido podem ser correlacionadas, uma vez que o *screening* em meio sólido, apesar de fornecer apenas resultados qualitativos, é mais simples de se realizar que o *screening* em meio líquido. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos durante o ensaio de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido. Avaliou-se, após 72 horas, o tamanho do halo formado nas placas e o crescimento celular de acordo com o tamanho das colônias, sendo sua intensidade determinada por meio de sinais "+". As leveduras que não produziram halos foram marcadas como "-". Foram avaliados o crescimento e formação de halos nos meios ABRA, contendo L-asparagina, e no meio controle ABRC, não contendo L-asparagina. A Figura 14 apresenta fotografias de todas as leveduras que foram positivas no ensaio qualitativo de produção de L-asparaginase em meio sólido.

Tabela 10 – Resultados obtidos para a seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido. O meio ABRA é o meio teste, contendo L-asparagina e o meio ABRC é o meio controle, sem L-asparagina. A análise de crescimento e de halo foram feitas qualitativamente por meio de sinais “+”.

Código Levedura	Rep.	Cresc ABRA	Halo ABRA	Cresc ABRC	Halo ABRC	Código Levedura	Rep.	Cresc ABRA	Halo ABRA	Cresc ABRC	Halo ABRC
SSS01	1	+	-	+	-	SSS22	1	++	-	+	-
	2	+	-	+	-		2	++	-	+	-
SSS02	1	+	-	+	-	SSS23	1	+	-	+	-
	2	+	-	+	-		2	+	-	+	-
SSS03	1	-	-	-	-	SSS24	1	++	++	+	-
	2	-	-	-	-		2	++	++	+	-
SSS04	1	+	-	+	-	SSS25	1	+	-	-	-
	2	+	-	+	-		2	+	-	-	-
SSS05	1	++	-	+	-	SSS26	1	+	-	-	-
	2	+	-	+	-		2	+	-	-	-
SSS06	1	+++	+	+	-	SSS27	1	+	-	+	-
	2	+++	+	+	-		2	+	-	+	-
SSS07	1	++	-	+	-	SSS28	1	++	-	-	-
	2	+	-	+	-		2	++	-	+	-
SSS08	1	+	-	+	-	SSS29	1	+	-	+	-
	2	++	-	+	-		2	+	-	+	-
SSS10	1	++	-	+	-	SSS30	1	-	-	-	-
	2	+	-	-	-		2	-	-	-	-
SSS11	1	+	-	+	-	SSS31	1	+++	-	+	-
	2	+	-	+	-		2	+++	-	+	-
SSS12	1	+	-	++	-	SSS32	1	++	++++	+	-
	2	++	-	++	-		2	++	++++	+	-
SSS13	1	+	-	+	-	SSS33	1	+	-	+	-
	2	++	-	-	-		2	+	-	+	-
SSS14	1	+	-	+	-	SSS34	1	+	-	+	-
	2	+	-	+	-		2	+	-	+	-
SSS15	1	-	-	+	-	SSS37	1	++++	-	+	-
	2	+	-	+	-		2	++++	-	+	-
SSS16	1	++	++	+	-	SSS38	1	+	-	+	-
	2	++	++	-	-		2	+++	-	+	-
SSS17	1	-	-	-	-	SSS39	1	+++	++	+	-
	2	-	-	-	-		2	+++	++	+	-
SSS18	1	+	-	-	-	SSS40	1	++	-	+	-
	2	+	-	-	-		2	++	-	+	-
SSS19	1	++	-	+	-	SSS41	1	+	-	+	-
	2	++	-	+	-		2	+	-	+	-
SSS20	1	-	-	-	-	SSS42	1	++	-	-	-
	2	-	-	-	-		2	++	-	+	-
SSS21	1	++++	+	+	-	SSS43	1	+	-	+	-
	2	++++	+	+	-		2	+	-	+	-

Fonte: arquivo pessoal. Rep. – replicata do cultivo. Cresc. ABRA – crescimento qualitativo das leveduras no meio ABRA. Cresc. ABRC – crescimento qualitativo das leveduras no meio ABRC.

Figura 14 – Fotografias das placas após 72 horas de cultivo das leveduras que foram positivas para o ensaio de produção de L-asparaginase em meio sólido

Fonte: arquivo pessoal.

De acordo com os resultados, apenas as leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS06), *Issatchenkia occidentalis* (SSS16 e SSS21), *Kluyveromyces marxianus* (SSS24), *Candida utilis* (SSS32) e *Pichia kudriavzevii* (SSS39) foram capazes de formar halos azuis no meio ABRA, indicativos da produção de L-asparaginase em meio sólido. Nenhuma das leveduras apresentaram halos durante o crescimento no meio ABRC, indicando que a coloração azul é possivelmente derivada da hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspartico e amônio. Entretanto, os resultados aqui apresentados são contraditórios em relação aos resultados previamente obtidos durante o processo de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase

em meio líquido. Nenhuma das leveduras que apresentaram halos nos meios ABRA apresentaram atividade asparaginolítica, tanto extracelular quanto periplasmática, detectável quando cultivadas no meio CDR líquido. De forma análoga, as leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43), que apresentaram atividade de L-asparaginase periplasmática quando cultivadas no meio CDR líquido, não formaram halos durante o crescimento em meio sólido. A mudança de coloração do meio de amarelo para azul, indicou que houve uma elevação do pH para acima de 7,5 – o pH em que o indicador azul de bromotimol muda de coloração – nos casos onde houve indícios de produção de L-asparaginase (MAHAJAN et al., 2013).

As leveduras que foram positivas no ensaio em placas contendo azul de bromotimol foram cultivadas em meio ABRA líquido para confirmação da atividade enzimática. Os resultados desse cultivo estão apresentados na Tabela 11. Avaliou-se o pH ao final do cultivo, biomassa formada em unidades de absorbância a 600 nm (após multiplicar o fator de diluição) e atividade enzimática periplasmática e extracelular empregando-se o método da hidroxilamina.

Tabela 11 – Resultados obtidos após cultivo em meio ABRA líquido das leveduras positivas para produção de L-asparaginase em meio sólido

Código da Levedura	Replicata	Absorbância 600 nm pós-diluição	pH final	Ativ Enzim. Extra (U/mL)	Ativ Enzim. Peri (U/Abs)
SSS06	1	8,95	6,12	n.d.	n.d.
	2	7,17	6,23	n.d.	n.d.
SSS16	1	7,24	7,70	n.d.	n.d.
	2	8,65	8,02	n.d.	n.d.
SSS21	1	4,30	6,93	n.d.	n.d.
	2	9,08	7,02	n.d.	n.d.
SSS24	1	6,26	7,98	n.d.	n.d.
	2	17,48	8,07	n.d.	n.d.
SSS32	1	5,10	8,54	n.d.	n.d.
	2	5,60	8,69	n.d.	n.d.
SSS39	1	1,30	7,89	n.d.	n.d.
	2	2,34	7,74	n.d.	n.d.

