

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de L-asparaginase pela levedura *Leucosporidium muscorum*
CRM 1648 isolada de sedimento marinho coletado na Península Antártica

Rominne Karla Barros Freire

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo, 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de L-asparaginase pela levedura *Leucosporidium muscorum*
CRM 1648 isolada de sedimento marinho coletado na Península Antártica

Rominne Karla Barros Freire

Versão Corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018 de 13/10/2011. Original
encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr.

Coorientador: Prof. Dr. Aldo Tonso

São Paulo, 2019

Rominne Karla Barros Freire

Produção de L-asparaginase pela levedura *Leucosporidium muscorum*
CRM 1648 isolada de sedimento marinho coletado na Península Antártica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTORA

Prof. Dr. Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2019.

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.

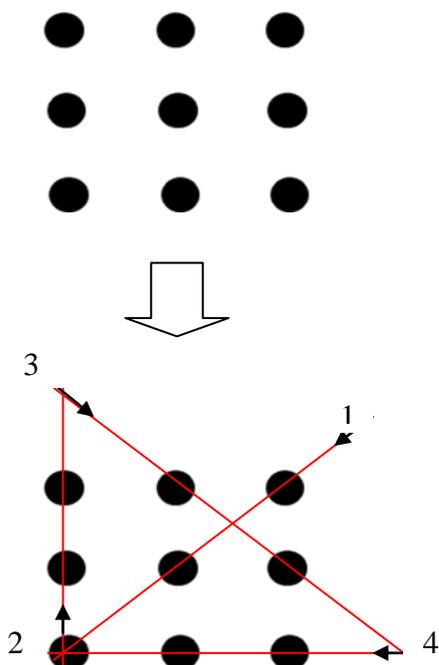
Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F862p	<p>Freire, Rominne Karla Barros Produção de L-asparaginase pela levedura Leucosporidium muscorum CRM 1648 isolada de sedimento marinho coletado na Península Antártica / Rominne Karla Barros Freire. - São Paulo, 2019. 140 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Pessoa Jr, Adalberto Coorientador: Tonso, Aldo</p> <p>1. L-asparaginase. 2. leveduras. 3. Antártica. 4. Leucemia Linfoblástica Aguda. 5. biorreator. I. T. II. Pessoa Jr, Adalberto , orientador. III. Tonso, Aldo, coorientador.</p>
-------	---

Epígrafe

Como ligar 9 pontos utilizando apenas 4 linhas retas?



Quando olhamos a figura e temos um olhar mais rígido, tendenciamos a limitar-nos à imagem do quadrado formado pelos pontos. Esse olhar fixo, limitado, faz a gente não alcançar a solução do problema que é, justamente, OLHAR PARA FORA, sair dos limites, ir além. Para fazer Ciência é preciso “sair da caixa”, para fazer Ciência é preciso “pensar vivo” e o conhecimento vivo é aquele que nunca se fecha, pois o final representa sempre o começo de um novo pensar.

Rominne Freire

(trecho do portfólio desenvolvido como parte do curso livre de Pedagogia Waldorf, em Fevereiro de 2017).

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.

Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”.

(Albert Einstein).

*Aos meus pais e irmãos,
que sempre me apoiaram nas minhas escolhas.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Lana e Wilson, pelo carinho e por terem me apoiado e me incentivado durante toda a minha trajetória.

Aos meus irmãos (Radha e Endrigo), sobrinhas e sobrinho (Cecília, Clarice e Dante), cunhado e cunhada (Gilles e Aline), pelo carinho e apoio emocional.

Ao meu orientador Prof. Adalberto por toda a paciência, disponibilidade e por ter aceitado a orientação desta tese.

Ao meu coorientador Prof. Aldo, sempre muito atencioso e disposto a passar horas com seus alunos em longas conversas e aprendizados. Gratidão por ter aceitado o convite e por ter compreendido e apoiado as minhas escolhas, em especial pela orientação nos ensaios em biorreator.

Ao Prof. Dr. Paul Long, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, no Instituto de Ciências Farmacêuticas do King's College, em Londres. Eu ainda não estava oficialmente matriculada no doutorado, mas foi uma experiência enriquecedora, da qual sou grata pela indicação do prof. Adalberto.

Ao prof. Dr. Felipe Rebello, profa. Dra. Gisele Monteiro, profa. Dra. Carlota Rangel, Profa. Dra. Lara Sette e Prof. Dr. João Carlos pela disponibilidade em me auxiliar e sanar dúvidas com relação a este trabalho. Em especial a Profa. Lara Sette e seu aluno Fábio Inforsato, por ceder as amostras de leveduras utilizadas neste trabalho e as informações acerca da coleta, e ao prof. Felipe Rebello pela disponibilidade em me orientar a respeito das análises estatísticas utilizadas neste trabalho.

Ao prof. Marco Antonio Stephano que participou do meu processo de entrada no doutorado, pelas sugestões, conversas nos corredores da Faculdade de Ciências Farmacêutica e pela oportunidade de organizar junto com ele e outros colegas o Curso de Inverno da FCF/USP nos anos de 2015 e 2017.

Aos amigos de bancada (e da vida) que me apoiaram, em especial a João Santos, Joãozinho, um irmão querido, que sempre me acolheu e esteve do meu lado ao longo de todo esse processo, pela orientação nas tentativas de purificação da enzima, pelas correções dos meus textos e incentivo para que eu não desistisse dessa jornada. Ao Ignácio Moguel, pela paciência e por ter me ajudado nas muitas tentativas para a purificação da enzima. Ao Rafael Ferraro, pela oportunidade de ensiná-lo e, assim, aprender muito mais com ele. Ao Carlos Mendonça pela disponibilidade e atenção na leitura e correção dos meus textos.

Por todas as conversas de incentivo, em especial a minha mãe, Lana (mãe, amiga, companheira em todos os momentos), a César Diaz, João Santos e ao prof. Aldo, que não me deixaram desistir.

A toda equipe (alunos, professores e técnicos) dos laboratórios de Biotecnologia, Nanobio e Biomol, aos novos e aos que já passaram por aqui, em especial à Larissa Bentim, Alessandra Apolinário e Luciana Bueno pela amizade e apoio; à Letícia Parizotto pelo auxílio nos ensaios em biorreator; ao Tales Costa-Silva e ao Juan Flores-Santos pela parceria no artigo COSTA-SILVA et al., 2018b.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP (que apoia o projeto temático no qual este trabalho está inserido).

A todos os que estiveram presentes na minha vida nesse período (2014-2019), aos que ficaram e aos que se foram, aos que me bem quiseram e àqueles que me mal quiseram, pois, como já disse a Monja Coen em uma de suas palestras, os nossos “inimigos” são os nossos maiores amigos, pois são eles que apontam nossos erros, nossas falhas e fraquezas, são o espelho que mostram as nossas sombras e, assim, impulsionam o nosso crescimento. Por isso, gratidão a todos!

Sumário

Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas.....	13
Lista de Equações.....	14
Lista de abreviações.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
Introdução e Justificativa.....	18
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1. <i>L-ASNase como agente quimioterápico</i>	21
1.2. <i>Estrutura e mecanismo de ação</i>	23
1.3. <i>Leucemia Linfoblástica Aguda</i>	25
1.4. <i>Tratamento de LLA</i>	26
1.5. <i>Outras aplicações da enzima L-ASNase</i>	29
1.6. <i>Em busca de alternativas às L-ASNases convencionais</i>	30
1.7. <i>Produção de L-ASNase em biorreator</i>	33
1.8. <i>Leveduras da região Antártica</i>	35
1.8.1. <i>Interesse biotecnológico</i>	36
1.8.2. <i>Leucosporidium muscorum</i>	40
II. OBJETIVOS.....	42
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	42
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	42
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. <i>Leveduras isoladas da Antártica</i>	43
3.2. <i>Preservação das linhagens</i>	45
3.3. <i>Meios de cultivo</i>	45
3.4. <i>Condições de cultivo em frascos agitados (shaker)</i>	46
3.5. <i>Seleção dos isolados produtores de L-ASNase</i>	46
3.6. <i>Análise univariada de fontes de carbono</i>	48
3.7. <i>Análise univariada de fontes de nitrogênio</i>	48
3.8. <i>Avaliação da interação de fontes nutricionais por delineamento fatorial completo para melhoramento do crescimento e produção de L-ASNase</i>	49
3.9. <i>Análise univariada das condições de cultivo: temperatura, pH inicial, concentração celular inicial (X_0) e concentração de água do mar no meio</i>	50
3.10. <i>Ensaio em biorreator</i>	51
3.10.1. <i>Preparo do biorreator</i>	51
3.10.2. <i>Ensaio em biorreator: condições de cultivo e oxigênio dissolvido</i>	52
3.11. <i>Metodologias Analíticas</i>	55
3.11.1. <i>Monitoramento do pH</i>	55
3.11.2. <i>Monitoramento do crescimento celular</i>	56
3.11.3. <i>Dosagem de atividade enzimática</i>	57
3.11.4. <i>Dosagem de proteínas totais</i>	59
3.11.5. <i>Dosagem de sacarose</i>	59
3.11.6. <i>Dosagem de prolina</i>	60
3.11.7. <i>Cálculo dos parâmetros cinéticos</i>	60
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61

4.1. <i>Triagem de leveduras adaptadas ao frio produtoras de L-ASNase (avaliação qualitativa)</i>	61
4.2. <i>Perfil de produção de L-ASNase pelas leveduras selecionadas (avaliação quantitativa) e seleção do melhor produtor</i>	65
4.3. <i>Triagem e seleção dos fatores nutricionais</i>	67
4.3.1. <i>Avaliação de fontes de carbono</i>	68
4.3.2. <i>Avaliação de fontes de nitrogênio</i>	70
4.4. <i>Otimização dos fatores nutricionais por delineamento fatorial completo</i>	73
4.5. <i>Análise univariada das variáveis temperatura (°C), concentração inicial de células (X₀), pH inicial e concentração de água do mar na composição do meio de cultivo</i>	79
4.6. <i>Cultivos em biorreator e avaliação do oxigênio dissolvido</i>	84
4.6.1. <i>Ensaio 1: sem controle de oxigênio dissolvido (OD < 20%)</i>	84
4.6.2. <i>Ensaio 2: sem controle de oxigênio dissolvido (OD > 20%)</i>	87
4.6.3. <i>Ensaio 3: oxigênio dissolvido controlado em 80%</i>	90
4.6.4. <i>Ensaio 4: oxigênio dissolvido controlado em 20%</i>	93
4.6.5. <i>Avaliação comparativa dos ensaios em biorreator</i>	95
V. CONCLUSÕES	100
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	102
VII. REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES.....	117
apêndice A.....	118
apêndice B.....	122
apêndice C.....	122
apêndice D.....	126
apêndice E.....	127
apêndice F.....	132
apêndice G.....	133
apêndice H.....	136
apêndice I.....	137

Lista de Figuras

Figura 1 – Número de publicações registradas na plataforma PUBMED do NCBI que faz referência ao termo “asparaginase” desde 1949 até os dias atuais. Pesquisa realizada em fevereiro de 2019.....	22
Figura 2 – Mecanismo de ação da enzima L-ASNase. Fonte: adaptado de AVRAMIS, 2012.....	23
Figura 3 –A atividade enzimática em relação a temperatura. A atividade das enzimas psicrófilas (círculo vazio) α -amilase (gráfico esquerdo) e celulase (gráfico direito) e seus correspondentes mesófilos (círculo cheio). Fonte: Adaptado de FELLER, 2013.....	38
Figura 4 – Imagem de células em microscópio e morfologia da colônia de linhagem de <i>L. muscorum</i> . Fonte: http://www.westerdijkinstituut.nl/collections , acesso em 12/12/18.....	41
Figura 5 – Mapa da Baía do Almirantado, localizada na Ilha do Rei George, Península Antártica. Os números no mapa da Baía do Almirantado (A) indicam os lugares onde as amostras foram coletadas. 1. Refúgio 2; 2. EACF (Estação Antártica Comandante Ferraz, base brasileira de pesquisa); 3. Botany Point. Fontes: (A) grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette; (B) acesso no Google Maps; e (C) adaptada de ANDRADE et al., 2015.....	44
Figura 6 – Distribuição de cada cepa e dos brancos (amostras sem microrganismo) em placas de 96 poços para pré-inóculo e produção.....	47
Figura 7 – Biorreator BIOSTAT [®] B-MO em uso para cultivo de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase.....	51
Figura 8 – Representação do painel de controle do biorreator BIOSTAT [®] B-MO e todos os parâmetros possíveis de controle: agitação, temperatura, pH, OD, vazão de ar puro de entrada (1) e vazão de O ₂ puro de entrada (2), este último controlado por pulsos de abertura (% de tempo de abertura) da válvula de O ₂ (3). No início do ensaio 4 a configuração foi modificada, conforme representado no círculo pontilhado.....	55
Figura 9 – Valores de densidade óptica em função de valores de massa seca celular, sendo o $R^2 = 0,987$	56
Figura 10 – Reações químicas no método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico de quantificação de L-ASNase. Fonte: adaptada de MAGRI et al., 2018.....	57
Figura 11 – Sequência de passos para a execução do teste de atividade pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico.....	58
Figura 12 – Triagem de produtores de L-ASNase entre 150 isolados da Antártica pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico. A intensidade da cor vermelha indica maior ou menor produção da enzima.....	62
Figura 13 – Resultado do cultivo dos isolados produtores de L-ASNase em meio CDM com azul de bromotimol. Da esquerda para a direita: meio não inoculado, meio sem fonte de nitrogênio, isolados 2, 26, 1, 16, 86, 94 e 85.....	63
Figura 14 – Morfologia das colônias dos isolados produtores.....	64
Figura 15 – Curva de crescimento e produção de L-ASNase por 7 isolados da Antártica	66
Figura 16 – Crescimento celular (A) e produção de L-ASNase (B) pela linhagem <i>L. muscorum</i> CRM 1648 em meio Czapek Dox com adição de diferentes fontes de carbono.....	69

Figura 17 – Crescimento celular (A) e produção de L-ASNase (B) pela linhagem <i>L. muscorum</i> CRM 1648 em meio Czapek Dox com diferentes fontes de nitrogênio.....	71
Figura 18 – Gráfico da superfície de resposta em 3D de MSC (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose (X1), extrato de levedura (X2) e prolina (X3). Valores fixados: X1 = 17, X2 = 15 e X3 = 16.....	78
Figura 19 – Efeito do meio Czapek Dox no crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase após o delineamento experimental. CD: meio Czapek Dox inicial, com glicose e prolina; CDM: meio Czapek Dox melhorado neste trabalho, contendo prolina (20 g.L ⁻¹), extrato de levedura (15 g.L ⁻¹) e sacarose (20 g.L ⁻¹).....	79
Figura 20 – Avaliação do crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 em meio CDM por análise de DO e massa seca celular, bem como de Ln(msc), quando X ₀ = 0,5 g.L ⁻¹ (A), X ₀ = 1,0 g.L ⁻¹ (B) e X ₀ = 1,5 g.L ⁻¹ (C). msc: massa seca celular.....	80
Figura 21 – Curva comparativa de crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase quanto a concentração celular inicial (X ₀).....	81
Figura 22 – Análise dos dados de inclinação das curvas de crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 (A) e produção de L-ASNase (B) por regressão linear em cada nível de X ₀	81
Figura 23 – Curva de crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes temperaturas.....	82
Figura 24 – Curva de crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes valores de pH inicial do meio CDM.....	83
Figura 25 – Curva de crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes concentrações de água do mar no meio CDM.....	84
Figura 26 – Perfis das variáveis pH, temperatura (°C), agitação (rpm) e volumes adicionados de ácido (HCl 20%) e base (NaOH 20%) registradas pelo biorreator durante o Ensaio 1.....	84
Figura 27 – Perfis das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 1 em biorreator.....	85
Figura 28 – Perfil das variáveis crescimento (DO e MSC), pH e produção de L-ASNase no Ensaio 1 em biorreator.....	86
Figura 29 – Perfil das variáveis produção de CO ₂ (CER) e Ln de CER na fase exponencial (A) e crescimento celular (massa seca celular, [X]) mais ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 1.....	86
Figura 30 – Perfis das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator durante o Ensaio 2.....	87
Figura 31 – Perfis das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 2 em biorreator.....	88
Figura 32 – Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e de prolina [S] e produção de L-ASNase no Ensaio 2 em biorreator.....	89
Figura 33 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 2.....	89
Figura 34 – Medida de pH do meio CDM e atividade de L-ASNase ao longo do cultivo de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 em biorreator no ensaio 2.....	90
Figura 35 – Perfis das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator durante o ensaio 3.....	91
Figura 36 – Perfis das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 3 em biorreator.....	91
Figura 37 – Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e prolina [S] e	92

produção de L-ASNase no Ensaio 3 em biorreator.....	
Figura 38 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 3.....	92
Figura 39 – Perfis das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator no Ensaio 4.....	93
Figura 40 – Perfis das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 4 em biorreator. O valor médio de OD foi de 25,1 %.....	94
Figura 41 –Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e de prolina [S] e produção de L-ASNase no Ensaio 4 em biorreator.....	95
Figura 42 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 4.....	95
Figura 43 – Comparação do perfil de OD em cada ensaio.....	97
Figura 44 – Comparação do perfil de crescimento (A) e de produção de L-ASNase (B) nas condições de OD avaliadas em biorreator.....	97
Figura 45 – Perfil comparativo da produtividade em células Px (A) e em produto L-ASNase Pp (B) nos ensaios 1-4 em biorreator.....	98
Figura 46 – Perfil comparativo do consumo dos substratos sacarose (A) e prolina (B) nos ensaios 2-4 em biorreator.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1 –Propriedades das L-ASNases disponíveis comercialmente. <i>Fontes: de Abud, 2005 e Narta et al., 2007.</i>	27
Tabela 2 – Referências encontradas na literatura relacionadas à produção de L-ASNase por espécies de leveduras.....	32
Tabela 3 – Informações sobre a espécie, material de origem e local de coleta dos isolados identificados neste trabalho como produtores de L-ASNase.....	43
Tabela 4 – Meios de cultivo utilizados para a preservação, manutenção e crescimento de leveduras isoladas da Antártica.....	46
Tabela 5 – Fontes de carbono e respectivas concentrações (C) em g.L ⁻¹ de cada fonte avaliada no meio CD para crescimento da levedura alvo e produção de L-ASNase.....	48
Tabela 6 – Fontes de nitrogênio e respectivas concentrações (C) em g.L ⁻¹ de cada fonte avaliada no meio CD para crescimento da levedura e produção de L-ASNase.....	49
Tabela 7 – Fatores e níveis avaliados em delineamento fatorial completo (I) para melhoramento do crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase.....	49
Tabela 8 – Fatores e níveis avaliados em delineamento fatorial completo (II) para melhoramento do crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase.....	50
Tabela 9 – Matriz do <i>planejamento fatorial completo(I)</i> e suas respectivas respostas para a avaliação do crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase.....	74
Tabela 10 –Análise de Variância (ANOVA) por regressão de superfície de resposta de MSC (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose (X1), extrato de levedura (X2) e prolina (X3) – <i>delineamento experimental I</i>	75
Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo (II)e suas respectivas respostas para a avaliação do crescimento de <i>L. muscorum</i> CRM 1648 e produção de L-ASNase.....	76
Tabela 12 –Análise de Variância (ANOVA) por regressão de superfície de resposta de MSC (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose (X1), extrato de levedura (X2) e prolina (X3) – <i>delineamento experimental II</i>	77

Lista de Equações

Equação 1 – Cálculo do volume de suspensão celular para inoculação do meio de cultivo.....	46
Equação 2 – Cálculo de predição da resposta <i>massa seca celular</i> no delineamento experimental.....	50
Equação 3 – Cálculo de predição da resposta <i>produção de L-ASNase</i> no delineamento experimental.....	50
Equação 4 – Cálculo da taxa de captação de O ₂ dissolvido (OUR).....	52
Equação 5 – Cálculo da taxa de produção de CO ₂ (CER).....	52
Equação 6 – Cálculo do coeficiente respiratório (RQ).....	52
Equação 7 – Cálculo do fluxo de ar de saída no biorreator (Φ_s).....	53
Equação 8 – Cálculo de massa seca celular (em gramas por litro).....	56
Equação 9 – Cálculo da relação entre DO e MSC.....	56
Equação 10 – Cálculo da velocidade específica de crescimento (μ_x).....	60
Equação 11 – Cálculo da Integral da equação 10.....	60
Equação 12 – Cálculo da produtividade em células.....	60
Equação 13 – Cálculo da produtividade em produto (L-ASNase).....	60

Lista de abreviações

L-ASNase –L-asparaginase
Asn – asparagina
LLA – leucemia linfoblástica aguda
ASNS – asparagina sintetase
MS – Ministério da Saúde
PI – ponto isolelétrico
FDA – *Food and Drug administration*
OFAT – *one-factor at a time*
DoE – Delineamento Experimental
CCD – *Central Composite Design*
OD – oxigênio dissolvido
DO – densidade óptica
CD – Czapek-Dox
CDM – Czapek-Dox Modificado
EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz
CRM – Central de Recursos Microbianos da UNESP
vvm – volume de gás por volume de meio por minuto
LpM – litro de gás por litro de meio por minuto
AHA – β -hidroxamato aspártico
GOD/POD– glicose oxidase/peroxidase
Eq – equação
UV – ultravioleta
TCA – ácido tricloroacético
RCN – repressão catabólica pelo nitrogênio
FN – fonte de nitrogênio
FC – fonte de carbono
MSC – massa seca celular
DEC – digestivo enzimático de caseína
RQ – coeficiente respiratório
OUR –taxa de captação de O₂ dissolvido
CER –taxa de produção de CO₂

RESUMO

FREIRE, R.K.B. Produção de L-asparaginase pela levedura *Leucosporidium muscorum* CRM 1648 isolada de sedimento marinho coletado na Península Antártica. 2019. 147f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

L-asparaginase (L-ASNase) é uma enzima com propriedades interessantes para a indústria médica, farmacêutica e de alimentos, que tem recebido atenção especial, inclusive no Brasil, por fazer parte do protocolo de tratamento de distúrbios linfoproliferativos, como a leucemia linfoblástica aguda (LLA). No mercado desde a década de 1970, as enzimas de origem bacteriana enfrentam algumas limitações por provocarem reações adversas graves em quase 80% dos pacientes em tratamento. Nesse contexto, L-ASNases provenientes de leveduras se destacam como alternativa, por serem mais próximas às congêneres humanas. A Antártica ainda é um ambiente pouco explorado, com grande diversidade de microrganismos com potencial para a produção de moléculas biológicas de interesse industrial. Nesse contexto, 150 leveduras isoladas de amostras de sedimento marinho coletadas na Península Antártica como parte do projeto MICROSFERA (PROANTAR/CNPq) foram avaliadas para a produção de L-ASNase. A triagem resultou em 9 isolados produtores, dos quais 7 pertencem ao gênero *Leucosporidium*. A linhagem *L. muscorum* CRM 1648 foi a que produziu mais enzima (540 U.L^{-1}), com maior produtividade ($5,6 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e, por isso, foi alvo deste estudo. A análise univariada de fontes de carbono e nitrogênio indicou maior crescimento desse microrganismo e produção de L-ASNase em meio CD com extrato de levedura, prolina e sacarose. Ureia, cloreto de amônio e sulfato de amônio resultaram em baixa ou nenhuma produção da enzima, sugerindo que a metabolização de fontes de nitrogênio por essa linhagem está sob a influência do fenômeno de repressão catabólica pelo nitrogênio (RCN). Dois delineamentos experimentais do tipo fatorial completo resultaram em um aumento de 10 vezes na produção e produtividade da enzima ($4582,5 \text{ U.L}^{-1}$ e $63,6 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente). A análise univariada da concentração inicial de inóculo (X_0), pH inicial do meio, temperatura e adição de água do mar mostrou que a melhor condição para a produção foi: pH = 5,5 ou 6,5, cultivo a 15°C com adição de água do mar (25-50% m/v). A variável X_0 não foi significativa nas concentrações avaliadas. Cultivos em biorreator (batelada) foram conduzidos em quatro diferentes níveis de oxigênio dissolvido (OD): (1) OD não controlado e abaixo de 20%, (2) OD não controlado e acima de 20%, (3) OD controlado em 80% e (4) OD controlado em 20%. Os resultados mostraram que OD é fator limitante para o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase por essa levedura e deve ser mantido acima de 35% para maior produção da enzima. Neste trabalho, a composição do meio e condições de cultivo foram estabelecidas para favorecer a produção de uma nova L-ASNase livre de atividade glutaminásica por levedura adaptada ao frio, abrindo espaço para novos estudos acerca de seu potencial antileucêmico e possível uso como alternativa às enzimas já existentes no mercado no tratamento de LLA.

Palavras-chaves: L-asparaginase; *Leucosporidium muscorum*; levedura adaptada ao frio; leucemia linfoblástica aguda; Antártica; biorreator; delineamento experimental; oxigênio dissolvido.

ABSTRACT

FREIRE, R.K.B. L-asparaginase production by the yeast *Leucosporidium muscorum* CRM 1648 isolated from marine sediments collected in Antarctic Peninsula. 2019. 147f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

L-asparaginase (L-ASNase) is an enzyme with interesting properties for medical, pharmaceutical and food industry, which has received special consideration, especially in Brazil, for being part of lymphoproliferative disorders treatment, such as acute lymphoblastic leukemia (ALL). Bacterial enzymes are on the market since the 1970s and face some limitations related to their serious adverse reactions that reach almost 80% of all patients in treatment. In this context, L-ASNases from yeasts are highlighted as important alternative to bacterial enzymes, due to the closer phylogeny to human congeners. Antarctic environment has much to be explored, with a vast diversity of microorganisms with potential to produce biomolecules with industrial interest. A total of 150 yeasts isolated from Antarctic marine sediments as part of MICROSFERA project (PROANTAR/CNPq) were evaluated for L-ASNase production. The screening resulted in 9 producers, 7 species from the genus *Leucosporidium*. *L. muscorum* CRM 1648 was the strain that yielded the highest L-ASNase activity (540 U.L^{-1}) and volumetric productivity ($5.6 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Carbon and Nitrogen sources were evaluated by a method of one-factor at a time (OFAT). From the gathered results, sucrose, yeast extract and proline resulted in a maximal growth and highest enzyme production. The absence or low production of L-ASNase in medium with urea, ammonium chloride and ammonium sulfate suggests the presence of nitrogen catabolic repression (NCR). Carbon and nitrogen concentration were evaluated by full factorial design and yielded about ten times higher enzyme and volumetric productivity (4582.5 U.L^{-1} and $63.6 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively). Initial inoculum concentration (X_0), initial pH, temperature and concentration of seawater in the culture were evaluated by OFAT analysis and the best condition for L-ASNase production was: pH = 5.5 or 6.5, at 15 °C with addition of seawater (25-50 wt%). X_0 was not considered a significant variable. Bioreactor assays (in batch regime) were performed in four different dissolved oxygen (DO) levels: (1) without DO control (DO remained under 20%), (2) without DO control (DO remained above 20%), (3) DO controlled at 80%, and (4) DO controlled at 20%. The results showed that DO is a key factor for growth of *L. muscorum* CRM 1648 and production of L-ASNase by this yeast and should be maintained above 35% for higher production of this enzyme. At this work, the medium and culture conditions were established to support the production of a novel glutaminase-free L-ASNase by a cold adapted yeast, opening a new path for further studies regarding its antileukemic potential and possible use as an alternative for ALL treatment.

Keywords: L-asparaginase; *Leucosporidium muscorum*; cold-adapted yeast; acute lymphoblastic leukemia; Antarctica; bioreactor; experimental design; dissolved oxygen.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Produção de L-asparaginase no Brasil: uma necessidade urgente

Desde a década de 70, quando a enzima L-asparaginase (L-ASNase) de *Escherichia coli* foi extraída, purificada e introduzida no protocolo de tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA), a taxa de sobrevivência aumentou sensivelmente e hoje é em torno de 80-90% (PIETERS et al., 2011; KATO; MANABE, 2018). Combinada com esteróides, vincristina e, às vezes, antraciclina nas etapas iniciais do tratamento, essa enzima se tornou um produto terapêutico de grande importância para a erradicação completa das células leucêmicas (KATO; MANABE, 2018), ainda que apresente limitações quanto à estabilidade no soro e possa causar hipersensibilidade em 3-78% dos pacientes (*apud* NARTA et al., 2007).

Mais recentemente, outras L-ASNases de origem bacteriana foram lançadas no mercado, uma forma peguilada proveniente da forma nativa de *E. coli* e outra nativa, proveniente da espécie *Erwinia chrysanthemi* (reclassificada como *Dickeya dadantii*, de acordo com GRENIER et al 2006). No Brasil, no entanto, a única formulação liberada para tratamento de LLA pela ANVISA é a nativa de *E. coli*. Além disso, o Brasil não é um país de fabricação de biofármacos, muito pelo contrário, costuma importar esse tipo de medicamento. Por depender da importação de L-ASNase, em 2013 o país sofreu problemas no seu abastecimento pela empresa fornecedora Bagó, que descontinuou a comercialização de Elspar®, fórmula de L-ASNase inicialmente fabricada pela Merck Sharp & Dohme (MSD) e, posteriormente, pela Lundbeck INC e OSO Biopharmaceutical (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com a Recomendação nº10/2013 do Ministério Público Federal, a ausência de L-ASNase nos protocolos de tratamento no Brasil é um problema de saúde pública e representaria um retrocesso de pelo menos 20 anos no tratamento de LLA nesse país, principalmente porque dados da época (2012-2013) do INCA (Instituto Nacional do Câncer) previam 11.500 novos casos/ano de câncer em crianças, dos quais 25% seriam de LLA e 15% de Linfoma Não Hodgkin (MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL, Recomendação nº10/2013). Embora dados atuais do INCA mostrem que no Brasil, de 2000 a 2005, a sobrevivência relativa em cinco anos de leucemia infantil tenha resultado em 70% (INCA, 2016), na falta de L-ASNase cerca de 5 mil crianças e adolescentes no Brasil teriam sua chance de cura comprometida (MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL, Recomendação nº10/2013).

Por ser a L-ASNase tão importante no protocolo de tratamento de LLA, associada ao fato de que o Brasil ainda não produz biofármacos e de que a enzima Elspar[®] (formulação nativa de *E. coli*) é, dentre as formulações comerciais, aquela que mais provoca reações imunológicas, existe uma urgente necessidade da sua produção nacional, bem como a pesquisa de fontes alternativas dessa enzima. Por isso, desde 2013 há uma demanda do Ministério da Saúde (MS) para que o Brasil comece a produzir L-ASNase. Recentemente, o MS adquiriu uma alternativa mais barata da enzima, de nome comercial Leuginase[®], cuja eficácia foi contestada por profissionais da área da saúde, gerando polêmica que foi parar na mídia brasileira e resultou em sua retirada do mercado (Fantástico, Rede Globo, 2017). Desde então há risco de desabastecimento dos hospitais que pode vir a comprometer o tratamento de pacientes com LLA.

Essas questões motivaram o projeto temático (FAPESP 2013/08617-7) *Produção de L-asparaginase extracelular: da bioprospecção à engenharia de um biofármaco antileucêmico*, que propõe incentivar a pesquisa nessa área, com a finalidade de buscar diferentes fontes produtoras dessa enzima em sua forma nativa, bem como utilizar de ferramentas de engenharia genética para melhorar os biofármacos que já estão no mercado ao reduzir as repostas imunológicas e, portanto, efeitos colaterais associados ao tratamento com as L-ASNases convencionais.

Em razão de suas condições inóspitas, a Antártica tem se revelado um ambiente bastante propício para a descoberta de novas biomoléculas com características interessantes para a indústria. Por isso, esse ambiente foi um dos escolhidos para rastrear microrganismos produtores de L-ASNase e este é o campo de pesquisa onde se encaixa este trabalho.

O presente trabalho focou na seleção de uma levedura produtora de L-ASNase, melhoramento do meio e condições de cultivo em frascos agitados e avaliação da demanda de oxigênio dissolvido (OD) em biorreator, visto que o entendimento da fisiologia do microrganismo produtor é essencial e compõe as primeiras etapas em um processo industrial que visa à produção de produtos biológicos. Optou-se por explorar apenas leveduras porque todas as L-ASNases disponíveis no mercado são de origem bacteriana e existe a expectativa de que a enzima de origem fúngica, por sofrer modificações pós-traducionais, possa resultar em um tratamento com menor resposta imunológica e, logo, com mais qualidade de vida para os pacientes com LLA. Conscientemente, espera-se que este trabalho não seja o fim, mas apenas o começo de

novas pesquisas tanto sobre a levedura *Leucosporidium muscorum* e seu potencial biotecnológico, como acerca da enzima L-ASNase produzida por esse microrganismo.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. L-ASNase como agente quimioterápico

L-asparaginase, L-asparagina amidohidrolase (EC 3.5.1.1), é um importante agente quimioterápico utilizado para o tratamento de uma infinidade de desordens linfoproliferativas e linfomas, principalmente de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças e jovens (NARTA et al., 2007). Clementi (1922) foi o primeiro a observar atividade elevada dessa enzima no soro de porquinhos da índia (*Cavia porcellus*). Anos mais tarde, Kidd (1953) reportaria a regressão de linfosarcomas em ratos tratados também com o soro desse animal. Em 1961, Broome relacionaria o estudo de Kidd com a observação feita por Clementi, concluindo que a enzima L-ASNase seria o agente responsável pela regressão de linfosarcomas (*apud* NARTA et al., 2007).

A extração de L-ASNase, em quantidades suficientes para a produção industrial, a partir do soro de porquinhos da índia envolve uma operação complicada, de forma que outras fontes produtoras da enzima foram buscadas. Mashburn e Wriston (1964), bem como Campbell e Mashburn (1969) reportaram a purificação de L-ASNase de *Escherichia coli* e demonstraram que esta tinha potencial tumoricida similar à enzima produzida por porquinhos da índia, com a vantagem de ser produzida mais facilmente e por um custo mais baixo (*apud* NARTA et al., 2007). Dessa forma, a obtenção da enzima a partir de sistemas mais simples, como bactérias, possibilitou a produção em larga escala para os primeiros estudos pré-clínicos e clínicos. Desde então, L-ASNases de diversas fontes têm sido estudadas, desde aquelas produzidas por microrganismos procariotos como *Escherichia coli* (CEDAR; SCHWARTZ, 1968), *Erwinia carotovora* (ROTH et al., 2013) e *Pseudomonas aeruginosa* (EL-BESSOUMY et al., 2004), até organismos eucariotos, como *Aspergillus terreus*, roedores, primatas e plantas (KHUMAR; SOBHA, 2012).

Uma pesquisa na plataforma PUBMED do National Center for Biotechnology Information (NCBI) realizada dia 26 de dezembro de 2018 mostra o registro de publicações que fazem referência a palavra “asparaginase”. Desde 1949 até os dias atuais são quase 5.000 publicações, as quais se mostram expressivas nos primeiros anos da década de 70, época na qual a enzima nativa de *E. coli* foi lançada no mercado. O tema tornou-se evidente novamente desde 2012, como mostra a Figura 1, período no qual o Ministério da Saúde começou a anunciar futuros problemas no abastecimento de

L-asparaginase e possível prejuízo no tratamento de crianças com LLA. Assim como o Brasil, outros países foram afetados, principalmente países do norte da África e Ásia.

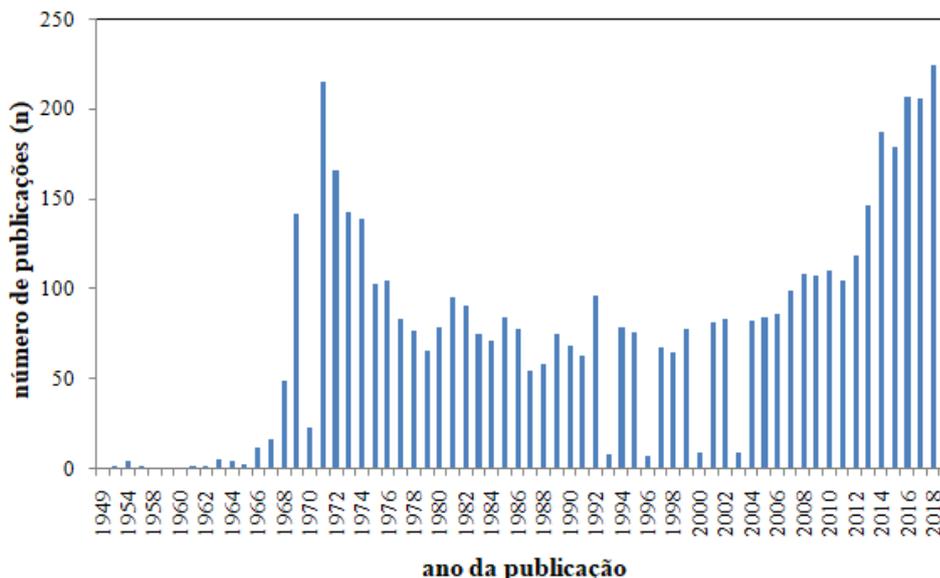


Figura 1 – Número de publicações registradas na plataforma PUBMED do NCBI que faz referência ao termo “asparaginase” desde 1949 até os dias atuais. *Pesquisa realizada em fevereiro de 2019.*

Como essa enzima é produzida por uma vasta variedade de animais e plantas, além de microrganismos diversos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras, microalgas), muitos desses trabalhos estão voltados a explorar novos nichos em busca de microrganismos produtores de L-ASNase, já que a produção e extração dessa enzima de plantas e mamíferos é mais demorada e complexa (DORIYA et al, 2016). A preferência pela enzima proveniente de microrganismos se deve ao fato da produção ser mais barata, abundante e mais simples para o aumento de escala e purificação, além dessas enzimas serem mais estáveis e de mais fácil modificação genética quando compara as congêneres de organismos superiores (VIMAL; KUMAR, 2017a).

L-ASNase é classificada em dois grupos: L-ASNase tipo bacteriana e L-ASNase tipo planta, as quais diferem estruturalmente e bioquimicamente. O tipo bacteriano tem outra subdivisão, tipo 1 e tipo 2. As L-ASNases tipo 1 correspondem a enzimas citosólicas que exibem baixa afinidade pelo substrato L-asparagina, enquanto as do tipo 2 são periplasmáticas e possuem alta afinidade pelo substrato. As formulações de L-ASNase que estão no mercado são do tipo 2, possuem estrutura

tetramérica composta por quatro subunidades idênticas, cada qual constituída por 326 resíduos de aminoácidos (DORIYA et al, 2016).

1.2. Estrutura e mecanismo de ação

A enzima L-ASNase age hidrolisando o grupamento amida da cadeia lateral do aminoácido, não essencial, L-asparagina (Asn), levando à formação de ácido aspártico e amônia (AVRAMIS, 2012), como mostra a Figura 2.

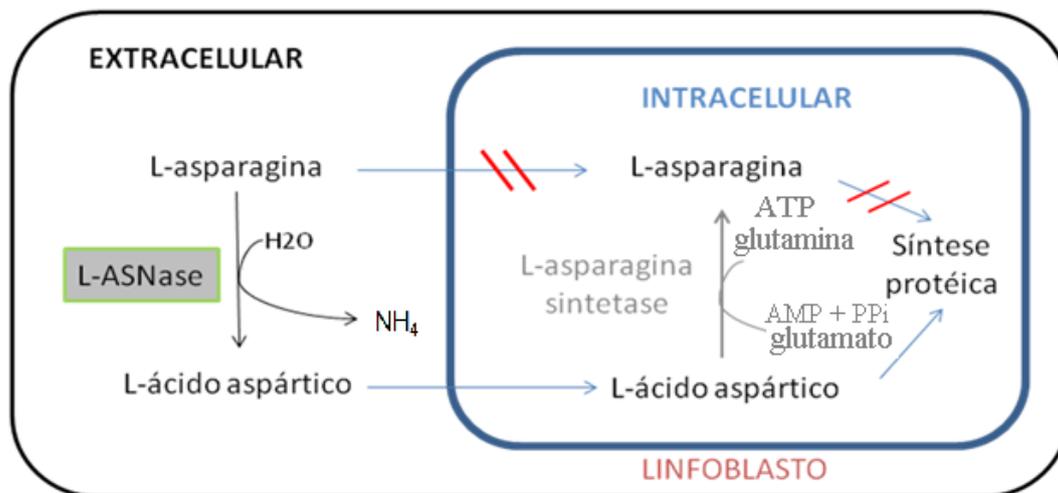


Figura 2 – Mecanismo de ação da enzima L-ASNase. *Fonte: adaptado de AVRAMIS, 2012.*

O aspartato resultante dessa reação sofre transaminação com α -cetogluturato, gerando glutamato e oxaloacetato que, em células de mamíferos, é convertido em malato no citosol, sendo transportado para a matriz mitocondrial pelo transportador malato- α -cetogluturato. Em bactérias, o oxaloacetato produzido na reação de transaminação pode ser utilizado diretamente no ciclo do ácido cítrico para a geração de energia na forma de potencial redutor (NELSON; COX, 2014).

Em células humanas normais, a asparagina é um aminoácido não essencial, já que pode ser sintetizada a partir de outros aminoácidos (como glutamato, glutamina e aspartato), através de transaminases e asparagina sintetase (MARINI et al., 2017). O modo de ação da enzima L-ASNase consiste no fato das células leucêmicas necessitarem de elevadas quantidades do aminoácido L-asparagina para a sua proliferação, além de não o sintetizarem em quantidades suficientes em razão de baixa ou nenhuma capacidade de produção de asparagina sintetase (NARTA et al., 2007; RAETZ; SALZER, 2010; KUMAR; SOBHA, 2012). Assim, para satisfazer a elevada demanda desse aminoácido, as células leucêmicas precisariam de asparagina fornecida

pela dieta ou proveniente de sua biossíntese, que é limitada (KUMAR; SOBHA, 2012). Dessa forma, a ação antineoplásica efetiva dessa enzima tem como base a necessidade nutricional dos linfoblastos leucêmicos, uma vez que deprimem a asparagina presente no soro, fator essencial para a síntese de proteínas, DNA e RNA, resultando em morte celular. Uma vantagem desse tratamento é que as células saudáveis não sofrem com os efeitos diretos das L-ASNases por serem capazes de produzir normalmente o aminoácido L-asparagina a partir de outros aminoácidos, como já mencionado.

