

Marcela Medeiros de Freitas

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO DO CENTRO-OESTE BRASILEIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Brasília

2020

Autorizo a reprodução e divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisas, tendo em vista que o seu conteúdo possui informações passíveis de proteção por meio de direitos de propriedade intelectual.

Catálogo da Publicação

Marcela Medeiros de Freitas

TÍTULO: Produção e purificação de L-asparaginase por fungos filamentosos isolados do Cerrado do centro-oeste brasileiro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior – Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Eliane Ferreira Noronha – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Yris Maria Fonseca-Bazzo – Universidade de Brasília (suplente)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, meu pai, minha avó Inês e meu tio Eugênio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bençãos e oportunidades.

Ao meu pai, minha irmã Manuela, meu cunhado Dion, minha sobrinha Isabella e meu sobrinho Matthew pelo apoio emocional.

À minha avó Inês e meu tio Eugênio Mariano pelo incentivo na busca dos meus sonhos acadêmicos.

À Professora Pérola pelos quase 10 anos de orientação, amizade e confiança em mim depositada.

Ao João Inácio da *University of Brighton* pela orientação, parceria, confiança em mim depositada e amizade.

Thank you, Professor David Timson and Dipak Sarker, for co-supervising my PhD project at University of Brighton.

Ao Professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho do Laboratório de Enzimologia pelas estirpes fúngicas cedidas para a execução deste projeto de pesquisa.

Ao Professor Maurício Homem de Melo pela colaboração com este projeto e às Professoras Yris Maria Fonseca-Bazzo e Damaris Silveira pelos ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001. À Capes pela bolsa de doutorado concedida durante o curso de Pós-Graduação e pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) Nº Processo: 0193.001661/2017 Timeline do Processo; Projeto: Purificação e Caracterização de L-Asparaginase Expressa por Fungos Filamentosos Isolados do Solo do Cerrado

Brasileiro; Edital: Edital 04/2017 - SELEÇÃO PÚBLICA DE PROPOSTAS DE PESQUISA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO DEMANDA ESPONTÂNEA

À Júlia e Patrícia por todo o auxílio e organização do Laboratório de Produtos Naturais e Laboratório de Controle da Qualidade ao longo da execução do projeto de pesquisa.

Thank you, Bertie, Joe, Lucas, Simon and Angela, for all the help throughout my experiments in the Microbiology laboratory and the reagents and equipment borrowed.

Thank you, Dr Jonathan Salvage, from the Image and Analysis Unit at University of Brighton for microscopic imaging.

Aos alunos da Professora Pérola, em especial Paula Souza, Samuel Cardoso, Kellen Cruvinel, Thais Barros e Kelly pela amizade, parceria e colaboração com este projeto de pesquisa.

Às alunas Letícia Santos e Luana Rossi por toda a ajuda no preparo e execução dos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Amanda Carneiro, João Victor Dutra Gomes e Edson Oliveira pela amizade e carinho.

Thank you to all my friends in Brighton, UK, you have made this experience abroad wonderful.

A todos os colegas e amigos com quem tive o prazer de trabalhar nos últimos 10 anos na UnB pelos ensinamentos e momentos de descontração.

A todos os meus amigos pelo apoio emocional e incentivo.

RESUMO

DE FREITAS, Marcela Medeiros. **Produção e purificação de L-asparaginase por fungos filamentosos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro**. Brasília, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