Fonte: arquivo pessoal. n.d – atividade enzimática não detectável. Ativ. Enzim. Extra – atividade enzimática extracelular. Ativ. Enzim. Peri – atividade enzimática periplasmática.

De acordo com a Tabela 11, percebeu-se uma certa correlação entre o pH ao final do cultivo líquido com a formação de halos azuis nas placas contendo o meio ABRA sólido. As leveduras que apresentaram maiores halos azuis em meio sólido – *Kluyveromyces marxianus* (SSS24) e *Candida utilis* (SSS32) – apresentaram, também, os maiores valores de pH nos meios de cultivo após 72 horas. Entretanto, nenhuma das leveduras avaliadas, previamente positivas para produção de L-asparaginase em meio sólido, apresentaram atividade enzimática extracelular ou periplasmática detectável quando cultivadas no meio ABRA líquido. O fato de o pH final dos cultivos terem sido elevados ao final do cultivo, indicou potencial produção de L-asparaginase com formação de amônio durante a degradação da L-asparagina em ácido L-aspártico. Entretanto, não foi possível quantificar a produção da enzima empregando-se o método da hidroxilamina. Uma possível explicação para esse comportamento é a produção de baixas concentrações de L-asparaginase durante o crescimento das leveduras em estudo. Outra possível explicação seria a capacidade de certas leveduras em produzir L-asparaginase durante o cultivo em meio sólido, mas não em meio líquido. Entretanto, questiona-se a razão pela qual as leveduras que foram previamente selecionadas como produtoras de L-asparaginase – *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43) – não foram capazes de formar halos quando cultivadas no meio ABRA sólido. Na literatura consultada, não se encontrou explicação para este fenômeno observado.

Verificou-se, também, que a levedura *Candida utilis* (SSS32) foi a levedura com maior formação de halo azul devido à possível produção de L-asparaginase (Tabela 10). Estudos prévios reportaram essa levedura como sendo produtora de L-asparaginase periplasmática (KIL; KIM; PARK, 1995; SAKAMOTO et al., 1977). Entretanto, de forma semelhante ao ocorrido no meio CDR líquido, não foi possível detectar atividade asparaginolítica nessa cepa ao cultivá-la no meio ABRA líquido. Também, sabe-se que as leveduras SSS06 e SSS08 pertencem à mesma espécie – *Issatchenkia orientalis*. Nos ensaios anteriores de seleção em meio líquido, a levedura SSS08 foi apontada como produtora de L-asparaginase periplasmática. A levedura SSS06, por sua vez, formou uma discreta coloração azulada na placa de cultivo, ao contrário da levedura SSS08. Entretanto, ao ser cultivada nos meios

CDR e ABRA líquidos, não foi possível identificar atividade asparaginolítica da cepa SSS06, ao contrário do observado na levedura SSS08 no meio CDR líquido. Uma possível explicação para esse comportamento é a diferença metabólica entre ambas as cepas, isoladas a partir de diferentes localidades.

O metabolismo de micro-organismos, de um modo geral, é influenciado pelas condições de cultivo, principalmente pela forma de cultivo em meio sólido ou em meio líquido (HÖLKER; LENZ, 2005; PANDEY, 2003). Dessa forma, a seleção de micro-organismos empregando meio sólido pode detectar aqueles capazes de produzir a enzima em meio sólido, mas não em meio líquido. Sendo assim, devido à dificuldade de correlacionar os resultados obtidos no *screening* de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido e em meio líquido, a metodologia de seleção em meio sólido não apresenta segurança como processo de seleção de leveduras para posterior produção enzimática em meio líquido.

5.2 Ensaio confirmatório para a produção de L-asparaginase pelas leveduras selecionadas

A produção de L-asparaginase periplasmática pelas leveduras previamente selecionadas foi confirmada em ensaio de cromatografia em camada delgada (CCD), analisando-se os picos dos aminoácidos relacionados com a atividade asparaginolítica: a L-asparagina e o ácido L-aspártico. Para tal, foram empregadas as suspensões de células dos cultivos SSS08-1 e SSS43-2, que produziram maior atividade enzimática nos ensaios de seleção em meio líquido. Como controle, empregou-se, também, solução de enzima Novozymes Acrylaway.

O ensaio produziu uma resposta qualitativa sobre a presença ou não de L-asparaginase no espaço periplasmático das células avaliadas (Figura 15). A corrida da cromatografia foi feita com as soluções teste e com padrões de L-asparagina e de ácido L-aspártico. A presença de picos do aminoácido ácido L-aspártico na corrida cromatográfica do teste confirmou a produção de L-asparaginase nas soluções teste, visto que a enzima produzida foi capaz de converter a L-asparagina contida nessas soluções em ácido L-aspártico. Testes preliminares com os padrões de L-asparagina e de ácido L-aspártico indicaram que a solução de ninhidrina

empregada para revelação da corrida não somente revelou os pontos na placa, como também teve sua coloração alterada ao reagir com a L-asparagina (cor amarela) ou com o ácido L-aspártico (cor avermelhada). A Figura 15 apresenta os resultados obtidos nos testes de cromatografia em camada delgada para confirmação da atividade asparaginolítica das leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*, previamente selecionadas.

Figura 14 – Cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação da atividade asparaginolítica das leveduras selecionadas no processo de *screening* – picos da esquerda para direita: padrão de L-asparagina, padrão de ácido L-aspártico, teste do cultivo SSS08-1, teste do cultivo SSS43-2, teste da enzima L-asparaginase comercial (Novozymes Acrylaway)

Fonte: arquivo pessoal

Conforme os resultados, percebeu-se que o padrão de L-asparagina teve maior retenção, apresentando um R_F menor (0,39) em comparação ao padrão de ácido L-aspártico, que apresentou um maior R_F (0,47). O teste com levedura *Issatchenkia orientalis* (cultivo SSS08-1) apresentou um destacado pico de ácido L-aspártico, indicando produção de L-asparaginase. Entretanto, percebeu-se ainda um discreto pico arrastado na região de retenção da L-asparagina, indicando que não houve conversão completa da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônio nesse ensaio. Por sua vez, no teste realizado com o cultivo de SSS43-02 de *Rhodotorula glutinis*, verificou-se destacado pico de ácido L-aspártico confirmando, assim, a produção de L-asparaginase. Não se observou, nesse caso, pico na região de L-asparagina, indicando que houve conversão completa desse aminoácido pela enzima L-asparaginase produzida. O controle positivo do método empregando a enzima L-asparaginase comercial Novozymes Acrylaway, foi capaz de produzir um único pico de ácido L-aspártico sem indícios do padrão de L-asparagina, assim como o comportamento apresentado pelo teste SSS43-2.

O ensaio de cromatografia em camada delgada (CCD) para confirmação da atividade asparaginolítica indicou ser um método rápido, simples e robusto. A rapidez do método foi destacada por este não requerer um extenso preparo de amostras previamente à aplicação nas placas de cromatografia. Pode-se considerar este método simples por não requerer equipamentos ou reagentes de alto custo, sendo necessária somente as placas cromatográficas, padrões, fase móvel, composta por propanol e ninhidrina, o agente revelador. A robustez deste método deve-se ao fato de que potenciais interferentes presentes nas amostras dificilmente interferem na definição dos picos, uma vez que a ninhidrina, empregada para revelação da corrida cromatográfica, reage especificamente com compostos que contêm aminas primárias, no caso os aminoácidos cuja retenção deseja-se detectar.