A enzima L-ASNase também é capaz de converter L-glutamina em ácido glutâmico e amônia, ainda que essa reação ocorra em menor velocidade e mais baixa afinidade pelo substrato (CHAN et al., 2014). Uma questão ainda pouco abordada e esclarecida é se a atividade glutaminásica da enzima L-ASNase seria prejudicial ao tratamento de LLA, já que aparentemente esta estaria associada a alguns efeitos adversos (neurotoxicidade, principalmente), ou se essa atividade atuaria juntamente com a atividade asparaginásica no combate a esse tipo de leucemia. Há indícios na literatura de que glutaminases microbianas também possuem atividade antitumoral e foi reportada a regressão completa de leucemia em camundongos tratados com L-ASNase em condições na qual a L-glutamina circulante foi depletada (*apud* WADE et al., 1971). De acordo com COVINI et al. (2012), a hidrólise de glutamina pela L-ASNase contribuiria com os efeitos tóxicos no tratamento de LLA mas, por outro lado, seria necessária para sustentar a depleção do aminoácido asparagina, contribuindo significativamente para a atividade antineoplásica da enzima.

CHAN et al. (2014) avaliaram o efeito da ausência de atividade glutaminásica na L-ASNase de *E. coli* comercial (Elspar[®]). Eles observaram que a enzima modificada por mutagênese sítio-específica (mutante Q59L) conseguia matar as células leucêmicas não produtoras de asparagina sintetase (ASNS negativas), mas que não tinha atividade alguma sobre as células cancerígenas produtoras dessa enzima (ASNS positivas). Esse resultado sugere que a ausência de atividade glutaminásica em variantes da enzima L-ASNase poderia alcançar melhor resultado terapêutico em células leucêmicas ASNS negativas e talvez possa ser interessante em alguns casos, já que supostamente reduziria a toxicidade no tratamento com L-ASNase. Por outro lado, a atividade glutaminásica continua sendo essencial para matar as células leucêmicas produtoras de asparagina sintetase (ASNS positivas) (CHAN et al., 2014). Faltam na literatura estudos adicionais que corroborem e se aprofundem mais nesse assunto.

1.3. *Leucemia Linfoblástica Aguda*

O termo leucemia refere-se a um grupo de doenças complexas e diferentes entre si que afetam a produção dos glóbulos brancos (HAMERSCHLAK, 2010). Pode ser classificada como linfóide ou mieloide, de acordo com o tipo celular afetado, e quanto ao tempo de desenvolvimento, podendo ser de forma aguda ou crônica. A forma aguda é caracterizada pelo aumento rápido de células imaturas no sangue, fazendo com que a medula óssea seja incapaz de produzir células sanguíneas saudáveis (INCA, 2016). A leucemia corresponde a aproximadamente 1/3 dos casos de câncer em crianças de 0-14 anos em todo o mundo, sendo a LLA o tipo mais frequente (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017).

De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), no Brasil, para o biênio de 2018-19 estimam-se 5.840 casos novos de leucemia em homens e 4.860 em mulheres, aproximadamente 7% de aumento em relação a estimativa para os anos 2016-17 (INCA, 2016). Os valores atuais correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, a leucemia em homens é o quinto tipo de câncer mais frequente na Região Norte (4,17/100 mil), na Região Nordeste ocupa a oitava posição (4,90/100 mil), nas Regiões Sudeste (5,79/100 mil) e Sul (8,67/100 mil) ocupa a décima posição e na Região Centro Oeste (4,88/100 mil) está na décima primeira posição. Para as mulheres, é a sexto tipo de câncer mais frequente na Região Norte (3,29/100 mil), o nono tipo mais frequente na Região Sul (6,50/100 mil), ocupa a décima posição na Região Nordeste (3,66/100 mil) e a décima primeira nas Regiões Sudeste (4,86/100 mil) e Centro-Oeste (3,93/100 mil).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) resulta na produção descontrolada de blastos de características linfóides e no bloqueio da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. É o tipo de câncer mais comum em crianças, representando, aproximadamente, 25% dos cânceres diagnosticados na população com menos de 15 anos (EGLER et al., 2016). Seu pico de incidência ocorre entre os 2 e 5 anos de idade, sendo quatro vezes mais frequente que a leucemia mieloide aguda (<http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca>, acesso em 22/10/2018). Nos Estados Unidos, dos 4.000 casos de LLA diagnosticados anualmente, dois terços são em crianças e adolescentes (LOPES et al., 2017). Nessa faixa etária, a melhora pode ocorrer

em até 80% dos casos com uma taxa de sobrevivência de 90% a depender do acesso ou não ao tratamento.

Desde a inserção de L-ASNase no tratamento de LLA, há mais de 40 anos, houve aumento da sobrevida dos pacientes de <10% a >80% (AVRAMIS; PANOSYAN, 2005). Apesar desse avanço, ainda se observa recidiva em 10-25% dos casos, principalmente após longos períodos de tratamento. No caso de pacientes na fase da adolescência e adultos jovens, entre 15-39 anos e diagnosticados com LLA, o tratamento não tem sido tão favorável, embora a literatura sugira aumento substancial da sobrevida de jovens adultos tratados com protocolos similares aos pediátricos, inclusive com L-ASNase (EGLER et al., 2016).

1.4. Tratamento de LLA

O tratamento completo da LLA deve considerar a idade do paciente, a imunofenotipagem, a citogenética, a contagem inicial de glóbulos, as condições clínicas e o envolvimento ou não do sistema nervoso, testículos e gânglios, e é realizado com quimioterapia. Os pacientes necessitam ser tratados assim que o diagnóstico é confirmado e o objetivo inicial é a remissão com restauração da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas (HAMERSCHLAK, 2010).

No Brasil, o tratamento da LLA também se dá com a combinação de várias drogas. É importante a escolha adequada do melhor esquema de tratamento e sua sequência para garantir as melhores chances de cura aos pacientes. A escolha do esquema quimioterápico deve ser feita com base na idade, quadro clínico, resultados laboratoriais e resposta ao tratamento inicial. A presença de fatores prognósticos desfavoráveis ou recidiva de doença deve dirigir a abordagem do paciente para tratamentos mais agressivos, incluindo o transplante de medula óssea nas suas diversas modalidades (HAMERSCHLAK, 2010).

O tratamento de LLA consiste em quatro fases ou blocos, cada uma composta por um coquetel de medicamentos, a fim de evitar resistência ao tratamento. São elas indução da remissão, consolidação, reindução e manutenção ou continuação, com uma duração total de tratamento de 2 a 3,5 anos, com terapia intensiva após os primeiros 6 a 9 meses (EGLER et al., 2016). O primeiro bloco de quimioterapia dura de 4 a 6 semanas e tem como objetivo induzir a remissão completa do câncer, a qual pode ocorrer em até 90% dos casos (COOPER et al., 2015). O tratamento nessa fase inclui, dentre outras drogas, L-ASNase que é também utilizada na segunda fase do tratamento

(consolidação), com duração de 4 a 8 meses e que serve de terapia preventiva para eliminar doenças subclínicas do sistema nervoso central (EGLER et al., 2016). Esse medicamento, que é um biofármaco, desde que começou a ser utilizado há aproximadamente 50 anos, permanece como um dos mais importantes agentes no tratamento de LLA (MARINI et al., 2017). Sua importância pode ser estimada em termos de seu valor de mercado, cuja contribuição fica em torno de 40 % em relação ao total de enzimas que são produzidas atualmente para uso médico (VIMAL; KUMAR, 2017a). Foi estabelecido por estudos em macacos *Rhesus* e humanos que o nível de atividade enzimática de L-ASNase deve ser $\geq 0,1$ U/mL para adequada depleção do aminoácido asparagina (MARINI et al., 2017).

Atualmente três formas de L-ASNase estão disponíveis no mercado para tratamento de LLA: a forma nativa obtida da linhagem bacteriana *Escherichia coli* K12, de nome comercial Elspar®, Merck & CO (JAFFE et al., 1971); a sua forma peguilada (PEG-ASNase), que possui uma ligação covalente com metoxi-polietileno glicol, *m*-PEG (PASUT; VERONESE, 2012), comercialmente denominada Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals, Inc.); e a L-asparaginase obtida da linhagem bacteriana *Erwinia chrysanthemi*, denominada crisantaspase e comercialmente chamada de Erwinase®, *EUSA Pharma Inc* (KEEGAN et al., 2011). As diferentes formulações apresentam diferenças em relação à atividade, afinidade pelo substrato (K_m), peso molecular, tempo de meia vida, ponto isoelétrico (PI), resultando em asparaginases com diferentes propriedades, toxicidade e eficácia (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades das L-ASNases disponíveis comercialmente. *Fontes: ABUD, 2005 e NARTA et al., 2007.*

	<i>E. coli</i>		<i>Erwinia chrysanthemi</i>
	Nativa	peguilada	nativa
atividade específica (U.mg ⁻¹)	280-400	280-400	650-700
K_M (μM)-L-asparaginase	12	12	12
K_M (μM)-L-glutaminase	3000	3000	1400
massa molecular (kDa)	141	145	138
ponto isoelétrico (PI)	5	5	8,7
tempo de meia-vida (dias)	1,24 ± 0,17	5,73 ± 3,24	0,65 ± 0,13

Dois mecanismos de resistência ao tratamento com L-ASNase têm sido propostos. O primeiro refere-se ao aumento dos níveis de produção de asparagina sintetase pelas células leucêmicas, de forma que elas conseguem ser auto-suficientes na produção do aminoácido Asn; o outro mecanismo seria a produção de anticorpos anti-asparaginase que neutralizariam a enzima impedindo a sua ação enzimática (EL-GHONEMY, 2014).

Aprovada pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) em 1978, a forma nativa de *E. coli* é a mais imunogênica (RIZZARI et al., 2013). Sua degradação pelas proteases lisossomais catepsina B e asparaginil endopeptidase resulta na inativação e exposição de epítomos, com consequente ativação da resposta imune (OFFMAN et al., 2011). Essa resposta pode ser sintomática, com sinais de hipersensibilidade clínica, ou assintomática, quando está associada com o aparecimento de anticorpos neutralizantes, efeito conhecido por “inativação silenciosa”, resultando em declínio rápido dos níveis de atividade enzimática (COVINI et al., 2012). Um estudo com 154 crianças com LLA mostrou que, após 29 dias do início do tratamento, aproximadamente 35% das crianças tratadas com L-ASNase de *E. coli* desenvolveram anticorpos anti-asparaginase, dos quais 56% apresentaram sintomas clínicos e 44% apresentaram inativação silenciosa (RIZZARI et al., 2013). A estimativa é que pelo menos 10% dos pacientes tratados com L-ASNase desenvolvem inativação silenciosa durante a terapia (MARINI et al., 2017).

A forma peguillada foi aprovada pelo FDA em fevereiro de 1994 como a segunda linha de tratamento para pacientes com LLA sensibilizados pela formulação nativa de *E. coli* (PIETERS et al., 2011). Essa formulação reduz a imunogenicidade da proteína, aumentando sua estabilidade no plasma, tem meia vida mais longa e pode ser administrada a doses mais baixas e intervalos mais longos (apud EL-GHONEMY, 2014).

Por outro lado, além de também induzir a inativação silenciosa, é comprovada a existência de reação-cruzada entre anticorpos desenvolvidos nos pacientes previamente tratados com L-ASNase nativa e PEG-ASNase, não sendo recomendada neste caso a mudança de uma para outra (PIETERS et al., 2011).

A alternativa quando há reação a alguma das formulações de *E. coli* é substituí-la por crisantaspase, aprovada em 2011 pelo FDA para utilização em segunda ou terceira linha de tratamento de LLA (KEEGAN et al., 2011). Embora a crisantaspase não apresente reação-cruzada com os outros dois tipos, ainda pode induzir reações

alérgicas em um terço dos pacientes (PIETERS et al., 2011; RIZZARI et al., 2013). Além disso, apresenta meia vida biológica menor e maior neurotoxicidade do que as outras asparaginases de *E. coli* (OFFMAN et al., 2011). De acordo com a literatura, os efeitos neurotóxicos são atribuídos à atividade de glutaminase, que é de aproximadamente 2% para *E. coli* e de 10% para *E. chrysanthemi* (PIETERS et al., 2011; AVRAMIS, 2012).

Dessa forma, a imunogenicidade continua sendo uma problemática na utilização de L-ASNase no protocolo de tratamento de LLA. Atribuída à forma tetramérica da enzima e, sobretudo, à presença de agregados nas formulações, reflete um sistema de produção ineficiente que tem prejudicado a aprovação dessas preparações (PIETERS et al., 2008). Por essa razão, a elucidação das propriedades dessa enzima, bem como a busca por novas fontes e condições otimizadas de cultivo, poderão contribuir para o desenvolvimento de um biofármaco antileucêmico que não possua as limitações presentes nas formulações já existentes no mercado.

1.5. Outras aplicações da enzima L-ASNase

Apesar da enzima L-ASNase ser mais conhecida e explorada como agente quimioterápico, possui outras propriedades interessantes para a indústria médica e veterinária que, inclui o tratamento de doenças infecciosas, autoimunes, câncer em cães e gatos (VIMAL; KUMAR, 2017a).

Bactérias patogênicas do gênero *Streptococcus*, por exemplo, durante aderência a células hospedeiras, libera toxinas (estreptolisinas) que induzem o estresse celular e, por consequência, o aumento dos níveis de asparagina sintetase e produção do aminoácido asparagina, que está envolvida com a expressão aumentada de genes da proliferação dessa bactéria (BARUCH et al., 2014). L-ASNase age bloqueando a proliferação do patógeno, de forma que esse estudo sugere o uso terapêutico dessa enzima contra esse tipo de infecção (VIMAL; KUMAR, 2017a; BARUCH et al., 2014).

Outra área de aplicação para essa molécula, cujo interesse tem sido crescente, é na indústria de alimentos, como agente mitigante da acrilamida (VIMAL; KUMAR, 2017a; ALAM et al., 2018). Alguns alimentos ricos em amido quando fritos ou aquecidos em temperatura elevada (acima de 120°C) liberam acrilamida. Ela é resultante da reação de Maillard que ocorre entre os grupos carbonil dos açúcares redutores e o grupamento amino do aminoácido asparagina, que estão presentes nesses alimentos (VIMAL; KUMAR, 2017a; ALAM et al., 2018; QESHMI et al., 2018). O uso

da asparagina como agente mitigante da acrilamida é importante porque a acrilamida é neurotóxica e classificada como agente carcinogênico (MEDEIROS et al., 2012). Há duas marcas de L-ASNase no mercado lançadas com esse propósito, para atender a indústria de alimentos: Acrylaway® e PreventASe®. Alimentos industrializados como biscoitos, salgadinhos, batata frita, cafés, cereais e torradas quando pré-tratados com Acrylaway® apresentaram redução de 50 a 90% dos níveis de acrilamida (VIMAL; KUMAR, 2017a). No entanto, existe demanda do mercado para buscar novas fontes de L-ASNase, com propriedades desejáveis para a indústria de alimentos, como estabilidade em ampla variedade de pH e temperaturas, elevada taxa de conversão de substrato, baixo K_m (elevada especificidade pelo substrato) e alto K_{cat} (elevada eficiência catalítica) para reduzir o tempo dessa etapa no processo industrial (VIMAL; KUMAR, 2017a).

1.6. *Em busca de alternativas às L-ASNases convencionais*

Estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de melhorar a estabilidade das L-ASNases, aumentar a meia vida e reduzir a imunogenicidade dessas enzimas. Inicialmente, foram propostas modificações químicas como forma de ocultar epítomos expostos na estrutura proteica dessa enzima, imunologicamente ativos e capazes de estimular as reações de hipersensibilidade (NARTA et al., 2007). A proposta mais conhecida nesse sentido resultou no desenvolvimento da forma peguilada da enzima (ABUCHOWSKI et al., 1979). Outra alternativa seria eliminar os epítomos imunodominantes por mutagênese sítio-específica. OFFMAN et al. (2011), através de estudos de modelagem e dinâmica molecular com L-ASNase nativa de *E. coli*, mostraram que a substituição de um único aminoácido pode bloquear a clivagem dessa enzima por proteases presentes no soro, mantendo ou melhorando a sua atividade enzimática.

Além do melhoramento das L-ASNases já existentes no mercado, muito estudos têm apostado na busca por outras fontes da enzima. Um exemplo são as L-ASNases produzidas por bactérias termofílicas, as quais possuem a vantagem de serem mais estáveis em temperaturas elevadas (PRITSA; KYRIAKIDIS, 2001; BANSAL et al., 2012); produzidas por bactérias do gênero *Rhizobium* (HUERTA-SAQUERO et al., 2013); *Yersinia pseudotuberculosis* (POKROVSKAYA et al., 2012); actinobactérias (KHAMNA et al., 2009; MEENA et al., 2015b; SAXENA et al., 2015); *Erwinia* spp. (KOTZIA; LABROU, 2007); *Pectobacterium* spp. (KUMAR et al., 2010); linhagens de

Bacillus (ALRUMMAN et al., 2019; ERVA et al., 2018; GHOLAMIAN et al., 2013; HYMAVATHI et al., 2010); *Pseudomonas aeruginosa* (GECKIL et al., 2006) e *Zymomonas mobilis* (EINSFELDT, 2014).

Embora as L-ASNases bacterianas continuem sendo as mais estudadas, alguns trabalhos têm apontado o interesse por fontes eucarióticas (leveduras e fungos filamentosos) em razão dessas células realizarem diversas modificações pós-traducionais (glicosilação, fosforilação, acilação, metilação, formação de pontes dissulfeto) que podem estar relacionadas à estabilidade proteica e ao mascaramento de sítios imunogênicos. Dessa forma, a busca por fontes eucarióticas de L-ASNase poderia resultar em uma enzima que produzisse menos efeitos colaterais em humanos (SHRIVASTAVA et al., 2015).

Microrganismos eucarióticos como fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, são comumente reportados na literatura como produtores de L-ASNase (da ROCHA et al., 2019; CACHUMBA et al., 2019; COSTA-SILVA et al., 2018a; VALA et al., 2018; KUMAR; SOBHA, 2012), além de *Trichosporon asashii* (ASHOK et al., 2019) e espécies endofíticas (SILVA et al., 2018). Também já foi registrada a produção de L-ASNase por microalgas das espécies *Spirulina maxima* (EL BAKY; EL BAROTY, 2016) e *Chlorella vulgaris* (EBRAHIMINEZHAD et al., 2014).

Há poucos trabalhos abordando a pesquisa de L-ASNases produzidas por leveduras. KRISHNAPURA et al. (2015) citam em seu artigo de revisão alguns trabalhos nesse sentido, de produção de L-ASNase por *Rhodospiridium toruloides*, *Candida guilliermondii* e *S. cerevisiae*, todos eles trabalhos muito antigos da década de 80. RAMAKRISHNAN; JOSEPH (1996) reportaram a caracterização de uma L-ASNase de *Rhodospiridium toruloides*, sugerindo que esta seria um homodímero (e não um tetrâmero, como são as de origem bacteriana), com uma subunidade de massa molecular de 87 kDa, e k_M 1,43 mM para asparagina e 6,45 mM para glutamina, com atividade ótima em pH 6,35 e temperatura de 37°C (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996). Esse trabalho traz a possibilidade de que novas estruturas moleculares da enzima, menores que os seus congêneres bacterianos, possam ser menos imunogênicos e, por isso, uma alternativa interessante no tratamento de LLA.

LOPES et al. (2017) também relatam em seu artigo de revisão a produção de L-ASNase pelos mesmos gêneros já citados aqui, em publicações também antigas. Uma busca no banco de dados do PUBMED (acesso em Janeiro de 2019) mostrou as seguintes referências, mais recentes, sobre a produção de L-ASNase por leveduras

(Tabela 2): produção heteróloga de ASP3 de *S. cerevisiae* por *P. pastoris* (FERRARA et al., 2006; 2010; GIRÃO et al., 2016), produção de L-ASNase em biorreator por linhagem de *Candida utilis* (MOMENI et al., 2015) e a produção dessa enzima pela levedura *Yarrowia lipolytica* (DARVISHI et al., 2019). A tese de MOGUEL (2018) traz resultados sobre a produção de L-ASNase de linhagem de *L. scotti*, levedura isolada de sedimentos marinhos coletados na Antártica. Alguns métodos de rompimento celular foram avaliados utilizando a linhagem *L. muscorum* CRM 1648, alvo do presente trabalho, mostrando que os métodos mecânicos, principalmente rompimento por pérolas de vidro e sonicação, foram mais eficientes para a recuperação de L-ASNase (COSTA-SILVA et al., 2018b). Esses e todos os trabalhos que envolvem o tema estão referenciados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Referências encontradas na literatura relacionadas à produção de L-ASNase por espécies de leveduras.

Taxonomia	Referências
<i>Candida utilis</i>	KIL et al., 1995; MOMENI et al., 2015
<i>Candida guilliermondii</i>	STEPANYAN; DAVTYAN, 1988
<i>Pichia polymorpha</i>	FODA et al., 1980
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996
<i>Rhodotorula</i> sp.	FODA et al., 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FERRARA et al., 2006 e 2010; GIRÃO et al., 2014 e 2016
<i>Leucosporidium scotti</i>	MOGUEL, 2018
<i>Leucosporidium muscorum</i>	COSTA-SILVA et al., 2018b
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DARVISHI et al., 2019

Portanto, ainda há muito a ser explorado entre as leveduras que, por serem organismos eucarióticos e apresentarem as vantagens já citadas anteriormente em relação a sistemas procarióticos, apresentam grande perspectiva de uso para a produção de biofármacos, como a L-ASNase. Dessa forma, a pesquisa desses microrganismos em diversos nichos traz uma perspectiva para encontrar uma L-ASNase com ação antileucêmica e, ao mesmo tempo, menos imunogênica que as congêneres disponíveis no mercado.

1.7. *Produção de L-ASNase em biorreator*

A produção de L-ASNase é feita principalmente por cultivo submerso (em meio líquido), embora também haja relatos na literatura de produção em meio sólido por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*. (CACHUMBA et al., 2019; DUTTA et al., 2015) e *Trichoderma viride* (ELSHAFEI; EL-GHONEMY, 2015), pela bactéria *Myroides gitamensis* (PRASAD TALLURI et al., 2019) e actinobactérias do gênero *Streptomyces* (BASHA et al., 2009). As vantagens da produção submersa é que esta é bem estabelecida, a manipulação dos componentes do meio é mais simples, não requer pré-tratamento do substrato, além do controle dos parâmetros físicos (pH, OD e temperatura) e purificação do produto serem realizados mais facilmente do que na fermentação em estado sólido (VIMAL; KUMAR, 2017a).

A otimização do processo de produção tem papel importante na indústria biotecnológica por melhorar os rendimentos e produtividade do processo sendo, portanto, decisiva para o sucesso comercial do produto (KUMAR et al., 2017). O melhoramento do processo é feito por meio da manipulação dos nutrientes e das condições do processo (pH, temperatura, tempo de cultivo, concentração inicial do inóculo, agitação) utilizando metodologias de análises estatísticas.

Uma das técnicas mais simples e mais utilizada é a análise univariada (OFAT, do inglês *one-factor at a time*), na qual é avaliado um fator por vez, pela variação dos níveis do fator em estudo (FUKUDA et al., 2018). Essa metodologia, por não conseguir avaliar a interação entre os fatores, costuma ser associada a técnicas de Delineamento Experimental (DoE) que se divide em: técnicas de rastreamento dos fatores (variáveis independentes – x) que são ou não significativos para as respostas avaliadas (variáveis dependentes – y), como por exemplo o estudo fatorial completo de dois níveis ou fracionado e Plackett-Burmann; e técnicas de otimização, como Box-Behnken, delineamento composto central (CCD, do inglês *Central Composite Design*) e fatorial completo de 3 níveis (FUKUDA et al., 2018). Como mostra o Apêndice A, as análises mais utilizadas para o melhoramento do processo de produção de L-ASNase de diferentes origens têm sido até então a análise univariada, o CCD e o fatorial completo e/ou fracionado.

A otimização do meio e condições de cultivo enfrentam alguns limites, pois ainda é possível melhorar a produtividade e o rendimento do processo caso aumente a capacidade de produção (volume de meio) e crie condições apropriadas de oxigenação

em um sistema que permita o controle e monitoramento dos parâmetros principais, como a aeração, agitação, pH e o oxigênio dissolvido. Por essa razão, a etapa seguinte ao melhoramento dos parâmetros nutricionais e de cultivo em frascos agitados é o cultivo em biorreator. O tipo de processo mais utilizado para cultivo em biorreator e produção de L-ASNase é a batelada (cultivo descontínuo) seguida pela batelada alimentada (descontínuo alimentado), como sugere o Apêndice A.

Ao analisar as publicações nos últimos 5 anos envolvendo o termo em inglês “asparaginase production” (Apêndice A), realizada no banco de dados do PUBMED e no Google Acadêmico, observa-se que os grupos que mais tem publicado estão localizados no Brasil e, principalmente, na Ásia e Sudoeste da África (Índia, Irã e Egito). Bactérias e fungos filamentosos são os grupos de microrganismos que mais têm sido explorados para a produção dessa enzima. Além disso, é possível encontrar organismos produtores de L-ASNase em nichos diversos ao redor do mundo, desde solo, rizosfera a ambiente marinho. As fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas para produção dessa enzima variam muito de acordo com o microrganismo utilizado na produção, mas parece existir uma tendência maior no uso de glicose como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio (Apêndice A).

A bactéria *Pectobacterium carotovorum* foi detectada como produtora de uma L-ASNase livre de atividade glutaminásica e cultivada em biorreator com 1,5 litros de volume útil, por 12 horas, em cultivo descontínuo e descontínuo alimentado, utilizando um meio com glicose e asparagina como fontes principais de carbono e nitrogênio, pH controlado em 8,6, a 30°C, com cascata de agitação variando de 160 a 600 rpm, aeração de 1,5 vvm e OD de 20% da saturação com ar. Nessas condições, a bactéria foi capaz de produzir, aproximadamente, 40 U.mL⁻¹ da enzima, valor duas vezes maior do que o obtido nos cultivos em batelada (KUMAR et al., 2017).

Fungo filamentosos da espécie *Aspergillus terreus* foi cultivado em meio Czapek-Dox contendo glicose e prolina como fontes de carbono e nitrogênio em cultivo descontínuo com 5 litros de volume útil, pH 9,5, sendo cultivado a 35°C e aeração de 0,5 vvm, obtendo uma produção final aproximada de 14 U.g⁻¹ de massa seca celular (COSTA-SILVA et al., 2018a).

A levedura *Yarrowia lipolytica* foi avaliada quanto a produção de L-ASNase, em um processo descontínuo, utilizando meio Czapek-Dox, pH inicial igual a 7,0, com glicose e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio. Essa levedura foi cultivada por 24 horas em um biorreator de 5 litros a 29°C, 500 rpm e 1 vvm de aeração,

produzindo 210 U.mL^{-1} da enzima, valor 12 vezes maior do que o obtido em frascos agitados (DARVISHI et al., 2019).

A levedura *Candida utilis* foi cultivada em biorreator (cultivo descontínuo) com melado de beterraba e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, pH ajustado para 7,0 e temperatura de 30°C . A produção de L-ASNase foi máxima e igual a $245,6 \text{ U.mL}^{-1}$ com 20 horas de cultivo sob agitação controlada em 300 rpm e aeração de 1,25 vvm (MOMENI et al., 2015).

Mais raramente, a produção de L-ASNase foi feita em cultivo contínuo. Bactéria da espécie *Zymomonas mobilis* foi cultivada em biorreator com 0,3 litros úteis de meio contendo sacarose, asparagina e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, a 30°C , em modo descontínuo até atingir a fase exponencial, quando o sistema passou a ser alimentado continuamente. A maior produção (117 U.L^{-1}) ocorreu em uma taxa de diluição igual a $0,20 \text{ h}^{-1}$ (MENEGAT et al., 2016).

Os métodos de quantificação da enzima são variados e os mais utilizados, segundo o Apêndice A, é o Método de Nessler, seguido pelo método de L-aspartil- β -hidroxâmico, este último sendo utilizado com bem menos frequência do que o primeiro. O problema do uso do método de Nessler é que, por quantificar indiretamente a enzima L-ASNase através da amônia que é liberada da reação de hidrólise da asparagina, pode superestimar a atividade enzimática em razão da presença de interferentes no caldo de cultivo (proteínas que, ao serem metabolizadas, liberam amônia). Os resultados de produção da enzima são expressos em diferentes unidades, em unidades totais da enzima (U), unidades por volume de cultivo (U.mL^{-1} ou U.L^{-1}), unidades por massa seca de células (U.g^{-1} ou U.mg^{-1}) ou unidades da enzima por mg de proteínas totais (U.mg^{-1}). Essas diferenças acabam dificultando a análise comparativa da produção de L-ASNase entre os diversos microrganismos estudados.

1.8. Leveduras da região Antártica

As leveduras são microrganismos eucarióticos que habitam quase todos os ambientes terrestres, inclusive ambientes onde ficam expostas permanentemente a temperaturas abaixo de 5°C (CARRASCO et al., 2016). Mais de 80% da biosfera da Terra é permanentemente ou periodicamente exposta a essas temperaturas baixas, o que incluem mares profundos (90% dos oceanos apresentam temperaturas $< 5^{\circ}\text{C}$), desertos gelados e regiões glaciais, como o ambiente Ártico e Antártico (BUZZINI et al., 2012; TSUJI et al., 2013).

O primeiro registro de vida microbiana em um ambiente frio data de 400 anos AC, em escritos do filósofo grego Aristóteles que mostravam a descrição do que depois descobriram ser um organismo fotossintético que deixava a neve avermelhada (DEMING, 2009). Apenas em 1887 o cientista germânico Forster descreveria a capacidade de uma bactéria reproduzir-se a 0 °C e em 1902 seria cunhada a terminologia psicrófilo por Schmidt-Nielsen para descrever microrganismos com tal comportamento (DEMING, 2009).

A definição clássica utilizada para classificar organismos adaptados ao frio se baseia nos parâmetros cinéticos de crescimento em diferentes temperaturas, de acordo com o qual o termo psicrófilo é reservado a organismos que podem crescer em temperatura abaixo ou igual a 0°C e cujas temperaturas ótima e máxima para crescimento são $\leq 15^{\circ}\text{C}$ e $\leq 20^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Aqueles que podem crescer a 0 °C e cuja máxima temperatura de crescimento pode estar acima de 20 °C são denominados psicrotolerantes ou psicrotróficos (MORITA, 1975).

Embora até hoje esses termos sejam ainda os mais utilizados, foi proposto o uso do termo estenopsicrófilo para o grupo que inclui os psicrófilos estritos ou obrigatórios, e euripsicrófilo, para o grupo que inclui os organismos psicrófilos ou psicrotróficos facultativos (WANG et al., 2017). Essa definição leva em consideração que, em ambientes frios, o que diferencia um grupo do outro não é a temperatura ótima e máxima de crescimento, mas sim a extensão da faixa de temperatura em que o microrganismo é capaz de crescer (RUSSELL, 2006). A maioria dos microrganismos recuperada de amostras das regiões Ártica e Antártica são psicrófilos euritérmicos, justamente porque a temperatura do solo nessas regiões pode sofrer grandes variações, de 30 a 40 °C (RUSSELL, 2006).

1.8.1. Interesse biotecnológico

A região Antártica, situada no polar austral, é a porção mais ao sul da Terra, com uma área correspondente a 14 milhões Km², o que faz da Antártica o quinto maior continente do mundo (TSUJI et al., 2013; SHIVAJI; PRASAD, 2009). Aproximadamente 98% dessa região da Terra é coberta por gelo e neve, com temperaturas na região costeira que variam de 5 a -35 °C (TSUJI et al., 2013).

O estudo de microrganismos provenientes da Antártica tem atraído o interesse de pesquisadores desde 1960 em razão das condições climáticas severas, onde predominam o frio extremo, ciclos de congelamento/descongelamento, alta salinidade, exposições

excessivas a luz UV alternadas com longos períodos de escuridão e baixa disponibilidade de nutrientes (apud DUARTE et al., 2013; apud BUZZINI et al., 2012; di MENNA, 1958). Desde então, espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos tem sido isoladas de diversos habitats na Antártica, como solo, gelo, líquens, macroalgas, esponjas, sedimento marinho, água do mar, plantas briófitas e angiospermas (*Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*) e biofilmes (VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013; TSUJI et al., 2013; DUARTE et al., 2016; CARRASCO et al., 2016; MARTORELL et al., 2017; INFORSATO, 2017; WENTZEL et al., 2018; FERREIRA et al., 2019). Foram identificadas aproximadamente 70 espécies de leveduras provenientes da Antártica, sendo 13 do filo Ascomycota e 57 do filo Basidiomycota (BUZZINI et al., 2012). Aparentemente 90% das leveduras isoladas na Antártica e em regiões de clima frio pertencem ao filo Basidiomycota, sendo que desse grupo espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Mrakia* são mais comumente reportadas (CARRASCO et al., 2012; MARTORELL et al., 2017; DUARTE et al., 2018).

Estudos têm mostrado que a capacidade de microrganismos crescerem em temperaturas tão baixas e condições tão adversas estaria associada a ajustes estruturais e fisiológicos, adaptações evolutivas para amenizar a redução das reações químicas devido às baixas temperaturas (de GARCIA; van BROOCK, 2016; FELLER, 2013; D'AMICO et al., 2002). Entre os mecanismos de adaptação estão a modificação de lipídeos de membrana, com maior presença de ácidos graxos insaturados ou poliinsaturados, que aumenta a fluidez da membrana; a síntese de proteínas termoprotetoras (proteínas de choque-frio) e de crioprotetores, reduzindo a presença de cristais de gelo no citoplasma; e desenvolvimento de mecanismos de proteção contra espécies reativas de oxigênio (FELLER, 2013; de GARCIA; van BROOCK, 2016). A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, por exemplo, seria uma forma de adaptação já que, com essas enzimas é possível aproveitar as fontes de carbono disponíveis no ambiente, contribuindo para o ciclo de nutrientes e mineralização da matéria orgânica (apud BUZZINI et al., 2012; apud CARRASCO et al., 2016). Além disso, também é relatada a produção de outras enzimas de adaptação ao frio e proteínas anticongelantes, que controlam a formação de cristais de gelo, evitando danos físicos na estrutura da célula (TSUJI et al., 2013).

O efeito da temperatura sobre as reações químicas é descrito pela equação de Arrhenius $k = Ae^{-E_a/RT}$, onde k é a constante da reação, A é uma constante para cada

sistema, relacionada à colisão das moléculas, E_A é a energia de ativação (energia mínima requerida para que uma reação se inicie), R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta em Kelvin. Por essa reação percebe-se que qualquer redução na temperatura provoca uma redução exponencial na velocidade de reação. Para superar esse efeito, os psicrófilos e psicrotolerantes sintetizam enzimas com maior eficiência catalítica, pelo aumento do seu poder catalítico (k_{cat}) ou da redução de sua afinidade pelo substrato (K_m) ou ainda pela mudança em ambos os parâmetros (D'AMICO et al., 2002; FELLER, 2013), como mostra a Figura 3.

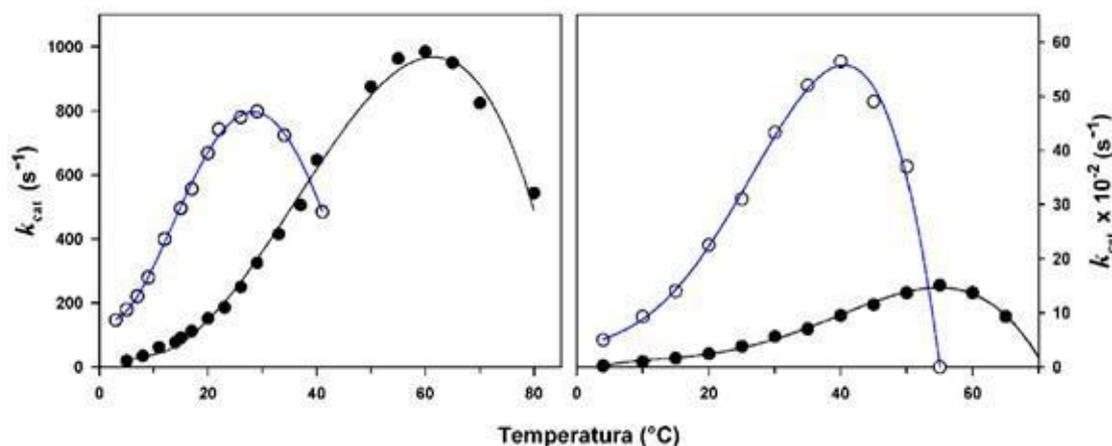


Figura 3 – A atividade enzimática em relação a temperatura. A atividade das enzimas psicrófilas (círculo vazio) α -amilase (gráfico esquerdo) e celulase (gráfico direito) e seus correspondentes mesófilos (círculo cheio). *Fonte: Adaptado de Feller (2013).*

O aumento do poder catalítico dessas enzimas pode ser até 10 vezes maior a baixas (e moderadas) temperaturas do que por seus homólogos mesófilos (FELLER; GERDAY, 2003). Isso é possível em razão dessas enzimas apresentarem uma estrutura mais flexível no sítio catalítico, que permite fazer e desfazer interações não covalentes, tornando-as mais ou menos ativas (FELLER, 2013). Essas propriedades fazem com que as enzimas adaptadas ao frio sejam altamente promissoras do ponto de vista biotecnológico, pois aceleram o tempo de processos realizados a temperaturas baixas/moderadas, reduzem a concentração enzimática requerida, resultam em alta produtividade nas reações com componentes termo-sensíveis, previnem transformações químicas indesejáveis e a perda de compostos voláteis e ainda diminuem os gastos com energia elétrica (MARGESIN et al., 2003).

A produção de enzimas psicrófilas – amilases, lipases, proteases, celulases, pectinases, β -gluconidases, esterases – tem sido reportada em leveduras e diferem dos similares produzidos por outros microrganismos (HAMID et al., 2014; CARRASCO et al., 2016). Amilases ativas no frio e celulases possuem alto potencial de aplicação em processos que requerem baixas temperaturas, como os requeridos na indústria de alimentos, biocombustíveis e detergentes (apud CARRASCO et al., 2016).

A triagem de microrganismos isolados a partir de amostras coletadas nas Ilhas Shetland do Sul, na Antártica, produtores de lipases, proteases e xilanases, revelou a presença de 21 espécies de leveduras dos filos ascomicota e basidiomicota, entre elas as mais abundantes foram *Candida glabrosa*, *Cryptococcus victoriae*, *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *R. laryngis* (DUARTE et al., 2013). Entre as leveduras avaliadas nesse estudo, 46,4%, 37,1% e 14,4% foram capazes de produzir lipases (a 15 °C), xilanases (a 15 °C) e proteases (a 25 °C), respectivamente.

Uma protease ácida produzida pela levedura isolada de ambiente marinho na Antártica, *Rhodotorula mucilaginosa*, foi purificada e caracterizada (LARIO et al., 2015). Essa enzima apresentou características interessantes como ótima atividade catalítica em pH 5,0 e temperatura de 50 °C, além de ser estável em altas concentrações salinas.

Um total de 226 microrganismos (60 fungos filamentosos e 166 leveduras) isolados de amostras de sedimento marinho, coletadas próxima a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), estação brasileira localizada na Ilha Rei George (Antártica marítimica) foram avaliados quanto a produção de lipases e proteases. A levedura da espécie *Metschnikowia australis* foi a mais abundante na região e a que apresentou maior atividade lipolítica (0,88 U.mL⁻¹), enquanto o fungo filamentoso do gênero *Pseudogymnoascus* apresentou a maior atividade proteolítica (6,21 U.mL⁻¹) entre os isolados avaliados (INFORSATO, 2017).

Enzimas pectinolíticas são utilizadas para a degradação de compostos de pectina nas indústrias de processamento de frutas e vegetais (apud HAMID et al., 2014). Essas enzimas produzidas por leveduras psicrófilas *Candida capitatum* e *R. mucilaginosa* exibiram 50-80% de sua atividade catalítica ótima em pH 3-5 e temperaturas de 6 e 12 °C, propriedades estas interessantes para a indústria de vinhos e clarificação a baixas temperaturas (SAHAY et al., 2013). Além disso, pectinases psicrófilas têm potencial para manter valores nutricionais, sabor e características sensoriais, propriedades importantes na indústria de alimentos (NAKAGAWA et al., 2002).

Uma linhagem de *Leucosporidium scotti*, também isolada da Península Antártica, foi avaliada e mostrou capacidade para a produção de L-ASNase e de acumular lipídios mono e poliinsaturados, ao ser cultivada em substratos de baixo custo, como sacarose e glicerol (MOGUEL, 2018). Seu cultivo em biorreator resultou em produtividade de $36,9 \text{ U.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ dessa enzima em condições otimizadas de cultivo ($15 \text{ }^\circ\text{C}$, $X_0: 5 \text{ g.L}^{-1}$; pH 7,0; 48 h; k_{La} : 89-92 h^{-1}). Esse trabalho apontou que L-ASNases advindas desse gênero de levedura tem potencial terapêutico, com uma eficiência catalítica próxima a da congênera de *E. coli* e mais elevada que a congênera de *S. cerevisiae*, indicando que as L-ASNases de espécies de *Leucosporidium* sp. possam apresentar propriedades interessantes para a indústria farmacêutica e de alimentos.