L-asparaginase (ANSase) é uma importante enzima na área farmacêutica utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) devido à sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina, um aminoácido não-essencial sintetizado por células normais, ao contrário das células neoplásicas. Os efeitos adversos das formulações de ASNase estão associados à imunogenicidade da enzima, seus resíduos após hidrólise por proteases, coatividade de glutaminase (GLNase), neurotoxicidade da amônia e sua origem bacteriana, portanto, é importante encontrar novas fontes de microrganismos eucarióticos produtores de ASNase com baixa atividade GLNase. Este trabalho avaliou o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de solo e plantas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro para a produção de ASNase. Quarenta isolados foram selecionados para triagem da produção de enzima, dentre os quais três isolados do solo apresentaram altos teores de atividade da ASNase com baixos valores de atividade da GLNase: *Penicillium sizovae*, *Penicillium cerradense* e *Fusarium proliferatum*. A triagem das variáveis que influenciam a produção de ASNase avaliadas por Plackett-Burman Design revelou que produção da enzima de *P. sizovae* foi reprimida por fontes de carbono, enquanto concentrações mais altas de carbono aumentaram a produção por *F. proliferatum*. Quanto à extração da proteína, a maceração da biomassa congelada liberou 5 vezes mais enzima das células do que a sonicação. A ASNase de *P. sizovae* foi parcialmente purificada por cromatografia de gel filtração seguida de troca iônica. A sequência da ASNase de *P. sizovae* foi identificada (massa molecular 160 kDa), sintetizada nas formas nativa e parcial (exclusão do peptídeo sinal) e expressa em *Komagataella phaffii* X-33 com vetor pPICZ α A, onde sua atividade biológica foi preservada intracelularmente. Este é o primeiro estudo que expressa a ASNase de um fungo filamentoso em uma levedura. Este estudo mostra o potencial dos fungos do Cerrado brasileiro como novas fontes de ASNase com uma possível redução dos efeitos colaterais para a terapia de LLA.

Palavras-chave: L-asparaginase; fungo; Cerrado; leucemia linfoblástica aguda

ABSTRACT

DE FREITAS, Marcela Medeiros. **Production and purification of L-asparaginase by filamentous fungi isolated from the Brazilian Midwestern Cerrado**. Brasília, 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

L-asparaginase (ASNase) is an important enzyme in the pharmaceutical field used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) due to its ability to hydrolyze L-asparagine, a non-essential amino acid synthesized by normal cells, unlike neoplastic cells. The adverse effects of ASNase formulations are associated with the immunogenicity of the enzyme, its residues after hydrolysis by proteases, glutaminase (GLNase) coactivity, ammonia neurotoxicity and its bacterial origin, therefore, it is important to find new sources of eukaryotic microorganisms producing ASNase with low GLNase activity. This work evaluated the biotechnological potential of filamentous fungi isolated from soil and plants of the the Brazilian Midwest Savanna for the production of ASNase. Forty isolates were selected for screening of enzyme production, among which three isolates from the soil showed high levels of ASNase activity with low values of GLNase activity: *Penicillium sizovae*, *Penicillium cerradense* and *Fusarium proliferatum*. The screening of variables that influence ASNase production evaluated by Plackett-Burman Design revealed that production of the *P. sizovae* enzyme was suppressed by carbon sources, while higher concentrations of carbon increased production by *F. proliferatum*. As for protein extraction, the maceration of frozen biomass released 5 times more enzyme from the cells than sonication. *P. sizovae* ASNase was partially purified by gel filtration chromatography followed by ion exchange. The sequence of *P. sizovae* ASNase was identified (molecular mass 160 kDa), synthesized in native and partial forms (exclusion of the signal peptide) and expressed in *Komagataella phaffii* X-33 with vector pPICZαA, where its biological activity was preserved intracellularly. This is the first study that expresses the ASNase of a filamentous fungus in a yeast. This study shows the potential of fungi from the Brazilian Cerrado as new sources of ASNase with a possible reduction of side effects for ALL therapy.