Os estudos confirmaram que a metodologia de cromatografia em camada delgada é possível de ser empregada como ensaio confirmatório da produção de L-asparaginase por leveduras nas condições experimentais apresentadas no presente trabalho. Entretanto, essa metodologia apresentou destacada potencialidade como uma possível ferramenta para seleção de novos micro-organismos produtores de L-asparaginase. Nesse caso, pode-se aplicar

diretamente o extrato de cultivo do meio CDR fermentado após o crescimento do micro-organismo cuja atividade asparaginolítica deseja-se determinar. A presença de pico de ácido L-aspartico indicaria qualitativamente a produção de L-asparaginase por este micro-organismo, uma vez que, durante seu crescimento, este foi capaz de converter a L-asparagina contida no meio CDR nesse metabólito.

5.3 Influência de aminoácidos na produção de L-asparaginase por *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*

Alguns estudos empregando fungos filamentosos discutiram a importância de fontes de nitrogênio indutoras da produção de L-asparaginase para alguns fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. Detectou-se um efeito indutor positivo na produção de L-asparaginase por esses micro-organismos ao se empregar o aminoácido L-prolina no meio de cultivo (KUMAR et al., 2013; SARQUIS et al., 2004). Sabe-se, também, da necessidade da adição de L-asparagina como agente indutor na produção de L-asparaginase por outros micro-organismos (ARRIVUKKARASAN et al., 2010; MOHAN KUMAR et al., 2013; KUMAR; PAKSHIRAJAN; VENKATA DASU, 2009; MAHAJAN et al., 2013). Testou-se, então, os aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina nos meios de cultivo de *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43) a fim de verificar a influência dessas moléculas indutoras na produção de L-asparaginase. Foi adotado como controle negativo para produção de L-asparaginase o meio contendo apenas nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Tabela 6). Os resultados obtidos para verificação da influência de diferentes aminoácidos na produção de L-asparaginase por *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis* estão expressos nas Tabelas 12 e 13. As curvas de peso seco e de calibração do método da hidroxilamina empregados no ensaio estão descritos nos Apêndices B, C e D. Empregou-se para o ensaio o espectrofotômetro Jenway 730S.

Tabela 12 – Influência dos aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina no crescimento e produção de L-asparaginase pela levedura *Issatchenkia orientalis* (SSS08)

Meio de cultivo	Replicata	Crescimento celular (mg.mL ⁻¹)	Atividade enzimática periplasmática (UI.g ⁻¹)	Atividade enzimática extracelular (U.mL ⁻¹)
CDAspN	1	9,72	19,5	n.d.
	2	10,43	17,3	n.d.
	3	6,27	24,3	n.d.
	Média	8,81 ± 2,22	20,38 ± 3,55	n.d.
CDAsp	1	11,61	12,6	n.d.
	2	8,25	21,0	n.d.
	3	12,09	11,6	n.d.
	Média	10,65 ± 2,09	15,10 ± 5,17	n.d.
CDGlutN	1	1,80	24,3	n.d.
	2	3,94	4,1	n.d.
	3	4,95	10,7	n.d.
	Média	3,56 ± 1,61	13,03 ± 10,28	n.d.
CDGlut	1	6,43	11,0	n.d.
	2	6,12	8,5	n.d.
	3	9,85	10,8	n.d.
	Média	7,47 ± 2,07	10,08 ± 1,41	n.d.
CDProIN	1	3,26	n.d.	n.d.
	2	2,84	n.d.	n.d.
	3	2,47	n.d.	n.d.
	Média	2,86 ± 0,40	n.d.	n.d.
CDProl	1	6,13	9,1	n.d.
	2	7,59	9,3	n.d.
	3	11,34	6,2	n.d.
	Média	8,35 ± 2,69	8,23 ± 1,73	n.d.
CDN	1	1,95	n.d.	n.d.
	2	0,87	n.d.	n.d.
	3	1,14	n.d.	n.d.
	Média	1,32 ± 0,56	n.d.	n.d.

Fonte: arquivo pessoal. n.d. – não detectável.

Tabela 13 – Influência dos aminoácidos L-asparagina, L-prolina e L-glutamina no crescimento e produção de L-asparaginase pela levedura *Rhodotorula glutinis* (SSS43)

Meio de cultivo	Replicata	Crescimento celular (mg.mL ⁻¹)	Atividade enzimática periplasmática (UI.g ⁻¹)	Atividade enzimática extracelular (U.mL ⁻¹)
CDAspN	1	1,17	45,8	n.d.
	2	0,93	27,1	n.d.
	3	1,10	32,8	n.d.
	Média	1,07 ± 0,12	35,23 ± 9,59	n.d.
CDAsp	1	1,13	35,6	n.d.
	2	1,71	32,9	n.d.
	3	0,86	39,1	n.d.
	Média	1,24 ± 0,43	35,85 ± 3,09	n.d.
CDGlutN	1	0,59	48,9	n.d.
	2	0,43	30,5	n.d.
	3	0,77	34,7	n.d.
	Média	0,60 ± 0,17	38,05 ± 9,65	n.d.
CDGlut	1	0,60	21,9	n.d.
	2	0,53	27,2	n.d.
	3	0,66	33,7	n.d.
	Média	0,60 ± 0,07	27,62 ± 5,93	n.d.
CDProIN	1	0,63	ND	n.d.
	2	-	-	-
	3	0,73	ND	n.d.
	Média	0,68	ND	n.d.
CDProl	1	0,59	56,9	n.d.
	2	0,42	56,6	n.d.
	3	0,58	57,7	n.d.
	Média	0,53 ± 0,10	57,05 ± 0,57	n.d.
CDN	1	1,18	ND	ND
	2	1,78	ND	ND
	3	1,81	ND	ND
	Média	1,59 ± 0,39	ND	n.d.

Fonte: arquivo pessoal. n.d. – não detectável.

De acordo com os resultados, verificou-se que ambas as leveduras foram capazes de crescer em todos os meios testados, exceto a levedura *Rhodotorula glutinis* no cultivo número 2 CDProlN, que não apresentou crescimento celular. Apesar de ter sido capaz de crescer e produzir L-asparaginase, percebeu-se que a levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou valores de crescimento celular ao final do cultivo bastante inferiores ao observado pela levedura *Issatchenkia orientalis*, capaz de atingir a concentração celular de 12,09 mg.mL⁻¹ no meio Asp. A concentração máxima de células observada para a levedura *Rhodotorula glutinis* foi de 1,81 mg.mL⁻¹, no meio CDN. Uma das possíveis explicações para esse comportamento foi o uso de uma inóculo pouco ativo. Entretanto, apesar do pouco crescimento em biomassa observado para a levedura *Rhodotorula glutinis* neste

ensaio, esta foi capaz de produzir quantidades expressivas de L-asparaginase periplasmática durante os cultivos, sendo possível discutir a influência que os aminoácidos tiveram durante o processo.