1.8.2. *Leucosporidium muscorum*

Do reino Fungi, filo Basidiomycota e família Leucosporidiales, a espécie *Leucosporidium muscorum* já teve outras denominações, entre elas: *Candida muscorum*, *Azymocandida muscorum*, *Rhodotorula muscorum*, *Leucosporidiella muscorum* e *Vanrija muscorum* (www.mycobank.org, acesso em: 10/01/19). Foi primeiramente isolada de solo de floresta na Ilha de Chatham, localizada aproximadamente a 800 km a Leste da Ilha Sul de Nova Zelândia, também denominada Ilha Te Waipounamu (di MENNA, 1958). Também foi registrado o isolamento dessa espécie de levedura em pequenas poças no glacial de Midre Lovénbreen, localizado em Spitsbergen, território ártico da Noruega (PATHAN et al., 2010); de musgos em decomposição do tipo *Sphagnum*, coletados na Nova Zelândia (SAMPAIO et al., 2003; GARCÍA et al., 2015); de esponja marinha nas proximidades da Baía Fildes, na Ilha do Rei George (LAICH et al., 2014); e de sedimentos marinhos próximo as bases brasileira e peruana na Baía do Almirantado (INFORSATO, 2017), local de onde vieram as amostras utilizadas neste trabalho.

Quando cultivada em agar Sabouraud, apresenta colônia cremosa e de coloração creme ou amarelada, célula ovóide ou cilíndrica $(2,5-4) \times (7-19) \mu$ (di MENNA, 1958). Essa espécie foi avaliada em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 37, 40, 42 e 45°C), mas não houve crescimento em temperatura acima de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (<http://www.westerdijknstitute.nl/collections>, acesso em 12/11/18). Outro trabalho mostrou que essa levedura é capaz de crescer a 4, 22 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$, mas não a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (PATHAN et al., 2010). O mesmo trabalho mostra que *L. muscorum* consegue crescer em meio com alta concentração de sais ($\leq 4,0 \%$ de NaCl, m/v) e foi capaz de produzir

urease, pectinase e amilase, quando cultivadas a 8°C e 22°C, mas não produziu proteases, celulases, nem lipases nas condições avaliadas (PATHAN et al., 2010). Por outro lado INFORSATO (2017) avaliou 170 isolados da Antártica e observou que um isolado da espécie *L. muscorum* foi aquele que mais produziu protease.

Aparentemente, a espécie *L. muscorum* não realiza fermentação e assimila as seguintes fontes de nutrientes: D-glicose, L-sorbose, D-xilose, D-arabinose, sacarose, maltose, trealose, celobiose, rafinose, glicerol, manitol, D-gluconato, succinato, citrato, nitrato, nitrito, cadaverina, lisina, creatinina, D-galactose, D-glucosamina, D-ribose e lactose (KURTZMAN; FELL, 1998). De acordo com di MENNA (1958), a assimilação de galactose e lactose é mais fraca. Parte desses testes foi avaliado e confirmado em outro trabalho (LAICH et al., 2014). O seu principal mecanismo de adaptação ao frio parece estar associado a elevada concentração de ácidos graxos insaturados presentes em sua membrana celular (PATHAN et al., 2010; GARCÍA et al., 2015).

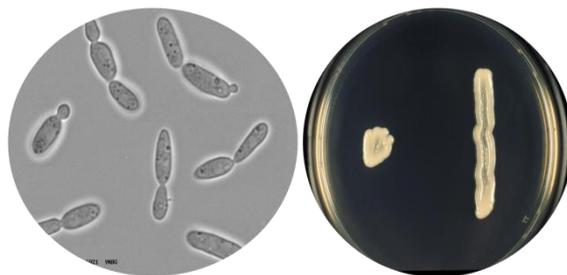


Figura 4 – Imagem de células em microscópio e morfologia da colônia de linhagem de *L. muscorum*. Fonte: <http://www.westerdijkinstituut.nl/collections>, acesso em 12/12/18.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de crescimento e produção de L-ASNase por leveduras isoladas de amostras de sedimentos marinhos coletados na Península Antártica, especialmente pela linhagem *Leucosporidium muscorum* CRM 1648, em condições diversas de cultivo em frascos agitados e em biorreator.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Rastrear e selecionar leveduras produtoras de L-ASNase isoladas na Antártica (*seleção qualitativa*).

2.2.2 Avaliar a produção de L-ASNase por esses microrganismos e selecionar o melhor produtor (*seleção quantitativa*).

2.2.3 Avaliar as melhores fontes de carbono e de nitrogênio para o crescimento e produção da enzima pela levedura *L. muscorum* CRM 1648.

2.2.4 Avaliar por delineamento experimental a melhor combinação entre as fontes de carbono e nitrogênio selecionadas na etapa anterior para o melhoramento da produção de L-ASNase.

2.2.5 Avaliar as melhores condições de cultivo (concentração inicial do inóculo, pH inicial, temperatura e presença de água do mar) para a produção de L-ASNase e crescimento de *L. muscorum* CRM 1648.

2.2.6 Avaliar em biorreator (cultivo descontínuo) o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e a produção de L-ASNase em situações de baixa e alta disponibilidade de oxigênio dissolvido.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Leveduras isoladas de sedimento marinho na Antártica

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho foram isoladas de amostras de sedimentos marinhos coletadas na fase IV da OPERANTAR XXXIII, em Janeiro de 2015, pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette (UNESP, Rio Claro-SP), no âmbito do projeto MICROSFERA, edital PROANTAR/CNPq, coordenado pela prof. Dra. Vivian Pellizari, IO/USP, São Paulo-SP (INFORSATO, 2017). A coleta foi realizada na Baía do Almirantado, na Ilha Rei George, localizada na Península Antártica (Figura 5). Neste trabalho foram utilizados 150 isolados, cujas fontes e locais de coleta estão listados na Tabela 3 e apontados na Figura 5.

Tabela 3 – Informações sobre a espécie, material de origem e local de coleta dos isolados identificados neste trabalho como produtores de L-ASNase.

código do isolado	espécies	material de origem	local de coleta (dado GPS)
1	<i>Leucosporidium muscorum</i>	sedimento marinho (zona entre marés)	Refugio 2 (62° 04.341'S 58° 25.233'W)
2	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho	Botany Point (62° 05.734'S 58° 19.919'W)
16	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho (zona entre marés)	Refugio 2 (62° 04.341'S 58° 25.233'W)
26	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho (zona entre marés)	Refugio 2 (62° 04.341'S 58° 25.233'W)
85	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho (zona entre marés)	Refugio 2 (62° 04.341'S 58° 25.233'W)
86	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho	Refugio 2 (62° 04.373'S 58° 25.335'W)
94	<i>L. muscorum</i>	sedimento marinho (zona entre marés)	Refugio 2 (62° 04.341'S 58° 25.233'W)
74	<i>Glaciozyma antarctica</i>	sedimento marinho	EACF (62° 05.130'S 58° 23.356'W)
17	<i>G. antarctica</i>	sedimento marinho	EACF (62° 05.130'S 58° 23.356'W)

EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz, base brasileira de pesquisa.

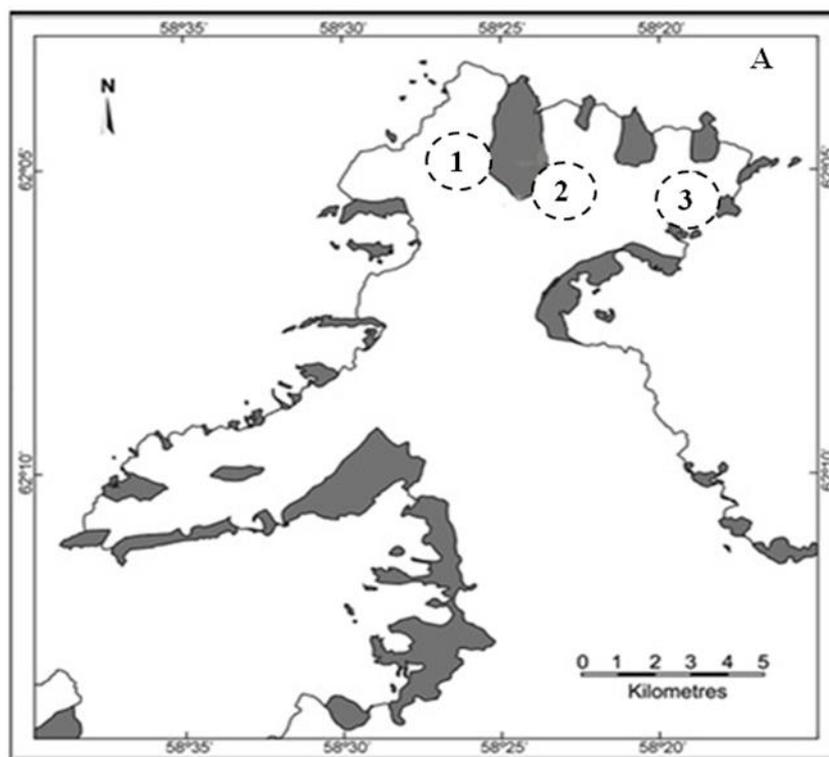
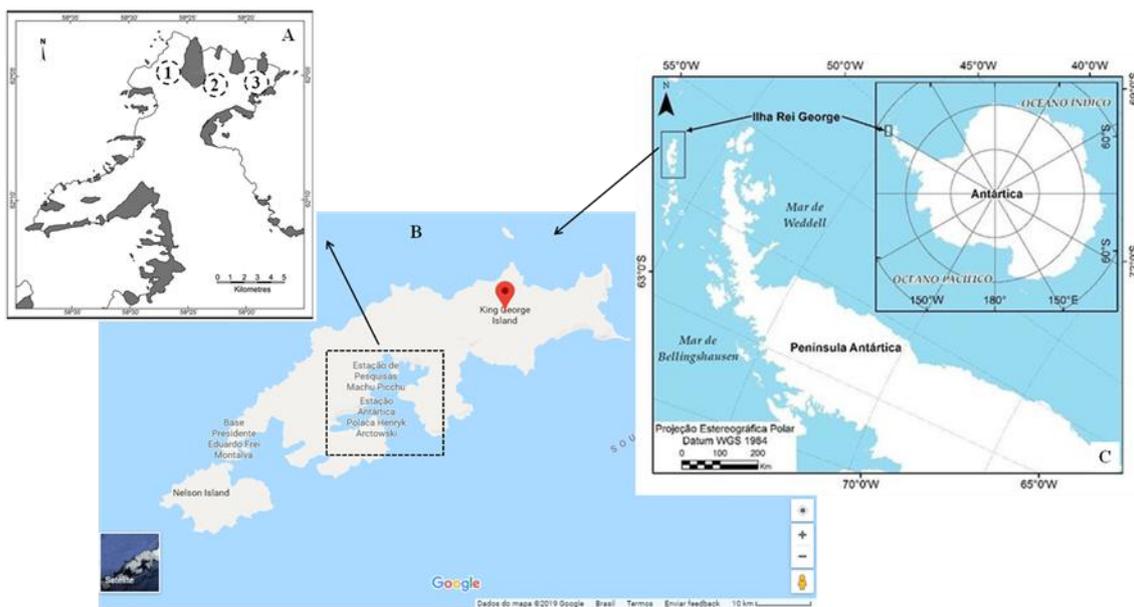


Figura 5 – Mapa da Baía do Almirantado, localizada na Ilha do Rei George, Península Antártica. Os números no mapa da Baía do Almirantado (A) indicam os lugares onde as amostras foram coletadas. 1. Refúgio 2; 2. EACF (Estação Antártica Comandante Ferraz, base brasileira de pesquisa); 3. Botany Point. *Fontes: (A) cedida pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette (UNESP/Rio Claro); (B) acesso no Google Maps; e (C) adaptada de ANDRADE et al., 2015.*

3.2. *Preservação das linhagens*

As linhagens foram preservadas por ultracongelamento em freezer a -80 °C, conforme a literatura (HUNTER-CEVERA; BELT, 1996; KIRSOP; DOYLE, 1991). Para cada isolado, uma colônia foi semeada em meio sólido inclinado ágar Sabouraud e, após 72 horas de crescimento em estufa a 15 °C, foi adicionada a cada tubo solução de glicerol (10% v/v). As células foram ressuspensas nessa solução e a suspensão foi aliqüotada em microtubos de 1,5 mL. Por fim, as alíquotas foram pré-resfriadas por 20 minutos a - 20°C, tendo-se o cuidado de evitar o congelamento da suspensão e, conseqüentemente, a formação de cristais que possam danificar as células do microrganismo. Esse resfriamento tem a função de permitir que o crioprotetor envolva inteiramente as células, aumentando a sua ação de proteção. Após esse tempo de pré-resfriamento, os microtubos foram mantidos em ultrafreezer (- 80°C).

3.3. *Meios de cultivo*

Neste trabalho foi utilizado caldo Sabouraud para preservação e ativação dos isolados; ágar Sabouraud para a manutenção das linhagens; e meio Czapek Dox (CD) (SAXENA; SINHA, 1981), para crescimento e produção de L-ASNase (Tabela 4). Este último meio também serviu como base para a avaliação de diversas fontes de carbono e nitrogênio. Os componentes dos meios foram esterilizados em autoclave (120 °C, 15 minutos). Os elementos traços do meio CD foram preparados a parte em uma solução concentrada 50 vezes, esterilizados e mantido resfriado. Dados da literatura (SAXENA; SINHA, 1981) mostram que a asparagina é utilizada para substituir o aminoácido prolina no meio CD, mas optou-se por utilizar este último em razão desta fonte de nitrogênio ter se mostrado melhor para a produção de L-ASNase em testes realizados pelo grupo (MOGUEL, 2018; COSTA-SILVA et al., 2018a). Após o preparo do meio, o pH foi ajustado para 5,5, utilizando-se soluções de NaOH e HCl (0,5 M cada).

Tabela 4 – Meios de cultivo utilizados para a preservação, manutenção e crescimento de leveduras isoladas da Antártica

Meio	Finalidade	Concentração (g.L ⁻¹)											
		DEC	glicose	prolina	sacarose	extrato de levedura	KCl	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ * 7H ₂ O	CUNO ₃ * 3H ₂ O	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	Fe(SO ₄) ₂ * 7H ₂ O	agar
Caldo Sabouraud	preservação e ativação	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar Sabouraud	manutenção	10	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
CD	crescimento e produção	-	2	10	-	-	0,52	1,52	0,52	0,001	0,001	0,001	-
CDM	crescimento e produção	-	-	20	20	5	0,52	1,52	0,52	0,001	0,001	0,001	-

CD – Czapek Dox (SAXENA; SINHA, 1981); CDM – Czapek Dox Modificado (neste trabalho); DEC – digestivo enzimático de caseína.

3.4. Condições de cultivo em frascos agitados (shaker)

Uma alíquota de 1 mL de criopreservado foi descongelada e inoculada em meio caldo Sabouraud Dextrose. O isolado cresceu por 72 horas em frascos agitados, com defletores, a 15 °C e 250 rpm. Após esse período, o caldo foi centrifugado (3220g, 10 minutos, 25 °C) e lavado duas vezes com água destilada estéril para a remoção do meio. As células foram inoculadas em meio líquido CD (meio de produção), com densidade óptica inicial (DO₆₀₀) igual a 0,2. O volume de pré-inóculo transferido para o meio de produção foi calculado conforme a equação 1:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (\text{Eq. 1})$$

Sendo C_i a concentração inicial (absorbância do pré-inóculo), V_i o volume inicial (volume de pré-inóculo a ser transferido para o meio de produção), C_f a concentração final no meio de produção ($DO = 0,2$) e V_f o volume final (50 mL).

As amostras foram coletadas a cada 24 horas por até 4-5 dias para análise de crescimento celular e produção de L-ASNase.

3.5. Seleção dos isolados produtores de L-ASNase

Para avaliar a produção da enzima L-ASNase, as 150 leveduras foram pré-cultivadas em placas de 96 poços contendo caldo Sabouraud Dextrose por 72 horas, a

15 °C e sob agitação de 300 rpm. As placas foram seladas com *BreathSeal*, adesivo que permite trocas gasosas com o meio externo sem que haja contaminação. Palitos estéreis foram utilizados para inocular cada isolado, um a um, por poço, conforme distribuição apresentada na Figura 6.

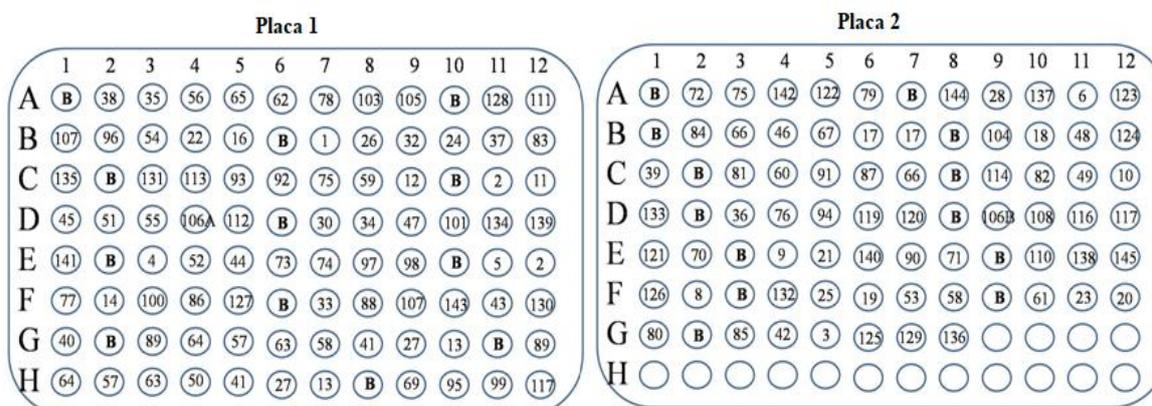


Figura 6 – Distribuição de cada cepa e dos brancos (amostras sem microrganismo) em placas de 96 poços para pré-inóculo e produção.

Foram denominadas “Branco” (B) as amostras contendo apenas o meio de cultivo estéril, para controle de contaminação das placas. Após 72 horas de crescimento, uma alíquota de cada isolado foi transferida para outra placa (obedecendo a ordem estabelecida na Figura 6) contendo meio CD. Os isolados foram então cultivados por mais 120 horas, a 15 °C e agitação de 800 rpm. Após esse período, cada isolado foi avaliado qualitativamente para a produção da enzima L-ASNase pelo método colorimétrico L-aspartil- β -hidroxâmico (ver *metodologias analíticas*, item 3.11.3). O critério de seleção foi a intensidade da coloração vermelha, após revelação com cloreto férrico.

As leveduras identificadas como produtoras nesta etapa foram cultivadas em volumes maiores (50 mL), utilizando para isso frascos de 250 mL com defletores. Foram feitos dois blocos, em um deles foi adicionado azul de bromotimol (0,007%) para inferir a produção de L-ASNase através da mudança de pH e, conseqüentemente, da coloração do meio de cultivo, que se torna azul quando básico. Para isso, foi utilizada a metodologia proposta por MAHAJAN et al. (2013). O azul de bromotimol é um indicador de pH que em meio ácido, como é o caso do meio CD (pH = 5,5), é alaranjado, enquanto em meio básico, torna-se azul. Como a produção de L-ASNase e conseqüente degradação de asparagina resulta em amônia e, portanto, aumento do pH, a

mudança de coloração dos meios para a cor azul é indicativo da produção da enzima de interesse. Meios CD não inoculados e sem fonte de nitrogênio (prolina) foram utilizados como controle.

O outro bloco foi cultivado conforme já descrito (item 3.4). Alíquotas foram retiradas de cada frasco a cada 24 horas durante 5 dias para avaliação quantitativa do crescimento e da produção de L-ASNase. A partir dessa fase, foi escolhido um isolado para dar continuidade ao trabalho e o critério de escolha foi a produção da enzima alvo. O melhor produtor foi taxonomicamente identificado como pertencente a espécie *Leucosporidium muscorum* e depositado na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) sob o código de acesso CRM 1648.

3.6. Análise univariada de fontes de carbono

Sete fontes de carbono (glicerol, sacarose, xilose, extrato de levedura, sorbitol, frutose, além de glicose) foram avaliadas na composição do meio CDM com o intuito de observar qual desses nutrientes teria impacto mais positivo sobre o crescimento da levedura e produção de L-ASNase. Os demais componentes do meio foram mantidos nas mesmas concentrações já descritas (Tabela 4). As fontes de carbono e concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 5. A prolina foi mantida como fonte de nitrogênio em todas as análises. O cultivo foi feito em triplicata, conforme já descrito (item 3.4).

Tabela 5 – Fontes de carbono e respectivas concentrações (C) em g.L⁻¹ de cada fonte avaliada no meio CD para crescimento da levedura alvo e produção de L-ASNase.

	Fonte	C (g.L ⁻¹)
1	glicose	2,0
2	glicerol	2,0
3	sacarose	2,0
4	xilose	2,0
5	extrato de levedura	2,0
6	sorbitol	2,0
7	frutose	2,0

3.7. Análise univariada de fontes de nitrogênio

Este ensaio foi feito como o ensaio anterior, mas manteve-se a glicose como fonte de carbono, variando a fonte de nitrogênio. Foram avaliadas 9 fontes de

nitrogênio: asparagina, glutamina, cloreto de amônio, sulfato de amônio, ureia, casaminoácidos, acetato de amônio, extrato de levedura e prolina (Tabela 6).

Tabela 6 – Fontes de nitrogênio e respectivas concentrações (C) em g.L^{-1} de cada fonte avaliada no meio CD para crescimento da levedura e produção de L-ASNase.

	Fonte	C (g.L^{-1})
1	asparagina	10,0
2	glutamina	10,0
3	prolina	10,0
4	cloreto de amônio	10,0
5	sulfato de amônio	10,0
6	ureia	10,0
7	casaminoácidos	10,0
8	acetato de amônio	10,0
9	extrato de levedura	10,0

3.8. Avaliação da interação de fontes nutricionais por delineamento fatorial completo para melhoramento do crescimento e produção de L-ASNase

A fim de avaliar as possíveis interações e efeitos sinérgicos entre as variáveis que melhor favoreçam o crescimento da levedura selecionada e produção da enzima L-ASNase, foi utilizado um planejamento experimental do tipo fatorial completo 3^3 com 27 ensaios e 4 replicações no ponto central. Os dados foram gerados e analisados pelo programa Minitab[®] 17, sendo X1 (sacarose), X2 (extrato de levedura) e X3 (prolina) as variáveis independentes selecionadas nas análises univariadas anteriores, e avaliadas em três níveis (-1, 0, +1), conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Fatores e níveis avaliados em *delineamento fatorial completo (I)* para melhoramento do crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase.

Fatores	níveis (g.L^{-1})		
	-1	0	1
X ₁	5	10	15
X ₂	0	5	10
X ₃	5	10	15

Com base nos resultados do delineamento anterior, foi estruturado um segundo planejamento experimental, também do tipo fatorial completo 3^3 , para a maximização das respostas. Neste novo planejamento, o ponto central do planejamento anterior passou a ocupar o nível -1 (Tabela 8). Os experimentos 1, 2, 4, 5, 10, 11, 13 e 14 não foram repetidos nesta etapa em razão de terem sido realizados na etapa anterior. Foram realizadas 4 repetições no ponto central.

Tabela 8 – Fatores e níveis avaliados em *delineamento fatorial completo (II)* para melhoramento do crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase.

Fatores	níveis (g.L ⁻¹)		
	-1	0	1
X ₁	10	15	20
X ₂	5	10	15
X ₃	10	15	20

As respostas avaliadas Y1 e Y2, massa seca celular (g.L⁻¹) e produção de L-ASNase (U.L⁻¹), respectivamente, foram analisadas pelas seguintes equações, que incluem todos os termos de interações, sem considerar a significância.

$$Y1 = -10,37 + 1,786 X1 + 0,691 X2 + 1,066 X3 - 0,05443 X1 * X1 - 0,04010 X2 * X2 - 0,03243 X3 * X3 + 0,03067 X1 * X2 - 0,01553 X1 * X3 \quad (\text{Eq.2})$$

$$Y2 = -76 - 146,8 X1 + 65 X2 + 336 X3 - 18,88 X2 * X2 - 19,08 X3 * X3 + 9,15 X1 * X2 + 16,17 X1 * X3 + 7,84 X2 * X3 \quad (\text{Eq.3})$$

3.9. Análise univariada das condições de cultivo: temperatura, pH inicial, concentração celular inicial (X₀) e concentração de água do mar no meio

A levedura *L. muscorum* CRM 1648 foi pré-cultivada em caldo Sabouraud dextrose e transferida para o meio de produção, conforme já descrito (item 3.4). Czapek Dox modificado (CDM) foi utilizado como meio de produção. Foram avaliados em blocos separados as seguintes variáveis: temperatura, pH inicial do meio, concentração de água do mar e a concentração inicial do inóculo (X₀), com a finalidade de avaliar o efeito de cada uma dessas variáveis sobre o crescimento da levedura e produção de L-ASNase. As temperaturas avaliadas foram: 9, 12, 15, 18, 21 e 30°C; pH inicial: 6,5, 5,5

e 4,5; concentração de água do mar: 0, 25 e 50% do volume total de meio (50 mL); e X_0 : 0,5; 1,0 e 1,5 g.L⁻¹. Cada condição foi feita em triplicata.

3.10. Ensaio em biorreator

3.10.1. Preparo do biorreator

Todos os experimentos em biorreator foram realizados no modelo BIOSTAT[®] B-MO (Figura 7), do fabricante Sartorius, equipado com sonda de temperatura, pH e de O₂ dissolvido (OD). Ao equipamento está acoplado também um analisador de gases (O₂ e CO₂), que permite detectar as porcentagens dos gases no gás de saída da dorna. Assim, é possível ter a informação a respeito do O₂ consumido e CO₂ produzido ao longo do cultivo, além de permitir a medição, regulação e avaliação online de temperatura, aeração, agitação, volume de meio ou qualquer substrato, ácido, base ou antiespumante que seja adicionado ao cultivo, pH e OD no meio. Os parâmetros e variáveis foram registradas a cada minuto pela unidade de controle.



Figura 7 – Biorreator BIOSTAT[®] B-MO em uso para cultivo de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase.

A sonda de pH foi calibrada antes da esterilização da dorna, utilizando dois pontos de calibração: uma solução tampão onde pH = 7,0, seguida de outra solução tampão (pH = 4,0). Após montagem e esterilização do biorreator (121 °C, 1 atm, 30 minutos), o sensor de O₂ foi conectado ao equipamento e polarizado por no mínimo 3 horas nas condições de máxima agitação e aeração a ser utilizada no experimento. Após esse período, a sonda de O₂ foi calibrada também por uma calibração de dois pontos. O

ponto 0 (0% de OD) foi obtido pela desconexão do conector da sonda de O₂ com a unidade de controle, enquanto o ponto 100 (100% de OD) foi obtido pela reconexão desta mesma sonda com a unidade de controle, estando o meio de cultivo saturado com ar.

3.10.2. Ensaio em biorreator: condições de cultivo e oxigênio dissolvido

Para os cultivos em biorreator foi utilizado o meio CDM. O pré-inóculo foi feito como já descrito (item 3.4). As células foram centrifugadas (3220g, 10 minutos, 25 °C), ressuspendidas em meio CDM e uma alíquota dessa suspensão celular foi transferida para um frasco de 250 mL contendo 100 mL de meio CDM estéril, conforme equação 1 (item 3.4). Esse volume foi inoculado na dorna de forma asséptica, sendo X₀ igual a 1 g.L⁻¹ e V_f igual a 1 litro (volume útil do biorreator).

Durante o cultivo microbiano, o oxigênio gasoso foi transferido para o meio de cultivo através de ar aspergido, mas em algumas situações foi necessária a adição de oxigênio puro. O balanço gasoso foi calculado de acordo com a relação de transferência de O₂ para o meio de cultivo (OUR, do inglês *Oxygen Uptake Rate*) e produção de CO₂ (CER, do inglês *Carbon Dioxide Evolution Rate*), através das medidas de fração molar gasosa que são obtidas pelo analisador de gases acoplado a saída de ar do biorreator. A relação do consumo de O₂ e produção de CO₂ é denominada Coeficiente Respiratório (RQ, do inglês *Respiratory Coefficient*). Dessa forma, o balanço gasoso foi feito conforme as equações:

$$Q_{O_2} \cdot X = OUR = \frac{\Phi_e \cdot y_{O_2e} - \Phi_s \cdot y_{O_2s}}{V} \quad (Eq. 4)$$

$$CER = \frac{\Phi_s \cdot y_{CO_2s} - \Phi_e \cdot y_{CO_2e}}{V} \quad (Eq. 5)$$

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (Eq. 6)$$

Onde,

RQ: coeficiente respiratório

OUR: velocidade de consumo de O₂ dissolvido (mmol O₂.L⁻¹.h⁻¹)

CER: velocidade de produção de CO₂ (mmol CO₂.L⁻¹.h⁻¹)

Q_{O₂}: velocidade específica de respiração (mmol O₂.g⁻¹.h⁻¹)

X: concentração de células na dorna (g.L^{-1})

V: volume de meio de cultivo (L)

ϕ : fluxo de gás (mmol.h^{-1}) de entrada (Φ_e) ou saída (Φ_s).

y: Fração molar de entrada (y_e) ou saída (y_s) de O_2 (Eq. 4) ou CO_2 (Eq. 5)

O fluxo de ar de saída (Φ_s) foi calculado supondo que o fluxo de gases inertes, basicamente nitrogênio, não varia na entrada e saída de ar. Dessa forma, Φ_s foi calculado conforme equação a seguir:

$$\Phi_s = \frac{\Phi_e \times (1 - y_{\text{O}_2e} - y_{\text{CO}_2e})}{1 - y_{\text{O}_2s} - y_{\text{CO}_2s}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Sendo que, no caso do gás de entrada ser ar, a expressão $(1 - y_{\text{O}_2e} - y_{\text{CO}_2e})$ corresponde a 0,7901.

No cultivo descontínuo, durante a fase Lag (fase em que as células ainda estão em adaptação, ou seja, $X = X_0$ e não há reprodução celular) e na fase de transição da fase Lag para a fase de crescimento exponencial, o valor de X é muito baixo e há pouco consumo de oxigênio pelas células, ou seja, Q_{O_2} é mínimo. Durante o cultivo, X aumenta e o mesmo ocorre com Q_{O_2} (aumenta a demanda respiratória por célula), que atinge o seu valor máximo na fase exponencial, quando a velocidade específica de crescimento (μ) é máxima.

Em razão do sistema de transferência de O_2 ser muito importante em um sistema aeróbico de cultivo, como é o caso do empregado neste trabalho, foi avaliado qual seria a demanda de oxigênio dissolvido (OD) pela levedura *L. muscorum* CRM 1648 que permitiria maior crescimento e produção da enzima L-ASNase, visto que não foram encontrados trabalhos na literatura que tragam informações a respeito da fisiologia desse microrganismo. As condições avaliadas foram: Ensaio 1 - sem controle de OD ($\text{OD} < 20\%$), Ensaio 2 - sem controle de OD ($\text{OD} > 20\%$), Ensaio 3 – OD controlado em 80% e Ensaio 4 – OD controlado em 20%. Em todos os ensaios foi adicionado previamente no meio de produção 2 mL de antiespumante.

O Ensaio 1 (OD não controlado e $< 20\%$) foi realizado a $15\text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm e controle do pH através da adição de HCl (20%) e NaOH (20%) para mantê-lo igual a 5,5. Neste ensaio, a entrada de ar (1) foi ativada, com aeração de 1 LpM (litro de ar por litro de meio por minuto), e a entrada de O_2 puro (2) foi mantida desligada (Figura 8).

Os outros ensaios em biorreator (ensaios 2, 3 e 4) também foram conduzidos na mesma temperatura, com algumas mudanças na agitação e aeração, e sem controle do pH (sem adição de ácido e base) porque foi observado após o ensaio 1 que este parâmetro poderia interferir na produção de L-ASNase.

O Ensaio 2 (OD não controlado e $> 20\%$) foi conduzido com cascata de agitação variando de 200 a 1200 rpm e aeração com ar puro e igual a 1 LpM (entrada de O_2 puro desligada, conforme ensaio anterior). No entanto, como o aumento da agitação para o máximo programado (1200 rpm) não foi suficiente para evitar a queda de OD ao longo do tempo, a aeração foi alterada para 1,5 LpM após 20 horas de cultivo. Os parâmetros de agitação e aeração utilizados neste ensaio não foram capazes de controlar OD, mas este se manteve acima de 20%.

O Ensaio 3 (OD controlado em 80%) foi conduzido com agitação constante de 600 rpm, aeração de 1 LpM com ar puro e cascata de adição de oxigênio (O_2) puro à linha de ar variando de 0 a 60% (porcentagem do tempo de abertura da válvula de O_2). Nesse ensaio, as entradas 1 e 2 estão ligadas, permitindo o incremento do ar com O_2 puro (Figura 8). Para controlar OD, o equipamento foi programado para abrir a válvula de O_2 (3) sempre que $OD < 80\%$, de forma que o ar puro seria incrementado com esse gás de acordo com o consumo de O_2 por *L. muscorum* CRM 1648.

O Ensaio 4 (OD controlado em 20%) foi conduzido de forma que OD se mantivesse em torno de 20%. Para isso, no início, gás nitrogênio foi conectado à entrada de ar (1) e à entrada de O_2 puro foi conectado ar puro (2). No entanto, por problemas na fonte de nitrogênio no início do cultivo (nas primeiras 6 horas) e na tentativa de manter os níveis de OD dentro do planejado, a entrada de N_2 foi desligada, mantendo-se apenas pulsos de ar puro (entrada 2 ligada e entrada 1 desligada), com a abertura da válvula (3) controlada em 0-20% (Figura 8). Quando OD atingiu um valor próximo a 20%, a configuração do sistema foi restabelecida para o original, conforme Figura 8 (Ar na entrada de ar e O_2 na entrada de O_2). Dessa forma, entradas 1 e 2 foram mantidas ligadas, com aeração de 1LpM de ar puro e cascata de O_2 puro, com abertura da válvula controlada em 0-30%. A cascata seria acionada sempre que $OD < 20\%$. A agitação foi mantida em 600 rpm durante todo o ensaio. Os limites da cascata de O_2 puro precisaram ser ajustados ao longo de todo o cultivo nos ensaios 3 e 4, de acordo com o crescimento da levedura e consumo de O_2 .

Em todos os ensaios, foram retiradas amostras de, aproximadamente, 12-15 mL a cada 3, 6 ou 12 horas, a depender da fase de cultivo (no início a frequência de coleta

foi maior) para a medição das seguintes variáveis: densidade óptica (DO) e massa seca celular para avaliar o crescimento; medida de pH *offline* para a confirmação dos valores obtidos de forma *online*; avaliação do consumo dos substratos prolina e sacarose; e atividade enzimática de L-ASNase. Os valores das variáveis dos processos referentes aos quatro ensaios estão registrados nos Apêndices B a I.

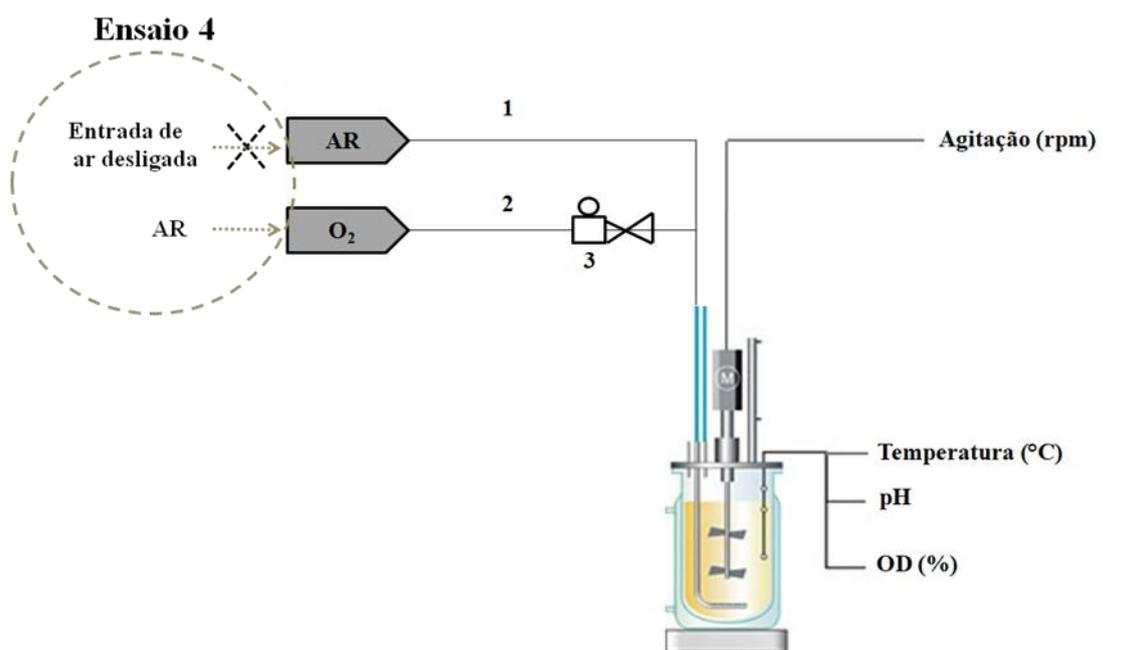


Figura 8 – Representação do painel de controle do biorreator BIOSTAT[®] B-MO e todos os parâmetros possíveis de controle: agitação, temperatura, pH, OD, vazão de ar puro de entrada (1) e vazão de O₂ puro de entrada (2), este último controlado por pulsos de abertura (% de tempo de abertura) da válvula de O₂ (3). No início do ensaio 4 a configuração foi modificada, conforme representado no círculo pontilhado.

3.11. Metodologias Analíticas

3.11.1. Monitoramento do pH

O pH foi medido em pHmetro de bancada (KASVI, modelo K39-1014B). O equipamento foi calibrado antes das medições utilizando dois pontos de calibração: uma solução tampão com pH = 7,0 e outra solução tampão com pH = 4,0.

3.11.2. Monitoramento do crescimento celular

O crescimento celular foi avaliado por densidade óptica e gravimetria. A medida de densidade óptica foi realizada em comprimento de onda (λ) igual a 600 nm em espectrofotômetro Expectra Max Plus 384. Em todas as análises utilizou-se como “branco” o próprio meio de cultivo sem células ou água (para as amostras diluídas em água destilada).

A concentração celular também foi avaliada pela massa seca celular (gravimetria) e expressa em g.L^{-1} . Amostras de 1 a 5 mL foram centrifugadas ($3220g \times 5 \text{ min}$) em tubo previamente pesado, o sobrenadante foi removido e reservado (para as medidas de substrato e pH), as células lavadas (duas vezes) e centrifugadas novamente. A água foi removida com cuidado e as células foram secadas em estufa em temperatura acima de $60 \text{ }^\circ\text{C}$. O valor da concentração de biomassa em gramas por litro foi calculado conforme equação a seguir:

$$MSC = ((P2 - P1) \times 1000) \div V \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde,

P1 – peso do tubo vazio (g)

P2 – peso tubo com a biomassa seca (g)

V – volume de cultivo centrifugado (L)

A relação entre DO e massa seca celular (X), apresentada na Figura 9, foi estabelecida pela equação:

$$DO = 2,049(X) - 2,047 \quad (\text{Eq. 9})$$

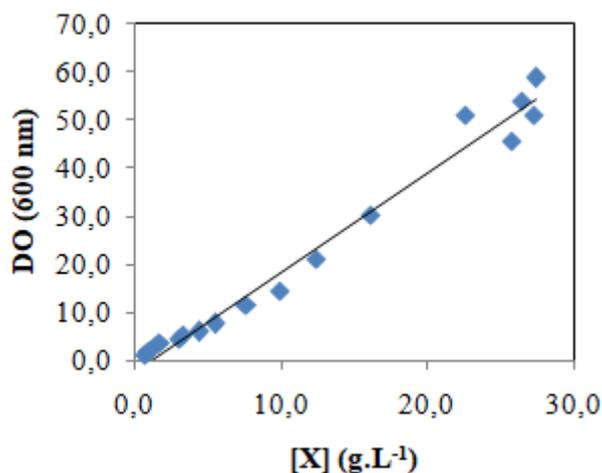


Figura 9 – Valores de densidade óptica em função de valores de massa seca celular, sendo o $R^2 = 0,987$.

3.11.3. Dosagem de atividade enzimática (L-ASNase e atividade glutaminásica)

A produção de L-ASNase e a presença ou não de atividade glutaminásica foi avaliada pelo método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico, utilizando como amostra alíquota da suspensão celular (adaptado de DRAINAS et al., 1977; FERRARA et al., 2004). De acordo com esse método, a atividade de L-ASNase pode ser determinada de forma indireta, pela quantificação do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico (ou β-hidroxamato aspártico, como mostra a Figura 10) produzido na reação de hidroxilaminólise efetuada pela enzima L-ASNase na presença de hidroxilamina, que resulta no complexo cromogênico β-hidroxamato aspártico férrico. Esse composto dá um tom vermelho ao meio, cuja tonalidade é mais intensa quanto maior é a sua concentração (Figuras 10 e 11).