De forma análoga ao observado durante o processo de seleção de leveduras, não foi possível detectar atividade enzimática extracelular durante o cultivo de ambas as leveduras em nenhum dos meios. Observou-se, no entanto, que os meios CDAspN, CDAsp, CDGlutN, CDGlut e CDProI foram capazes de induzir a produção de L-asparaginase periplasmática em ambas as leveduras, sendo que apenas os cultivos nos meios CDN (controle) e CDProIN não apresentaram indícios de produção enzimática.

Para a levedura *Issatchenkia orientalis*, a maior atividade média nos cultivos foi observada no meio CDAspN (atividade de $20,38 \pm 3,55 \text{ U.g}^{-1}$), que continha as fontes de nitrogênio L-asparagina e nitrato de amônio. Entretanto, verificou-se que a levedura *Issatchenkia orientalis* foi capaz, também, de produzir L-asparaginase no meio contendo somente L-asparagina como fonte de nitrogênio, produzindo atividade média de $15,10 \pm 5,17 \text{ U.g}^{-1}$. Comportamento semelhante ao observado durante os cultivos com L-asparagina ocorreu durante os cultivos com o aminoácido L-glutamina. No meio GlutN, contendo L-glutamina e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio, observou-se atividade enzimática média de $13,03 \pm 10,28 \text{ U.g}^{-1}$ e, no meio Glut, contendo apenas L-glutamina como fonte de nitrogênio, detectou-se atividade média de $10,08 \pm 1,41 \text{ U.g}^{-1}$. Assim, percebeu-se que a levedura *Issatchenkia orientalis* foi capaz de produzir L-asparaginase empregando somente a L-glutamina e a L-asparagina como fontes de nitrogênio, sem a necessidade de adição de outras fontes externas, como o nitrato de amônio. Entretanto, durante os cultivos empregando o aminoácido L-prolina, percebeu-se que a adição de nitrato de amônio inibiu a produção de L-asparaginase, não sendo possível detectar atividade asparaginolítica periplasmática ao término do cultivo. No entanto, o cultivo empregando apenas a L-prolina como fonte de nitrogênio foi capaz de produzir atividade asparaginolítica média de $8,23 \pm 1,73 \text{ U.g}^{-1}$.

Os meios de cultivo que induziram a produção de L-asparaginase para a levedura *Issatchenkia orientalis* foram os mesmos que induziram a produção enzimática por *Rhodotorula glutinis*. Entretanto, ao contrário do observado para a levedura *Issatchenkia orientalis*, a maior produção de L-asparaginase em

Rhodotorula glutinis ocorreu no meio CDProL, contendo apenas L-prolina como fonte de nitrogênio, observando-se atividade de L-asparaginase média de $57,05 \pm 0,57 \text{ U.g}^{-1}$. Assim como observado para a levedura *Issatchenkia orientalis*, o meio contendo L-prolina em conjunto com nitrato de amônio inibiu totalmente a produção de L-asparaginase por *Rhodotorula glutinis*. Expressivas atividades enzimáticas foram observadas nos meios CDAspN ($35,23 \pm 9,59 \text{ U.g}^{-1}$), CDAsp ($35,85 \pm 3,09 \text{ U.g}^{-1}$), CDGlutN ($38,05 \pm 9,65 \text{ U.g}^{-1}$) e CDGlut ($27,62 \pm 5,93 \text{ U.g}^{-1}$), assim como observado durante os cultivos da levedura *Issatchenkia orientalis*. Percebeu-se, também, que não foi necessária a adição de outras fontes de nitrogênio, como o nitrato de amônio, além dos aminoácidos indutores para produção expressiva de L-asparaginase por *Rhodotorula glutinis*.

Foda, Zedan e Hashem (1980) avaliaram a influência de moléculas estruturalmente semelhantes à L-asparagina como potenciais indutores na produção de L-asparaginase pela levedura *Rhodotorula rubra* UCD-C46A, pertencente ao mesmo gênero que a levedura SSS43 (*Rhodotorula glutinis*). Nesse caso, os autores verificaram que esta levedura foi capaz de produzir L-asparaginase ao se empregar nos meios de cultivo L-asparagina, L-glutamina, ácido L-aspartico, ácido L-glutâmico, L-alanina e extrato de levedura, o controle negativo. A indução da produção de L-asparaginase por certos aminoácidos foi semelhante ao encontrado pela levedura SSS43 (*Rhodotorula glutinis*). Entretanto, quando cultivada em extrato de levedura empregado como controle negativo, a levedura *Rhodotorula rubra* também foi capaz de produzir L-asparaginase, ao contrário do reportado no presente trabalho, em que a levedura *Rhodotorula glutinis* foi incapaz de produzir L-asparaginase no meio controle. Este comportamento pode ser explicado pela presença de aminoácidos indutores da produção de L-asparaginase no extrato de levedura, ao passo que o nitrato de amônio, empregado no presente trabalho, é uma fonte de nitrogênio que não contém traços de aminoácidos que podem levar à indução da produção de L-asparaginase.

Sabe-se que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* produz dois tipos de L-asparaginase: a L-asparaginase I, intracelular e de característica constitutiva, e a L-asparaginase II, periplasmática e induzível a partir da regulação por fontes de nitrogênio (DUNLOP et al., 1977). Considerando que as leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis* não produziram L-asparaginase no meio controle

(CDN), contendo apenas nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, observa-se que a produção dessa enzima é induzível a partir da adição dos aminoácidos L-asparagina, L-glutamina e L-prolina. Assim, observou-se que a L-asparaginase produzida por ambas as leveduras apresenta características semelhantes à L-asparaginase II de *S. cerevisiae*, uma vez que ambas são induzíveis dependentes da fonte de nitrogênio e de natureza periplasmática.

Entretanto, ao contrário do observado para as leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*, observou-se que cepas de *S. cerevisiae* não foram capazes de produzir L-asparaginase do tipo II em meios contendo L-prolina como fonte de nitrogênio (OLIVEIRA; CARVAJAL; BON, 1999). No entanto, Sarquis e colaboradores (2004), estudando a regulação da produção de L-asparaginase extracelular pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus*, encontraram um comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Os autores concluíram que a produção de L-asparaginase empregando o fungo *Aspergillus terreus* é altamente regulada pela fonte de nitrogênio utilizada. Estes autores obtiveram maior produção de L-asparaginase em meio contendo apenas L-prolina como fonte de nitrogênio (58 U.L⁻¹). A associação da L-prolina com outras fontes de nitrogênio, como L-glutamina e ureia, reduziu o rendimento da produção, conforme observado pelas leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Issatchenkia orientalis*.

5.4 Cinética da produção de L-asparaginase periplasmática por *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis* cultivadas em meio líquido

A fim de verificar os aspectos da produção de L-asparaginase periplasmática pelas leveduras SSS08 (*Issatchenkia orientalis*) e SSS43 (*Rhodotorula glutinis*), previamente selecionadas, realizou-se um ensaio de cinética da produção dessa enzima por um tempo de cultivo de 144 horas. Durante as primeiras 72 horas de cultivo, empregou-se o meio CDR para crescimento das leveduras, um meio contendo nitrato de amônio e L-asparagina como fontes de nitrogênio para estimular a produção de biomassa celular (Tabela 5). Após esse tempo de cultivo, a biomassa formada nos frascos foi inoculada em um novo meio, CDP, contendo apenas L-asparagina como fonte de nitrogênio e baixas concentrações de glicose (Tabela 5). Optou-se pela troca de meio após 72 horas de cultivo a fim de evitar o

estresse por acúmulo de metabólitos tóxicos durante o cultivo. As Figuras 15 e 16 apresentam os dados obtidos durante o ensaio de cinética da produção de L-asparaginase pelas leveduras *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*, respectivamente. Os dados numéricos foram apresentados nos Apêndices E e F, respectivamente.

Figura 15 – Resultados obtidos durante o ensaio de cinética de produção de L-asparaginase por *Issatchenkia orientalis*

Fonte: arquivo pessoal

Figura 16 – Resultados obtidos durante o ensaio de cinética de produção de L-asparaginase por *Rhodotorula glutinis*

Fonte: arquivo pessoal

De acordo com os resultados (Figuras 15 e 16), observou-se ao final dos cultivos que a levedura *Issatchenkia orientalis* apresentou maior formação de biomassa ($26,47 \pm 0,99$ mg.mL⁻¹) em relação à levedura *Rhodotorula glutinis* ($11,59 \pm 2,38$ mg.mL⁻¹). Por outro lado, a produção média de L-asparaginase pela levedura *Rhodotorula glutinis* foi expressivamente maior em relação à levedura *Issatchenkia orientalis*. Esses resultados corroboram aqueles observados nos ensaios prévios de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase e de influência de

aminoácidos na produção dessa enzima, em que houve maior produção de biomassa pela levedura *Issatchenkia orientalis* e maior produção de L-asparaginase periplasmática pela levedura *Rhodotorula glutinis*.

Verifica-se na Figura 15 que a levedura *Issatchenkia orientalis* apresentou acentuado crescimento celular durante as primeiras 36 horas de cultivo, quando atingiu a concentração celular média de $23,47 \pm 2,39 \text{ mg.mL}^{-1}$. Houve um discreto crescimento celular no período de 36 a 72 horas, quando a concentração celular atingiu seu valor máximo ($26,13 \pm 1,50 \text{ mg.mL}^{-1}$). Após a substituição do meio de cultivo CDR pelo CDP, houve uma estabilização na concentração celular. Quanto ao perfil de produção de L-asparaginase, percebeu-se que este se assemelha ao perfil de crescimento da concentração celular. Houve uma maior produção enzimática durante as primeiras 36 horas, quando a atividade enzimática média atingiu $16,92 \pm 1,55 \text{ U.g}^{-1}$. Após as primeiras 48 horas de cultivo, houve uma discreta redução na atividade enzimática periplasmática, atingindo valores de $12,04 \pm 0,36 \text{ U.g}^{-1}$ após 144 horas de cultivo. Apesar dessa perda de atividade enzimática durante o cultivo, possivelmente devido à desnaturação proteica, percebeu-se que houve certa estabilidade da atividade da enzima, mesmo após 144 horas de cultivo. Esse fenômeno ocorreu, possivelmente, devido à sua natureza periplasmática, mantendo-a estabilizada no microambiente celular sem que ocorressem mudanças conformacionais drásticas que pudessem levar à perda de atividade.

Por outro lado, os resultados apresentados na Figura 16 indicam que a levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou um crescimento celular acentuado durante as primeiras 72 horas de cultivo, quando atingiu a concentração celular de $12,04 \pm 0,61 \text{ mg.mL}^{-1}$. A partir de então, manteve-se estável, com discreta redução após 132 horas. Assim como foi observado para a levedura *Issatchenkia orientalis*, os resultados apontaram para um perfil de produção de L-asparaginase durante a fase exponencial de crescimento celular. Durante as primeiras 48 horas de cultivo, houve discreta produção de L-asparaginase, alcançando a atividade enzimática de $11,91 \pm 0,92 \text{ U.g}^{-1}$. Houve um destacado aumento na atividade enzimática após 72 horas de cultivo, alcançando valores de $53,45 \pm 0,85 \text{ U.g}^{-1}$. A maior produção de L-asparaginase ($80,96 \pm 12,19 \text{ U.g}^{-1}$) ocorreu após 84 horas de cultivo, mantendo-se a estabilidade até o final do cultivo de 144 horas. Após 144 horas de cultivo, observou-se uma discreta redução na atividade enzimática, que atingiu valores de

$68,15 \pm 23,28 \text{ U.g}^{-1}$. Assim como observado para a L-asparaginase de *Issatchenkia orientalis*, a enzima da levedura *Rhodotorula glutinis* apresentou alta estabilidade, perdendo apenas parcialmente sua atividade enzimática durante o cultivo. Possivelmente a enzima periplasmática manteve-se estável devido ao microambiente celular em que estava exposta.

O perfil cinético de produção de L-asparaginase por ambas as leveduras permitiu observar uma destacada produção da enzima durante as primeiras horas de cultivo em meio CDR. Entretanto, após troca do meio CDR pelo meio CDP e estabilização da concentração celular, não foi observado aumento na produção enzimática, indicando que a enzima é produzida de forma mais intensa durante a fase logarítmica do crescimento celular. Percebeu-se, portanto, que a indução da produção enzimática pelo aminoácido L-asparagina ocorreu durante a fase inicial de crescimento das leveduras, e não durante a fase estacionária. Não se observou, para as leveduras perda significativa de atividade enzimática após 144 horas de cultivo, demonstrando estabilidade da enzima periplasmática quando em seu ambiente natural.

Destaca-se, também, que durante o estudo cinético, observou-se a maior atividade periplasmática de L-asparaginase obtida no trabalho, até o presente momento: $80,96 \pm 12,19 \text{ U.g}^{-1}$, referente ao cultivo de *Rhodotorula glutinis* após 84 horas. Por outro lado, apesar de a levedura *Rhodotorula glutinis* apresentar maior produção de enzima periplasmática, percebeu-se que esta precisou de mais tempo para atingir a fase estacionária do crescimento celular e, ainda, produziu aproximadamente 50% da concentração celular produzida por *Issatchenkia orientalis* em apenas 36 horas. Assim, apesar de a levedura *Issatchenkia orientalis* produzir menores quantidades de L-asparaginase periplasmática, ainda assim apresentou potencialidade como um bom micro-organismo produtor de L-asparaginase devido à destacada velocidade com que é capaz de atingir elevadas concentrações celulares no meio CDR, produzindo a enzima de interesse durante o processo.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu desvendar aspectos importantes no processo de seleção e produção de L-asparaginase de leveduras, principalmente das espécies *Issatchenkia orientalis* e *Rhodotorula glutinis*.