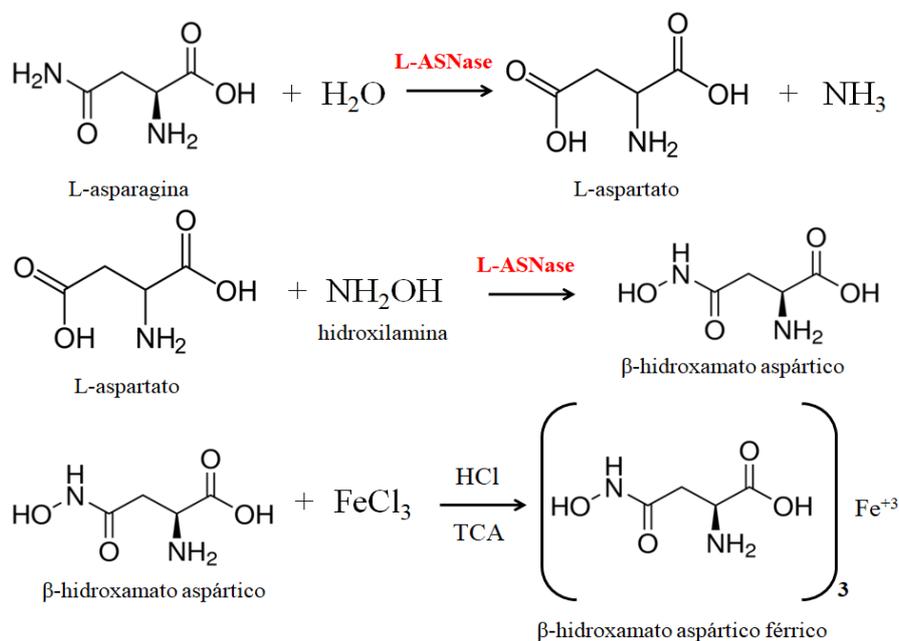


Figura 10 – Reações químicas no método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico de quantificação de L-ASNase. *Fonte: adaptada de MAGRI et al, 2018.*

A reação foi montada em microtubos com capacidade igual a 2 mL, onde foram adicionados: 600 microlitros de tampão Tris-HCl 50 mM e pH 8,6, 100 microlitros de amostra de suspensão celular, 200 microlitros de solução do substrato asparagina (0,1 M) ou glutamina (0,1 M) e 200 microlitros de solução de hidroxilamina neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH 2 M) em pH neutro (entre 6,8 e 7,2). Para a reação, os microtubos “branco” e “teste” foram agitados em *termoshaker* a 850 rpm e 37°C durante 30 minutos. Nos tubos “branco” a solução de hidroxilamina só foi adicionada após o período de reação, conforme mostra a Figura 11, juntamente com uma solução de

TCA e cloreto férrico ($100 \text{ g.L}^{-1} \text{ FeCl}_3$, $50 \text{ g.L}^{-1} \text{ TCA}$ em uma solução de HCl a $0,66\text{M}$), que também foi adicionada nos tubos “teste”. Os microtubos foram centrifugados $3220g$ por 5 minutos e 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a medição, que foi feita em espectrofotômetro Expectra Max Plus 384, em comprimento de onda (λ) igual a 500 nanômetros (nm).

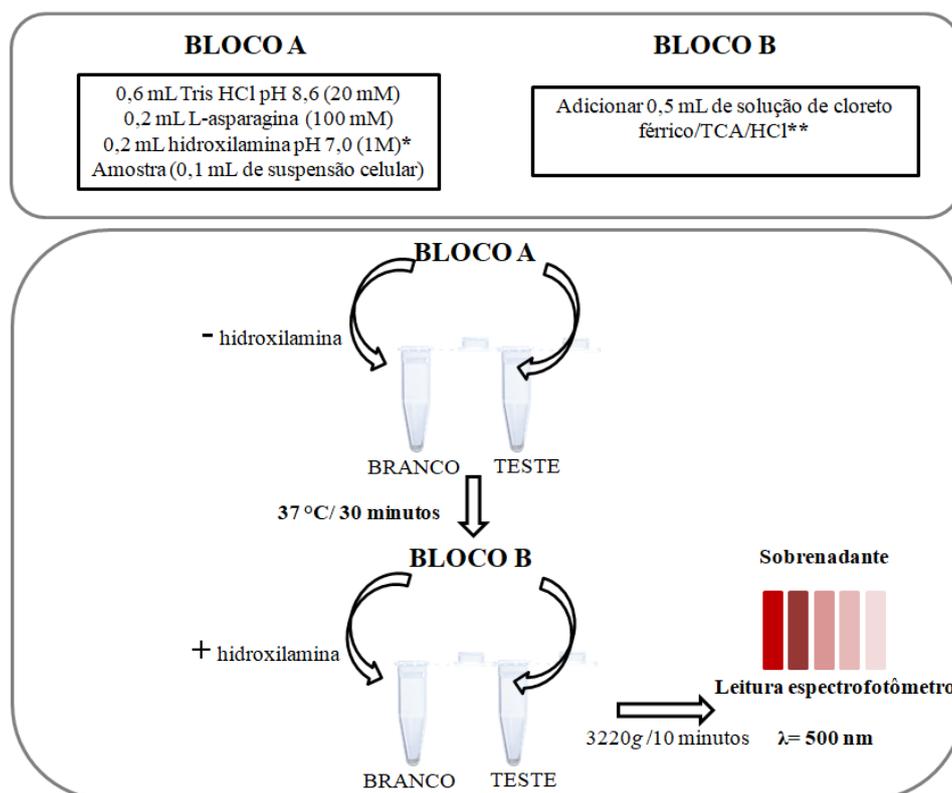


Figura 11 – Sequência de passos para a execução do teste de atividade pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico.

* Solução de hidroxilamina (2M) neutralizada com solução de NaOH (2M).

** 10 % (p/v) FeCl_3 , mais 5 % (p/v) ácido tricloroacético (TCA) em solução de HCl ($0,66\text{M}$).

Uma unidade de atividade (L-ASNase ou atividade glutaminásica) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir $1 \mu\text{mol}$ de β -hidroxamato aspártico ou $1 \mu\text{mol}$ de ácido γ -hidroxamato glutâmico (no caso de a glutamina ser utilizada como substrato) por minuto de tempo e por volume de amostra (MOGUEL, 2018). O valor de produção de L-ASNase foi calculado em U.L^{-1} (unidade de enzima por volume de meio). A atividade total (U) foi calculada multiplicando o valor de atividade em U.L^{-1} pelo volume total (v) do meio de produção.

3.11.4. Dosagem de sacarose

Para a dosagem de sacarose, foi utilizado o método colorimétrico GOD/invertase (TEIXEIRA et al., 2012). Nesse método, foi adicionado 85 μL de água destilada, 5 μL de amostra (sobrenadante das amostras coletadas nos experimentos em biorreator) e 10 μL de invertase por poço de uma placa de 96 poços. A invertase foi diluída em água até atingir a concentração de 8000 U.mL^{-1} . A reação ocorreu a 55°C por 10 minutos. Nessa etapa, a invertase atua catalisando a quebra de sacarose, formando glicose e frutose. Após esse período, 200 μL de GOD/POD (sigla em inglês para glicose oxidase/peroxidase) foi adicionado em cada poço e a placa foi encubada por mais 15 minutos a 37°C . Nessa etapa, a enzima GOD catalisa a reação de oxidação de uma molécula de glicose formando peróxido (H_2O_2) e ácido glucurônico. A molécula de H_2O_2 por sua vez reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade da cor é proporcional a concentração de glicose na amostra e no padrão (e, portanto, proporcional a concentração de sacarose). A leitura foi feita em espectrofotômetro Expectra Max Plus 384 a 490 nm. A curva padrão foi construída com sacarose diluída em água nas concentrações de 0,0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,20 e 0,25% (g/100 mL), faixa onde mostrou linearidade. Cada análise foi feita em duplicata.

3.11.5. Dosagem de prolina

A análise do consumo de prolina foi feita colorimetricamente como descrito por ABRAHAM et al. (2010). Em microtubos de 2 mL foi adicionado 100 μL de amostra, 100 μL de ácido sulfosalicílico (solução a 3%), 200 μL de ácido acético glacial e 200 μL de nihidrina ácida (1,25 g de nihidrina em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido ortofosfórico a 6M). Os microtubos foram incubados a 96°C por 1 hora e depois desse período colocados em gelo para a adição de 1 mL de tolueno com o intuito de parar a reação. As amostras foram agitadas em vortex por 20 segundos e a fase orgânica (fase topo) foi coletada. A leitura foi feita em cubeta de vidro, no espectrofotômetro Expectra Max Plus 384 a 520 nm.

3.11.6. Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os resultados obtidos nos ensaios em biorreator referentes ao crescimento celular, formação do produto (L-ASNase) e consumo de substratos (sacarose e prolina) foram colocados em gráficos para a determinação dos seguintes parâmetros cinéticos:

a) velocidade específica de crescimento (μ_x)

Foi calculada nos ensaios em frascos agitados e biorreator a partir de dados de biomassa. Foram utilizados os pontos da fase logarítmica de crescimento, onde a velocidade específica de crescimento é constante e máxima ($\mu_x = \mu_{max}$) (SCHMIDELL et al., 2001).

Supondo μ_x constante, o valor de μ_{max} foi calculado pela inclinação da reta tangente resultante da representação gráfica do logaritmo natural (Ln) de X em função do tempo. Essa relação é estabelecida pelas equações:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (\text{Eq. 10})$$

Quando μ_x é constante, a integral da equação acima resulta em:

$$\text{Ln} \frac{X}{X_i} = \mu_x \cdot (t - t_i) \quad (\text{Eq. 11})$$

b) Produtividade

O desempenho do processo de produção de células e produto (L-ASNase) foi avaliado pela produtividade ao longo do cultivo, respectivamente, P_x e P_p , calculada conforme as equações 15 e 16, sendo o sufixo f = final e i = inicial.

$$P_x = \frac{X_f - X_i}{t_f} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$P_p = \frac{P_f - P_i}{t_f} \quad (\text{Eq. 13})$$

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região Antártica é conhecida pelas suas condições inóspitas, apresentando o clima mais frio e seco da terra, além de alta salinidade, baixa precipitação e disponibilidade de nutrientes, ciclos alternados de congelamento e descongelamento e alta irradiação UV alternada por longos períodos de escuridão (*apud* DUARTE et al., 2013). Apesar do ambiente adverso, essa região tem se revelado uma fonte de numerosos microrganismos psicrófilos e psicrotolerantes, denominados de forma generalizada de microrganismos adaptados ao frio, com grande capacidade metabólica para produzir uma diversidade de substâncias de interesse industrial. Por essa razão tem sido cada vez mais comum a triagem de biomoléculas em microrganismos isolados dessa região, inclusive em leveduras (BUZZINI et al., 2012; DUARTE et al., 2013; LARIO et al., 2015; CARRASCO et al., 2016).

4.1. Triagem de leveduras adaptadas ao frio produtoras de L-ASNase (avaliação qualitativa)

A triagem de microrganismos, principalmente leveduras e fungos filamentosos, produtores de L-ASNase normalmente é feito em meio sólido Czapek Dox (CD) suplementado com o indicador vermelho de fenol na concentração de 0,009% (m/v) ou azul de bromotimol a 0,007% (m/v) (MAHAJAN et al., 2013). A avaliação qualitativa da produção de L-ASNase em meio sólido, no entanto, não foi empregada neste trabalho porque foi observado por outros pesquisadores desse grupo de pesquisa que a habilidade de certos fungos de produzirem L-ASNase em meio sólido pode ser diferente da habilidade de produção em meio líquido. Essa observação também foi reportada por LAPMAK et al. (2010).

Foram cultivadas em caldo CD, 150 leveduras de amostras isoladas de sedimentos marinhos na Península Antártica, provenientes das regiões Refúgio 2, EACF e Botany Point (Figura 5), em busca de produtores da enzima L-ASNase. Após 120 horas de cultivo, cada amostra foi avaliada quanto a presença dessa enzima na suspensão celular. Nesse momento o objetivo não era fazer uma avaliação quantitativa, mas identificar qualitativamente os produtores, conforme mostrado na Figura 12. Foi considerado produtor da enzima aquele que assumiu a coloração vermelha no meio de reação após a adição de cloreto férrico/TCA/HCl. Como existe relação entre a intensidade da coloração vermelha e a produção do complexo L-aspartil- β -hidroxamato

com íon férrico, as amostras com coloração amarelo-alaranjada foram consideradas negativas para a produção de L-ASNase. Os isolados 17 (placa II, B6-7) e 74 (placa I, E7) aparentemente produziram menos que os demais (coloração rosa claro), porém os isolados 85 (placa II, G3) e 94 (placa II, D5) foram aqueles que visualmente produziram mais enzima, pois atingiram uma coloração vinho, bem mais escura que os demais. Esse resultado foi confirmado posteriormente, com o cultivo em frascos agitados em maior volume útil (50 mL), no qual foi possível avaliar a produção de L-ASNase ao longo do tempo. Os isolados 17 e 74 foram descartados na etapa de cultivo em frascos devido a contaminações sucessivas com fungos filamentosos.

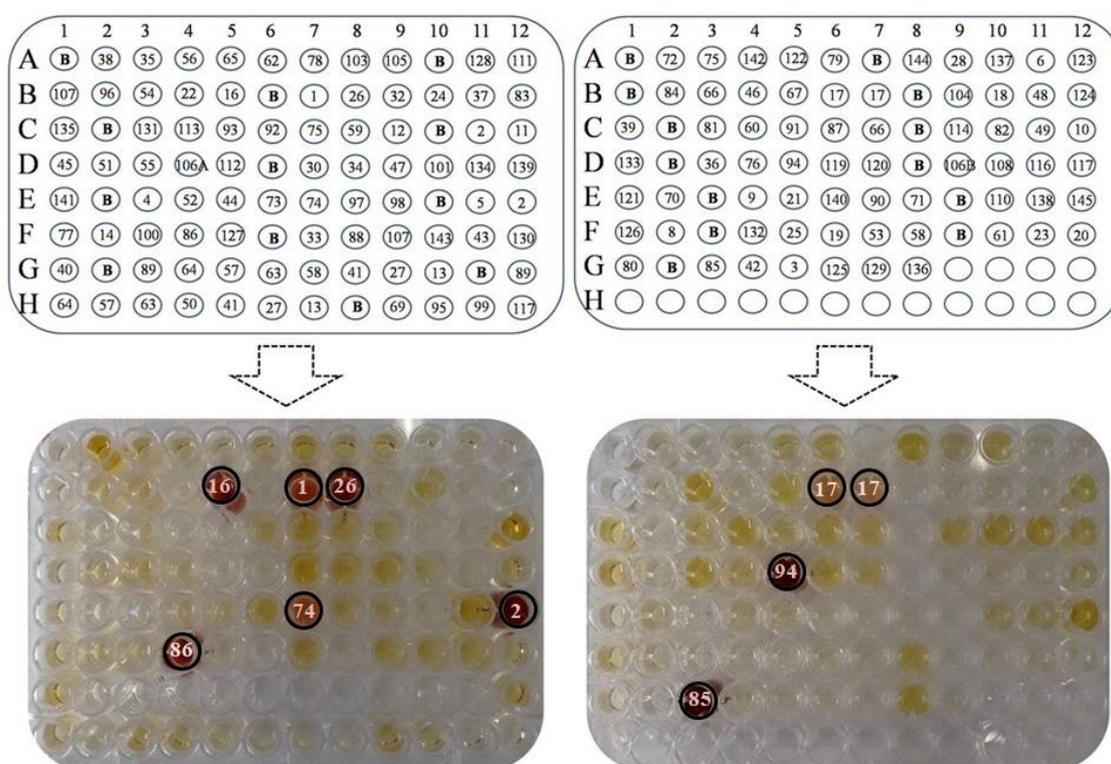


Figura 12 – Triagem de produtores de L-ASNase entre 150 isolados da Antártica pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico. A maior intensidade da cor vermelha indica maior produção da enzima.

Os isolados identificados nesta etapa como produtores da enzima alvo foram cultivados em frascos agitados contendo meio líquido CD e azul de bromotimol (0,007%), de acordo com a metodologia proposta por MAHAJAN et al. (2013). Um frasco com meio estéril e outro com meio CD sem prolina (fonte de nitrogênio) foram utilizados como controle. A produção da enzima foi avaliada visualmente pela mudança

de coloração do meio, que se tornou azul após 72 horas de cultivo. Como azul de bromotimol é um indicador de pH, ficando laranja em meio ácido e azul quando em meio básico, a intensidade da cor azul indicou maior produção de L-ASNase (a reação catalisada por esta enzima resulta na produção de amônia, que torna o meio básico). O resultado deste cultivo (Figura 13) confirma maior produção de L-ASNase pelos isolados 85 e 94.

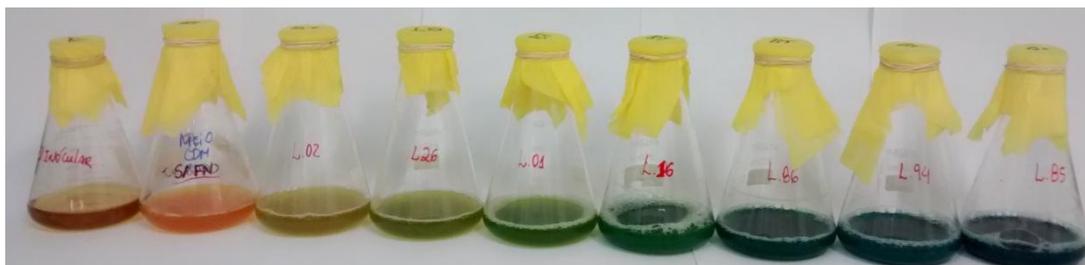


Figura 13 – Resultado do cultivo dos isolados produtores de L-ASNase em meio CDM com azul de bromotimol. Da esquerda para a direita: meio não inoculado, meio sem fonte de nitrogênio, isolados 2, 26, 1, 16, 86, 94 e 85.

Os resultados do seqüenciamento de marcadores taxonômicos e análises filogenéticas (INFORSATO, 2017) revelaram que os isolados 17 e 74 pertencem a mesma espécie *Glaciozyma antarctica* e que os outros isolados produtores pertencem a espécie *Leucosporidium muscorum*.

A morfologia das colônias dos isolados produtores (Figura 14) confirma que todos eles apresentaram colônias de cor creme, com superfície lisa, aspecto cremoso e textura mucoide. Nenhum desses isolados produziram pigmento em meio ágar Sabouraud. A morfologia das colônias mostrada na Figura 14 corrobora com as características morfológicas já descritas para a espécie tipo *L. muscorum* (di MENNA, 1958).

Nessa etapa do trabalho, 9 isolados (6%) foram identificados como potenciais produtores de L-ASNase, sendo que desse total 7 (77,8%) pertencem a espécie *L. muscorum*. Espécies da ordem *Leucosporidiales* reconhecidas como potenciais fontes de enzimas extracelulares adaptadas ao frio e de interesse industrial tem sido isoladas predominantemente de ambientes frios e reportadas como leveduras psicrotolerantes (VAZ et al., 2011). O isolamento de leveduras de regiões diversas na Antártica resultou em 89 isolados dentre os quais dois eram da espécie *L. muscorum*, um proveniente da rizosfera de uma planta nativa da Antártica (*Deschampsia antarctica*) e o outro de

sedimento marinho próximo a estação Machu Picchu, na Baía do Almirantado (VAZ et al., 2011), muito próximo ao local onde foram isoladas as leveduras utilizadas neste trabalho.

Pode-se supor, portanto, que a espécie *L. muscorum* é característica de regiões polares, de clima mais frio, por ter sido isolada até então apenas de regiões mais próximas aos pólos (di MENNA, 1958; SAMPAIO et al., 2003; PATHAN et al., 2010; GARCÍA et al., 2015), uma vez que não foram encontrados registros desse microrganismo em regiões tropicais. Por ser essa espécie filogeneticamente próxima a leveduras do gênero *Glaciozyma* spp., e dos gêneros *Rhodotorula* spp. e *Rhodospiridium* spp. (WANG et al., 2015), que já foram identificados como produtores de L-ASNase (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996; FODA et al., 1980; IMADA et al., 1973), associado ao fato de que outra espécie do gênero *Leucosporidium* sp. também foi identificada como produtora dessa enzima (MOGUEL, 2018), é possível haver alguma correlação entre esse grupo de leveduras e a produção de L-ASNase, que precisa ser melhor investigada.

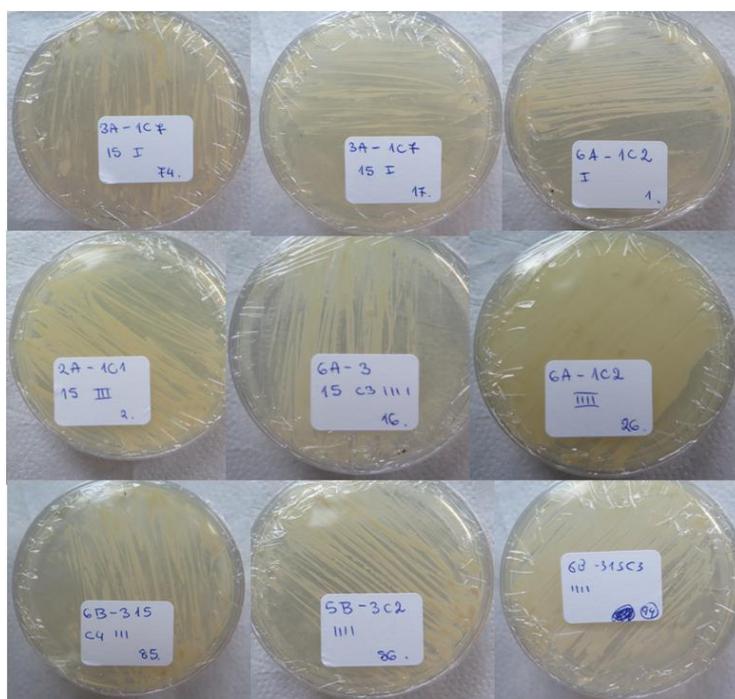


Figura 14 –Morfologia das colônias dos isolados produtores.

Já foi demonstrado que a espécie *L. muscorum* é capaz de produzir diversas enzimas, incluindo proteases, amilases, pectinases, urease (INFORSATO, 2017; PATHAN et al., 2010), mas não foi identificada a produção de L-ASNase por essa

levedura, sendo este trabalho o primeiro a trazer essa informação. É válido registrar que os isolados 85 e 94 são provenientes de uma mesma região (Refúgio 2, entre marés) e, portanto, poderiam tratar da mesma linhagem, sugerindo que mesmo uma mesma linhagem pode trazer especificidades quanto a produção de biomoléculas. O mesmo pode-se dizer dos isolados 1, 16 e 26, também isolados de uma mesma região (tabela 3).

4.2. Perfil de produção de L-ASNase pelas leveduras selecionadas (avaliação quantitativa) e seleção do melhor produtor

As leveduras selecionadas na etapa anterior (no total 7 isolados: 1, 2, 16, 26, 85, 86 e 94) foram cultivadas em volume maior de meio (50 mL), utilizando frascos do tipo *Erlenmeyer* com defletores e 250 mL de volume total. O objetivo desta etapa foi avaliar a produção de L-ASNase por cada isolado ao longo do cultivo e selecionar um deles, com maior capacidade de produção da enzima, para dar continuidade às etapas subsequentes.

O perfil de crescimento foi muito similar entre eles, mas os isolados 85 e 94 produziram 2 vezes mais do que os demais (Figura 15), com produtividade média igual a 4,8 e 5,6 U.L⁻¹.h⁻¹ em 96 horas de cultivo, respectivamente.

Como os resultados do teste quantitativo foi bem similar ao obtido qualitativamente nas placas de 96 poços, é possível concluir que esse método de triagem foi eficiente na seleção de microrganismos produtores de L-ASNase e vale ser valorizado no presente trabalho, já que o uso desse tipo de metodologia para a avaliação da produção de L-ASNase não foi previamente encontrado na literatura consultada. A triagem normalmente é realizada em meio sólido (MAHAJAN et al., 2013) e isso tem se mostrado um problema quando o cultivo é feito em meio líquido, pois nem sempre aqueles que se mostram produtores em meio sólido conseguem manter a produção em meio submerso, como já havia sido notado em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados).

O isolado 94 foi identificado como sendo da espécie *Leucosporidium muscorum* e depositado na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), com o número de acesso CRM 1648. Nessa etapa do trabalho a linhagem *L. muscorum* CRM 1648 foi selecionada e se tornou o microrganismo alvo deste trabalho. Esse isolado foi o escolhido porque, apesar de ter apresentado um perfil de produção de L-ASNase muito semelhante ao do isolado 85 até aproximadamente 85 horas de cultivo, atingiu maior produção e produtividade após esse período (Figura 15).

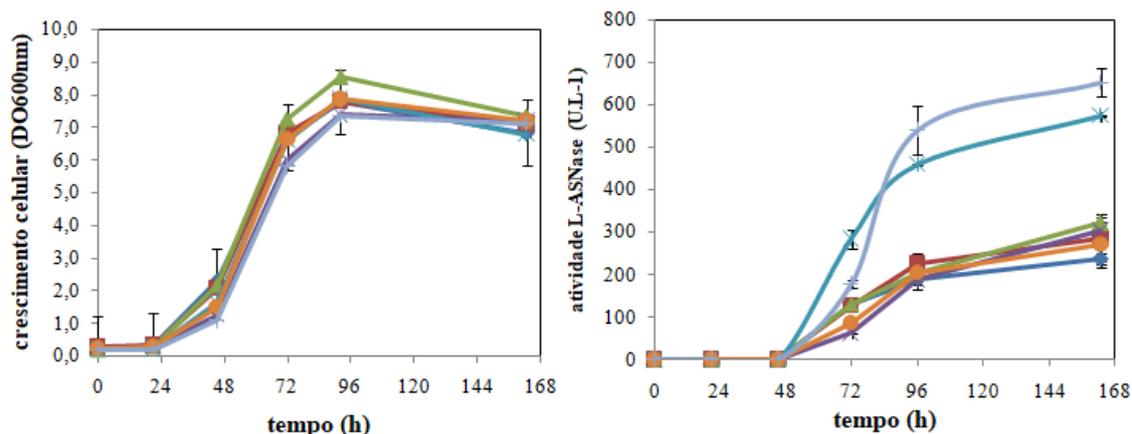


Figura 15 – Curva de crescimento e produção de L-ASNase por sete isolados da Antártica.

Legenda: —●— isolado 1 —■— isolado 2 —▲— isolado 16 —×— isolado 26 —*— isolado 85
—●— isolado 86 —+— isolado 94

Também foi avaliada presença de atividade glutaminásica na suspensão celular e de atividade de L-ASNase no sobrenadante. O resultado das análises indicou ausência de atividade glutaminásica e de enzima extracelular para os 7 isolados analisados.

A avaliação de 108 cepas de *Rhodotorula* spp., entre as espécies *R. flava*, *R. rubra*, *R. macerans*, mostrou que 30 delas apresentaram atividade de L-ASNase, 8 delas apresentaram atividade de L-ASNase e glutaminase e que nenhuma apresentou apenas atividade glutaminásica (IMADA et al., 1973). Linhagem de *Leucosporidium scotti* produtora de L-ASNase apresentou atividade glutaminásica baixa, próxima a zero (MOGUEL, 2018). Como já comentado anteriormente, a ausência de atividade glutaminásica pode ter um efeito positivo no tratamento de pacientes com LLA, uma vez que a hidrólise de glutamina por L-ASNase contribuiria com os efeitos neurotóxicos no tratamento desse tipo de leucemia (COVINI et al., 2012), além disso, a ausência de atividade glutaminásica em algumas variantes de L-ASNase teria melhor resultado terapêutico em células leucêmicas ASNS negativas (CHAN et al., 2014).

A produção extracelular de L-ASNase foi identificada para leveduras da espécie *Rhodotorula rosa* (ARIMA et al., 1972) e *R. rubra* (IMADA et al., 1973). Mais frequentemente, a enzima produzida por leveduras parece ficar alojada no periplasma da célula (MOGUEL, 2018; FERRARA et al., 2004). Dessa forma, é possível que a enzima L-ASNase produzida pela levedura *L. muscorum* CRM 1648 seja do tipo periplasmática.

4.3. Triagem e seleção de fatores nutricionais

A triagem e seleção dos componentes do meio de cultivo são importantes para tornar o processo de produção economicamente viável, principalmente porque essa composição é específica para cada organismo produtor (GHOLAMIAN et al., 2013). Dessa forma, não há parâmetros físicos nem nutricionais estabelecidos para a máxima produção de L-ASNase pelas diferentes fontes microbianas (ELSHAFEI; ELGHONEMY, 2015). Em estudos prévios, a produção de L-ASNase pela bactéria *Serratia marcescens* foi maior na presença de extrato de levedura, lactose e frutose, mas reduziu na presença de glicose (HEINEMANN; HOWARD, 1969). Por outro lado, a produção dessa enzima pela bactéria *Erwinia aroideae* foi melhorada na presença de lactose, mas reprimida quando na presença de glicose (LIU; ZAJIC, 1971). Em mutantes de *S. marcescens*, nomeados 933 e WF, a produção de L-ASNase foi estimulada na presença de glicose e sacarose e inibida por lactose, respectivamente, mas em ambos mutantes a produção dessa enzima foi estimulada por extrato de levedura (SUKUMARAN et al., 1979).

De acordo com a literatura (SCHIMIDELL et al., 2001), algumas características gerais devem ser consideradas ao compor o meio de cultivo: 1. Este deve ser o mais barato possível, embora, no caso de produtos de alto valor agregado como um biofármaco, o custo do meio não impacte tanto no valor final do produto; 2. Atender às necessidades nutricionais do microrganismo; 3. Auxiliar no controle do processo, por exemplo, evitando variações drásticas do pH ou formação excessiva de espuma; 4. Não dificultar a recuperação do produto; 5. Ter composição razoavelmente fixa para não prejudicar a manutenção do controle de qualidade do processo; 6. Não dificultar o tratamento final do efluente (SCHIMIDELL et al., 2001). A princípio, foi levado em conta principalmente o item 2, a fim de avaliar quais fontes de carbono e nitrogênio mais favorecem o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e a produção de L-ASNase por essa levedura.

Os microrganismos utilizam como fonte de carbono e, frequentemente, também como fonte de energia, diversos açúcares, entre eles: glicose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos, como o amido e a celulose (SCHIMIDELL et al., 2001). Como fonte de nitrogênio são frequentemente utilizados sais, como o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), o fosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄), aminoácidos e uréia. Como fontes de fósforo são utilizadas comumente os sais de fosfato (fosfato de sódio, potássio, amônio etc). Ainda necessita-se adicionar outros elementos, entre minerais como Na (sódio), Ca (cálcio),

Mg (magnésio) e elementos traços como Mn (manganês), Cu (cobre), Fe (ferro), Zn (Zinco), entre outros a depender da composição média do microrganismo usado. Para leveduras, a composição média de carbono é de 48% da massa seca celular, podendo variar de 46-52%, enquanto a composição média de nitrogênio é de 7,5 % (6 a 8,5%) da massa seca celular (OKAFOR, 2007).

A produção de enzimas pode ser influenciada por diferentes fatores incluindo pH, salinidade, disponibilidade de oxigênio e fontes de nutrientes. O estudo das variáveis em um bioprocessamento pode ser feito em um procedimento experimental do tipo OFAT, análise univariada, que envolve o estudo de uma variável por vez, fixando-se as demais variáveis envolvidas no processo (FUKUDA et al., 2018). Esse foi o procedimento experimental utilizado para avaliar o efeito de 7 diferentes fontes de carbono (FC) e 9 fontes de nitrogênio (FN) sobre o crescimento celular e produção de L-ASNase pela levedura *L. muscorum* 1648. Algumas fontes de nitrogênio, como prolina, extrato de levedura, glutamina são também fontes de carbono, mas foram utilizadas neste trabalho como fonte única de nitrogênio na composição do meio CD e, por essa razão, foram classificadas dessa forma. O extrato de levedura foi a única fonte avaliada nas duas situações, ora como fonte de carbono, ora como fonte de nitrogênio.

4.3.1. Avaliação de fontes de carbono

No meio de cultivo, as fontes de carbono são utilizadas para melhorar o crescimento e, subsequentemente, melhorar a produção de metabólitos primários, por exemplo, enzimas (KALYANASUNDARAM et al., 2015). Nesta etapa, glicose, glicerol, sacarose, xilose, extrato de levedura, sorbitol e frutose foram utilizados na concentração inicial de 2 g.L⁻¹, mantendo-se os outros componentes do meio CD nas suas respectivas concentrações, conforme materiais e métodos. Essas fontes de carbono foram escolhidas por estarem disponíveis no laboratório e porque são frequentemente citadas na literatura em experimentos de otimização do meio de cultivo para a produção de L-ASNase por diferentes tipos de microrganismos (GHOLAMIAN et al., 2013; KALYANASUNDARAM et al., 2015).

De acordo com os resultados (Figura 16), o extrato de levedura foi a fonte de carbono que proporcionou maior crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 nas primeiras 72 horas de cultivo (DO = 13,2 ± 1,0), três vezes maior quando comparado ao meio CD com glicose (DO = 3,7 ± 0,17). Embora a quantidade de carbono seja similar em todos os meios, além de carbono, o extrato de levedura é fonte adicional de outros nutrientes,

que se encontram disponíveis para a célula crescer (fatores de crescimento, vitaminas, sais, açúcares, proteínas), o que possivelmente tenha favorecido o rápido crescimento de *L.muscorum* CRM 1648 no meio CD com extrato de levedura.

Depois do extrato de levedura, as fontes de carbono que mais favoreceram o crescimento da levedura alvo foram, nessa ordem (valores em 72 horas de cultivo), sacarose (DO = $4,8 \pm 0,18$), glicose (DO = $3,7 \pm 0,17$), sorbitol (DO = $3,4 \pm 0,38$) e frutose (DO = $3,1 \pm 0,09$). As fontes que menos favoreceram o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 foram xilose (DO = $1,8 \pm 0,3$) e glicerol (DO = $1,7 \pm 0,1$).

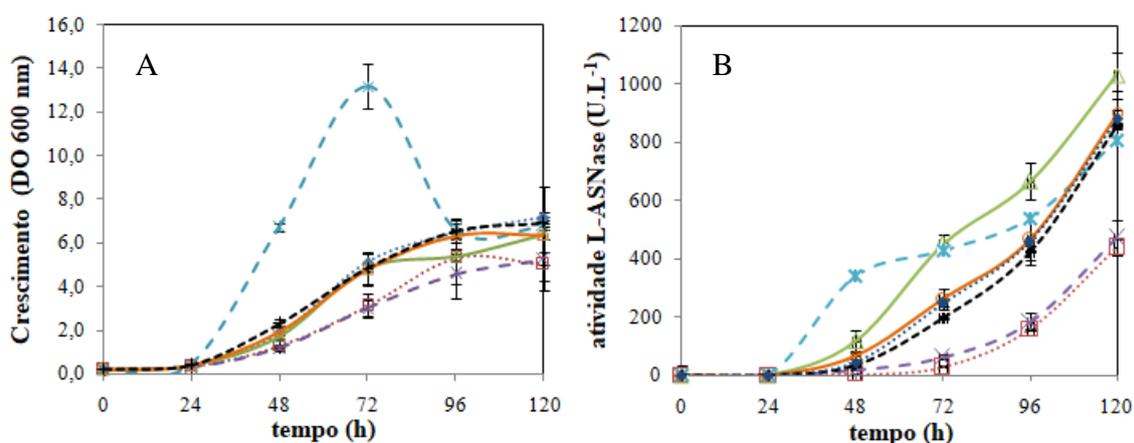


Figura 16 – Crescimento celular (A) e produção de L-ASNase (B) pela linhagem *L. muscorum* CRM 1648 em meio Czapek Dox com adição de diferentes fontes de carbono. *Legenda:* ◆ glicose ◻ glicerol ▲ sacarose ✱ xilose ✱ extrato de levedura

● sorbitol + frutose.

O crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 em meio com sacarose indica que essa levedura é capaz de metabolizar esse açúcar, o que corrobora com outros trabalhos que mostram que espécies do gênero *Leucosporidium* são capazes de crescer em meio com sacarose, maltose, glicerol, pentoses (xilose e ribulose), dentre outras fontes de carbono (MAŠÍNOVÁ et al., 2017; FILIPPUCI et al., 2016; WANG et al., 2015). O catabolismo de sacarose por leveduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, resulta na dissociação desse açúcar em frutose e glicose pela enzima invertase, a qual age extracelularmente (BATISTA et al., 2004). Nem todos os microrganismos são produtores dessa enzima e, por isso, não conseguem metabolizar a sacarose. Supõe-se, portanto, que a levedura *L. muscorum* CRM 1648 produza invertase ou alguma enzima similar que tenha a mesma função, até porque há registros na literatura da produção da enzima β -frutofuranosidase (outra denominação dada à enzima invertase) por espécies

de leveduras taxonomicamente próximas ao gênero *Leucosporidium* como, por exemplo, a espécie *Rhodotorula dairenenses* (GUTIÉRREZ-ALONSO et al., 2009) e *R. glutinis* (RUBIO et al., 2002).

Sacarose foi a fonte de carbono que resultou em maior produção de L-ASNase ($1028,3 \pm 81,4 \text{ U.L}^{-1}$) no final do cultivo (após 120 horas), seguida por sorbitol ($895,8 \pm 77,5 \text{ U.L}^{-1}$), glicose ($878,8 \pm 32,8 \text{ U.L}^{-1}$), frutose ($856,5 \pm 9,2 \text{ U.L}^{-1}$) e extrato de levedura ($806,4 \pm 19,7 \text{ U.L}^{-1}$). Meio CD com xilose ou glicerol resultou em uma produção pelo menos duas vezes menor ($471,7 \pm 59,7 \text{ U.L}^{-1}$ e $439,6 \pm 28,9 \text{ U.L}^{-1}$, respectivamente) em relação ao meio com sacarose.

Linhagem de *Leucosporidium scotti* isolada de amostra da Península Antártica foi avaliada em meio CD com diferentes fontes de carbono e nitrogênio e, dentre as fontes de carbono consideradas no estudo, sacarose seguida por glicerol foram as que mais favoreceram tanto o crescimento como a produção de L-ASNase por essa levedura (MOGUEL, 2018). Resultado similar foi obtido por linhagem de *Leucosporidium creatinivorum*, que mostrou crescimento também em meio com xilose e maltose, mas não foi capaz de crescer em galactose e celobiose (FILIPPUCCI et al., 2016). Em outro estudo, *L. muscorum* foi capaz de assimilar sorbose, xilose, lactose e rafinose (LAICH et al., 2014). Sacarose e glicerol não foram avaliadas nesse trabalho.

Como conclusão desta etapa, sacarose foi a fonte de carbono que mais favoreceu a produção de L-ASNase e, juntamente com o extrato de levedura, a que mais contribuiu para o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648.

4.3.2. Avaliação de fontes de nitrogênio

O nitrogênio (orgânico e inorgânico) é metabolizado para produzir aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas e componentes da parede celular. Juntamente com o carbono, a fonte de nitrogênio (FN) auxilia no crescimento e maior produção de enzimas e, dependendo do tipo de fonte de carbono adicionada no meio, podem proporcionar maior ou menor produção de L-ASNase (KALYANASUNDARAM et al., 2015).

De acordo com o gráfico de crescimento (Figura 17), *L. muscorum* CRM 1648 não foi capaz de crescer em meio com ureia ou com cloreto de amônio. Por outro lado, o crescimento foi mais acelerado em meio CD com extrato de levedura ($\text{DO} = 6,4 \pm 0,12$ em 75 horas de cultivo). Meio CD com prolina resultou em maior valor de DO no final do cultivo ($\text{DO} = 8,2 \pm 0,14$). Dessa forma, as fontes de nitrogênio que proporcionaram maior crescimento foram, nessa ordem, prolina, casaminoácidos e

extrato de levedura, cujo valor final de DO foi igual a 8,2, 6,7 e 6,5, respectivamente, embora o extrato de levedura novamente tenha sido a fonte que resultou em crescimento mais acelerado.

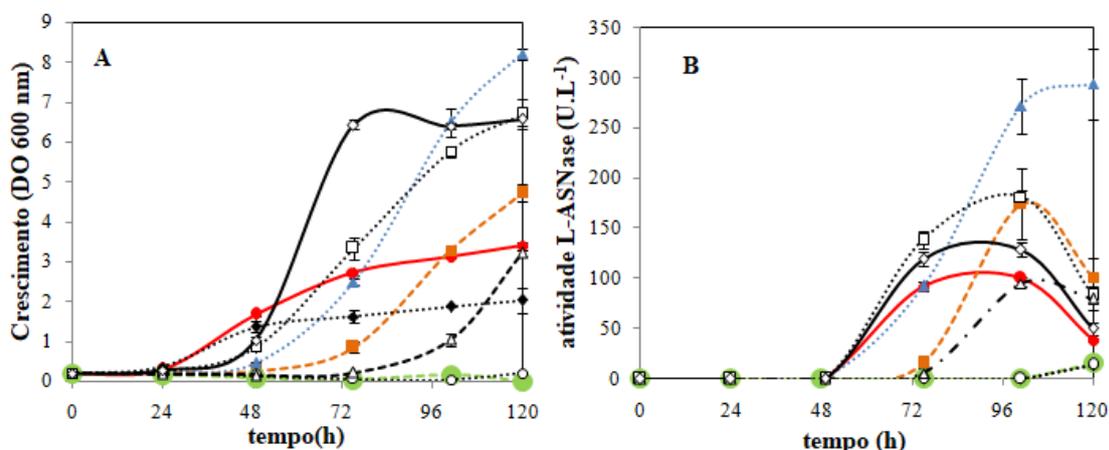


Figura 17 – Crescimento celular (A) e produção de L-ASNase (B) pela linhagem *L. muscorum* CRM 1648 em meio Czapek Dox com diferentes fontes de nitrogênio.

Legenda: —●— asparagina —■— glutamina —▲— prolina —●— cloreto de amônio —◆— sulfato de amônio
—○— ureia —□— casaminoácidos —△— acetato de amônio —◇— extrato de levedura .