O método de Nessler não foi adequado durante o processo de seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase devido à reação cruzada com interferentes contidos nos extratos de cultivo que inviabilizaram a quantificação da atividade enzimática extracelular. Este método também não foi capaz de detectar atividade asparaginolítica periplasmática em nenhuma das leveduras testadas.

O processo de seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase em meio sólido mostrou-se ineficaz, uma vez que não foi possível correlacionar a formação de halos de coloração azul no meio ABRA sólido com a produção de L-asparaginase extracelular ou periplasmática no meio ABRA líquido.

A seleção de novas leveduras produtoras de L-asparaginase empregando-se a quantificação da atividade enzimática pela metodologia da hidroxilamina não identificou nenhuma levedura capaz de produzir L-asparaginase extracelular. Por outro lado foi capaz de detectar a produção de L-asparaginase periplasmática nas leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43), leveduras estas ainda não descritas na literatura pertinente como produtoras desta enzima.

A metodologia de cromatografia em camada delgada (CCD) foi eficaz para confirmar a produção de L-asparaginase a partir da análise dos picos cromatográficos dos aminoácidos L-asparagina e ácido L-aspártico, confirmando a produção de L-asparaginase periplasmática pelas leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43).

A adição dos aminoácidos L-glutamina e L-asparagina ao meio de cultivo, associados ou não ao nitrato de amônio como fonte de nitrogênio secundária, induziu a produção de L-asparaginase periplasmática das leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43). Entretanto, a presença do aminoácido L-prolina no meio de cultivo só induziu a produção de L-asparaginase na ausência de nitrato de amônio nas leveduras selecionadas.

A maior produção da enzima L-asparaginase periplasmática ocorreu durante a fase de crescimento exponencial das leveduras *Issatchenkia orientalis* (SSS08) e *Rhodotorula glutinis* (SSS43). Não se observou perdas significativas de atividade enzimática após 144 horas de cultivo, demonstrando a estabilidade da L-asparaginase periplasmática no microambiente periplasmático das células.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT Laboratories. Stephen Pacetti. **Amino acid mimetic copolymers and medical devices coated with the copolymers**. US8048975 B2, nov 2006.
- ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 115–122, 2002.
- AEHLE, W. **Enzymes in industry**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2007. 489 p.
- AGARWAL, A; KUMAR, S.; VEERANKI, V. D. Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. **Letters in applied microbiology**, v. 52, n. 4, p. 307–13, 2011.
- AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5655–64, 2001.
- AHRNÉ, L. et al. Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 10, p. 1708–1715, 2007.
- ANESE, M. et al. Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2837–2842, 2011.
- ANESE, M.; QUARTA, B.; FRIAS, J. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 435–440, 2011.
- ARIMA, K. et al. Production of extracellular L-Asparaginases by microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 356–361, 1972.
- ARRIBAS-LORENZO, G.; FOGLIANO, V.; MORALES, F. J. Acrylamide formation in a cookie system as influenced by the oil phenol profile and degree of oxidation. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 63–72, 2009.
- ARRIVUKKARASAN, S. et al. Effect of medium composition and kinetic studies on extracellular and intracellular production of L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum*. **Food Science and Technology International**, v. 16, n. 2, p. 115–125, 2010.
- ARRIVUKKARASAN, S. et al. Effect of medium composition and kinetic studies on extracellular and intracellular production of L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum*. **Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional**, v. 16, n. 2, p. 115–125, 2010.

BALASUBRAMANIAN, K.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Production, isolation and purification of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* using submerged fermentation. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 778–783, 2012.

BANSAL, S. et al. Structural stability and functional analysis of L-asparaginase from *Pyrococcus furiosus*. **Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 375–81, 2010.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Screening of supplementary nitrogen source for fungal L-asparaginase production from soya bean meal flour using latin square design. **International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2011.

BISWAS, S. K. et al. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome B gene. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1191–9, 2001.

BON, E. P. S.; et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 95-122.

BORKOTAKY, B.; BEZBARUAH, R. L. Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp. **Folia microbiologica**, v. 47, n. 5, p. 473–6, 2002.

BROOME, J. D. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from Guinea Pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 35, n. 6, p. 967–974, 1965.

BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase activity of Guinea Pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**. v. 191, p. 1114-1115, 1961.

BROOME, J. D. Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginases as tumor inhibitors. **British Journal of Cancer**, v. 22, n. 3, p. 595–602, 1968.

BUTT, M. S. et al. Xylanases and their applications in baking industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 22–31, 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D.R. Enzimas. In:_____. **Bioquímica ilustrada**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 53-68.

CHOHAN, S. M.; RASHID, N. TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 438–43, 2013.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. et al. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 149–155, 2004.

COPELAND, R. A. A brief history of enzymology. In: _____. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis**. 2nd Ed. New York: John-Wiley & Sons Inc. Publication, 2000. p. 1-10.

CRUZ, M. E. M. et al. Enzimas em medicamentos e diagnósticos. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 307-331.

DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-Asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

DESNICK, R. J.; SCHUCHMAN, E. H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** v. 13, p. 307-335, 2012.

DEWAN, S. S. Global markets for enzymes in industrial applications. **BCC Research**, 2012. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>>. Acesso em: 05/04/2014.

DHARMARAJ, S. Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 102–108, 2011.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977.

DUNLOP, P. C. et al. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 4, p. 1297–1304, 1977.

EBRAHIMINEZHAD, A.; RASOUL-AMINI, S.; GHASEMI, Y. L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 307–11, 2011.

EISELE, N. et al. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3316–21, 2011.

EL-BESSOUMY, A. A; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 387–93, 2004.

ELSHAFEI, A. M. et al. Purification, Characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158–174, 2012.

ELZAINY, T.; ALI, T. Detection of the antitumor glutaminase-asparaginase in the filamentous fungi. **Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1389–1395, 2006.

FELDMANN, H. (Ed). Yeast cell architecture and functions. In: _____. **Yeast: molecular and cell biology**. 2nd Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2012. p. 5-24.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

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

FERRARA, M. A. et al. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* *ASP3* gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 3, p. 71–76, 2010.

FERRARA, M. A. et al. Kinetics of asparaginase II fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2dal80 mutant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, n. 2, p. 299–305, 2004.

FERRARA, M. A. **Produção de asparaginase por *Saccharomyces cerevisiae* e por expressão heteróloga do gene *ASP3* em *Pichia pastoris***. 2004. 124f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

FODA, M.; ZEDAN, H.; HASHEM, S. Characterization of a novel L-asparaginase produced by *Rhodotorula rubra*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 22, p. 87–95, 1980.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4504–26, 2003.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6113–6140, 2008.

GECKIL, H. et al. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 2, p. 203–208, 2006.

GECKIL, H.; GENCER, S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 691–697, 2004.

GRAHAM, M. L. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p. 1293–1302, 2003.

GRENIER, A. et al. The Phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) Is a Pathogen of the Pea Aphid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1956–1965, 2006.

GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 111-125, 1950.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L - asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 23–26, 1997.