Ao avaliar a produção de L-ASNase (Figura 17), observa-se ausência de produção nos meios contendo ureia e cloreto de amônio, além de uma produção lenta e muito baixa em meio com sulfato de amônio, no qual a produtividade foi zero até as primeiras 100 horas de cultivo. A produção da enzima foi maior em meio CD com prolina ($294 \pm 35,4 \text{ U.L}^{-1}$), seguido por casaminoácido ($181,2 \pm 6,6 \text{ U.L}^{-1}$) e glutamina ($173,8 \pm 35,4 \text{ U.L}^{-1}$).

Portanto, o aminoácido prolina foi a fonte de nitrogênio que mais contribuiu para a produção de L-ASNase por *L. muscorum* CRM 1648. Esse aminoácido também se mostrou a melhor opção de fonte de nitrogênio para a produção dessa enzima por uma linhagem de *L. scotti* (MOGUEL, 2018) e por fungo filamentosos da espécie *Aspergillus terreus* (COSTA-SILVA et al., 2018a). De acordo com DUNLOP et al. (1975), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* quando cultivada em fontes pobres em nitrogênio como a prolina ou quando sujeita a falta desse elemento, produziria 0,4% de L-asparaginase tipo II (ASP3), do tipo periplasmática, em relação a quantidade de proteínas totais. A enzima ASP3 não seria induzida por L-asparagina que, na realidade, seria uma das fontes de nitrogênio mais eficientes na repressão da biossíntese de L-ASNase. De acordo com DUNLOP et al. (1980), a biossíntese de ASP3 está sujeita a

forte repressão catabólica por uma variedade de compostos de nitrogênio, fenômeno denominado de repressão catabólica pelo nitrogênio (RCN).

SARQUIS et al. (2004) avaliaram a produção de L-ASNase por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* spp. em diferentes FN, inclusive prolina, e também observaram que esse aminoácido era aquele que mais favorecia a produção de L-ASNase pela espécie *A. terreus* e que glutamina e ureia foram as fontes que resultaram em menor produção da enzima, indicando que a metabolização de fontes de nitrogênio por esses fungos filamentosos sofre influência do fenômeno de RCN (SARQUIS et al., 2004).

Embora microrganismos consigam utilizar uma grande variedade de fontes de nitrogênio, o crescimento irá variar conforme o tipo de FN disponível no meio. Por essa razão, a fim de selecionar a melhor FN, os microrganismos desenvolvem mecanismos de regulação que permitem o uso de nutrientes que melhor suportem o seu crescimento (SANCHEZ; DEMAIN, 2002). Amônia, glutamina e asparagina são reconhecidas como fontes de nitrogênio mais facilmente metabolizáveis ou mais ricas. A ausência de fontes ricas em nitrogênio resulta na liberação a nível transcricional das vias de catabolismo de fontes de N consideradas não preferenciais ou “pobres” (prolina, ureia, glutamato), o que caracteriza o fenômeno de repressão catabólica pelo nitrogênio (HOLFMAN-BANG, 1999). Segundo a literatura (MAGAZANIK; KAIZER, 2002), as leveduras ao crescerem nessas fontes de nitrogênio aumentam a expressão de enzimas envolvidas na síntese de glutamato e glutamina e, por consequência, aumentam a atividade de permeases responsáveis pela captação de aminoácidos a serem utilizados como fonte de N.

Segundo ARIMA et al (1972), os fungos e as leveduras mostram modos de regulação de L-ASNase similar aos das células vegetais, onde a produção extracelular da enzima é estimulada por uma carência de nitrogênio. Há na literatura estudos sobre o mecanismo de RCN na levedura *S. cerevisiae* (DUNLOP et al., 1980; OLIVEIRA, 1999; HOFMAN-BANG, 1999). OLIVEIRA (1999) cita que a produção de ASP3 seria induzida pela falta de nitrogênio e não pela presença de asparagina. MOGUEL (2018) também sugere que este fenômeno ocorra em linhagem de *L. scotti*.

Com base nessas informações, a ausência de atividade no meio com ureia, sulfato de amônio e cloreto de amônio, observada quando *L. muscorum* CRM 1648 foi cultivada nessas fontes de nitrogênio, muito provavelmente é consequência do fenômeno de RCN. A presença de atividade após 120 horas de cultivo nos meios com

essas fontes de nitrogênio indica que esta foi consumida (falta de nitrogênio, do inglês *nitrogen starvation*), desreprimindo o catabolismo de fontes de N. Além disso, explicaria também o fato da prolina, que é uma das FN mais pobres, ser aquela que mais favorece a produção de L-ASNase.

Como conclusão desta etapa, o aminoácido prolina foi a FN que mais favoreceu a produção de L-ASNase e, juntamente com o extrato de levedura, a que mais contribuiu para o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648. Sacarose, extrato de levedura e prolina foram, portanto, as fontes de carbono e nitrogênio que mais contribuíram para o crescimento dessa levedura e produção da enzima e, por isso, foram selecionadas para compor o meio Czapek-Dox Modificado (CDM), que foi otimizado na etapa a seguir.

4.4. Otimização dos fatores nutricionais por delineamento fatorial completo

As combinações e resultados obtidos no *delineamento experimental (I)* estão dispostos na Tabela 9. Os resultados experimentais referentes aos pontos centrais para ambas as respostas (crescimento e produção) foram muito próximos, indicando confiabilidade nos resultados.

O delineamento experimental mostrou que a produção da enzima tende a aumentar com o aumento da concentração de prolina e sacarose (15 g.L^{-1} cada), porém em nível intermediário de extrato de levedura (5 g.L^{-1}), como mostra o experimento 26 ($3658,3 \text{ U.L}^{-1}$ de L-ASNase), que teve a maior produção de L-ASNase (Tabela 9). A análise estatística desse ensaio foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) para ambas as respostas, sendo significativos os valores de $p < 0,1$ (Tabela 10).

Os resultados de ANOVA (Tabela 10) mostram que as concentrações de sacarose, extrato de levedura e prolina têm relação direta com o crescimento e produção da enzima, uma vez que os termos lineares desses três fatores foram significativos ($p < 0,1$) para as duas respostas. Ao analisar a Soma dos Quadrados, a resposta crescimento sofre maior influência do fator sacarose (SQ = 167,58), seguida pelo fator extrato de levedura (SQ = 35,77) e, em menor grau, pela prolina (SQ = 8,9). Esses fatores têm menor influência sobre a produção de L-ASNase, mas também existe um efeito sobre essa resposta, que é mais afetada pela sacarose (SQ = 7,78) e em menor grau pelos outros dois fatores (SQ aproximadamente igual a 0,7 para ambos). Os termos quadráticos não influenciaram nenhuma das respostas, mas as interações foram significativas, exceto a interação de sacarose ou de extrato de levedura com prolina, que

não foi significativa para o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 ($p>0,1$). Os valores de R^2 e R^2 ajustado estão bem próximo a 100%, indicando que os resultados estão bem ajustados com o modelo.

Tabela 9 – Matriz do planejamento fatorial completo (I) e suas respectivas respostas para a avaliação do crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase.

Exp.	Fatores (g.L ⁻¹)			X (g.L ⁻¹)		L-ASNase (U.L ⁻¹)	
	sacarose	ext. de levedura	prolina	experimental	previsto	experimental	previsto
1	5	0	5	2,36	1,72	911,79	797,25
2	5	5	5	4,13	4,94	430,83	1075,00
3	5	10	5	5,13	6,15	681,52	408,75
4	5	0	10	3,23	4,62	1463,32	1450,50
5	5	5	10	7,65	7,84	2150,42	1924,25
6	5	10	10	8,88	9,05	1996,29	1454,00
7	5	0	15	3,80	5,89	1377,9	1149,75
8	5	5	15	7,82	9,11	1184,77	1819,50
9	5	10	15	9,68	10,33	1210,77	1545,25
10	5	0	5	5,74	1,72	367,69	797,25
11	10	5	5	9,35	10,55	623,96	974,00
12	10	10	5	11,98	12,53	870,94	536,50
13	10	0	10	8,74	9,46	1996,29	1525,00
14	10	5	10	11,88	13,45	2098,42	2227,50
15	10	10	10	13,14	15,43	1327,76	1986,00
16	10	0	15	9,15	10,74	1485,61	1628,50
17	10	5	15	12,4	14,73	3240,48	2527,00
18	10	10	15	14,44	16,71	2813,37	2481,50
19	15	0	5	7,99	8,69	397,40	137,75
20	15	5	5	12,02	13,45	809,66	873,00
21	15	10	5	15,12	16,19	882,08	664,25
22	15	0	10	8,65	11,59	1374,19	1599,50
23	15	5	10	14,41	16,34	2896,94	2530,75
24	15	10	10	16,94	19,09	1819,87	2518,00
25	15	0	15	8,53	12,87	1541,32	2107,25
26	15	5	15	15,01	17,62	3658,31	3234,50
27	15	10	15	16,61	20,37	3491,18	3417,75
PC1	10	5	10	11,86	13,45	2330,55	2227,50
PC2	10	5	10	11,93	13,45	2135,56	2227,50
PC3	10	5	10	11,75	13,45	2525,53	2227,50
PC4	10	5	10	11,47	13,45	2107,71	2227,50

Dados do 4° dia de cultivo

MSC – massa seca celular

Exp – experimento; PC – ponto central.

Tabela 10 –Análise de Variância (ANOVA) por regressão de superfície de resposta de X (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose, extrato de levedura e prolina – *delineamento experimental I*.

Modelo	X (g.L ⁻¹)			L-ASNase (U.L ⁻¹)		
	GL	SQ	Valor p	GL	SQ	Valor p
Regressão	7	230,818		5	0,3567	
X1	2	167,577	0,000	1	7,7813	0,084
X2	2	35,768	0,000	1	0,7272	0,000
X3	2	8,922	0,000	1	0,6917	0,012
X1 X2	4	2,273	0,006		0,7486	0,061
X1 X3	4		0,235	1	1577187	0,010
X2 X3	4		0,290		0,3567	0,048
Erro	12	4,239		16	0,9850	
Total	30	463,371		30	12,0162	

X1 – sacarose; X2 – extrato de levedura; X3 – prolina; GL – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados. $R^2 = 99,1\%$, R^2 ajustado = 97,7% (Resposta Y1). $R^2 = 91,8\%$, R^2 ajustado = 84,6% (Resposta Y2). Interações significativas para $p < 0,1$. Foi realizada transformação Box Cox ($\lambda = 0$) para ajuste do modelo.

Por ter sido observado nesse ensaio que era possível aumentar a produção de L-ASNase com o aumento do nível de sacarose e prolina, foi feito outro delineamento experimental (II), no qual foi observado que há uma tendência de aumento nos níveis dos três fatores resultarem em maior produção de L-ASNase (4582,5 U.L⁻¹) no ensaio 27) e crescimento de *L. muscorum* CRM 1648. Na resposta crescimento isso não fica tão claro, visto que a massa seca celular é maior no experimento 8 (28,3 g.L⁻¹), cuja composição do meio é 10 g.L⁻¹ (sacarose), 5 g.L⁻¹ (extrato de levedura) e 20 g.L⁻¹ (prolina). Nesse ensaio foi observado que nos níveis mais baixos de sacarose e prolina, o aumento de extrato de levedura parece prejudicar o crescimento, mas que esse efeito é amenizado e até revertido quando os níveis daqueles fatores são aumentados (Tabela 11). Assim como no DoE (I), os resultados referentes aos pontos centrais no DoE (II) também foram muito próximos, indicando confiabilidade nos resultados.

Tabela 11 – Matriz do planejamento fatorial completo (II) e suas respectivas respostas para a avaliação do crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase.

Exp.	Fatores (g.L ⁻¹)			X (g.L ⁻¹)		L-ASNase (U.L ⁻¹)	
	sacarose	ext. de levedura	L-prolina	experimental	previsto	experimental	previsto
1	10	5	10	17,85	13,45	2355,62	2227,50
2	10	10	10	22,50	15,43	2714,02	1986,00
3	10	15	10	12,60	15,41	2481,06	800,50
4	10	5	15	20,25	14,73	1757,66	2527,00
5	10	10	15	25,05	16,71	3032,50	2481,50
6	10	15	15	17,73	16,68	2673,16	1492,00
7	10	5	20	26,97	14,38	4216,64	1872,50
8	10	10	20	28,30	16,36	3992,89	2023,00
9	10	15	20	19,59	16,34	2235,91	1229,50
10	15	5	10	20,10	16,34	2697,31	2530,75
11	15	10	10	23,15	19,09	2948,00	2518,00
12	15	15	10	17,24	19,83	3292,31	1561,25
13	15	5	15	16,94	17,62	1648,09	3234,50
14	15	10	15	16,61	20,37	1880,42	3417,75
15	15	15	15	20,97	21,11	3585,41	2657,00
16	15	5	20	20,10	17,27	3061,58	2984,25
17	15	10	20	19,94	20,02	3567,24	3363,50
18	15	15	20	23,46	20,76	3312,22	2798,75
19	20	5	10	17,05	16,51	3633,12	2834,00
20	20	10	10	17,41	20,03	3884,90	3050,00
21	20	15	10	18,94	21,54	3378,75	2322,00
22	20	5	15	21,38	17,79	1762,36	3942,00
23	20	10	15	20,66	21,31	3920,72	4354,00
24	20	15	15	22,81	22,81	3681,28	3822,00
25	20	5	20	23,78	17,45	3065,73	4096,00
26	20	10	20	25,30	20,96	4279,65	4704,00
27	20	15	20	24,24	22,47	4582,47	4368,00
PC1	15	10	15	18,26	20,37	3887,69	3417,75
PC2	15	10	15	19,12	20,37	4081,61	3417,75
PC3	15	10	15	19,57	20,37	3558,09	3417,75
PC4	15	10	15	19,17	20,37	3457,53	3417,75

Dados do 4º dia de cultivo

MSC – massa seca celular

Exp – experimento

PC – ponto central

Pela Tabela ANOVA do segundo delineamento experimental (Tabela 12), todos os termos lineares foram significativos para ambas as respostas, exceto a sacarose, que não foi significativa para a produção de L-ASNase ($p > 0,1$). Ao avaliar a relevância dos

termos lineares para cada resposta (soma dos quadrados), observou-se que para a resposta crescimento, novamente sacarose teve maior influência sobre essa resposta (SQ = 2,33), seguida por extrato de levedura (SQ = 1,59) e prolina (SQ = 0,63). Por outro lado, ao avaliar a resposta produção de L-ASNase, sacarose praticamente não influenciou essa resposta (SQ = 0,07), mas esta foi influenciada pelos outros dois fatores, principalmente por prolina (SQ = 5,31). Dessa vez, os termos quadráticos influenciaram a resposta crescimento e apenas o termo quadrático de prolina teve influência sobre a produção da enzima. Apenas a interação de sacarose e extrato de levedura influenciou a resposta crescimento, embora não tenha sido significativo ($p > 0,1$), enquanto que para a resposta produção isso foi observado de forma significativa apenas para a interação de sacarose com prolina. O valor de R^2 foi um pouco mais baixo do que no primeiro ensaio, principalmente para a resposta atividade de L-ASNase (79,34%), mas esse valor ainda permite dizer que os resultados estão bem ajustados com o modelo.

Tabela 12 –Análise de Variância (ANOVA) por regressão de superfície de resposta de X (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose, extrato de levedura e prolina – *delineamento experimental II*.

Modelo	X (g.L ⁻¹)			L-ASNase (U.L ⁻¹)		
	GL	SQ	Valor p	GL	SQ	Valor p
Regressão	7	15.9504	0.000	5	18.7184	0.000
X1	1	2.3332	0.000	1	0.0709	0.371
X2	1	1.5950	0.000	1	1.0340	0.001
X3	1	0.6377	0.000	1	5.3111	0.000
X1 X1	1	0.9099	0.000			
X2 X2	1	0.2100	0.025			
X3 X3	1	0.4075	0.002	1	4.3099	0.000
X1 X2	1	0.1294	0.075			
X1 X3				1	0.4501	0.027
X2 X3						
Erro	54	2.1204		56	4.8757	
Total	61	18.0708		61	23.5941	

X1 – sacarose; X2 – extrato de levedura; X3 – prolina; GL – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados. $R^2 = 88,27\%$, R^2 ajustado = 86,75% (Resposta Y1). $R^2 = 79,34\%$, R^2 ajustado = 77,49% (Resposta Y2). Interações significativas para $p < 0,1$. Foi realizada transformação Box Cox ($\lambda = 0$) para ajuste do modelo.

Os gráficos gerados pelas análises (Figura 18) confirmam o que já foi observado nas tabelas anteriores (Tabelas 9 e 11), que há uma tendência de maior crescimento de

L. muscorum CRM1648 nos níveis mais elevados dos três fatores. Na produção de L-ASNase por essa levedura, observa-se um comportamento sinérgico entre a sacarose e o extrato de levedura, indicando uma maior produção quanto maior é o nível de cada um desses nutrientes, sugerindo inclusive a possibilidade de melhorar ainda mais a produção ao extrapolar os níveis desses dois fatores. Por outro lado, ao avaliar o sinergismo entre prolina e sacarose ou prolina e extrato de levedura, observa-se que os fatores sacarose e extrato de levedura praticamente não influenciam a resposta produção e que esta depende quase que exclusivamente do aumento de prolina no meio, indicando a grande relevância desse fator para a produção de L-ASNase por *L. muscorum* CRM 1648.

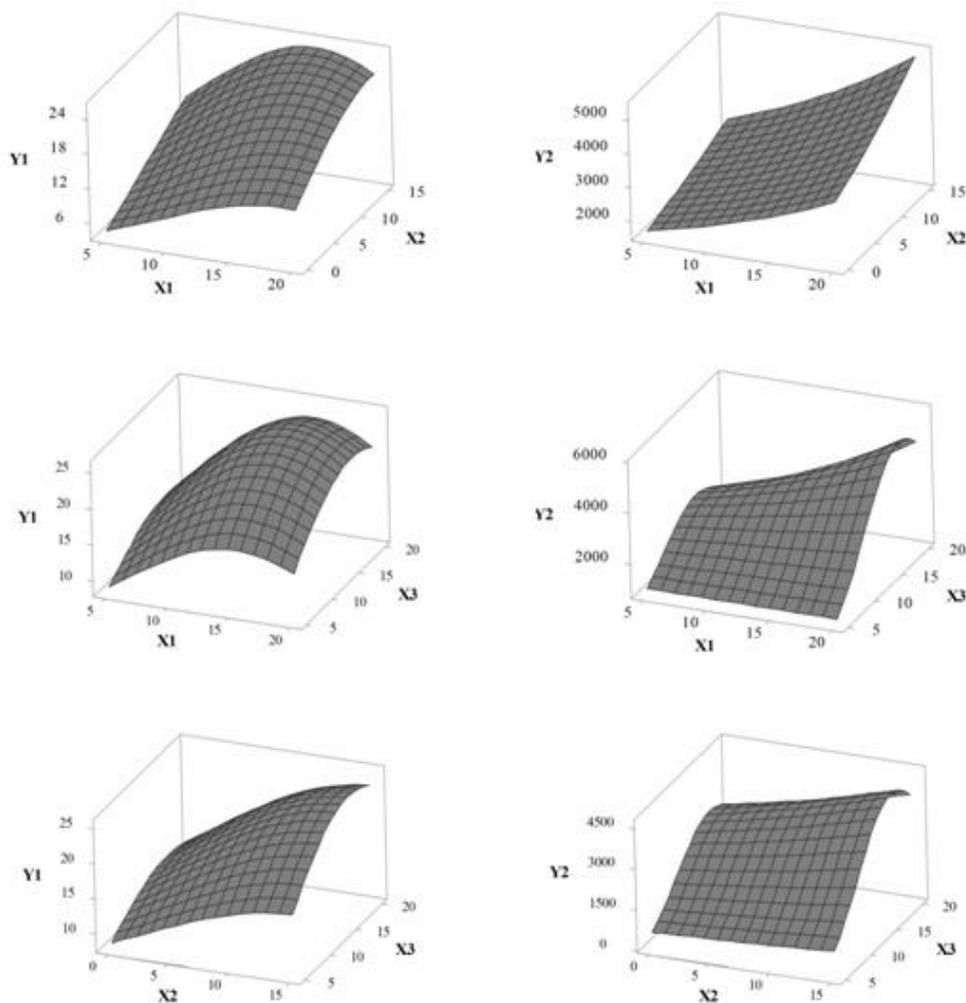


Figura 18. Gráfico da superfície de resposta em 3D de MSC (Y1) e atividade de L-ASNase (Y2) em função da concentração de sacarose (X1), extrato de levedura (X2), e prolina (X3). Valores fixados: X1 = 17, X2 = 15 e X3 = 16.

A metodologia de delineamento experimental por fatorial completo resultou em crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase por essa levedura aproximadamente 10 vezes maior do que no meio de cultivo inicial CD (Figura 19), indicando que essa metodologia foi relevante para atingir o propósito de otimização do meio de cultivo nas condições avaliadas até aqui.

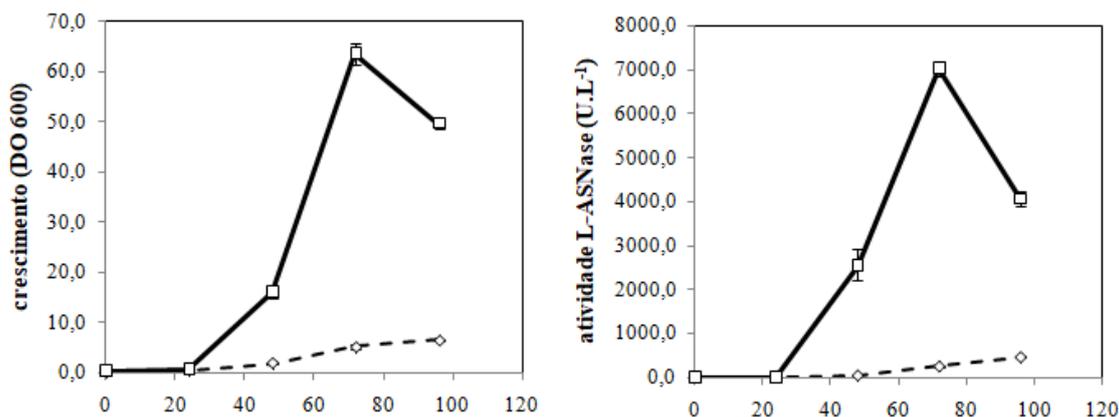


Figura19 – Efeito do meio Czapek Dox no crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase após o delineamento experimental. CD: meio Czapek Dox inicial, com glicose e prolina; CDM: meio Czapek Dox melhorado neste trabalho, contendo prolina (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (15 g.L⁻¹) e sacarose (20 g.L⁻¹).
 Legenda: - ◇ - Meio CD — □ — Meio CDM

4.5. Análise univariada das variáveis temperatura (°C), concentração inicial de células (X_0), pH inicial e concentração de água do mar na composição do meio de cultivo.

Foram avaliados três valores distintos de concentração inicial do inoculo ($X_0 = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$; $X_0 = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $X_0 = 1,5 \text{ g.L}^{-1}$), com o objetivo de observar o efeito desse fator no crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase. A avaliação de X_0 mostrou que o crescimento da levedura e produção da enzima alcançou o seu ápice com 48 horas de cultivo nas três condições avaliadas (Figuras 20 e 21). Há uma pequena diferença na velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) para cada condição de X_0 , sendo $\mu_{0,5}$ (μ_{\max} quando $X_0 = 0,5 \text{ g.L}^{-1}$) igual a $0,064 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{1,0} = 0,054 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{1,5} = 0,041 \text{ h}^{-1}$ (Figura 20). Ainda assim, a análise dos dados por regressão indicou que a inclinação das curvas não teve diferença significativa entre elas, ou seja, X_0 nas

concentrações avaliadas não interferiu nem no crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 nem na produção da enzima de interesse por essa levedura (Figura 22).

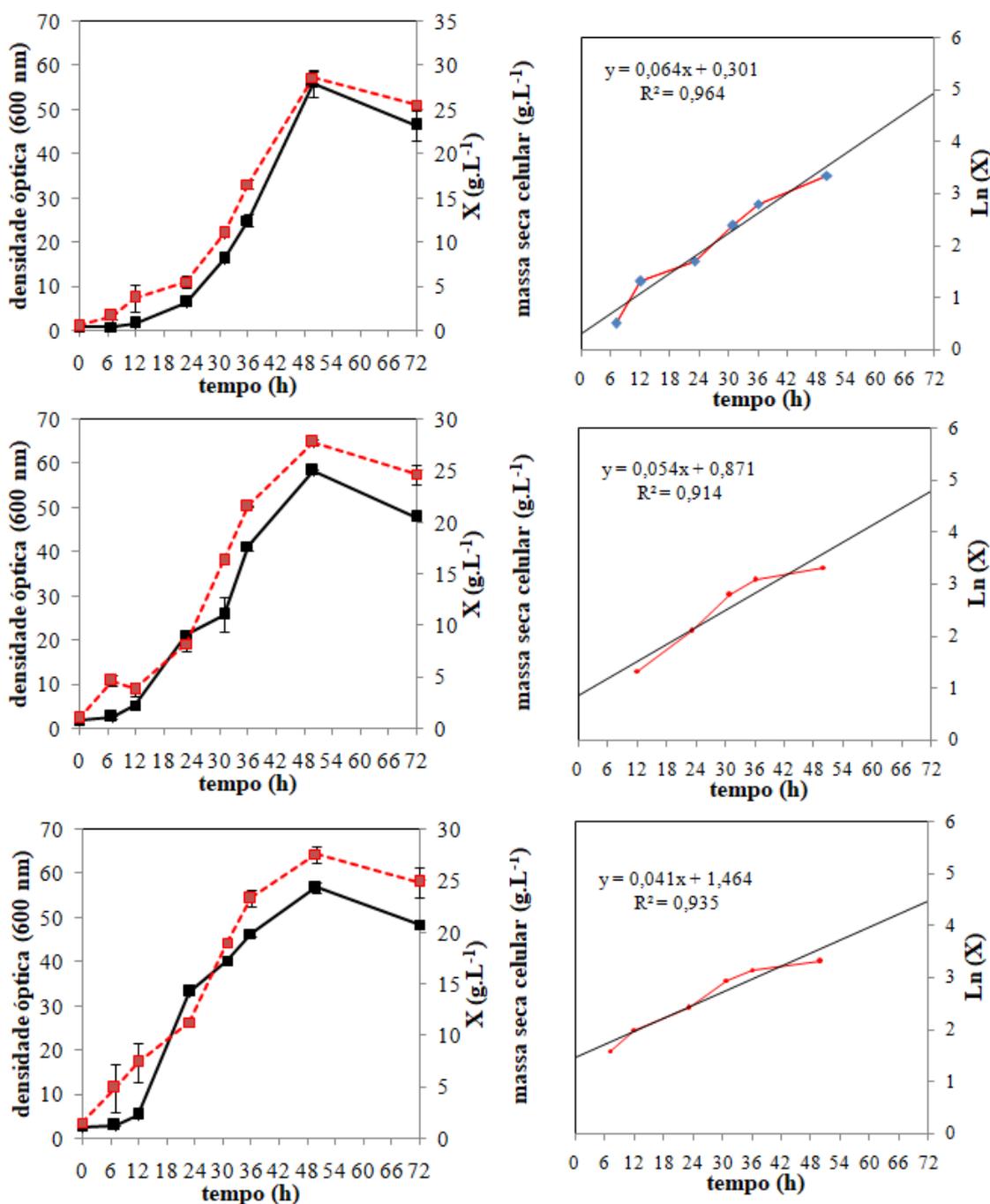


Figura 20 – Avaliação do crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 em meio CDM por análise de DO (preto) e X (vermelho), bem como de Ln(X), quando X₀ = 0,5 g.L⁻¹(A), X₀ = 1,0 g.L⁻¹(B) e X₀ = 1,5 g.L⁻¹(C).

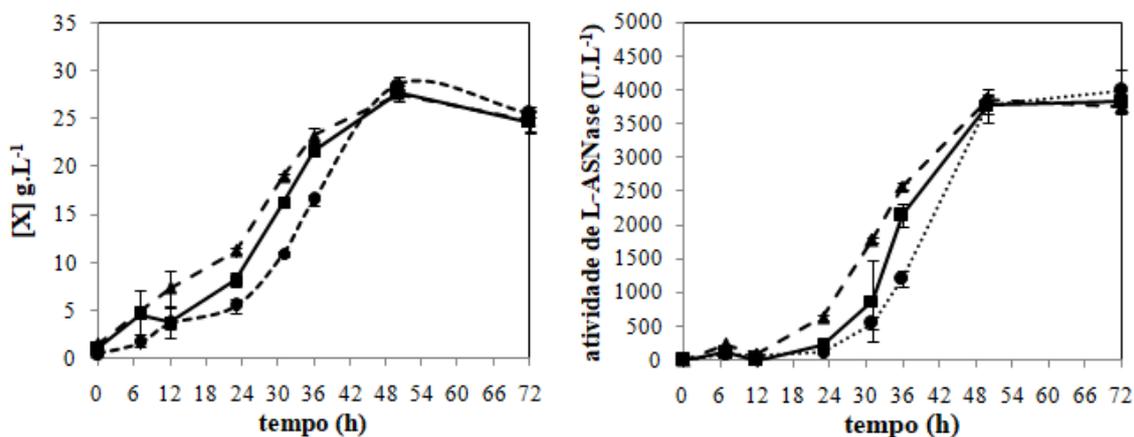


Figura 21 – Curva comparativa de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase quanto a concentração celular inicial (X_0).

Legenda: $\cdots \bullet \cdots$ X_0 0,5 $\text{---} \blacksquare \text{---}$ X_0 1,0 $\text{---} \blacktriangle \text{---}$ X_0 1,5

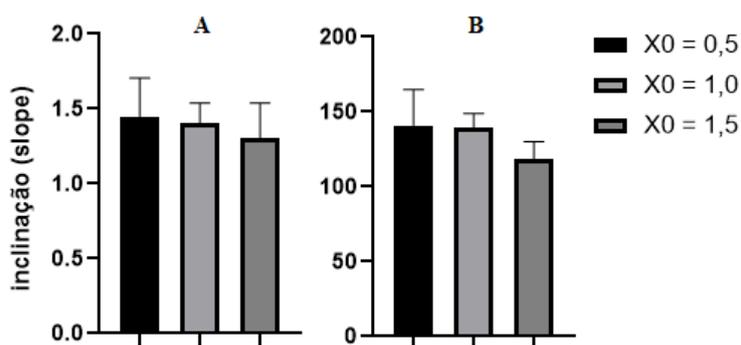


Figura 22 – Análise dos dados de inclinação das curvas de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 (A) e produção de L-ASNase (B) por regressão linear em cada nível de X_0 .

Foi avaliada a capacidade de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase nas seguintes temperaturas: 9, 12, 15, 18 e 21 °C. A levedura foi capaz de crescer em todas as temperaturas avaliadas (Figura 23). O crescimento foi maior quanto maior a temperatura até 18°C. Quando cultivada a 21°C, o crescimento caiu depois de 48 horas de cultivo. Por esse experimento é possível supor que a temperatura ótima de crescimento dessa levedura é em torno de 18 °C. Pela definição de Morita (1975), essa levedura seria psicrotrófica ou psicrotolerante (temperatura ótima de crescimento acima de 15 °C e máxima acima de 20°C), corroborando com dados descritos na literatura que mostram que a espécie *L. muscorum* é capaz de crescer até 25 °C (PATHAN et al., 2010). Para a produção de L-ASNase foi observado que temperaturas mais altas (18 e 21°C) e na temperatura mais baixa (9°C) a produção não

alcançou 4.000 U.L⁻¹. A produção foi maior quando a levedura foi cultivada a 12 e 15°C (acima de 7000 U.L⁻¹), indicando que esta é a faixa mais indicada para maior produção dessa enzima. Em 18°C a produção em 120 horas de cultivo é 3718,7 ± 217,7 U.L⁻¹, enquanto a 12 e 15°C nesse intervalo de tempo foi obtido quase o dobro de atividade de L-ASNase (respectivamente, 6973,1 ± 492,4 e 7112,3 ± 761,6 U.L⁻¹). Dessa forma, como a produção de L-ASNase é a resposta mais importante nesse trabalho e em 15°C a levedura *L. muscorum* cresce um pouco mais rápido do que a 12°C, a temperatura de 15°C, parece ser a melhor opção para cultivar a linhagem CRM 1648 para a produção de L-ASNase. De acordo com PATHAN et al. (2010), essa espécie é capaz de crescer a 4, 22 e 25 °C, mas não a 30 °C. Em outro estudo foi observado que outra espécie do mesmo gênero, *Leucosporidium escuderoi*, não foi capaz de crescer em temperaturas acima de 25 °C (LAICH et al., 2014).

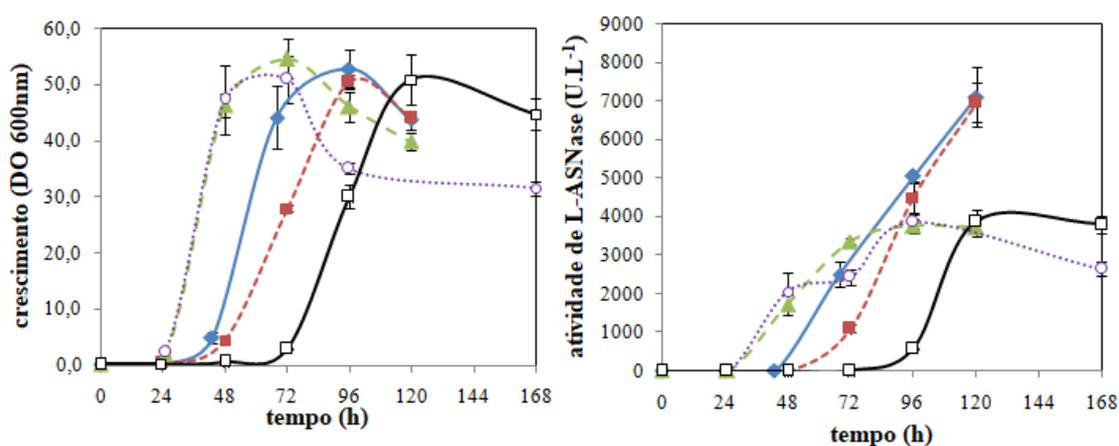


Figura 23 – Curva de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes temperaturas. *Legenda:* —□— 9°C —■— 12°C —◆— 15°C —▲— 18°C —○— 21°C

O pH inicial do meio de cultivo CDM também foi avaliado e, de acordo com os resultados não houve interferência desse fator no crescimento de *L. muscorum* CRM 1648, mas esta interferência se fez presente na avaliação da produção da enzima (Figura 24). A produtividade foi menor em 72 horas de cultivo para a condição em que o pH inicial do meio era igual a 4,5 (64 U.L⁻¹.h⁻¹ em relação a 77 e 78 U.L⁻¹.h⁻¹ obtido nas outras condições, respectivamente), sugerindo que valores de pH mais baixos são prejudiciais a produção de L-ASNase por essa levedura.

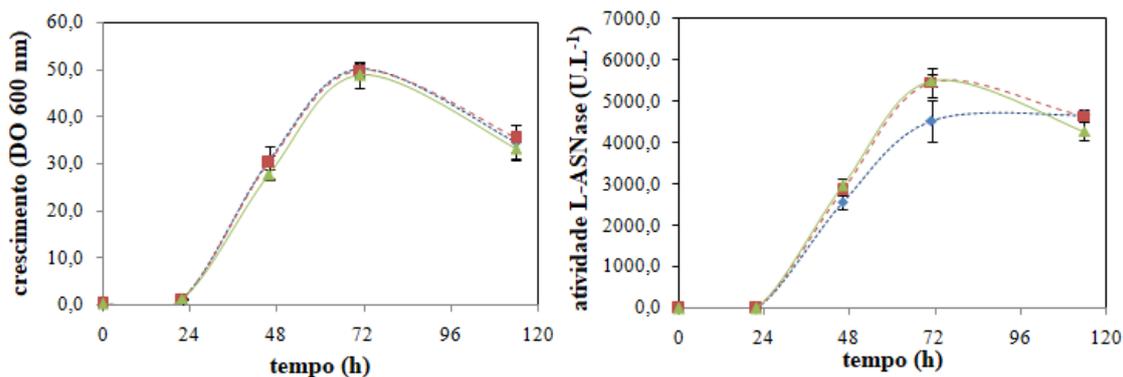


Figura 24 – Curva de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes valores de pH inicial do meio CDM.

Legenda: ---♦--- pH 4,5 ---■--- pH 5,5 ---▲--- pH 6,5

A avaliação da água do mar na composição do meio CDM mostrou que essa variável favoreceu tanto o crescimento como a produção de L-ASNase (Figura 25). Nos casos avaliados o pico de crescimento e produção ocorreu em 72 horas de cultivo. Nesse ponto, as condições com 25% e 50% de água do mar resultaram em um crescimento 1,4 e 1,3 vezes maior que no cultivo sem água do mar, respectivamente. Na produção da enzima, a adição de água do mar, independente da quantidade, resultou em uma atividade 1,4 vezes maior do que no meio sem água do mar. Esses resultados sugerem que até 25% de água do mar no meio promove uma diferença significativa nas respostas crescimento e produção, mas acima dessa concentração (ou pelo menos até 50%, que foi o máximo avaliado), não há incremento nem prejuízo das respostas. O bom desempenho da levedura em meio com alta salinidade, como é o caso da água do mar, corrobora com o fato de que *L. muscorum* CRM 1648 foi isolada de material coletado em sedimento marinho, na Península Antártica, como já comentado em materiais e métodos (capítulo 3, item 3.1).

A análise univariada das condições de cultivo (X_0 , pH inicial e temperatura) e concentração de água do mar no meio CDM mostrou que *L. muscorum* CRM 1648 deve ser cultivada em meio CDM com pelo menos 25% (v/v) de água do mar, pH ajustado para 5,5 ou 6,5, a 15 °C. A variável X_0 , nos valores avaliados, não interferiu significativamente no crescimento da levedura nem na produção da enzima.

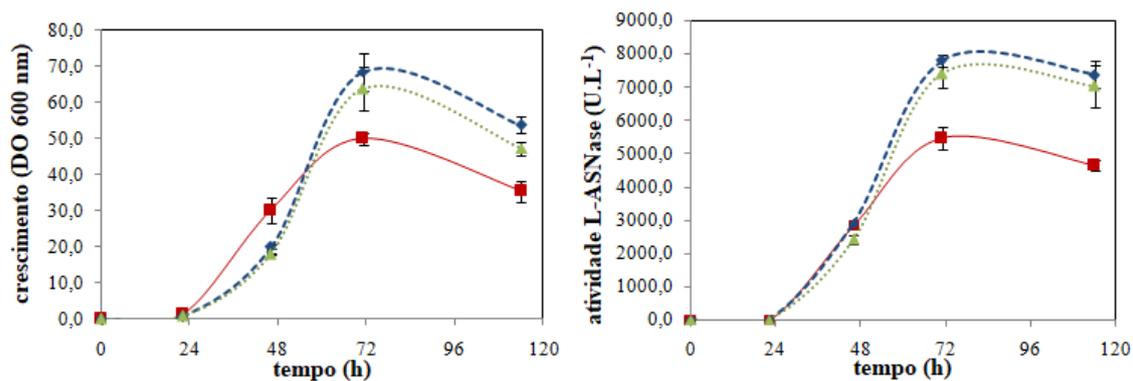


Figura 25 – Curva de crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase em diferentes concentrações de água do mar no meio CDM.

Legenda: —■— ausência de água do mar —◆— água do mar 25% —▲— água do mar 50%

4.6. Cultivos em biorreator e avaliação do oxigênio dissolvido

4.6.1. Ensaio 1: sem controle de oxigênio dissolvido ($OD < 20\%$)

Os dados desse ensaio estão apresentados nas Figuras 26 a 29 e Apêndices B e C. Esse ensaio teve duração de 96 horas e o crescimento da levedura *L. muscorum* CRM 1648 alcançou o máximo de 26 g.L^{-1} de massa seca celular (Apêndice B). A temperatura e agitação se mantiveram durante todo o cultivo em torno de 15°C e 500 rpm, respectivamente (Figura 27, Apêndice C). O pH também se manteve em torno de 5,5, através da adição de ácido (HCl 20%) e base (NaOH 20%), como mostra a Figura 26.

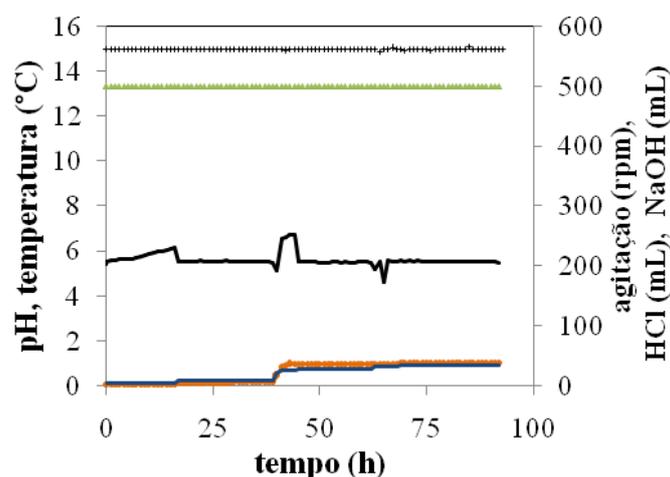


Figura 26 – Perfil das variáveis pH, temperatura ($^\circ\text{C}$), agitação (rpm) e volumes adicionados de ácido (HCl 20%) e base (NaOH 20%) registradas pelo biorreator durante o ensaio 1.

Legenda: + temperatura — pH ▲ agitação —●— HCl 20% —○— NaOH 20%

O sistema foi alimentado com ar atmosférico e a aeração se manteve em torno de 1 LpM em todo o processo (Figura 27). O oxigênio dissolvido mostra uma queda constante nas primeiras 24 horas (Figura 27), período que corresponde à fase exponencial, no qual se observa a maior velocidade de produção de CO₂, $\mu_{\max} = 0,169$ mmol CO₂.L⁻¹.h⁻¹ (Figura 29). Depois desse período até quase 75 horas, o OD cai com menor velocidade até quase 5% e aumenta para, aproximadamente, 30%, indicando que as células diminuíram o consumo de oxigênio. Isso pode ocorrer porque as células pararam de crescer, talvez devido ao oxigênio ser limitante ou pelo término de uma das fontes de carbono.

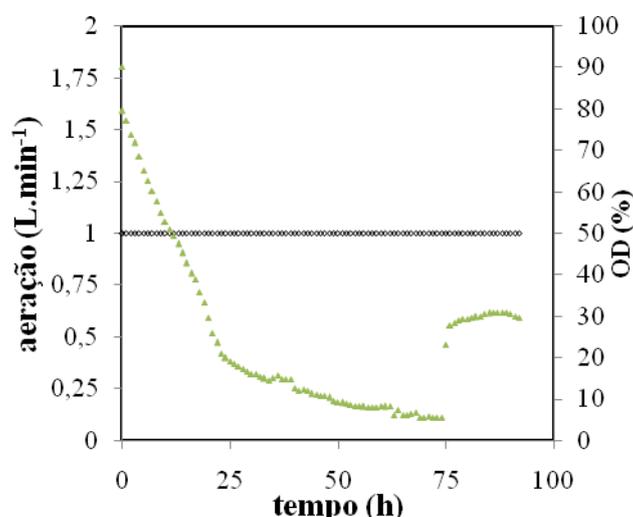


Figura 27 – Perfil das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 1 em biorreator. *Legenda:* * aeração ◀ OD .

A Figura 28 mostra o perfil de crescimento por massa seca celular [X] e densidade óptica (DO 600 nm), pH e atividade de L-ASNase ao longo de quase 96 horas de cultivo. Observa-se que praticamente não houve produção da enzima e que, no final do cultivo, *L. muscorum* não havia ainda estacionado o seu crescimento, indicando que algo, possivelmente o O₂, seria o fator limitante. A análise do crescimento [X] e taxa de produção de CO₂ e os respectivos perfis de Ln dessas variáveis ao longo do tempo (Figura 30) mostram que a velocidade de crescimento foi constante nas primeiras 24 horas de cultivo, sendo μ_{\max} calculado pelo Ln da concentração de CO₂ produzido (CER) igual a 0,169 h⁻¹ e μ_{\max} pelo Ln de [X] igual a 0,084 h⁻¹. Como esses valores estão muito diferentes, a avaliação da velocidade de crescimento foi feita por Ln(X) nos ensaios subseqüentes.

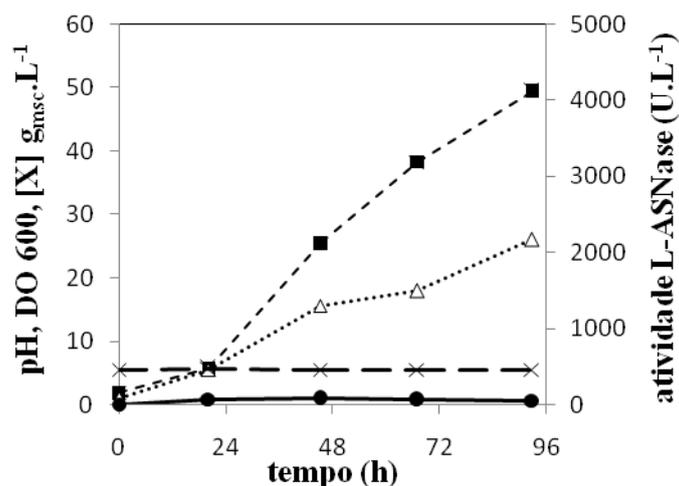


Figura 28 – Perfil das variáveis crescimento (DO e MSC), pH e produção de L-ASNase no ensaio 1 em biorreator.

Legenda: --■-- DO 600△.... msc —×— pH —●— atividade L-ASNase

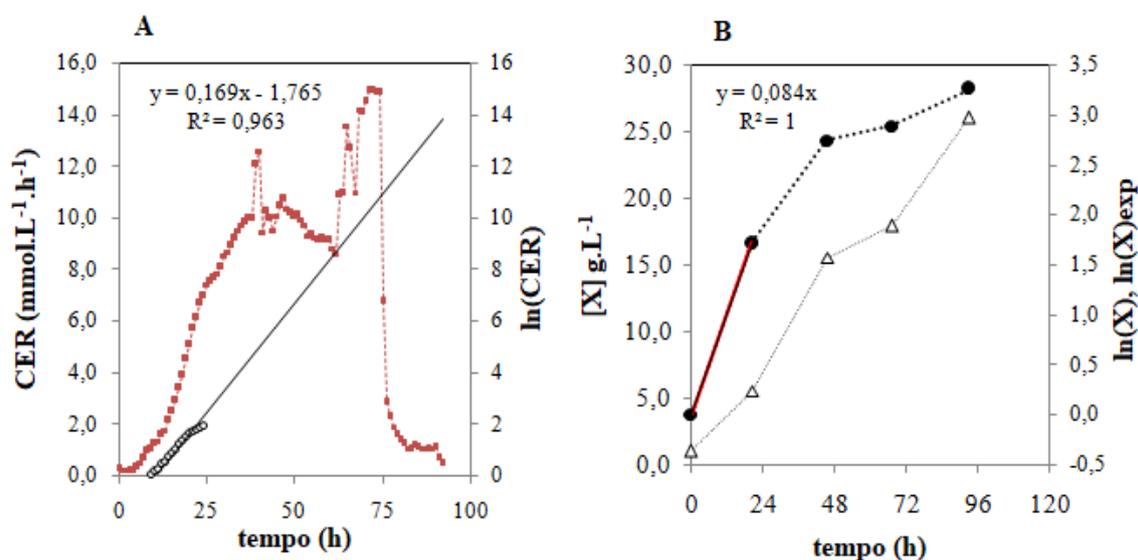


Figura 29 – Perfil das variáveis produção de CO₂ (CER) e Ln de CER na fase exponencial (A) e crescimento celular (massa seca celular, [X]) mais ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 1. Legenda:

---■--- CER ○ lnCER — Linear(lnCER) (A)
●.... ln(X) — ln(X)exp △.... [X] — Linear(ln(X)exp) (B)

Como já havia sido observado nos cultivos em frascos agitados que o pH tende a aumentar bastante quando há a produção de L-ASNase, variando de um pH inicial igual a 5,5 até, aproximadamente, 8,5 no final do cultivo (dados não mostrados), havia nessa

altura a suspeita de que o pH, ao ser controlado em 5,5 durante todo o cultivo, poderia estar interferindo na produção da enzima. Por essa razão, o ensaio seguinte em biorreator foi conduzido sem controle de pH (sem adição de ácido e base ao sistema).

4.6.2. Ensaio 2: sem controle de oxigênio dissolvido ($OD > 20\%$)

O objetivo deste ensaio foi avaliar o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase em biorreator, em condição de alta concentração de oxigênio dissolvido (OD controlado em 80%). Os dados obtidos desse ensaio estão informados nos Apêndices D e E e nas Figuras 30 a 34. A agitação variou de 200 a 1200 rpm, alcançando o valor máximo em 11 horas de cultivo, onde se manteve até o final (Figura 24). A temperatura foi mantida em 15 °C e o pH, que não foi controlado, aumentou de 5,5 a, aproximadamente, 8,6 (Figura 30).

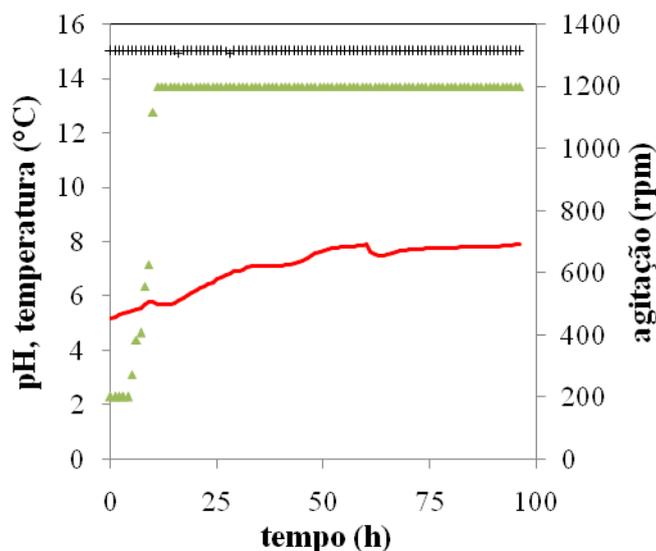


Figura 30 – Perfil das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator durante o Ensaio 2. *Legenda:* — pH + temperatura ▲ agitação.

A aeração foi mantida em 1 LpM nas primeiras 24 horas, mas com a condição escolhida não foi possível manter $OD = 80\%$, mesmo quando a agitação estava no seu valor máximo, por isso, a aeração foi aumentada para 1,5 LpM na tentativa de evitar o decaimento de OD (Figura 31). Ainda assim, OD decaiu até se estabilizar por volta de 30%, após 50 horas de cultivo. Como o aumento da aeração não foi suficiente para

manter OD em 80% e o aumento da agitação poderia provocar o cisalhamento da célula, a adição de oxigênio puro foi a alternativa adotada no ensaio seguinte (ensaio 3).

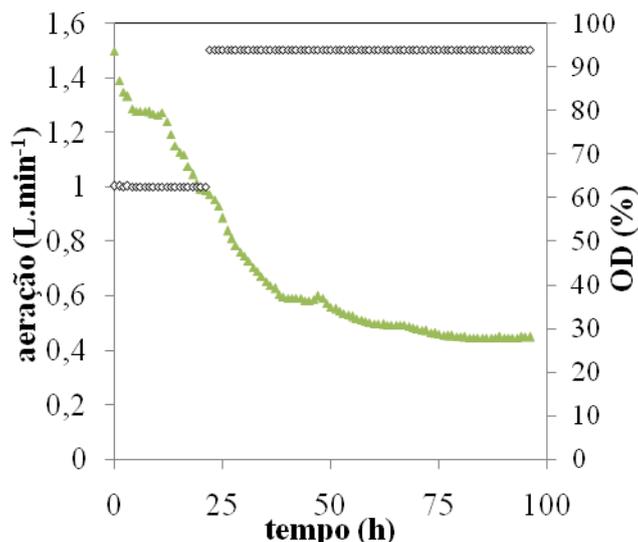


Figura 31 – Perfil das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 2 em biorreator. *Legenda:* ▲ OD ♦ aeração

A Figura 32 mostra o perfil de crescimento [X], produção de L-ASNase e consumo dos substratos sacarose e prolina. Dessa vez, foi detectada produção de L-ASNase. A produtividade em células e em produto é máxima por volta de 47 horas de cultivo e, respectivamente, igual a 0,58 g.L⁻¹.h⁻¹ e 75,4 U.L⁻¹.h⁻¹ (Apêndice D). Nessa condição e intervalo de tempo *L. muscorum* CRM 1648 produziu, aproximadamente, 27 g.L⁻¹ de massa seca celular e 3.500 U.L⁻¹ de L-ASNase (Apêndice D). A velocidade específica de crescimento é constante e máxima nesse intervalo de tempo (Figura 33), sendo μ_{\max} de [X] igual a 0,085 h⁻¹. A produção parece estar associada ao crescimento, pois se observa que o consumo dos substratos e produção de células e produtos ocorrem simultaneamente e, quando acabam os dois substratos, por volta de 47 horas de cultivo, não se observa mais crescimento nem produção da enzima (Figura 32). Os substratos são consumidos ao mesmo tempo, embora o consumo de sacarose seja um pouco mais rápido que o consumo de prolina.

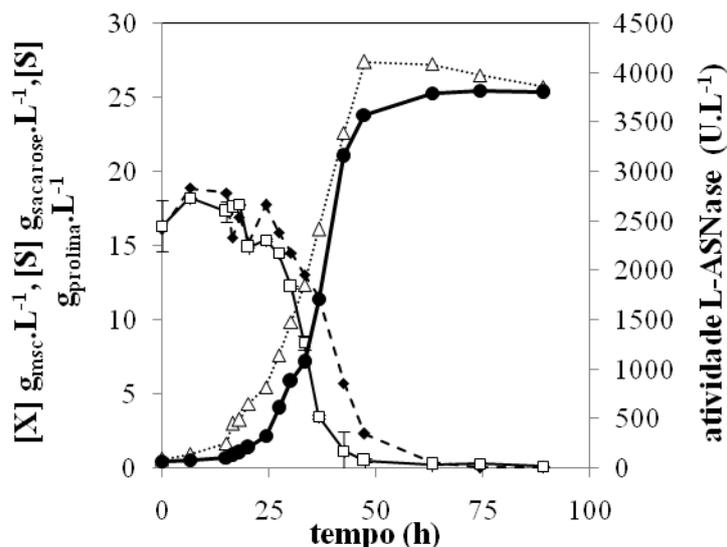


Figura 32 – Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e de prolina [S] e produção de L-ASNase no Ensaio 2 em biorreator. Legenda:

...△... X —□— Ssac - -♦- - Spro —●— atividade

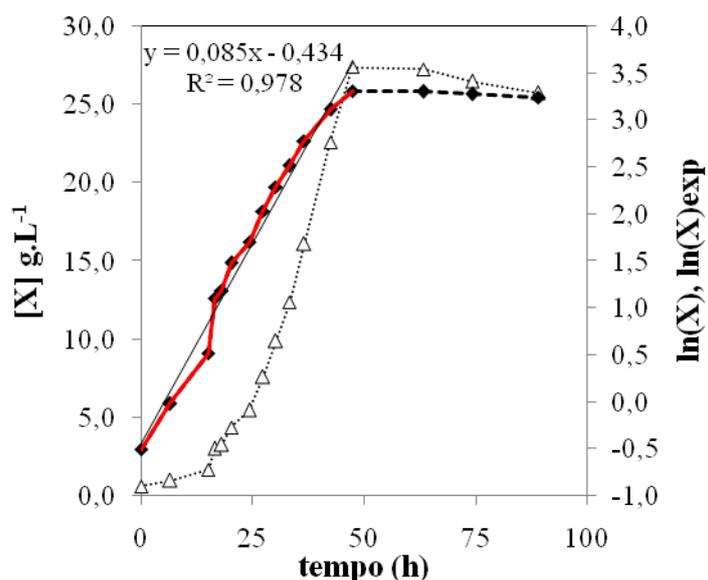


Figura 33 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), $\ln(X)$ e $\ln(X)$ na fase exponencial ($\ln(X)_{exp}$) no Ensaio 2.

Legenda: ...●... $\ln(X)$ —●— $\ln(X)_{exp}$...△... [X] — Linear ($\ln(X)_{exp}$)

Como nesse experimento não houve controle de pH, foi observado que houve produção e que existe uma correlação entre o aumento dessa variável e a produção de L-ASNase (Figura 34). Não é possível dizer que o aumento do pH ao longo do cultivo está associado a produção da enzima L-ASNase, mas sugere que o seu monitoramento

poderia ser utilizado na indústria como método simples, rápido e de baixo custo para monitorar a produção da enzima por *L. muscorum* CRM 1648.

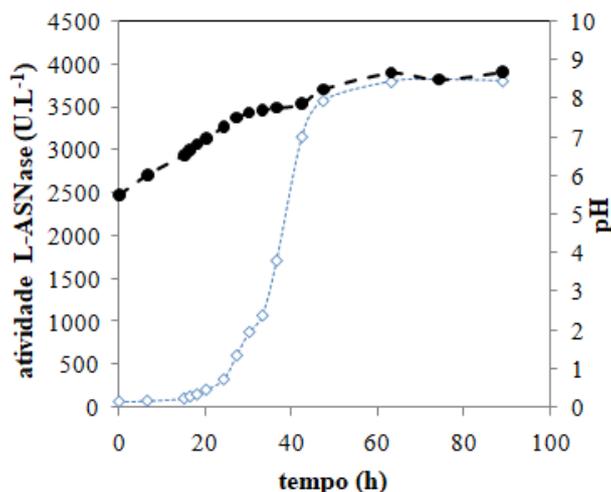


Figura 34 – Medida de pH do meio CDM e atividade de L-ASNase ao longo do cultivo de *L. muscorum* CRM 1648 em biorreator no Ensaio 2. Legenda:
 ---◇--- atividade de L-ASNase - ● - pH

4.6.3. Ensaio 3: oxigênio dissolvido controlado em 80%

Os resultados desse ensaio estão apresentados nas Figuras 35 a 38 e Apêndices F e G. Como as condições estabelecidas não foram suficientes para manter OD em torno de 80 %, foi feito outro ensaio no qual a agitação foi mantida em 600 rpm e foi adicionado oxigênio puro. A temperatura foi mantida a 15°C e o pH aumentou ao longo do cultivo de 5,5 até aproximadamente 8,5 (Figura 35, Apêndice F).

A aeração foi mantida em 1 LpM e, embora OD tenha oscilado bastante ao longo do tempo, mostrou um perfil bem diferente do apresentado nos dois ensaios anteriores, não houve uma queda constante, mas oscilações em torno do valor médio de 85 % (Figura 36). A manutenção de OD foi feita com a adição de oxigênio puro na corrente de vazão fixa de ar e esse procedimento requer atenção 24 horas e modificação constante da porcentagem de fechamento e abertura da válvula, que dar acesso a mangueira de O₂ puro (valvO₂). A válvula só foi aberta a partir de 15 horas de cultivo, aproximadamente, quando *L. muscorum* CRM 1648 começou a crescer exponencialmente (Figuras 37-38). Até 50 horas de cultivo foi observada muita oscilação na abertura e fechamento da válvula de O₂ e conseqüente variação de OD no

meio, período que coincide com a fase exponencial de crescimento. Depois desse período, e com o término dos substratos, que foram completamente consumidos, observou-se que a vazão de ar foi suficiente para manter os níveis de OD, de forma que ValvO₂ foi mantida fechada.

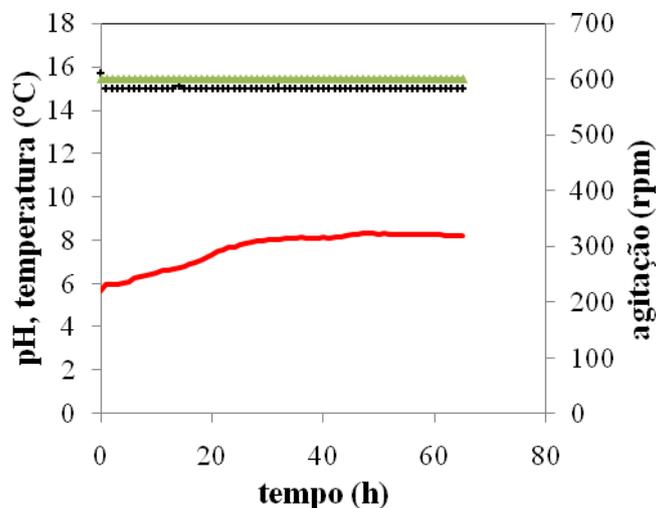


Figura 35 – Perfil das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator durante repetição do Ensaio 3. *Legenda:*
 — pH + temperatura ▲ agitação

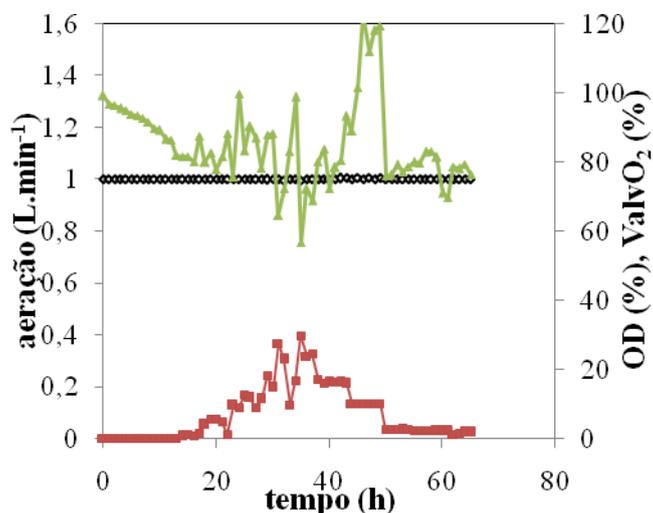


Figura 36 – Perfil das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 3 em biorreator. O valor médio de OD foi de 85,3 %. *Legenda:*
 ♦ aeração ▲ OD ■ valvO₂(%)

Neste ensaio a produtividade em células e em produto foi maior por volta de 40 horas de cultivo (0,49 g.L⁻¹.h⁻¹ e 115,5 U.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente), como mostram a

Figura 37 e o APÊNDICE F. Nesse intervalo, foram produzidas, aproximadamente, 20 g.L^{-1} de células e 4700 U.L^{-1} de L-ASNase. Também foi observado que o consumo, crescimento e produção da enzima ocorreram concomitantemente. Os substratos foram consumidos completamente, mas a sacarose foi consumida primeiro, após 35 horas de cultivo, enquanto a concentração de prolina só zerou em 50 horas (Figura 37). A velocidade específica máxima de crescimento foi maior neste ensaio, igual a $0,11 \text{ h}^{-1}$ (Figura 38).

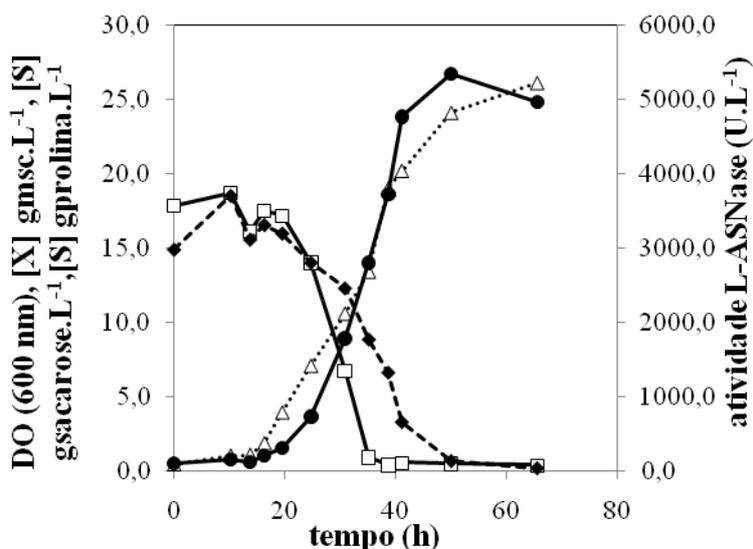


Figura 37 – Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e prolina [S] e produção de L-ASNase no Ensaio 3 em biorreator. *Legenda:*

...△... X —□— Ssac —●— Spro —●— atividade

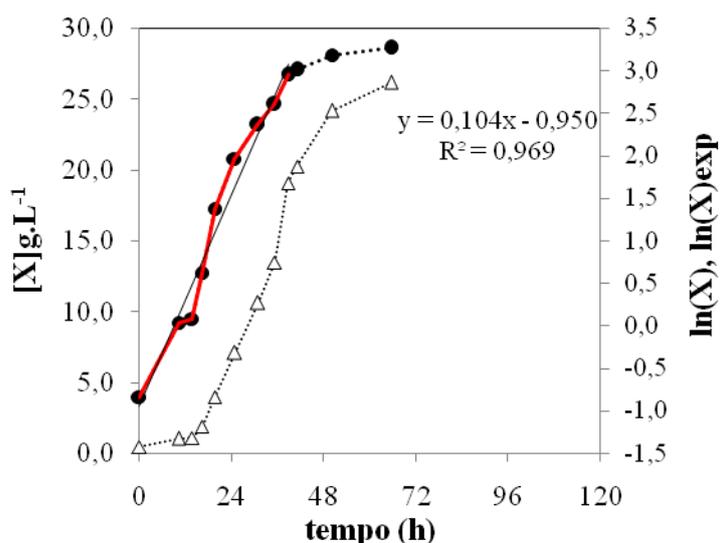


Figura 38 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), $\ln(X)$ e $\ln(X)$ na fase exponencial ($\ln(X)_{\text{exp}}$) no Ensaio 3. *Legenda:*

...●... $\ln(X)$ —●— $\ln(X)_{\text{exp}}$...△... [X] — Linear ($\ln(X)_{\text{exp}}$)

4.6.4. Ensaio 4: oxigênio dissolvido controlado em 20%

O objetivo deste ensaio foi avaliar o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase em biorreator, em condição de baixa concentração de oxigênio dissolvido (OD controlado em 20%). Os dados obtidos desse ensaio estão informados nos Apêndices H e I e nas Figuras 39 a 42. A agitação foi mantida em 600 rpm e a temperatura foi controlada em 15 °C durante todo o cultivo. O pH aumentou ao longo do cultivo como nos ensaios anteriores, chegando a 8,6 no final (Figura 39).

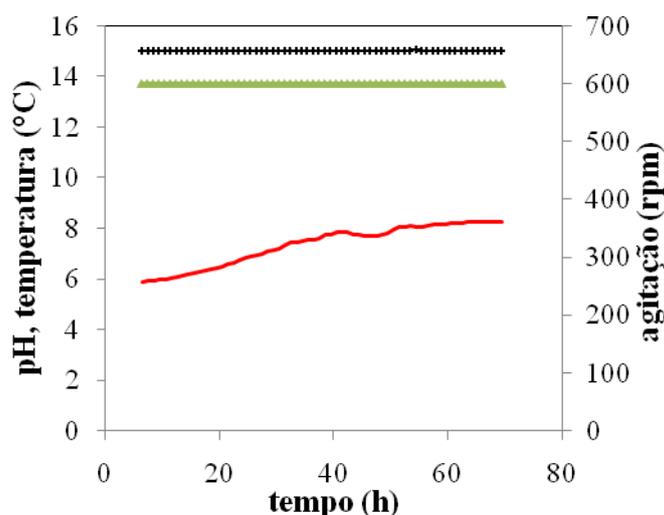


Figura 39 – Perfil das variáveis pH, temperatura (°C) e agitação (rpm) registradas pelo biorreator no ensaio 4. *Legenda:* — pH + temperatura ▲ agitação.

Este ensaio foi montado de forma que nitrogênio puro era injetado na entrada de ar do biorreator e era alimentado com pulsos de ar puro na entrada de O₂, conforme descrito em materiais e métodos (item 3.10.2). Isso foi feito para que OD do meio caísse rapidamente para 20%. No entanto, após 6 horas de cultivo, a mangueira de nitrogênio rompeu e esvaziou a fonte de nitrogênio. Por isso, a entrada de nitrogênio foi fechada e OD caiu continuamente durante as primeiras 15 horas de cultivo até, aproximadamente, 20%, quando pequenos pulsos de ar começaram a ser injetados no meio provocando oscilações, inicialmente sutis, de OD (Figura 40). Essas oscilações se tornaram maiores quando *L. muscorum* CRM 1648 começou a crescer exponencialmente. Quando os pulsos de ar não eram mais capazes de manter OD em torno de 20% e este começou a cair abaixo desse valor, a entrada de ar foi aberta (aeração do sistema igual a 1 LpM a partir de 43 horas de cultivo) e o sistema foi alimentado com ar puro (nessa etapa, o ar puro foi ligado na entrada de ar e O₂ puro na entrada de O₂). No intervalo de tempo de

43-53 horas de cultivo o sistema foi alimentado com pulsos de O_2 puro para tentar manter $OD = 20\%$ e sustentar o crescimento das células, que ainda estavam em fase exponencial (Figuras 41 e 42). O sistema deixou de ser alimentado com O_2 puro depois de 53 horas, pois as células pararam de crescer a partir desse ponto, já que nesse momento as células passaram a respirar menos, de forma que havia menor necessidade de OD no meio. Embora OD tenha oscilado, o valor médio dessa variável ao longo do cultivo foi de $25,1\%$ (Figura40).

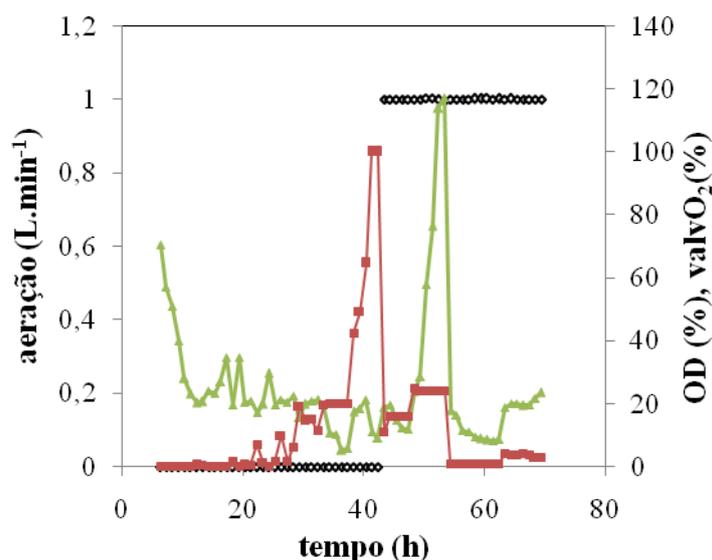


Figura 40 – Perfil das variáveis aeração e oxigênio dissolvido (OD) no Ensaio 4 em biorreator. O valor médio de OD foi de $25,1\%$.

Legenda: \diamond aeração \blacktriangle OD \blacksquare valvO₂(%)

No final do crescimento exponencial, com aproximadamente 52 horas de cultivo, foi obtida a maior produtividade em células e em produto ($0,51 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $97,5 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) deste ensaio, como mostra o Apêndice H. Nesse intervalo, foram produzidas, aproximadamente, 27 g.L^{-1} de células e 5116 U.L^{-1} de L-ASNase. Novamente foi observado que o consumo, crescimento e produção da enzima ocorreram concomitantemente, mas dessa vez, a prolina não foi consumida em sua totalidade, ao contrário da sacarose, que em 43 horas já não foi mais detectada no meio de cultivo (Figura 41). Este ensaio resultou em menor valor de velocidade específica máxima de crescimento, igual a $0,07 \text{ h}^{-1}$ (Figura 42).

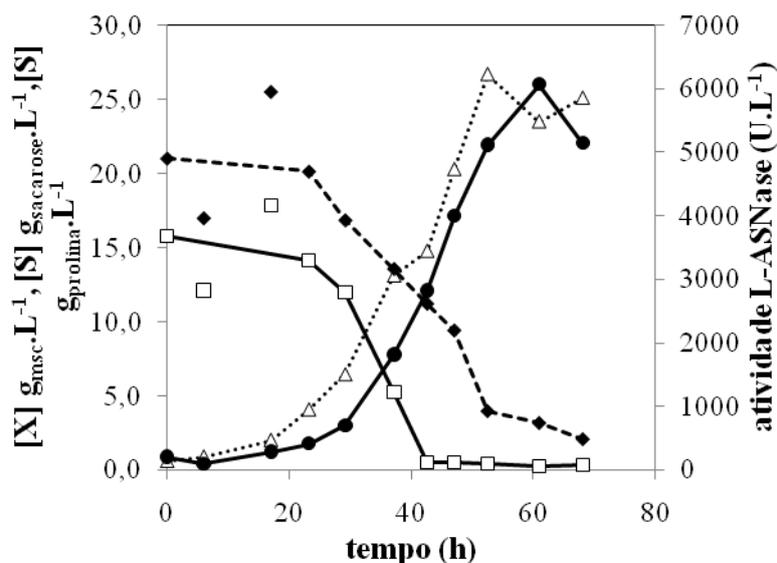


Figura 41 – Perfil de crescimento [X], consumo de sacarose e de prolina [S] e produção de L-ASNase no Ensaio 4 em biorreator. *Legenda:*

.....Δ..... X —□— Ssac -◆- Spro —●— atividade

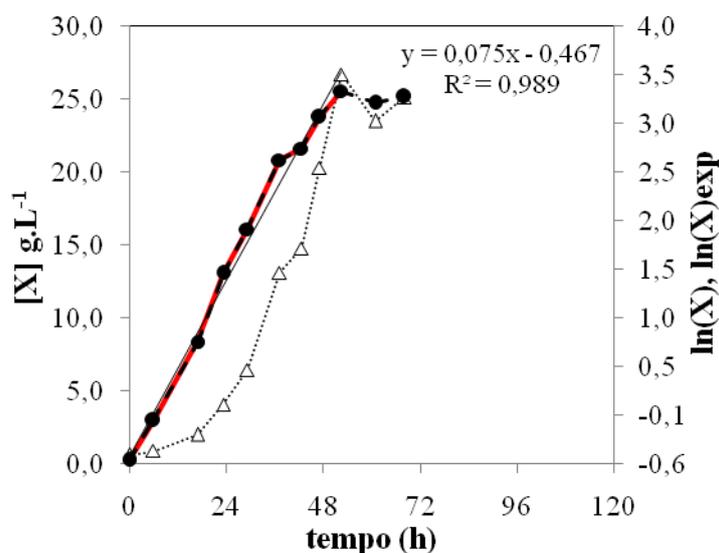


Figura 42 – Perfil das variáveis crescimento celular (massa seca celular, [X]), ln(X) e ln(X) na fase exponencial (ln(X)exp) no Ensaio 4. *Legenda:*

.....●..... ln(X) —●— ln(X)exp Δ..... [X] — Linear(ln(X)exp)

4.6.5. Avaliação comparativa dos ensaios em biorreator

Ao avaliar comparativamente a relação de OD no meio de cultivo dos quatro ensaios em biorreator (Figura 43) com o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 (Figura 44 A), foi observado crescimento mais rápido nos ensaios 2 e 3, nos quais OD

se manteve bem acima de 20%, quando comparado aos ensaios 1 e 4, nos quais OD se manteve em torno de 20% e até abaixo desse valor, chegando a 5% em alguns momentos. Além disso, a curva de crescimento no Ensaio 1 começa a se distanciar das curvas dos outros três ensaios após 40 horas de cultivo, quando OD nesse ensaio já está muito próximo a 10% (Apêndice C). Outra observação é que, no Ensaio 1 as células de *L. muscorum* CRM 1648 ficaram expostas por, aproximadamente, 12 horas a um valor de OD em torno de 5% (de 64 a 75 horas de cultivo, como mostra o Apêndice C), enquanto no Ensaio 4 OD se manteve em 20%, havendo oscilações nesse valor que fez OD cair em torno de 5% por 2 horas (entre 36 e 37 horas de cultivo), e outra oscilação logo em seguida (próximo a 50 horas), quando OD subiu acima de 100% (Figura 43, Apêndice I). Essa diferença, aparentemente, fez com que a levedura desacelerasse seu crescimento no Ensaio 1, mas continuasse a crescer progressivamente no ensaio 4. O valor final de X nos 4 ensaios foi semelhante e igual a, aproximadamente, 26 g. L^{-1} , no entanto observa-se uma grande diferença no comportamento das curvas nos Ensaios 2, 3 e 4 em relação ao Ensaio 1 (Figura 44 A). Dessa forma, OD demonstrou ser uma variável crítica por interferir na velocidade de crescimento da levedura, embora a produção de células no final do cultivo tenha sido igual nas quatro condições.

A análise da relação de OD com a síntese de produto mostrou que essa variável também foi crítica para a produção da enzima L-ASNase pela levedura *L. muscorum* CRM 1648. No Ensaio 3 a produção foi maior e mais rápida possivelmente porque nesse ensaio OD se manteve sempre elevado, controlado em 80%. Nos Ensaios 2 e 4, nos quais OD se manteve acima de 20%, a produção foi bastante similar até aproximadamente 50 horas de cultivo, quando no Ensaio 4 ocorre o pico de OD, que extrapola 100%. Nesse ponto, observa-se que a enzima continua sendo produzida no Ensaio 4, onde as células por alguns instantes (50 a 53 horas de cultivo, como mostra o Apêndice I) são expostas a concentrações elevadas de OD. Em contrapartida, no Ensaio 2, a partir desse ponto, OD cai progressivamente de, aproximadamente, 35% a 30% (Apêndice E). Esse comportamento sugere que não só valores elevados de OD são favoráveis para a produção de L-ASNase, como também valores abaixo de 35% já começam a prejudicar a sua produção.

A curva de produção de L-ASNase no Ensaio 1 não foi adicionada a Figura 44 B porque esse resultado teve influência de outro fator, o pH, que interferiu com a análise de OD nesse ensaio. Ainda assim, como existe correlação entre o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 e produção de L-ASNase por essa levedura, é possível supor que,

a produção da enzima seria mais baixa no Ensaio 1 em relação aos outros três ensaios, já que OD se mostrou limitante tanto para o crescimento de *L. muscorum* CRM 1648 como para a produção de L-ASNase por esse microrganismo.

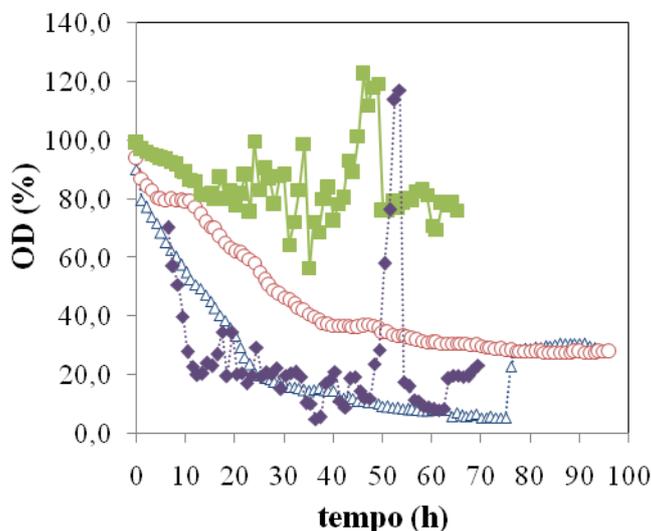


Figura 43 – Comparação do perfil de OD em cada ensaio. *Legenda:* Ensaio 1: triângulo azul vazio; Ensaio 2: círculo vermelho vazio; Ensaio 3: quadrado verde cheio; Ensaio 4: losango roxo cheio.

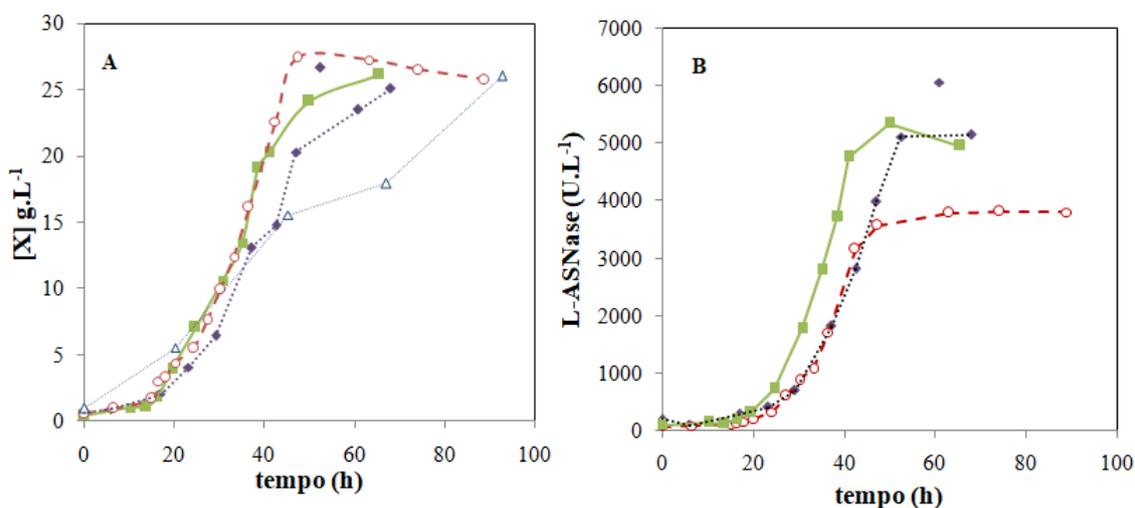


Figura 44 – Comparação do perfil de crescimento (A) e de produção de L-ASNase (B) nas condições de OD avaliadas em biorreator. *Legenda:* Ensaio 1: triângulo azul; Ensaio 2: círculo vermelho; Ensaio 3: quadrado verde; Ensaio 4: losango roxo.

A produtividade em células (P_x) foi maior entre 40 e 50 horas de cultivo (Figura 45) nos ensaios 2 ($0,58 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e 3 ($0,50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), que tiveram níveis mais elevados

de OD no meio, em relação aos ensaios 4 ($0,51 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e, principalmente, em relação ao ensaio 1 ($0,34 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

A produtividade em produto L-ASNase (Pp) também foi maior nesse mesmo intervalo de tempo, entre 40 e 50 horas, nos ensaios 2 ($75 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e 3 ($116 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), confirmando que existe correlação entre o crescimento de *L.muscorum* CRM 1648 e a produção da enzima. O valor de Pp do Ensaio 2 chega no seu máximo em aproximadamente 50 horas de cultivo quando começa a cair, o que possivelmente está relacionado a queda contínua de OD para valores abaixo de 35%. Pelo perfil de Px e Pp do Ensaio 2 é possível supor que a manutenção de valores mais elevados de OD é mais importante para a produção de L-ASNase do que para o crescimento da levedura, visto que a queda de OD abaixo de 35% teve um efeito mais negativo sobre Pp do que sobre Px. Como o controle e manutenção do pH prejudicou a produção de L-ASNase no Ensaio 1, o perfil de Pp desse ensaio não foi incluído na Figura 45.