GUPTA, N.; DASH, S.; BASAK, U. L-asparaginases from fungi of Bhitarkanika mangrove ecosystem. **AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol**, v. 17, n. 1, p. 15–18, 2009.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923–929, 2012.

GURUNG, N. et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 214–221, 2003.

HATANAKA, T. et al. Extracellular production and characterization of two *Streptomyces* L-asparaginases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 7, p. 836–844, 2011.

HENDRIKSEN, H. V et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 2009.

HERNÁNDEZ-ALMANZA, A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. **Food Bioscience**, v. 5, p. 64–72, 2014.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. L-asparaginase: an anti tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid-state fermentation. **International Journal of Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 88–99, 2011.

HUANG, L. et al. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561–9, 2014.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191–198, 2009.

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

ITO, K.; MATSUSHIMA, K.; KOYAMA, Y. Gene cloning, purification, and characterization of a novel peptidoglutaminase-asparaginase from *Aspergillus sojae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5182–5188, 2012.

JESPERSEN, L. et al. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4-5, p. 441–453, 2005.

JIA, M. et al. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 61, p. 9428–9434, 2013.

KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

KERAMAT, J. et al. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 530–543, 2010.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, 1953.

KIL, J.; KIM, G.; PARK, I. Extraction of extracellular L-Asparaginase from *Candida utilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 749–750, 1995.

KITAGAWA, T. et al. Construction of a β -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1841–1853, 2010.

KUKUROVÁ, K. et al. Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 12, p. 1532–1539, 2009.

KUKUROVÁ, K. et al. Raising agents strongly influence acrylamide and HMF formation in cookies and conditions for asparaginase activity in dough. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 1, p. 1–8, 2013.

KUMAR, D. S.; SOBHA, K. L-Asparaginase from microbes: a comprehensive review. **Advances in Bioresearch**, v. 3, n. 4, p. 137–157, 2012.

KUMAR, S.; PAKSHIRAJAN, K.; VENKATA DASU, V. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 477–486, 2009.

KUMAR, S.; PAKSHIRAJAN, K.; VENKATA DASU, V. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 477–486, 2009.

KUMAR, S.; VEERANKI, V. D.; PAKSHIRAJAN, K. Assessment of physical process conditions for enhanced production of novel glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 3, p. 327–337, 2011.

KWON, Y. J.; WANG, F.; LIU, C. Z. Deep-bed solid state fermentation of sweet sorghum stalk to ethanol by thermotolerant *Issatchenkia orientalis* IPE 100. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11262–11265, 2011.

LOFTUS, P. Lundbeck to Halt Sale of Leukemia Drug, Citing Supply Problems. **Automated Trader**, 2012. Disponível em: <<http://www.automatedtrader.net/real-time-dow-jones/112517/lundbeck-to-halt-sale-of-leukemia-drug--citing-supply-problems>>. Acesso em: 09/03/2014.

MAHAJAN, R. V et al. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 341, n. 2, p. 122–126, 2013.

MAHAJAN, R. V et al. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 341, n. 2, p. 122–126, 2013.

MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. Improved beta-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 27–32, 2009.

MASHBURN, L.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450–453, 1964.

MCCOLLISTER, D. D.; OYEN, F.; ROWE, V. K. Toxicology of acrylamide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 6, p. 172–181, 1964.

MEDEIROS VINCI, R. et al. Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: challenges and pitfalls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 898–906, 2011.

MICHALSKA, K.; JASKOLSKI, M. Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 4, p. 627–40, 2006.

MISHRA, A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 33–42, 2006.

MOHAN KUMAR, N. S. et al. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 741–748, 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150–158, 2013.

MÜLLER, H. J. et al. Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. **British Journal of Haematology**, v. 110, n. 2, p. 379–384, 2000.

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

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

NAWAZ, M. S. et al. Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 568–572, 1998.

NELSON, D.; COX, M. Enzymes. In:_____. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008. p. 183-233.

NEUMAN, R. E.; McCOY, T. A. Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 *in vitro* for asparagine and glutamine. **Science**, v. 124, n. 3212, p. 124-125, 1956.

NOVOZYMES. A low-acrylamide future beckons. **Health and nutrition information sheet**. Disponível em:

<http://www.acrylaway.novozymes.com/en/information-center/News-and-updates/Documents/Acrylaway_Information.pdf>. Acesso em: 05/04/2014.

OLIVEIRA, E. M. M. et al. The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 1, p. 31–7, 2003.

OLIVEIRA, E. M. M.; CARVAJAL, E.; BON, E. P. S. L-Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, n. 2, p. 311–316, 1999.

OLVERA-NOVOA, M.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C.; OLIVERA-CASTILLO, L. Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 257–264, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81–84, 2003.

PANOSYAN, E. et al. Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology and Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217–226, 2004.

PEDRESCHI, F. et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1473–1476, 2011.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 386–392, 2008.

PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515–521, 2008.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011.

POKROVSKII, V. S. et al. Physicochemical properties and antiproliferative activity of recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 18–22, 2012.

POULSEN, P.B.; BUCHHOLZ, H.K. History of enzymology with emphasis on food production. In: WHITAKER, J.; VORAGEN, A.G.J.; WONG, D.W.S. **Handbook of food enzymology**. New York: CRC Press, 2003. p. 11–20

PRADHAN, B.; DASH, S. K.; SAHOO, S. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 936–941, 2013.

PRAKASHAM, R. S. et al. Evaluation of antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated *Bacillus circulans*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 72–80, 2010.

PRAKASHAM, R. S. et al. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. - 6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 5, p. 1382–1391, 2007.

PREMA, P.; NARMADHA DEVI, M.; ALAGUMANIKUMARAN, N. Production of tumor inhibitory L-asparaginase by wild and mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 4, p. 163–171, 2013.

RAMAKRISHNAN, M. S.; JOSEPH, R. Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 316–325, 1996.

RANI, S. A.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. B. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279–282, 2012.

ROZALSKA, M.; MIKUCKI, J. Staphylococcal L-asparaginase: catabolic repression of synthesis. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 41, p. 145–150, 1992.

SAKAMOTO, T. et al. Partial purification and some properties of extracellular asparaginase from *Candida utilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1359–1364, 1977.

SALZER, W.; SEIBEL, N.; SMITH, M. *Erwinia* asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1407–1414, 2012.

SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, Dick. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1415–1427, 2005.

SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

SCHEETZ, R. W.; WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, p. 184–189, 1971.

SCHMIDT, F. Saúde garante medicamento contra leucemia infantil. **Portal saúde**, 2012. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/11749/162/saude-garante-medicamento-contra-leucemia-infantil.html>>. Acesso em: 27/10/2013.

SHRIVASTAVA, A. et al. Biotechnological advancement in isolation of anti-neoplastic compounds from natural origin: a novel source of L-asparaginase. **Acta bio-medica: Atenei Parmensis**, v. 81, n. 2, p. 104–108, 2010.

SIGMA-ALDRICH. Enzymatic assay of ASPARAGINASE (EC 3.5.1.1), 1997. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/18220/Asparaginase.pdf>>. Acesso em: 03/09/2013.