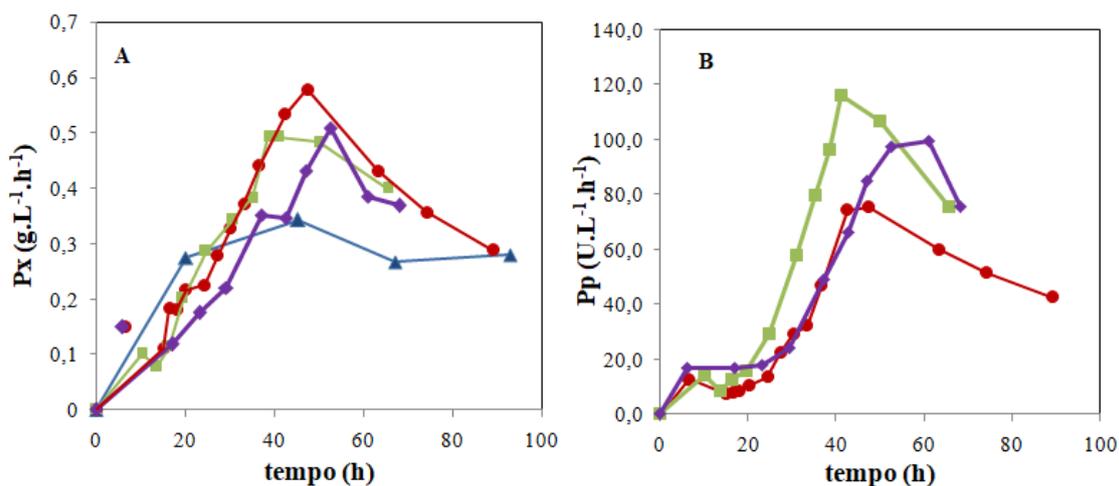


Figura 45 – Perfil comparativo da produtividade em células Px (A) e em produto L-ASNase Pp (B) nos Ensaios 1-4 em biorreator. *Legenda:* Ensaio 1: triângulo azul; Ensaio 2: círculo vermelho; Ensaio 3: quadrado verde; Ensaio 4: losango roxo.

Quanto ao perfil de consumo dos substratos (Figura 46), embora *L. muscorum* CRM 1648 tenha consumido sacarose mais rapidamente do que prolina em todas as condições de OD avaliadas, o consumo desses dois nutrientes foi mais rápido em condição de maior disponibilidade de oxigênio no meio, ou seja, nos ensaios 2, 3 e 4, respectivamente, mostrando que OD é importante por interferir na velocidade de consumo das fontes de carbono (e nitrogênio, no caso de prolina) e, conseqüentemente,

na velocidade de crescimento dessa levedura. Aparentemente OD influenciou mais no consumo de prolina, já que no Ensaio 4, no qual OD é mais baixo, o consumo de prolina é mais lento e ela nem chega a ser consumida completamente em 68 horas de cultivo como ocorre nos outros dois ensaios, nos quais OD é mantido elevado e acima de 20% ao longo de todo o cultivo.

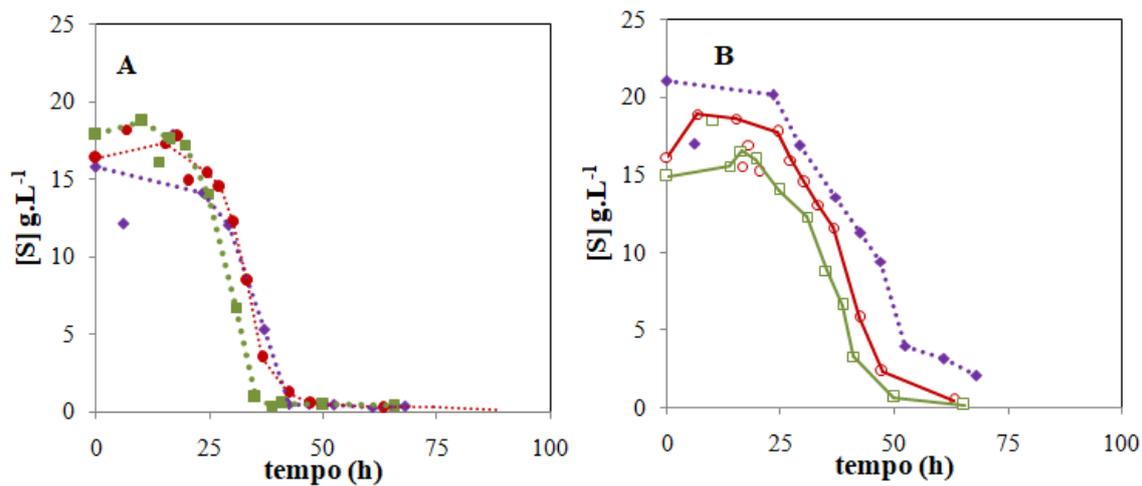


Figura 46 – Perfil comparativo do consumo dos substratos sacarose (A) e prolina (B) nos ensaios 2-4 em biorreator. *Legenda:* Ensaio 2: círculo vermelho; Ensaio 3: quadrado verde; Ensaio 4: losango roxo.

V. CONCLUSÕES

Este trabalho explorou o potencial de um ambiente extremo (Antártica marítima), ao investigar novas fontes microbianas produtoras da enzima L-ASNase que, dentre outras aplicações, possui papel chave no tratamento da leucemia linfoblástica aguda. Dos 150 isolados pesquisados, 6% produziu a enzima e desses quase 80% era da espécie *Leucosporidium muscorum*, sugerindo que não há muitos produtores de L-ASNase nesse ambiente (ou pelo menos não foi detectado), mas que os poucos que tem em sua maioria pertencem ao gênero *Leucosporidium*.

De acordo com os resultados apresentados, a linhagem *L. muscorum* CRM 1648 foi capaz de produzir uma L-ASNase sem atividade glutaminásica em maior quantidade do que os demais isolados, tornando-se alvo deste trabalho. Ao estudar as condições de cultivo e substratos (fontes de carbono e nitrogênio) para melhor crescimento e produção de L-ASNase foi possível conhecer um pouco das características dessa levedura, que cresceu melhor em meio CD com extrato de levedura e produziu mais L-ASNase com sacarose como fonte de carbono e prolina como fonte de nitrogênio. A preferência dessa linhagem por fontes pobres de nitrogênio como a prolina sugere a presença do fenômeno de Repressão Catabólica pelo Nitrogênio, que ocorre em outras espécies de levedura, como *Saccharomyces cerevisiae*.

O estudo da temperatura de cultivo indicou que a temperatura ótima de crescimento dessa levedura é 18°C, mas que a produção da enzima é mais favorecida quando o cultivo é realizado a 15°C. A condição de cultivo que mais favoreceu a produção de L-ASNase por *L. muscorum* CRM 1648 foi o cultivo a 15°C, pH inicial igual a 5,5 ou 6,5 com adição de pelo menos 25% de água do mar. A concentração inicial do inoculo (X_0), por outro lado, não influenciou significativamente nenhuma das respostas.

Os cultivos em biorreator com diferentes ofertas de oxigênio dissolvido às células mostraram que o crescimento da levedura e, em especial, a produção da enzima são favorecidos quando OD é mantido elevado, em torno de 80%.

Embora seja necessário purificar e caracterizar a enzima produzida por *L. muscorum* CRM 1648 este trabalho mostrou que esse microrganismo é produtor de uma L-ASNase livre de atividade glutaminásica, característica que pode ser interessante para o uso dessa enzima no tratamento de LLA.

Além disso, todo o trabalho referente ao melhoramento do meio e das condições de cultivo em biorreator resultou em valores aproximadamente 10 vezes mais elevados de produção de L-ASNase e produtividade (4582 U.L⁻¹ e 63,6 U.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente) quando comparado aos valores obtidos antes do delineamento experimental.

Essa etapa (*upstream*) é de suma importância para tornar o processo viável industrialmente, visto que a baixa produtividade pode tornar o processo muito caro e inviabilizá-lo, ainda que o produto seja de alto valor agregado, como é o caso de uma enzima de uso clínico. Somado a isso, não foram encontrados relatos de produção de L-ASNase por essa levedura e o que tem acerca do metabolismo e crescimento é muito escasso e superficial. As informações que resultam desse trabalho são, portanto, inéditas e importantes para o desenvolvimento de um processo produtivo que vise à produção de L-ASNase pela levedura de origem antártica *L. muscorum* CRM 1648.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora este trabalho tenha sido relevante no que concerne ao estudo da fase *upstream*, no melhoramento das condições de cultivo para a produção de L-ASNase, pela levedura adaptada ao frio *L. muscorum* CRM 1648, se faz necessário purificar a enzima, caracterizá-la e avaliá-la quanto ao potencial antileucêmico para poder afirmar seu uso no tratamento de LLA.

Esses estudos foram iniciados e parte dele resultou no artigo COSTA-SILVA et al., 2018b, no qual colaborei, mas encontramos algumas dificuldades na recuperação da enzima nas etapas finais de purificação. Foram avaliados alguns sistemas de duas fases aquosas, além de cromatografia de troca iônica e por exclusão molecular, até então sem sucesso. É preciso, portanto, avaliar outros sistemas de purificação e testar alguns inibidores de proteases para reduzir a degradação do produto ao longo do processo.

Outro ponto interessante seria explorar a produção de outros potenciais produtos de interesse industrial por *L. muscorum* CRM 1648, como por exemplo, lipídios mono e poliinsaturados, visto que há relatos na literatura que confirmam a produção desse tipo de lipídio por leveduras do gênero *Leucosporidium*, que pode ser interessante para a indústria de biodiesel e de alimentos.

VII. REFERÊNCIAS

- ABDELRAZEK, N.A. et al. Experimental and bioinformatics study for production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. **AMB Express**, v. 9, p. 39 -55, 2019.
- ABRAHAM, E.; SZABADOS, L.; ERDEL, L. Methods for determination of proline in plants. *Methods in Molecular Biology*, v. 639, p. 317-331, 2010.
- ABUCHOWSKI A. et al. Treatment of L5178Y tumor bearing BDF₁ mice with a non-immunogenic L-glutaminase asparaginase. **Cancer Treat Rep**, v. 63, p.1127–9, 1979.
- ABUD, A. K. de S. **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *zymomonas mobilis***. 2005. 243f. Tese (Doutorado) – Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- ANDRADE, A.M. **Influência da radiação solar na distribuição superficial da vegetação na Península Fildes, Antártica Marítima**. In: XVII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO. João Pessoa, PB: SBSR. 2015.
- ASHOK, A. et al. Microbes Producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of antarctic soil and moss. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1423-1432.
- ALAM, S. et al. Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system. *Bioresource Technology*, v. 269, p. 121-126, 2018.
- ALRUMMAN, S.A. et al. Production and anticancer activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3756-3770, 2019.
- ARIMA, K., et al. Production of extracellular L-asparaginases by microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.36, p.356-361, 1972.
- AVRAMIS, V.I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer Research**, vol. 32, p. 2423-2438, 2012.
- AVRAMIS, V.I.; PANOSYAN, E.H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. **Clinical pharmacokinetics**, v. 44, n. 4, p. 367-93, 2005.

- BADOEI-DALFARD, A. L-asparaginase production in the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. **Molecular Biology Research Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2016.
- BANSAL, S. et al. Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action. **FASEB Journal**, v. p. 1161-1171, 2012.
- BARUCH, M. et al. An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation. **Cell**, v.156, p. 97–108, 2014.
- BATISTA, A.S. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n.1, p.26-33, 2004.
- BUZZINI, P. et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 82, p. 217-241, 2012.
- CACHUMBA, J.J.M. et al. Extracellular L-asparaginase production in solid state fermentation by using sugarcane bagasse as support material. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2019. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1566152>.
- CARVALHO, J.C.M. et al. Tecnologia de Fermentações. In: VITOLO, M. **Biotechnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo, SP: Blucher, 2015. Cap.3. p.144-145.
- CARRASCO, M. et al. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. **BMC Microbiology**, v.16, p.21-29, 2016.
- CEDAR, H.; SCHWARTZ, J.H. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 96, n. 6, p. 2043-2048, 1968.
- CHAN, W.K. et al. The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **BLOOD**, v.123, n. 23, 2014.
- COOPER, S.L.; BROWN, P. A. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatr Clin North Am.**, v. 62, n. 1, p. 61–73, 2015.
- COSTA-SILVA, T.A. et al. Optimization of culture conditions and bench scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95-104, 2018a.

- COSTA-SILVA, T.A. et al. Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 8, p. 707-717, 2018b.
- COVINI, D. et al. Expanding Targets for a Metabolic Therapy of Cancer: L-Asparaginase. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 7, p. 4-13, 2012.
- D'AMICO, S. et al. Molecular basis of cold adaptation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 357, p. 917–925, 2002.
- DARVISHI, F.; FARAJI, N.; SHAMSI, F. Production and structural modeling of a novel asparaginase in *Yarrowia lipolytica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 955-961, 2019.
- DEMING, J.W. Extremophiles: Cold environments. In: Schaechter, M. (ed). **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 483-494.
- DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. **The Scientific World Journal**, 2014. doi: 10.1155/2014/895167.
- di MENNA, M.E. Yeasts from Antarctica. **Journal of General Microbiology**, v.23, p. 295–300, 1960.
- DIAS, F.F.G.; SATO, H.H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 2016.
- DORIYA, K.; JOSE, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D.S. Solid state fermentation Vs submerged fermentation for the production of L-asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 115-135, 2016.
- DRAINAS, C. et al. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 493-501, 1977.
- DUARTE, A.W.F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeast isolates from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-1035, 2013.
- DUARTE, A.W.F. et al. Yeasts from macroalgae and lichens that inhabit the South Shetland Islands, Antarctica. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 5, p. 874-885, 2016.
- DUARTE, A.W.F. et al. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 600-619, 2018.

- DUNLOP, P.C. et al. Nitrogen Catabolite Repression of Asparaginase II in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 142, n. 1, p. 422-426, 1980.
- DUTTA, S.; GHOSH, S.; PRAMANIK, S. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: production and some physicochemical properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 425-431, 2015.
- EBRAHIMINEZHAD, A. et al. *Chlorella vulgaris* - a novel microalgal source for L-asparaginase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 214-217, 2014.
- EGLER, R.A., AHUJA, S.P., MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62-71, 2016.
- EINSFELDT, K. **Desenvolvimento de uma nova L-asparaginase recombinante de *Zymomonas mobilis* para aplicação como biofármaco**. 2014. 154f. Tese (Doutorado) – Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- EL BAKY, H.H.A; EL BAROTY, G.S. Optimization of growth conditions for purification and production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. doi: 10.1155/2016/1785938.
- 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. 387-393, 2004.
- EBRAHIMINEZHAD, A. et al. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 214-217, 2014.
- EL-GHONEMY, D.H.E. Microbial Amidases and their Industrial Applications: A Review. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v.4, n.1, p.173-178, 2014.
- EL-NAGGAR, N.E.A. Extracellular production of the oncolytic enzyme, L-asparaginase, by newly isolated *Streptomyces* sp. strain NEAE-95 as potential microbial cell factories: optimization of culture conditions using response surface methodology. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, p. 162-178, 2015.
- EL-NAGGAR, N.E.A. et al. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces brolosae* NEAE-115. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, p. 51-66, 2018.

- ELSHAFEI, A.M.; EL-GHONEMY, D.H. Screening and media optimization for enhancing L-asparaginase production, an anticancer agent, from different filamentous fungi in solid state fermentation. **British Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2015.
- ERVA, R.R. et al. Optimization of L-asparaginase production from novel *Enterobacter* sp., by submerged fermentation using response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 219-228, 2017.
- ERVA, R.R.; VENKATESWARULU, T.C.; PAGALA, B. Multi level statistical optimization of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* VUVD001. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.
- FANTÁSTICO, Rede Globo. *Ministério da Saúde anuncia que não compra mais leuginase da China*. Disponível em: <<http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2017/07/ministerio-da-saude-anuncia-que-nao-compra-mais-leuginase-da-china.html>>, acesso em 25/05/2017.
- FARAG, A.M.; HASSAN, S.W.; BELTAGY, E.A.; EL-SHENAWY, M.A. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 295–302, 2015.
- FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature**. v.1, p.200-208, 2003.
- FELLER, G. Psychrophilic Enzymes: from folding to function and biotechnology. **Scientifica**, v. 2013, p.1-28, 2013.
- FENG, Y. et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 4, p. 1509-1520, 2017.
- FERRARA, M. A. et al. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1457-1463, 2006.
- FERRARA M.N., SEVERINO, N.M.B., VALENTE, R.H., PERALES, J., BON, E.P.S. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 71-76, 2010.
- FERREIRA, E.M.S. et al. Taxonomy and richness of yeasts associated with angiosperms, bryophytes, and meltwater biofilms collected in the Antarctic Peninsula. **Extremophiles**, v. 23, p. 151-159, 2019.

- FILIPPUCCI, S. et al. Study of *Holtermanniella wattica*, *Leucosporidium creatinivorum*, *Naganishia adeliensis*, *Solicoccozyma aerea*, and *Solicoccozyma terricola* for their lipogenic aptitude from different carbon sources. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 259-273, 2016.
- FODA, M.S; ZEDAN, H.H.; HASHEM, S.A. Formation and properties of L-glutaminase and L-asparaginase activities in *Pichia polymorpha*. **Acta Microbiologica Polonica**, v.29, p.343-352, 1980.
- FUKUDA, I.M. et al. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 1-16, 2018.
- de GARCÍA, V. et al. Sex in the cold: taxonomic reorganization of psychrotolerant yeasts in the order *Leucosporidiales*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. 1-12, 2015.
- de GARCIA, V.; van BROOK, M.R. Cold-Adapted Yeasts from Patagonia Argentina. **International Journal of Biodiversity**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2016.
- GECKIL, H. et al. Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 203–8, 2006.
- GIRÃO, L.F.C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **BMC Proceedings**, v. 8 (Suppl 4), p78-79. 2014.
- GIRÃO, L.F.C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* asparaginase II, a potential antileukemic drug: Purification and characterization of the enzyme expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 118-125, 2016.
- GHOLAMIAN, S. et al. Optimization of culture media for L-Asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus* sp. GH5¹, **Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 856- 863, 2013.
- GONÇALVES, A.B. et al. Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase:from screening to medium development. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 387-394, 2016.
- GUTIÉRREZ-ALONSO, P. et al. Biochemical characterization of a β -fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. **FEMS Yeast Res**, v. 9, p. 768–773, 2009.
- HAMERSCHLAK, N. Bone marrow transplantation for acute leukemias in Brazil. Where are we going? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 2, p. 97, 2010.

- HAMID, B. et al. Psychrophilic yeasts and their biotechnological applications - A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 22, p. 2188-2197, 2014.
- HEINEMANN, B.; HOWARD, A.J. Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology**, v. 18, p. 550-554, 1969.
- HOFMAN-BANG, J. Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biotechnology**, v. 12, 1999.
- HUERTA-SAQUERO, A. et al. Rhizobium etli asparaginase II: an alternative for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. **Bioengineered**, v. 4, n. 1, p. 30-36, 2013.
- HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. **Maintenance Cultures for Biotechnology and Industry**. London: Academic Press, 1996.
- HYMAVATHI, M. et al. Impact of Carbon and Nitrogen Sources on L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574): Application of Saturated Plackett-Burman Design. **Chemical and Biochemical Engineering**, v.4, p. 473-480, 2010.
- IMADA, A. et al. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v.76, p. 85-99, 1973.
- INFORSATO, F.J. **Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas**. 2017. 138f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, SP.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
- JAFFE, N. et al. L-Asparaginase in the Treatment of Neoplastic Diseases. **Cancer Research**, v. 31, p. 942-949, 1971.
- KEEGAN, P. Erwinase (Erwinia L-asparaginase) is indicated as a component of a multi agent chemotherapeutic regimen for the treatment of patients with Acute lymphoblastic leukemia (ALL) who have developed hypersensitivity to *E. coli* derived asparaginase. **Division Director Summary Review**, 22p, 2011.

- KALYANASUNDARAM, I. et al. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 663-677, 2015.
- KHAMNA, S., YOKOTA, A., LUMYONG, S. L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. **IJIB**, v. 6, n. 1, p. 22-26, 2009.
- KIL, J.O; KIM, G.N.; PARK, I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v..59, p.749-750. 1995.
- KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures - A Manual of Laboratory Methods**. 2nd ed., London: Academic Press, 1991.
- KOTZIA, G.A.; LABROU N.E. L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. **Journal of Biotechnology**, v.127, p.657-69, 2007.
- KRISHNAPURA, P. R., BELUR, P.D., SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L- asparaginases. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1-18, 2015.
- KRISHNAPURA, P. R., BELUR, P.D. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some *Zingiberaceae* plants for L-asparaginase production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 281-287, 2016.
- KUMAR, S. et al. Batch and fed-batch bioreactor studies for the enhanced production of glutaminase-free Lasparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 74-80, 2017.
- KUMAR S., VENKATA D.V., PAKSHIRAJAN K. Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Proc Biochem**, v. 45, p.223-9, 2010.
- KUMAR, D.S.; SOBHA, K. L-asparaginase from microbes: a comprehensive review. **Advances in Bioresearch**, v. 3, n. 4, 2012.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- LAICH, F.; CHÁVEZ, R.; VACA, I. *Leucosporidium escuderoi* f.a., sp. nov., a basidiomycetous yeast associated with an Antarctic marine sponge. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 593-601, 2014.
- LAPMAK, K. et al. L-Asparaginase production by *Bipolaris* sp. BR438 isolated from Brown Rice in Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 37, n. 1, p. 160-164, 2010.

- LARIO, L.D. et al. Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **Fungal Biology**, v. 119, p.1129-1136, 2015.
- LIU, F.S; ZAJIC, J.E. L-Asparaginase synthesis by *Erwinia aroideae*, **Applied Microbiology**, v. 23, p. 667–668, 1971.
- LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1-18, 2017.
- MAGAZANIK, B.; KAISER, C.A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, p. 1-18, 2002.
- MAHAJAN, R. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms, **Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters**, v. 341, p. 122-126, 2013.
- MARGESIN, R. et al. Cold adapted Microorganisms: Adaptation strategies and biotechnological potential. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, p.871-885,2003.
- MARINI, B.L. et al. Catalyzing improvements in ALL therapy with asparaginase. **Blood Reviews**, v. 31, p. 328-338, 2017.
- MARTORELL, M.M. et al. Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Jornal of Basic Microbiology*, v. 57, p. 504-516, 2017.
- MAŠÍNOVÁ, T. et al. *Libkindia masarykiana* gen. et sp. nov., *Yurkovia mendeliana* gen. et sp. nov. and *Leucosporidium krtinense* f.a. sp. nov., isolated from temperate forest soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 902-908, 2017.
- MEDEIROS, V.R.; MESTDAGH, F.; de MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**. v, 133, n. 4, p. 1138-1154, 2012.
- MEENA, B. et al. Novel glutaminase free L-asparaginase from *Nocardiopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 2, p. 373-388, 2015a.

- MEENA, B. et al. L-Asparaginase from *Streptomyces griseus* NIOT-VKMA29: optimization of process variables using factorial designs and molecular characterization of L-asparaginase gene. **Scientific Reports**, v. 5, 2015b.
- MENEGAT, F.B. et al. Optimization of asparaginase production from *Zymomonas mobilis* by continuous fermentation. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 2, p. 163-168, 2016.
- MINISTÉRIO PÚBLICO FEDERAL. PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM SÃO PAULO. Recomendação nº 10/2013, de 5 de Abril de 2013, São Paulo.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, *Esclarecimentos L-asparaginase*. Disponível em:<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf>, acesso em 01/01/2019.
- MOGUEL, I.S. **Production of L-asparaginase of pharmaceutical interest from yeasts isolated from the Antarctic continent**. 2018. 114f. Tese (Doutorado) – Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- MOMENI, V.; ALEMZADEH, I.; VOSOUGHI, M. Enhancement of *L-asparaginase* production by *Candida utilis* in a 13 L fermenter and its purification. **International Journal of Engineering**, v. 28, n. 8, p. 1134-1139, 2015.
- MORITA, R.Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 39, n. 2, p. 144-167, 1975.
- MOSTAFA, E.E.; EL-DEEN, A.M.N.; AWAD, H.M.; MAWAD, M.A. Partial characterization of L-asparaginase-producing by *Streptomyces* sp. SAH1_CWMSG isolated from Rhizosphere soil in Egypt. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 1290-1307, 2016.
- NARAGANI, K.; MUVVA, V. Optimum conditions for L-asparaginase production by *Rhodococcus erythropolis* VLK-12 isolated from marine habitats. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 4, n. 10, p. 1-5, 2016.
- NAKAGAWA, T. et al. Cold-activepectinolytic activity of psychrophilic basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v 94, p.175-177, 2002.
- NARTA, U.K.;KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 61, p. 208–221, 2007.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre:Artmed, 2014.

- OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. Estados Unidos: Science Publishers, 2007.
- OFFMAN, M.N. et al. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. **Blood Journal**, v. 117, p. 1614-1621, 2011.
- OLIVEIRA, E. M. et al. L-Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae* Activity profile during growth using an ure2 mutant P40-3C and a P40-3C+*URE2*p strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n.1, p.311-316, 1999.
- PASUT, G.; VERONESE, F. M. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 461-472, 2012.
- PATHAN, A.A.K. et al. Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of MidreLove´nbreen Glacier, Arctic and bioprospecting for enzymesand fatty acids. **Current Microbiology**, v. 60, p. 307-314, 2010.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, p. 238-249, 2011.
- POKROVSKAYA, M.V. et al. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. **Protein Expression and Purification**, v. 82, P. 150-154, 2012.
- PRITSA, A.A.; KYRIAKIDIS, D.A. L-asparaginase of *Thermusthermophilus*: purification, properties and identification of essentialamino acids for its catalytic activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 216, p. 93–101, 2001.
- PRASAD TALLURI, V.S.S.L.; LANKA, S.S.; RAJAGOPAL SALADI, V. Statistical Optimization of Process Parameters by Central Composite Design (CCD) for an enhanced Production of L-asparaginase by *Myroides gitamensis*BSH-3, a novel species. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 59-66, 2019.
- QESHMI, F.I. et al. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, p. 99-112, 2018.
- RAETZ, E.A., SALZER, W.L. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. **Medical Progress**, v. 32, n. 7, p. 554-563, 2010.

- RAMAKRISHNAN, M.S.; JOSEPH, R. Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p.316-325, 1996.
- RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Co-oncology**, v.25, p. S1-S9, 2013.
- da ROCHA, W.R.V et al. Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, 2019. doi: 10.1111/jam.14221.
- ROTH, J.E.S.N. et al. Recombinant *Erwinia carotovora* L-asparaginase II production in *Escherichia coli* fed-batch cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 245-256, 2013.
- RUBIO, M.C.; RUNCO R.; NAVARRO A.R. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. **Phytochemistry**, v.61, p. 605–609, 2002.
- RUSSELL, N.J. Antarctic micro-organisms: coming in from the cold. **Culture**, Oxoid, v. 27, n. 2, 2006.
- SAHAY, S. et al. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p.115-121, 2013.
- SAMPAIO, JP. Et al. Taxonomic studies in the Microbotryomycetidae: *Leucosporidium golubevii* sp. nov., *Leucosporidiella* gen. nov. and the new orders Leucosporidiales and Sporidiobolales. **Mycological Progress**, v. 2, p. 53-68, 2003.
- SANCHEZ, S.; DEMAINE, A.L. Metabolic regulation of fermentation process. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895–906, 2002.
- SANTOS, J.A. **Potencial biotecnológico de fungos marinhos e antárticos da central de recursos microbianos da UNESP (CRM-UNESP)**. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.
- SARQUIS, M.I.M. et al. Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n.5, p. 489-492, 2004.
- SAXENA, R.K.; SINHA, U. L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current Science**, v. 50, p. 218-219, 1981.

- SAXENA, A.; UPADHYAY, R.; KANGO, N. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 786-793, 2015.
- SCHIMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP:Blucher, 2001.
- SHAKAMBARI, G. et al. Agro waste utilization for cost-effective production of L-Asparaginase by *Pseudomonas plecoglossicida* RS1 with anticancer and acrylamide mitigation potential. **ACS Omega**, v. 2, p. 8108-8117, 2017.
- SHARAFI, Z. et al. Screening for Type II L-Asparaginases: Lessons from the Genus *Halomonas*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.16, n. 4, p. 1565-1573, 2017.
- SHIVAJI, S.; PRASAD, G.S. **Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications**. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G (ed(s)). **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Amsterdam: Springer, 2009, p 3-18.
- SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1-10, 2015.
- SILVA, L.F. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p.162-174, 2018.
- SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p.76-85, 1985.
- STELIAROVA-FOUCHER, E. et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. **Lancet Oncology**, v. 18, p. 719-731, 2017.
- STEPANYAN, K.R.; DAVTYAN, M.A. Some questions of thermostability of L-asparaginase of yeast *Candida guilliermondii*. **BiologicheskiiZhurnal Armenii**, v.41, p.599-603, 1988.
- SUKUMARAN, C.P.; SINGH, D.V.; MAHADEVAN, P.R. Synthesis of L-asparaginase by *Serratia marcescens* (Nima). **Journal of Biosciences**, v. 3, p. 263–269, 1979.
- TEIXEIRA, A.I. et al. Development of a method to quantify sucrose in soybean grains. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1134-1136, 2012.

- TSUJI, M. et al. Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. **FEMS Microbiology Letters**, v. 346, p. 121-130, 2013.
- VALA, A.K. et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41-46, 2018.
- VAZ, A.B.M. et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 937-947, 2011.
- VIMAL, A.; KUMAR, A. Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 1, p. 40 – 61, 2017a.
- VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and *in silico* validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9 – 17, 2017b.
- WANG, Q. M. et al. Living strategy of cold-adapted fungi with the reference to several representative species. **Mycology**, v. 8, n. 3, p. 178-188, 2017.
- WANG, Q. M. et al. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within *Puccinio mycotina*. **Studies in Mycology**, v. 81, p. 149-189, 2015.
- WADE, H.E.; ROBINSON, H.K.; PHILLIPS, B.W. Asparaginase and Glutaminase Activities of Bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.69, n. 2, p. 299-311, 1971.
- WENTZEL, L.C.P. et al. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) soils and marine sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 12-24, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Dados comparativos sobre publicações envolvendo a produção de L-ASNase por bactérias, fungos filamentosos, leveduras e microalgas nos últimos 5 anos de acordo com dados do PUBMED e Google Acadêmico (acesso: março de 2019).

espécie	origem	condições de cultivo								indicador de produção de L-ASNase	análise da atividade	análise estatística	referência	país
		cultivo	FC	FN	pH	T°C	agitação (rpm)	aeração (vvm)	tempo (dias)					
<i>Bacillus licheniformis</i>	solo	ferment. submersa	glicose	cloreto de amônio	7,4	39,6	200	sem aeração	1	8,0 U.mL ⁻¹ h ⁻¹	Nessler	CCD	ABDELRAZEK et al. (2019)	Egito
<i>Bacillus licheniformis</i>	costa do Mar Vermelho	ferment. submersa	glicose	sulfato de amônio	6,5	37	250	sem aeração	3	11,74 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada	ALRUMMAN et al. (2019)	Arábia Saudita
<i>Myroides gitamensis</i>	solo de matadouro	fermentação em estado sólido	farelo de trigo	extrato de levedura	7,5	37	120	sem aeração	2	296,0 U	Nessler	univariada; CCD	PRASAD TALLURI et al. (2019)	Índia
<i>Bacillus subtilis</i>	coleção de cultura	ferment. submersa	glicose	asparagina	8,3	35	200	sem aeração	6	2,9 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada; ANNs	ERVA et al. (2018)	Índia
<i>Streptomyces brollosae</i>	solo	ferment. submersa	glicose	asparagina	7	30	150	sem aeração	7	795,0 U	Nessler	ausente	EL-NAGGAR et al. (2018)	Egito
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	ambiente marinho	ferment. submersa	cascas de cebola e alho	asparagina	ND	37	estático	sem aeração	1	1,1 U.mL ⁻¹	Nessler	CCD	SHAKAMBARI et al. (2017)	Índia
<i>Halomonas</i> sp.	ambiente halofílico	ferment. submersa	glicose	asparagina	7	30	180	sem aeração	1	6,2 U.mL ⁻¹	Nessler	CCD	SHARAFI et al. (2017)	Irã
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	coleção de cultura	ferment. submersa (descontínuo e desc. alimentado)	glicose	asparagina e ext. levedura	8,5	30	160-600	1,5-2,0	0,5	40,0 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	KUMAR et al. (2017)	Índia
<i>Enterobacter</i> sp.	coleção de cultura	ferment. submersa	citrate de sódio	cloreto de amônio	6	33	200	sem aeração	1,5	18,35 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada; CCD	ERVA et al. (2017)	Índia

espécie	origem	condições de cultivo								indicador de produção de L-ASNase	análise de L-ASNase	análise estatística	referência	país
		cultivo	FC	FN	pH	T°C	agitação (rpm)	aeração (vvm)	tempo (dias)					
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	fontes termais	fermentação submersa	glicose	asparagina	ND	30	160	sem aeração	2	240,0 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	BADOEI-DALFARD (2016)	Irã
<i>Bacillus subtilis</i>	coleção de cultura	fermentação submersa (descontínuo e desc. alimentado)	sacarose	asparagina	ND	37	600-1000	1,8	2	407,6 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	FENG et al. (2016)	China
<i>Zymomonas mobilis</i>	coleção de cultura	fermentação submersa (contínuo)	sacarose	extrato de levedura e asparagina	ND	30	ND	ND	1	117,4 U.L ⁻¹	Nessler	fatorial completo	MENEGAT et al. (2016)	Brasil
<i>Streptomyces ghanensis</i>	solo	fermentação submersa	glicerol	sulfato de amônio	7	28	200	sem aeração	5	106,9 U	Nessler	univariada	MOSTAFA et al. (2016)	Egito
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	sedimento marinho	fermentação submersa	glicerol	extrato de levedura	7	30	ND	sem aeração	3	10,9 U	Nessler	univariada	NARAGANI; MUVVA (2016)	Índia
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	solo	fermentação submersa	amido	asparagina	7,2	28	150	sem aeração	2	19,2 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	SAXENA et al. (2015)	Índia
<i>Streptomyces parvus</i>	solo	fermentação submersa	glicose, amido	asparagina, extrato de levedura	7	30	200	sem aeração	8	92,4 U.mL ⁻¹	Nessler	Plackett-Burman; Box-Behnken	EL-NAGGAR et al. (2015)	Egito
<i>Streptomyces olivaceus</i>	solo	fermentação submersa	glicose	asparagina	6,8	35	200	sem aeração	3	68,6 U.mL ⁻¹	Nessler	Plackett-Burman; CCD	EL-NAGGAR et al. (2015)	Egito
<i>Streptomyces griseus</i>	sedimento marinho	fermentação submersa	amido	extrato de levedura	8	35	estático	sem aeração	6	57,8 U.mL ⁻¹	Nessler	Box-Behnken	MEENA et al. (2015b)	Índia
<i>Nocardiopsis alba</i>	sedimento marinho	fermentação submersa	maltose	extrato de levedura	8	30	125	sem aeração	6	18,5 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada	MEENA et al. (2015a)	Índia
<i>Streptomyces ginsengisoli</i>	sedimento de rios	fermentação submersa	glicose	peptona	8	30	120	sem aeração	5	3,23 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada	DESHPANDE et al. (2014)	Índia

espécie	origem	condições de cultivo								indicador de produção de L-ASNase	análise de L-ASNase	análise estatística	referência	país
		cultivo	FC	FN	pH	T°C	agitação (rpm)	aeração (vvm)	tempo (dias)					
<i>Aspergillus terreus</i>	coleção de cultura	fermentação em estado sólido	bagaço de cana	asparagina e glutamina	ND	30	ND	0,7	4	121,0 U.L ⁻¹	L-aspartil-β-hidroxâmico	fatorial completo	CACHUMBA et al. (2019)	Brasil
<i>Aspergillus terreus</i>	Solo de Caatinga	fermentação submersa (descontínuo e desc. alimentado)	glicose	prolina	5,7 - 7	29	***tipo pneumática	0,5	5	75,0 U	L-aspartil-β-hidroxâmico	fatorial completo; fracionado	da ROCHA et al. (2019)	Brasil*
<i>Trichosporon asahii</i>	musgo do continente Antartico	fermentação submersa	glicose	asparagina	7	30	180	sem aeração	2,5	20,6 U.mL ⁻¹	Nessler	Taguchi	ASHOK et al. (2019)	Índia
<i>Aspergillus terreus</i>	solo brasileiro	fermentação submersa (descontínuo)	glicose	prolina	9,5	35	***tipo pneumática	0,5	5	13,8 U.g ⁻¹	L-aspartil-β-hidroxâmico	fatorial completo; fracionado	COSTA-SILVA et al (2018)	Brasil*
<i>Penicillium</i> sp. e <i>Tillandsia catimbauensis</i>	planta típica da caatinga	fermentação submersa	glicose	asparagina	6	30	120	sem aeração	4	1,3 U.g ⁻¹	L-aspartil-β-hidroxâmico	fatorial completo	SILVA et al. (2018)	Brasil*
<i>Aspergillus niger</i>	ambiente marinho	fermentação submersa (descontínuo)	resíduo do óleo de amendoim	asparagina	4	28	150	0,4	7	16,0 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	VALA et al. (2018)	Índia
<i>Aspergillus oryzae</i>	coleção de cultura	fermentação submersa	glicose	prolina	8	30	150	sem aeração	3	67.5 U mL ⁻¹	Nessler	Plackett-Burman; CCRD	DIAS; SATO (2016)	Brasil
<i>Penicillium</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp.	coleção de cultura	fermentação submersa (descontínuo)	glicerol	asparagina	5,5	30	estático	sem aeração	3	8,3 e 11,4 U.mL ⁻¹	Nessler	ausente	GONÇALVES et al. (2016)	Brasil
<i>Trichoderma viride</i>	solo	fermentação em estado sólido	glicose	caseína	5	28	ND	sem aeração	4	113, 4 U.g ⁻¹	Nessler	univariada	ELSHAFEI; EL-GHONEMY (2015)	Egito

espécie	origem	condições de cultivo								indicador de produção de L-ASNase	análise de L-ASNase	análise estatística	referência	país
		cultivo	FC	FN	pH	T°C	agitação (rpm)	aeração (vvm)	tempo (dias)					
<i>Aspergillus terreus</i>	costa do Mar Vermelho	fermentação submersa	glicose	asparagina	6	35	estático	sem aeração	5	*33,9 U.mg ⁻¹	Nessler	Plackett-Burman	FARAG et al. (2015)	Egito
<i>Talaromyces pinophilus</i>	rizoma	fermentação submersa	amido	extrato de levedura	6,5	25	120	sem aeração	5	109,0 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada	KRISHNAPURA; BELUR (2016)	Índia
<i>Aspergillus fumigatus</i>	solo	fermentação em estado sólido	farelo de trigo	asparagina	5	37	estático	sem aeração	4	*321,7 U.mg ⁻¹	Nessler	ausente	DUTTA et al. (2015)	Índia
<i>Aspergillus</i> sp.	folhas da planta <i>Sueada monoica</i>	fermentação submersa	glicose; farelo de trigo	sulfato de amônio	7	30	estático	sem aeração	5	35,3 U.mL ⁻¹	Nessler	univariada	KALYANASUNDARAM et al. (2015)	Índia
<i>Yarrowia lipolytica</i>	coleção de cultura	fermentação submersa (descontínuo)	glicose	asparagina	7	29	500	1	1	210,0 U.mL ⁻¹	Nessler	CCD	DARVISHI et al. (2019)	Irã
<i>Candida utilis</i>	coleção de cultura	fermentação submersa (descontínuo)	melado de beterraba	extrato de levedura	7	30	300	1,25	1	245,6 U.mL ⁻¹	L-aspartil-β-hidroxiâmico	ausente	MOMENI et al. (2015)	Irã
<i>Spirulina maxima</i>	ND	aquário de vidro	CO ₂	nitrito de sódio	8,5	37	ND	**20	18	51,3 U.L ⁻¹	Nessler	univariada	El BAKY; El BAROTY (2016)	Egito
<i>Chlorella vulgaris</i>	amostras de água e solo	fermentação submersa	CO ₂	asparagina	ND	25	ND	ND	14	10 U.g ⁻¹	Nessler	ausente	EBRAHIMINEZHAD et al. (2014)	Irã

*U. mg⁻¹ refere-se a unidade de atividade em relação a quantidade de proteínas totais em miligrama.

** unidade: L.h⁻¹

***Agitação tipo pneumática é feita em biorreator do tipo “coluna de bolhas”, no qual a transferência de oxigênio e agitação ocorre devido a bolhas de pequeno diâmetro que saem de uma serpentina localizada no fundo do reator (SCHIMIDELL et al., 2001).

Ausente: não foi realizado.

O termo “sem aeração” significa que não foi injetado ar ou qualquer outro gás no meio de cultivo.

ND: parâmetro não determinado ou não encontrado.

ANNs: do inglês “artificial neural networks”; CCD: “Central Composite Design”; CCRD: “Central Composite Rotational Design”.

APÊNDICE B. Dados do cultivo de *L.muscorum* CRM 1648 em biorreator no Ensaio 1 (sem controle de OD, OD < 20%).

Amostras	tempo (h)	crescimento		pH	L-ASNase (U.L ⁻¹)	L-ASNase total (U)	Px (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Pp (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)
		DO600	[X] (g.L ⁻¹)					
A1	0,00	1,84	1	5,5	ND	ND	0	0
A2	20,21	5,77	5,54	5,67	71,18	71,90	0,27	3,52
A3	45,30	25,45	15,54	5,52	77,37	78,95	0,34	1,71
A4	67,05	38,25	17,92	5,54	58,80	60,62	0,27	0,88
A5	92,86	49,45	26,02	5,45	57,26	59,64	0,28	0,62

DO600: densidade óptica, $\lambda=600$ nm. [X]: massa seca celular. Px: produtividade em célula. Pp: produtividade em produto (L-ASNase).
ND: não determinado.