SINGH, Y. et al. Extracellular L-Asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1759-1774, 2013.

SKOG, K. et al. Heatox: heat-generated food toxicants, identification, characterization and risk minimization. Final Report, 2007. **Lund University**. Disponível em: <http://www.slv.se/upload/heatox/documents/Heatox_Final%20_report.pdf>. Acesso em: 29/04/2014.

SONIYAMBY, A. R. et al. Isolation, production and anti-tumor activity of L-asparaginase of *Penicillium sp.* **Internation Journal of Microbiological Research**, v. 2, n. 1, p. 38–42, 2011.

SURDYK, N.; ROSÉN, J.; ANDERSSON, R.; ÅMAN, P. Effects of asparagine, fructose and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2047–2051, 2004.

TAO, J. et al. Production of biodiesel with acid hydrolysate of populus euramevicana CV Leaves by *Rhodotorula glutinis*. **International Journal of Green Energy**, v. 7, n. 4, p. 387–396, 2010.

TAREKE, E. et al. Acrylamide: a cooking carcinogen? **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 6, p. 517–522, 2000.

TAREKE, E. et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4998–5006, 2002.

TONDEE, T.; SIRIANUNTAPIBOON, S.; OHMOMO, S. Decolorization of molasses wastewater by yeast strain, *Issatchenkia orientalis* No. SF9-246. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5511–5519, 2008.

UPPULURI, K. B. et al. Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box–Behnken design in column bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2013.

USHA, R. et al. Screening of actinomycetes from mangrove ecosystem for L-asparaginase activity and optimization by response surface methodology. **Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów**, v. 60, n. 3, p. 213–221, 2011.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168–178, 2011.

VELLARD, M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Curr. Opin. Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 444-450, 2003.

VENIL, C. K.; NANTHAKUMAR, K.; KARTHIKEYAN, K. Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: optimization by response surface methodology. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 10–30, 2009.

VERMA, N. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–62, 2007.

VIDYA, J.; PANDEY, A. Recombinant expression and characterization of L-asparaginase II from a moderately thermotolerant bacterial isolate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 973–980, 2012.

UDDARAJU, S. P. et al. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase by *Serratia marcescens*. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 2, n. 4, p. 89–94, 2010.

WADE, H. E.; CAMMACK, K. A. Physicochemical studies of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Nature**, v. 224, p. 594-595, 1969.

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

WRISTON, J. C.; YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 39, p. 185–248, 1973.

XIAO, H. et al. Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 121, 2014.

YEN, H. W.; YANG, Y. C. The effects of irradiation and microfiltration on the cells growing and total lipids production in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 539–541, 2012.

ZALEWSKA-SZEWCZYK, B. et al. The anti-asparagines antibodies correlate with L-asparagines activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 5, p. 931–936, 2007.

ZEEB, B.; FISCHER, L.; WEISS, J. Stabilization of food dispersions by enzymes. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 198–213, 2014.

ZIA, M. A. et al. Production of L-asparaginase from *Aspergillus niger* using agro wastes by-products in submerged fermentation process. **Jurnal Teknologi**, v. 62, n. 2, p. 47–51, 2013.

ZIMMER, K. R.; et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

ZUO, S. et al. Recent research progress on microbial L-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069–1079, 2014.

ZYZAK, D. V et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4782–4787, 2003.

APÊNDICES

Apêndice A – Curva de calibração empregada para a determinação da concentração de AHA e realização da atividade enzimática pelo método da hidroxilamina no ensaio de seleção de novos micro-organismos produtores de L-asparaginase. Espectrofotômetro Biospectro SP 220

	umol	Abs1	Abs2	Média
B	0	0	0	0
P1	0,1	0,016	0,017	0,0165
P2	0,25	0,03	0,036	0,033
P3	0,5	0,067	0,077	0,072
P4	0,75	0,107	0,113	0,11
P5	1	0,177	0,179	0,178
P6	1,5	0,231	0,239	0,235
P7	2	0,305	0,297	0,301
P8	3	0,432	0,419	0,4255

Fonte: arquivo pessoal.

Apêndice B – Curva de calibração empregada para a determinação da concentração de AHA e realização da atividade enzimática pelo método da hidroxilamina no ensaio de seleção de novos micro-organismos produtores de L-asparaginase. Espectrofotômetro Jenway 730S.

Solução Padrão	μmol	A1	A2	A3	Xa
P1	0,100	0,025	0,030	0,018	0,0243
P2	0,250	0,061	0,061	0,060	0,0607
P3	0,500	0,111	0,125	0,125	0,1203
P4	0,750	0,216	0,212	0,221	0,2163
P5	1,000	0,285	0,296	0,321	0,3007
P6	1,500	0,455	0,498	0,471	0,4747
P7	2,000	0,669	0,681	0,671	0,6737
P8	3,000	0,977	0,987	0,965	0,9763

Fonte: arquivo pessoal

Apêndice C – curva de calibração de peso seco para determinação da concentração celular da levedura SSS08 (*Issatchenkia orientalis*). Espectrofotômetro Jenway 730S.

Fonte: arquivo pessoal

Apêndice D – curva de calibração de peso seco para determinação da concentração celular da levedura SSS43 (*Rhodotorula glutinis*). Espectrofotômetro Jenway 730S.

Fonte: arquivo pessoal

Apêndice E – Resultados obtidos durante o ensaio de cinética de produção de L-asparaginase por *Issatchenkia orientalis*

Tempo (h)	Concentração celular média (mg.mL⁻¹)	Atividade de L-asparaginase periplasmática média (U.g⁻¹)
0	0	0
12	8,00 ± 0,14	6,28 ± 0,21
24	16,09 ± 1,85	8,39 ± 0,25
36	23,47 ± 2,39	16,92 ± 1,55
48	22,05 ± 2,38	16,52 ± 1,24
60	24,50 ± 0,71	13,59 ± 2,66
72	26,13 ± 1,50	13,77 ± 1,79
96	25,62 ± 0,85	12,45 ± 0,25
120	25,97 ± 1,41	12,43 ± 0,38
144	26,47 ± 0,99	12,04 ± 0,36

Fonte: arquivo pessoal

Apêndice F – Resultados obtidos durante o ensaio de cinética de produção de L-asparaginase por *Rhodotorula glutinis*

Tempo (h)	Concentração celular média (mg.mL⁻¹)	Atividade de L-asparaginase periplasmática média (U.g⁻¹)
0	0	0
12	3,09 ± 0,50	14,65 ± 3,06
24	4,49 ± 0,38	21,36 ± 2,92
36	6,73 ± 0,54	13,28 ± 1,48
48	8,31 ± 0,72	11,91 ± 0,92
72	12,04 ± 0,61	53,45 ± 0,85
84	11,54 ± 0,81	80,96 ± 12,19
96	12,34 ± 1,16	73,00 ± 9,85
108	12,38 ± 0,27	62,61 ± 7,36
120	12,14 ± 0,62	70,78 ± 10,48
132	10,92 ± 1,21	74,05 ± 3,22
144	11,59 ± 2,38	68,15 ± 23,28

Fonte: arquivo pessoal