APÊNDICE C. Dados *online* do Biorreator BIOSTAT[®] B-MO no Ensaio 1 (sem controle de OD, OD < 20%). Os valores de OUR, CER e RQ foram calculados com base em dados do fluxo de entrada e frações molares dos gases na saída de ar fornecidos pelo equipamento.

Data/hora	tempo (h)	temperat (°C)	agitação (rpm)	pH (pH)	OD (%sat)	aeração (LpM)	HCl 20% (ml)	NaOH 20% (ml)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
26/02/2018 19:18	0	15,0	600	5,43	90,08	1,0	2	4	0,513	-0,311	-0,606
26/02/2018 20:18	1	15,0	600	5,54	79,50	1,0	2	4	1,350	0,234	0,173
26/02/2018 21:18	2	15,0	600	5,56	77,16	1,0	2	4	1,355	0,220	0,162
26/02/2018 22:18	3	15,0	600	5,59	73,90	1,0	2	4	1,362	0,203	0,149
26/02/2018 23:18	4	15,0	600	5,63	71,79	1,0	2	4	1,368	0,186	0,136
27/02/2018 00:18	5	15,0	600	5,63	68,46	1,0	2	4	1,364	0,209	0,153
27/02/2018 01:18	6	15,0	600	5,63	65,09	1,0	2	4	1,729	0,329	0,190

Data/hora	tempo	temperat	agitação	pH	OD	aeração	HCl 20%	NaOH 20%	OUR	CER	RQ
	(h)	(°C)	(rpm)	(pH)	(%sat)	(LpM)	(ml)	(ml)	mmol/L.h	mmol/L.h	
27/02/2018 02:18	7	15,0	600	5,64	62,60	1,0	2	4	2,092	0,500	0,239
27/02/2018 03:18	8	15,0	600	5,68	60,19	1,0	2	4	2,636	0,657	0,249
27/02/2018 04:18	9	15,0	600	5,73	57,66	1,0	2	4	3,039	0,929	0,306
27/02/2018 05:18	10	15,0	600	5,79	55,04	1,0	2	4	3,142	1,025	0,326
27/02/2018 06:18	11	15,0	600	5,85	52,71	1,0	2	4	3,102	1,205	0,388
27/02/2018 07:18	12	15,0	600	5,90	50,89	1,0	2	4	3,467	1,341	0,387
27/02/2018 08:18	13	15,0	600	5,95	49,45	1,0	2	4	3,011	1,589	0,528
27/02/2018 09:18	14	15,0	600	6,01	47,39	1,0	2	4	3,372	1,745	0,517
27/02/2018 10:18	15	15,0	600	6,06	45,21	1,0	2	4	3,131	2,126	0,679
27/02/2018 11:18	16	15,0	600	6,12	42,72	1,0	2	4	2,878	2,505	0,870
27/02/2018 12:18	17	15,0	600	6,18	40,28	1,0	2	4	2,775	2,887	1,040
27/02/2018 13:18	18	15,0	600	5,54	38,77	1,0	4	9	3,376	3,376	1,000
27/02/2018 14:18	19	15,0	600	5,55	35,81	1,0	4	9	3,313	3,877	1,170
27/02/2018 15:18	20	15,0	600	5,54	33,33	1,0	4	9	4,098	4,499	1,098
27/02/2018 16:18	21	15,0	600	5,55	29,54	1,0	5	9	3,959	5,081	1,283
27/02/2018 17:18	22	15,0	600	5,54	25,92	1,0	5	9	5,407	5,712	1,056
27/02/2018 18:18	23	15,0	600	5,55	23,56	1,0	5	9	6,521	6,135	0,941
27/02/2018 19:18	24	15,0	600	5,55	20,86	1,0	5	9	7,005	6,690	0,955
27/02/2018 20:18	25	15,0	600	5,54	19,85	1,0	5	9	8,274	6,963	0,842
27/02/2018 21:18	26	15,0	600	5,52	19,07	1,0	5	9	8,448	7,418	0,878
27/02/2018 22:18	27	15,0	600	5,54	18,50	1,0	5	9	8,839	7,520	0,851
27/02/2018 23:18	28	15,0	600	5,53	17,75	1,0	5	9	8,826	7,657	0,868
28/02/2018 00:18	29	15,0	600	5,55	17,30	1,0	5	9	9,264	7,835	0,846
28/02/2018 01:18	30	15,0	600	5,53	16,61	1,0	5	9	9,349	8,103	0,867
28/02/2018 02:18	31	15,0	600	5,55	16,10	1,0	6	9	9,662	8,523	0,882

Data/hora	tempo	temperat	agitação	pH	OD	aeração	HCl 20%	NaOH 20%	OUR	CER	RQ
	(h)	(°C)	(rpm)	(pH)	(%sat)	(LpM)	(ml)	(ml)	mmol/L.h	mmol/L.h	
28/02/2018 03:18	32	15,0	600	5,53	15,89	1,0	6	9	9,645	8,682	0,900
28/02/2018 04:18	33	15,0	600	5,55	15,43	1,0	6	9	9,991	8,935	0,894
28/02/2018 05:18	34	15,0	600	5,53	14,90	1,0	6	9	10,556	9,212	0,873
28/02/2018 06:18	35	15,0	600	5,55	14,45	1,0	6	9	10,670	9,520	0,892
28/02/2018 07:18	36	15,0	600	5,53	15,10	1,0	6	9	8,913	9,728	1,091
28/02/2018 08:18	37	15,0	600	5,51	15,59	1,0	6	9	7,500	9,819	1,309
28/02/2018 09:18	38	15,0	600	5,52	14,86	1,0	6	9	7,981	9,947	1,246
28/02/2018 10:18	39	15,0	600	5,55	14,70	1,0	6	9	7,800	9,959	1,277
28/02/2018 11:18	40	15,0	600	5,48	14,70	1,0	6	9	10,045	12,085	1,203
28/02/2018 12:18	41	15,0	600	5,12	12,52	1,0	16,48	21,97	8,804	12,601	1,431
28/02/2018 13:18	42	14,9	600	6,56	11,87	1,0	32,48	25,97	6,513	9,453	1,451
28/02/2018 14:18	43	15,0	600	6,62	12,33	1,0	34,48	25,97	7,987	10,229	1,281
28/02/2018 15:18	44	15,0	600	6,70	11,97	1,0	35,48	25,97	5,997	9,948	1,659
28/02/2018 16:18	45	15,0	600	6,74	11,21	1,0	36,48	25,97	6,544	9,507	1,453
28/02/2018 17:18	46	15,0	600	5,53	11,05	1,0	37,48	26,97	8,083	10,069	1,246
28/02/2018 18:18	47	15,0	600	5,52	10,74	1,0	37,48	26,97	8,696	10,465	1,204
28/02/2018 19:18	48	15,0	600	5,51	10,70	1,0	37,48	26,97	9,402	10,732	1,141
28/02/2018 20:18	49	15,0	600	5,52	10,26	1,0	37,48	26,97	9,447	10,363	1,097
28/02/2018 21:18	50	15,0	600	5,50	9,56	1,0	37,48	26,97	9,577	10,168	1,062
28/02/2018 22:18	51	15,0	600	5,49	9,23	1,0	37,48	26,97	9,490	10,050	1,059
28/02/2018 23:18	52	15,0	600	5,45	9,01	1,0	37,48	26,97	9,633	10,127	1,051
01/03/2018 00:18	53	15,0	600	5,47	8,85	1,0	37,48	26,97	9,404	9,928	1,056
01/03/2018 01:18	54	15,0	600	5,50	8,64	1,0	37,48	26,97	9,410	9,713	1,032
01/03/2018 02:18	55	15,0	600	5,53	8,39	1,0	37,48	26,97	9,120	9,305	1,020
01/03/2018 03:18	56	15,0	600	5,47	8,31	1,0	37,48	26,97	9,485	9,331	0,984

Data/hora	tempo (h)	temperat (°C)	agitação (rpm)	pH (pH)	OD (%sat)	aeração (LpM)	HCl 20% (ml)	NaOH 20% (ml)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
01/03/2018 04:18	57	15,0	600	5,50	8,11	1,0	37,48	26,97	9,529	9,243	0,970
01/03/2018 05:18	58	15,0	600	5,46	7,91	1,0	37,48	26,97	9,550	9,116	0,955
01/03/2018 06:18	59	15,0	600	5,46	7,96	1,0	37,48	26,97	9,569	9,205	0,962
01/03/2018 07:18	60	15,0	600	5,54	8,04	1,0	37,48	26,97	9,100	9,173	1,008
01/03/2018 08:18	61	15,0	600	5,55	8,24	1,0	37,48	26,97	8,569	9,112	1,063
01/03/2018 09:18	62	15,0	600	5,53	8,11	1,0	37,48	26,97	6,958	8,809	1,266
01/03/2018 10:18	63	15,0	600	5,46	8,16	1,0	37,48	26,97	7,009	8,604	1,228
01/03/2018 11:18	64	14,9	600	5,18	6,02	1,0	37,48	32,97	9,630	10,873	1,129
01/03/2018 12:18	65	15,0	600	5,55	7,25	1,0	37,48	32,97	9,747	10,949	1,123
01/03/2018 13:18	66	15,0	600	4,61	6,13	1,0	37,48	32,97	11,105	13,560	1,221
01/03/2018 14:18	67	15,0	600	5,56	6,07	1,0	37,48	32,97	13,288	12,694	0,955
01/03/2018 15:18	68	15,0	600	5,54	6,40	1,0	37,48	32,97	11,062	10,976	0,992
01/03/2018 16:18	69	15,0	600	5,51	6,71	1,0	37,48	32,97	15,126	14,196	0,939
01/03/2018 17:18	70	14,9	600	5,56	5,54	1,0	38,48	33,77	17,984	14,095	0,784
01/03/2018 18:18	71	15,0	600	5,51	5,60	1,0	38,48	33,77	16,205	14,529	0,897
01/03/2018 19:18	72	15,0	600	5,56	5,67	1,0	38,48	33,77	16,781	14,949	0,891
01/03/2018 20:18	73	15,0	600	5,53	5,60	1,0	38,48	33,77	16,856	14,915	0,885
01/03/2018 21:18	74	15,0	600	5,56	5,61	1,0	38,48	33,77	18,323	14,846	0,810
01/03/2018 22:18	75	15,0	600	5,51	5,55	1,0	38,48	33,77	18,417	14,877	0,808
01/03/2018 23:18	76	14,9	600	5,54	23,01	1,0	38,48	33,77	7,796	6,733	0,864
02/03/2018 00:18	77	15,0	600	5,54	27,62	1,0	38,48	33,77	5,746	2,843	0,495
02/03/2018 01:18	78	15,0	600	5,53	28,41	1,0	38,48	33,77	5,384	2,258	0,419
02/03/2018 02:18	79	15,0	600	5,51	28,87	1,0	38,48	33,77	5,259	1,890	0,359
02/03/2018 03:18	80	15,0	600	5,54	29,18	1,0	38,48	33,77	5,347	1,598	0,299
02/03/2018 04:18	81	15,0	600	5,52	29,33	1,0	38,48	33,77	4,732	1,385	0,293
02/03/2018 05:18	82	15,0	600	5,55	29,53	1,0	38,48	33,77	4,959	1,207	0,243

Data/hora	tempo (h)	temperat (°C)	agitação (rpm)	pH (pH)	OD (%sat)	aeração (LpM)	HCl 20% (ml)	NaOH 20% (ml)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
02/03/2018 06:18	83	15,0	600	5,53	29,73	1,0	38,48	33,77	4,835	1,059	0,219
02/03/2018 07:18	84	15,0	600	5,55	29,93	1,0	38,48	33,77	4,353	1,037	0,238
02/03/2018 08:18	85	15,1	600	5,52	30,48	1,0	38,48	33,77	2,168	1,148	0,529
02/03/2018 09:18	86	15,0	600	5,55	30,65	1,0	38,48	33,77	1,766	1,079	0,611
02/03/2018 10:18	87	15,0	600	5,51	30,85	1,0	38,48	33,77	0,660	1,059	1,605
02/03/2018 11:18	88	15,0	600	5,54	30,78	1,0	38,48	33,77	0,218	1,049	4,817
02/03/2018 12:18	89	15,0	600	5,50	30,78	1,0	38,48	33,77	-0,754	1,038	-1,377
02/03/2018 13:18	90	15,0	600	5,53	30,78	1,0	38,48	33,77	-1,349	1,053	-0,780
02/03/2018 14:18	91	15,0	600	5,52	30,62	1,0	38,48	33,77	-2,254	1,078	-0,478
02/03/2018 15:18	92	15,0	600	5,54	29,99	1,0	38,48	33,77	0,315	0,689	2,185
02/03/2018 16:18	93	15,0	600	5,48	29,63	1,0	38,48	33,77	1,496	0,472	0,315

APÊNDICE D. Dados do cultivo de *L.muscorum* CRM 1648 em biorreator no Ensaio 2 (sem controle de OD, OD > 20%)

Amostras	tempo (h)	crescimento		pH	L-ASNase (U.L ⁻¹)	L-ASNase total (U)	[S] _{sac} (g.L ⁻¹)	[S] _{pro} (g.L ⁻¹)	Px (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Pp (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)
		DO600	[X] (g.L ⁻¹)							
A1	0,00	1,28	0,61	5,50	72,91	72,19	16,13	16,36	0,00	0,00
A2	6,55	2,08	0,98	ND	82,75	81,09	18,89	18,21	0,15	12,63
A3	15,10	3,57	1,68	6,54	108,96	105,69	18,60	17,32	0,11	7,22
A4	16,49	4,40	3,03	6,67	131,90	126,63	15,54	17,57	0,18	8,00
A5	18,07	5,24	3,27	6,81	155,66	147,88	16,91	17,78	0,18	8,61
A6	20,19	5,87	4,38	6,96	210,55	197,92	15,21	14,91	0,22	10,43
A7	24,29	7,60	5,48	7,27	330,98	307,82	17,74	15,40	0,23	13,63

A8	27,31	11,48	7,62	7,50	609,54	560,77	15,92	14,51	0,28	22,32
A9	30,21	14,4	9,89	7,62	881,53	802,20	14,52	12,24	0,33	29,18
A10	33,28	21,04	12,39	7,70	1074,88	967,39	13,08	8,48	0,37	32,30
A11	36,55	30,2	16,11	7,75	1712,27	1523,92	11,58	3,51	0,44	46,85
A12	42,42	50,8	22,61	7,85	3154,19	2775,68	5,76	1,20	0,53	74,36
A13	47,35	58,6	27,41	8,23	3572,01	3107,65	2,32	0,52	0,58	75,44
A14	63,16	50,9	27,26	8,65	3793,22	3262,17	0,42	0,25	0,43	60,06
A15	74,22	53,8	26,49	8,48	3817,79	3245,13	0,07	0,31	0,36	51,44
A16	89,02	45,6	25,74	8,68	3801,41	3193,18	0,11	0,14	0,29	42,70

DO600: densidade óptica, $\lambda=600$ nm. [X]: massa seca celular. [S]_{sac}: concentração de sacarose. [S]_{pro}: concentração de prolina. Px: produtividade em célula. Pp: produtividade em produto (L-ASNase).

APÊNDICE E. Dados *online* do Biorreator BIOSTAT® B-MO no ensaio 2 (sem controle de OD, OD > 20%). Os valores de OUR, CER e RQ foram calculados com base em dados do fluxo de entrada e frações molares dos gases na saída de ar fornecidos pelo equipamento.

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
30/06/2018 16:08	0	15,0	200	5,16	93,72	1,0	0,089	0,609	
30/06/2018 17:08	1	15,0	200	5,23	86,95	1,0	0,457	-0,048	-0,105
30/06/2018 18:08	2	15,0	200	5,30	84,30	1,0	0,840	0,000	0,000
30/06/2018 19:08	3	15,0	200	5,36	83,22	1,0	0,849	-0,016	-0,018
30/06/2018 20:08	4	15,0	200	5,41	80,47	1,0	1,223	0,083	0,068
30/06/2018 21:08	5	15,0	274	5,44	79,83	1,0	1,941	0,088	0,045
30/06/2018 22:08	6	15,0	385	5,50	79,74	1,0	2,114	0,239	0,113
30/06/2018 23:08	7	15,0	406	5,57	79,80	1,0	2,849	0,388	0,136

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
01/07/2018 00:08	8	15,0	555	5,70	79,72	1,0	2,737	0,563	0,206
01/07/2018 01:08	9	15,0	626	5,79	79,35	1,0	3,118	0,694	0,223
01/07/2018 02:08	10	15,0	1116	5,81	78,89	1,0	3,822	0,893	0,234
01/07/2018 03:08	11	15,0	1200	5,70	79,53	1,0	3,686	0,982	0,266
01/07/2018 04:08	12	15,0	1200	5,69	77,40	1,0	4,196	1,098	0,262
01/07/2018 05:08	13	15,0	1200	5,70	74,57	1,0	4,550	1,332	0,293
01/07/2018 06:08	14	15,0	1200	5,72	71,95	1,0	4,812	1,634	0,340
01/07/2018 07:08	15	15,0	1200	5,75	70,52	1,0	5,084	1,874	0,369
01/07/2018 08:08	16	14,9	1200	5,82	69,84	1,0	5,333	2,214	0,415
01/07/2018 09:08	17	15,0	1200	5,93	67,25	1,0	5,247	2,644	0,504
01/07/2018 10:08	18	15,0	1200	6,04	65,30	1,0	5,168	3,056	0,591
01/07/2018 11:08	19	15,0	1200	6,13	63,43	1,0	5,565	3,628	0,652
01/07/2018 12:08	20	15,0	1200	6,22	61,89	1,0	5,498	4,139	0,753
01/07/2018 13:08	21	15,0	1200	6,30	61,53	1,0	6,253	4,800	0,768
01/07/2018 14:08	22	15,0	1200	6,38	60,84	1,5	6,109	5,373	0,880
01/07/2018 15:08	23	15,0	1200	6,44	59,57	1,5	6,257	6,207	0,992
01/07/2018 16:08	24	15,0	1200	6,52	58,18	1,5	6,556	6,883	1,050
01/07/2018 17:08	25	15,0	1200	6,62	55,32	1,5	7,553	7,331	0,971
01/07/2018 18:08	26	15,0	1200	6,71	52,36	1,5	9,807	8,107	0,827
01/07/2018 19:08	27	15,0	1200	6,77	50,60	1,5	11,308	8,920	0,789
01/07/2018 20:08	28	14,9	1200	6,84	49,01	1,5	13,366	9,729	0,728
01/07/2018 21:08	29	15,0	1200	6,91	47,58	1,5	13,959	10,694	0,766
01/07/2018 22:08	30	15,0	1200	6,94	46,62	1,5	15,352	12,030	0,784
01/07/2018 23:08	31	15,0	1200	6,95	45,46	1,5	16,033	12,861	0,802
02/07/2018 00:08	32	15,0	1200	7,04	44,02	1,5	17,682	14,141	0,800
02/07/2018 01:08	33	15,0	1200	7,09	43,01	1,5	18,110	14,991	0,828

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
02/07/2018 02:08	34	15,0	1200	7,11	41,91	1,5	18,890	15,664	0,829
02/07/2018 03:08	35	15,0	1200	7,10	40,86	1,5	21,233	16,972	0,799
02/07/2018 04:08	36	15,0	1200	7,09	39,87	1,5	21,847	18,405	0,842
02/07/2018 05:08	37	15,0	1200	7,11	39,16	1,5	21,846	18,930	0,867
02/07/2018 06:08	38	15,0	1200	7,12	37,89	1,5	22,720	20,022	0,881
02/07/2018 07:08	39	15,0	1200	7,12	37,19	1,5	25,060	20,867	0,833
02/07/2018 08:08	40	15,0	1200	7,13	36,95	1,5	24,776	21,440	0,865
02/07/2018 09:08	41	15,0	1200	7,14	36,97	1,5	25,051	22,226	0,887
02/07/2018 10:08	42	15,0	1200	7,17	36,89	1,5	24,959	22,889	0,917
02/07/2018 11:08	43	15,0	1200	7,21	36,89	1,5	24,187	23,068	0,954
02/07/2018 12:08	44	15,0	1200	7,25	36,43	1,5	22,777	23,196	1,018
02/07/2018 13:08	45	15,0	1200	7,30	36,32	1,5	22,270	22,743	1,021
02/07/2018 14:08	46	15,0	1200	7,39	36,66	1,5	18,769	17,029	0,907
02/07/2018 15:08	47	15,0	1200	7,50	37,36	1,5	14,218	12,959	0,911
02/07/2018 16:08	48	15,0	1200	7,58	37,00	1,5	12,221	10,961	0,897
02/07/2018 17:08	49	15,0	1200	7,63	35,84	1,5	11,547	9,778	0,847
02/07/2018 18:08	50	15,0	1200	7,67	34,84	1,5	11,837	8,944	0,756
02/07/2018 19:08	51	15,0	1200	7,71	34,44	1,5	12,047	8,399	0,697
02/07/2018 20:08	52	15,0	1200	7,75	33,98	1,5	11,451	7,837	0,684
02/07/2018 21:08	53	15,0	1200	7,78	33,51	1,5	11,675	7,521	0,644
02/07/2018 22:08	54	15,0	1200	7,80	33,16	1,5	11,797	7,320	0,621
02/07/2018 23:08	55	15,0	1200	7,81	32,71	1,5	11,908	7,193	0,604
03/07/2018 00:08	56	15,0	1200	7,82	32,34	1,5	12,076	7,127	0,590
03/07/2018 01:08	57	15,0	1200	7,83	31,99	1,5	12,284	7,021	0,572
03/07/2018 02:08	58	15,0	1200	7,84	31,58	1,5	12,187	6,978	0,573
03/07/2018 03:08	59	15,0	1200	7,87	31,29	1,5	12,328	6,741	0,547

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
03/07/2018 04:08	60	15,0	1200	7,92	31,00	1,5	13,310	7,324	0,550
03/07/2018 05:08	61	15,0	1200	7,61	31,00	1,5	13,162	7,207	0,548
03/07/2018 06:08	62	15,0	1200	7,51	30,94	1,5	13,324	6,819	0,512
03/07/2018 07:08	63	15,0	1200	7,47	30,76	1,5	13,230	6,673	0,504
03/07/2018 08:08	64	15,0	1200	7,48	30,71	1,5	13,010	5,654	0,435
03/07/2018 09:08	65	15,0	1200	7,53	30,76	1,5	11,079	5,687	0,513
03/07/2018 10:08	66	15,0	1200	7,59	30,82	1,5	9,948	5,651	0,568
03/07/2018 11:08	67	15,0	1200	7,64	30,71	1,5	9,195	5,682	0,618
03/07/2018 12:08	68	15,0	1200	7,67	30,45	1,5	9,381	5,180	0,552
03/07/2018 13:08	69	15,0	1200	7,69	30,12	1,5	9,745	5,055	0,519
03/07/2018 14:08	70	15,0	1200	7,71	29,89	1,5	9,148	5,038	0,551
03/07/2018 15:08	71	15,0	1200	7,72	29,60	1,5	9,667	4,837	0,500
03/07/2018 16:08	72	15,0	1200	7,73	29,42	1,5	9,777	4,645	0,475
03/07/2018 17:08	73	15,0	1200	7,74	29,07	1,5	10,750	4,377	0,407
03/07/2018 18:08	74	15,0	1200	7,75	28,84	1,5	12,101	4,347	0,359
03/07/2018 19:08	75	15,0	1200	7,75	28,66	1,5	10,985	4,034	0,367
03/07/2018 20:08	76	15,0	1200	7,75	28,43	1,5	12,150	3,889	0,320
03/07/2018 21:08	77	15,0	1200	7,76	28,31	1,5	12,488	3,771	0,302
03/07/2018 22:08	78	15,0	1200	7,76	28,25	1,5	13,684	3,622	0,265
03/07/2018 23:08	79	15,0	1200	7,76	28,14	1,5	12,759	3,377	0,265
04/07/2018 00:08	80	15,0	1200	7,77	28,08	1,5	12,892	3,178	0,246
04/07/2018 01:08	81	15,0	1200	7,78	28,02	1,5	12,967	3,238	0,250
04/07/2018 02:08	82	15,0	1200	7,79	27,90	1,5	9,686	3,009	0,311
04/07/2018 03:08	83	15,0	1200	7,80	27,85	1,5	12,793	2,854	0,223
04/07/2018 04:08	84	15,0	1200	7,81	27,85	1,5	11,960	2,945	0,246
04/07/2018 05:08	85	15,0	1200	7,81	27,81	1,5	12,126	2,624	0,216

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	OUR mmol/L.h	CER mmol/L.h	RQ
04/07/2018 06:08	86	15,0	1200	7,83	27,79	1,5	12,251	2,454	0,200
04/07/2018 07:08	87	15,0	1200	7,83	27,79	1,5	12,390	2,235	0,180
04/07/2018 08:08	88	15,0	1200	7,83	27,73	1,5	12,498	2,173	0,174
04/07/2018 09:08	89	15,0	1200	7,82	27,98	1,5	11,457	1,815	0,158
04/07/2018 10:08	90	15,0	1200	7,81	27,90	1,5	10,458	1,679	0,161
04/07/2018 11:08	91	15,0	1200	7,83	27,85	1,5	10,293	2,081	0,202
04/07/2018 12:08	92	15,0	1200	7,85	27,85	1,5	9,105	1,915	0,210
04/07/2018 13:08	93	15,0	1200	7,86	27,85	1,5	8,786	1,626	0,185
04/07/2018 14:08	94	15,0	1200	7,87	28,02	1,5	7,370	1,777	0,241
04/07/2018 15:08	95	15,0	1200	7,89	28,14	1,5	5,510	2,119	0,385
04/07/2018 16:08	96	15,0	1200	7,91	27,96	1,5	2,604	1,749	0,671

APÊNDICE F. Dados do cultivo de *L.muscorum* CRM 1648 em biorreator no Ensaio 3 (OD controlado em 80%)

Amostras	tempo (h)	crescimento		pH	L-ASNase (U.L ⁻¹)	L-ASNase total (U)	[S] _{sac} (g.L ⁻¹)	[S] _{pro} (g.L ⁻¹)	Px (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Pp (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)
		DO600	[X] (g.L ⁻¹)							
A1	0,00	1,28	0,43	5,77	101,21	100,19	17,87	14,87	0,00	0,00
A2	10,22	2,63	1,03	6,24	146,70	143,77	18,72	18,50	0,10	14,35
A3	13,72	3,15	1,08	6,62	116,06	112,58	16,13	15,55	0,08	8,46
A4	16,30	5,60	1,86	6,72	202,41	194,32	17,53	16,53	0,11	12,42
A5	19,52	7,13	3,94	6,97	309,19	293,73	17,21	15,96	0,20	15,84
A6	24,70	13,72	7,08	7,31	726,09	682,53	14,04	13,99	0,29	29,40
A7	30,81	25,92	10,6	7,48	1782,73	1657,94	6,72	12,27	0,34	57,86
A8	35,14	39,36	13,43	7,41	2799,44	2575,49	0,90	8,82	0,38	79,67
A9	38,64	50,88	19,06	7,62	3723,31	3388,21	0,39	6,59	0,49	96,36
A10	41,08	67,70	20,22	7,89	4763,23	4286,91	0,52	3,27	0,49	115,95
A11	50,0	60,80	24,14	8,3	5338,90	4751,62	0,46	0,64	0,48	106,78
A12	66,0	60,20	26,15	8,32	4958,22	4363,23	0,37	0,16	0,40	75,70

DO600: densidade óptica, $\lambda=600$ nm. [X]: massa seca celular. [S]_{sac}: concentração de sacarose. [S]_{pro}: concentração de prolina. Px: produtividade em célula. Pp: produtividade em produto (L-ASNase).

APÊNDICE G. Dados *online* do Biorreator BIOSTAT® B-MO no Ensaio 3 (OD 80%). Os valores de OUR, CER e RQ foram calculados com base em dados do fluxo de entrada e frações molares dos gases na saída de ar fornecidos pelo equipamento. ValvO2 corresponde a porcentagem de tempo de abertura da válvula de O₂ puro.

Data/Hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (% sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
24/08/2018 21:17	0	15,7	600	5,65	99,08	1,0	0,0	-0,140
24/08/2018 22:17	1	15,0	600	5,93	96,80	1,0	0,0	-0,031
24/08/2018 23:17	2	15,0	600	5,95	96,30	1,0	0,0	0,077
25/08/2018 00:17	3	15,0	600	5,95	95,39	1,0	0,0	0,204
25/08/2018 01:17	4	15,0	600	5,98	94,96	1,0	0,0	0,272
25/08/2018 02:17	5	15,0	600	6,07	93,84	1,0	0,0	0,351
25/08/2018 03:17	6	15,0	600	6,26	93,33	1,0	0,0	0,560
25/08/2018 04:17	7	15,0	600	6,32	92,61	1,0	0,0	0,668
25/08/2018 05:17	8	15,0	600	6,39	91,54	1,0	0,0	0,911
25/08/2018 06:17	9	15,0	600	6,45	89,77	1,0	0,0	1,101
25/08/2018 07:17	10	15,0	600	6,51	89,09	1,0	0,0	1,202
25/08/2018 08:17	11	15,0	600	6,58	86,52	1,0	0,0	1,482
25/08/2018 09:17	12	15,0	600	6,63	86,20	1,0	0,0	1,737
25/08/2018 10:17	13	15,0	600	6,68	81,79	1,0	0,0	2,133
25/08/2018 11:17	14	15,1	600	6,73	81,45	1,0	0,6	2,468
25/08/2018 12:17	15	15,0	600	6,81	81,60	1,0	1,2	2,806
25/08/2018 13:17	16	15,0	600	6,89	79,90	1,0	0,8	3,317
25/08/2018 14:17	17	15,0	600	6,96	87,30	1,0	1,3	3,846
25/08/2018 15:17	18	15,0	600	7,08	79,85	1,0	3,9	4,263
25/08/2018 16:17	19	15,0	600	7,20	82,48	1,0	5,4	4,981
25/08/2018 17:17	20	15,0	600	7,35	77,88	1,0	5,4	5,555

Data/Hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
25/08/2018 18:17	21	15,0	600	7,51	81,62	1,0	4,7	6,298
25/08/2018 19:17	22	15,0	600	7,55	88,21	1,0	1,1	6,717
25/08/2018 20:17	23	15,0	600	7,66	75,50	1,0	9,5	7,364
25/08/2018 21:17	24	15,0	600	7,70	99,63	1,0	8,9	8,240
25/08/2018 22:17	25	15,0	600	7,77	83,18	1,0	12,6	8,933
25/08/2018 23:17	26	15,0	600	7,85	90,23	1,0	11,6	10,163
26/08/2018 00:17	27	15,0	600	7,93	86,86	1,0	8,8	9,654
26/08/2018 01:17	28	15,0	600	7,95	78,04	1,0	11,2	10,915
26/08/2018 02:17	29	15,0	600	7,98	87,90	1,0	18,1	10,362
26/08/2018 03:17	30	15,0	600	8,01	88,19	1,0	14,6	11,030
26/08/2018 04:17	31	15,0	600	8,03	64,44	1,0	27,4	10,217
26/08/2018 05:17	32	15,0	600	8,05	72,25	1,0	22,8	12,631
26/08/2018 06:17	33	15,0	600	8,09	83,03	1,0	9,6	10,675
26/08/2018 07:17	34	15,0	600	8,09	98,73	1,0	16,6	10,833
26/08/2018 08:17	35	15,0	600	8,12	56,65	1,0	29,7	11,302
26/08/2018 09:17	36	15,0	600	8,15	72,10	1,0	23,7	11,210
26/08/2018 10:17	37	15,0	600	8,11	68,71	1,0	24,3	10,583
26/08/2018 11:17	38	15,0	600	8,12	80,10	1,0	17,0	12,620
26/08/2018 12:17	39	15,0	600	8,12	83,69	1,0	15,9	13,567
26/08/2018 13:17	40	15,0	600	8,13	72,36	1,0	16,7	13,917
26/08/2018 14:17	41	15,0	600	8,12	78,39	1,0	16,4	14,147
26/08/2018 15:17	42	15,0	600	8,13	80,30	1,0	16,1	14,062
26/08/2018 16:17	43	15,0	600	8,16	93,13	1,0	15,7	12,027
26/08/2018 17:17	44	15,0	600	8,24	88,94	1,0	10,0	9,405
26/08/2018 18:17	45	15,0	600	8,27	101,40	1,0	10,0	7,568
26/08/2018 19:17	46	15,0	600	8,29	122,52	1,0	10,0	6,831

Data/Hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
26/08/2018 20:17	47	15,0	600	8,32	111,81	1,0	10,0	6,267
26/08/2018 21:17	48	15,0	600	8,32	117,98	1,0	10,0	5,821
26/08/2018 22:17	49	15,0	600	8,33	119,43	1,0	10,0	5,309
26/08/2018 23:17	50	15,0	600	8,29	75,99	1,0	2,5	6,301
27/08/2018 00:17	51	15,0	600	8,30	76,14	1,0	2,5	6,161
27/08/2018 01:17	52	15,0	600	8,30	79,06	1,0	2,5	6,021
27/08/2018 02:17	53	15,0	600	8,27	77,10	1,0	2,4	5,565
27/08/2018 03:17	54	15,0	600	8,27	78,50	1,0	2,5	5,639
27/08/2018 04:17	55	15,0	600	8,27	79,81	1,0	2,2	5,653
27/08/2018 05:17	56	15,0	600	8,25	79,54	1,0	2,2	5,551
27/08/2018 06:17	57	15,0	600	8,27	82,79	1,0	2,2	5,502
27/08/2018 07:17	58	15,0	600	8,26	82,87	1,0	2,3	5,312
27/08/2018 08:17	59	15,0	600	8,25	81,28	1,0	2,0	5,351
27/08/2018 09:17	60	15,0	600	8,25	70,96	1,0	2,0	5,195
27/08/2018 10:17	61	15,0	600	8,24	69,56	1,0	2,0	5,242
27/08/2018 11:17	62	15,0	600	8,24	78,59	1,0	1,1	4,992
27/08/2018 12:17	63	15,0	600	8,22	78,00	1,0	1,6	4,834
27/08/2018 13:17	64	15,0	600	8,22	79,23	1,0	1,6	4,742
27/08/2018 14:17	65	15,0	600	8,21	76,25	1,0	1,6	4,661

APÊNDICE H. Dados do cultivo de *L.muscorum* CRM1648 em biorreator no Ensaio 4 (OD controlado em 20%).

Amostras	tempo (h)	crescimento		pH	L-ASNase (U.L ⁻¹)	L-ASNase total (U)	[S] _{sac} (g.L ⁻¹)	[S] _{pro} (g.L ⁻¹)	Px (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Pp (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)
		DO600	[X] (g.L ⁻¹)							
A1	0,00	2,12	0,60	5,68	203,34	203,34	15,77	21,01	0,00	0,00
A2	6,00	1,88	0,90	6,30	100,28	97,75	12,13	16,98	0,10	16,71
A3	17,00	5,43	2,02	6,39	287,84	269,18	17,84	25,52	0,12	16,93
A4	23,24	7,58	4,08	6,83	412,26	376,63	14,13	20,13	0,18	17,74
A5	29,20	13,62	6,44	7,24	698,24	622,80	11,99	16,84	0,22	23,91
A6	37,20	28,64	13,10	7,60	1816,16	1567,62	5,28	13,55	0,35	48,82
A7	42,60	41,90	14,76	7,50	2822,66	2385,53	0,50	11,20	0,35	66,26
A8	47,05	55,20	20,28	7,57	3992,57	3302,36	0,50	9,40	0,43	84,86
A9	52,50	66,80	26,68	8,19	5116,06	4139,48	0,41	3,95	0,51	97,45
A10	60,95	61,20	23,50	8,33	6063,14	4709,20	0,27	3,15	0,39	99,48
A11	68,10	56,60	40,50	8,61	5143,92	3865,54	0,33	2,05	0,59	75,53

DO600: densidade óptica, $\lambda=600$ nm. [X]: massa seca celular. [S]_{sac}: concentração de sacarose. [S]_{pro}: concentração de prolina. Px: produtividade em célula. Pp: produtividade em produto (L-ASNase).

APÊNDICE I. Dados *online* do Biorreator BIOSTAT® B-MO no ensaio 4 (OD 20%). Os valores de OUR, CER e RQ foram calculados com base em dados do fluxo de entrada e frações molares dos gases na saída de ar fornecidos pelo equipamento. ValvO2 corresponde a porcentagem de tempo de abertura da válvula de O₂ puro.

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (% sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
14/09/2018 23:37	6	15	600	5,9	70,3	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 00:37	7	15	600	5,9	57,2	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 01:37	8	15	600	5,9	50,8	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 02:37	9	15	600	6,0	40,1	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 03:37	10	15	600	6,0	28,0	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 04:37	11	15	600	6,0	23,0	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 05:37	12	15	600	6,1	20,2	0,0	0,3	0,00
15/09/2018 06:37	13	15	600	6,1	20,6	0,0	0,6	0,00
15/09/2018 07:37	14	15	600	6,2	24,1	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 08:37	15	15	600	6,2	23,2	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 09:37	16	15	600	6,3	27,1	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 10:37	17	15	600	6,3	34,7	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 11:37	18	15	600	6,4	19,7	0,0	1,1	0,00
15/09/2018 12:37	19	15	600	6,4	34,5	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 13:37	20	15	600	6,5	20,4	0,0	0,3	0,00
15/09/2018 14:37	21	15	600	6,6	20,8	0,0	0,5	0,00
15/09/2018 15:37	22	15	600	6,6	17,2	0,0	7,0	0,00
15/09/2018 16:37	23	15	600	6,7	19,8	0,0	1,2	0,00
15/09/2018 17:37	24	15	600	6,8	29,5	0,0	0,0	0,00
15/09/2018 18:37	25	15	600	6,9	19,5	0,0	1,7	0,00
15/09/2018 19:37	26	15	600	7,0	21,3	0,0	9,9	0,00

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
15/09/2018 20:37	27	15	600	7,0	20,3	0,0	1,6	0,00
15/09/2018 21:37	28	15	600	7,1	22,5	0,0	6,3	0,00
15/09/2018 22:37	29	15	600	7,2	15,4	0,0	19,3	0,00
15/09/2018 23:37	30	15	600	7,2	19,8	0,0	14,5	0,00
16/09/2018 00:37	31	15	600	7,3	20,8	0,0	15,1	0,00
16/09/2018 01:37	32	15	600	7,4	21,0	0,0	11,6	0,00
16/09/2018 02:37	33	15	600	7,5	19,5	0,0	19,5	0,00
16/09/2018 03:37	34	15	600	7,5	10,5	0,0	20,0	0,00
16/09/2018 04:37	35	15	600	7,5	10,2	0,0	20,0	0,00
16/09/2018 05:37	36	15	600	7,6	5,2	0,0	20,0	0,00
16/09/2018 06:37	37	15	600	7,6	5,8	0,0	20,0	0,00
16/09/2018 07:37	38	15	600	7,7	17,3	0,0	42,4	0,00
16/09/2018 08:37	39	15	600	7,8	18,5	0,0	49,2	0,00
16/09/2018 09:37	40	15	600	7,8	21,3	0,0	64,6	0,00
16/09/2018 10:37	41	15	600	7,9	11,1	0,0	100,0	0,00
16/09/2018 11:37	42	15	600	7,9	9,0	0,0	100,0	0,00
16/09/2018 12:37	43	15	600	7,8	18,8	1,0	11,0	16,87
16/09/2018 13:37	44	15	600	7,7	19,5	1,0	16,0	15,81
16/09/2018 14:37	45	15	600	7,7	14,6	1,0	16,0	16,33
16/09/2018 15:37	46	15	600	7,7	12,3	1,0	16,0	16,94
16/09/2018 16:37	47	15	600	7,7	12,0	1,0	16,0	17,43
16/09/2018 17:37	48	15	600	7,8	23,9	1,0	25,0	13,12
16/09/2018 18:37	49	15	600	7,8	28,6	1,0	24,0	11,91
16/09/2018 19:37	50	15	600	8,0	58,0	1,0	24,0	6,79
16/09/2018 20:37	51	15	600	8,1	76,3	1,0	24,0	5,04
16/09/2018 21:37	52	15	600	8,1	113,8	1,0	24,0	4,39

Data/hora	tempo (h)	temperat. (°C)	agitação (rpm)	pH	OD (%sat)	aeração (LpM)	ValvO2 (%)	CER mmol/L.h
16/09/2018 22:37	53	15	600	8,1	117,2	1,0	24,0	4,07
16/09/2018 23:37	54	15	600	8,1	17,8	1,0	1,0	6,96
17/09/2018 00:37	55	15	600	8,1	16,2	1,0	1,0	6,94
17/09/2018 01:37	56	15	600	8,1	11,5	1,0	1,0	6,64
17/09/2018 02:37	57	15	600	8,1	11,1	1,0	1,0	6,51
17/09/2018 03:37	58	15	600	8,2	9,4	1,0	1,0	6,33
17/09/2018 04:37	59	15	600	8,2	8,8	1,0	1,0	6,32
17/09/2018 05:37	60	15	600	8,2	8,4	1,0	1,0	6,24
17/09/2018 06:37	61	15	600	8,2	8,3	1,0	1,0	6,21
17/09/2018 07:37	62	15	600	8,2	8,5	1,0	1,0	6,21
17/09/2018 08:37	63	15	600	8,3	18,8	1,0	4,0	6,08
17/09/2018 09:37	64	15	600	8,3	20,0	1,0	3,8	5,91
17/09/2018 10:37	65	15	600	8,3	19,9	1,0	3,9	5,92
17/09/2018 11:37	66	15	600	8,3	19,4	1,0	4,0	5,86
17/09/2018 12:37	67	15	600	8,3	19,7	1,0	3,7	5,78
17/09/2018 13:37	68	15	600	8,3	21,8	1,0	3,0	5,75
17/09/2018 14:37	69	15	600	8,3	23,5	1,0	3,0	5,65