Keywords: L-asparaginase; fungi; Brazilian Savanna; acute lymphoblastic leukemia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Asparagina sintetase (A) e asparaginase (B) de origem bacteriana com asparagina no sítio ativo (em vermelho) utilizando o aminoácido treonina (em verde) para realizar a reação de clivagem. Fonte: (GOODSELL, 2005)31
- Figura 2 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas (A) e fungos (B). Fonte: (BROWN; WOLF; PRADOS-ROSALES; CASADEVALL, 2015)33
- Figura 3 - Parede celular dos fungos. Fonte: (CASADEVALL; NOSANCHUK; WILLIAMSON; RODRIGUES, 2009)34
- Figura 4 - Mecanismo de reação da asparagina com hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β -hidroxamato aspártico férrico57
- Figura 5 - Triagem semi-quantitativa da produção de L-asparaginase pelos fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro em meio sólido contendo uma única fonte de nitrogênio: L-asparagina como substrato da enzima (à esquerda) e nitrato de sódio como controle (à direita). 2DCSS6 (1); 2DMGSE2 (2); 2DSSSE1 (3); 2DSST1 (4); 2DSST10 (5); 2RCSS1 (6); BR (7); CAG (8); CAG1 (9); CAG2 (10); CAG3 (11); CAM01 (12); CB02 (13); DCFF2 (14); DCFF4 (15); DCFS1 (16); DCFS6 (17); DCFS9 (18); DCFS10 (19); DCFT2 (20); DCFT5 (21); DCFTP7 (22); EP01 (23); EP03 (24); EP04 (25); GOI3 (26); IPE02 (27); IPE03 (28); IPE05 (29); OH01 (30); OH03 (31); PEQ02 (32); PT02 (33); RCFS3 (34); RCFS6 (35); RCFS7 (36); RCFS17 (37); RCFS21 (38); RCFS24 (39); RCFT14 (40)79
- Figura 6 - Triagem quantitativa da produção de L-asparaginase quantificada nas células dos 40 fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro após cultivo submerso. As análises foram realizadas em duplicatas dentro de cada replicata (n = 4) e os resultados são apresentados como distribuição das atividades enzimáticas para cada isolado do solo (marrom) e isolado das plantas (verde)84
- Figura 7 - Triagem quantitativa da produção de glutaminase quantificada nas células dos fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro após cultivo submerso com maiores níveis de atividade de L-asparaginase. As análises foram realizadas em duplicatas dentro de cada replicata (n = 4) e os resultados são apresentados como distribuição das atividades enzimáticas para cada isolado87
- Figura 8 - Comparação da atividade de L-asparaginase por fungos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro sob diferentes cultivos submersos em

diferentes períodos de incubação. IC: meio de cultivo indutor do crescimento; MCDM: meio de cultivo Czapek Dox modificado.....	88
Figura 9 - Imagens de microscopia de varredura das amostras de biomassa de <i>Penicillium sp.</i> 2DSST1 (A) e (B) controle; (C) e (D) biomassa submetida a extração mecânica por maceração com gral e pistilo; (E) e (F) biomassa submetida a maceração física por sonicação	93
Figura 10 - A morfologia da superfície dos esporos dos fungos foi analisada por MEV após irradiações (0 e 1,0 kGy). Os esporos expostos foram esmagados e exibiram um alto grau de esvaziamento na superfície dos esporos em <i>B. cinerea</i> (A), <i>P. expansum</i> (B), e <i>R. stolonifer</i> (C). Fonte: (JEONG; SHIN; CHU; PARK, 2015).....	94
Figura 11 - <i>Penicillium sizovae</i> 2DSST1 crescido em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (A) frente (B) verso	95
Figura 12 - <i>Fusarium proliferatum</i> DCFS10 crescido em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (A) frente (B) verso	95
Figura 13 - Árvore filogenética bayesiana baseada em sequências concatenadas. Os valores das probabilidades bayesianas posteriores são indicados nos nós e as linhas grossas indicam probabilidade posterior maior ou igual a 0,99. Os espécimes deste estudo estão destacados em negrito. Sequências ITS, calmodulina, β -tubulina e RPB2 de espécies de <i>Penicillium</i> da seção Citrina (a). A árvore foi enraizada com <i>Coccidioides immitis</i> CBS 146.56 ^T . Sequências ITS, β -tubulina e EF-1 α do gênero <i>Fusarium</i> (b). A árvore foi enraizada com <i>Penicillium chrysogenum</i> CBS 306.48 ^T . ^T = tipo; ^{NT} = novo tipo.....	96
Figura 14 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis frente às atividades de L-asparaginase (A) e atividades específicas (B) por <i>P. sizovae</i>	105
Figura 15 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis frente às atividades de L-asparaginase (A) e atividades específicas (B) por <i>F. proliferatum</i> .116	116
Figura 16 - Variação da biomassa (•) após 120 h e atividade enzimática específica (Δ) após 96 h de incubação a 32°C e 120 rpm. <i>P. sizovae</i> (A) e <i>F. proliferatum</i> (B)	123
Figura 17 - Avaliação da influência da adição de glicina na estabilidade da enzima L-asparaginase em solução de proteínas precipitadas com 40-60 % de acetona após 24 horas de armazenamento	160
Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo filamentoso <i>P. sizovae</i> eluído em coluna de gel filtração Superdex 200 Increase 10/300 GL em eluição isocrática com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 e fluxo 0,75 mL/min a 25°C	164

Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo filamentososo <i>P. sizovae</i> eluído em coluna de troca iônica do tipo aniônica HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow em gradiente de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 com concentração crescente de NaCl (0-0,5 M) e fluxo 0,5 mL/min a 25°C.....	165
Figura 20 - Perfil eletroforético em condições desnaturantes de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %). Padrão de massa molar: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa) (P); extrato bruto do fungo <i>P. sizovae</i> (1); fração 4 da coluna gel filtração Superdex 200 Increase 10/300 GL (2); fração 6 da coluna aniônica HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow (3)	166
Figura 21 - Diagrama das etapas da expressão heteróloga da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> em <i>K. phaffii</i>	190
Figura 22 - Sequência da construção do vetor pPICZ α A (1.143 bases) contendo: mRNA 5'AOX1 (azul claro); sítio de ligação 5'AOX1 (rosa); sequência do sinal fator α (amarelo); sítio de restrição EcoRI (cinza); o gene parcial da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> – nomeado NATIVE L-ASP pPICZ α A - sem os primeiros 20 códons (códon de iniciação e 19 códons referentes à sinalização de membrana) e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' para tornar a sequência de proteína em <i>frame</i> com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZ α A (verde); sítio de restrição Xba I (cinza); epítipo c-myc (roxo); cauda polihistidina (vermelho); sítio de ligação 3'AOX1 (azul escuro).....	192
Figura 23 - Mapa do plasmídeo pPICZ α A construído contendo a sequência de L-asparaginase nativa de <i>P. sizovae</i>	194
Figura 24 - Sequência da construção do vetor pPICZ α A (1.086 bases) contendo: mRNA 5'AOX1 (azul claro); sítio de ligação 5'AOX1 (rosa); sequência do sinal fator α (amarelo); sítio de restrição EcoRI (cinza); o gene parcial da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> – nomeado PARTIAL L-ASP pPICZ α A - sem os primeiros 20 códons (códon de iniciação e 19 códons referentes à sinalização de membrana) e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' para tornar a sequência de proteína em <i>frame</i> com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZ α A (verde); sítio de restrição Xba I (cinza); epítipo c-myc (roxo); cauda polihistidina (vermelho); sítio de ligação 3'AOX1 (azul escuro).....	196
Figura 25 - Mapa do plasmídeo pPICZ α A construído contendo a sequência de L-asparaginase parcial de <i>P. sizovae</i>	198

Figura 26 - Alinhamento dos primers degenerados sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	211
Figura 27 - Produtos de PCR purificados a partir da amplificação do DNA genômico de <i>P. sizovae</i> com <i>primers</i> degenerados usados na identificação do gene da L-asparaginase em gel de agarose 1,2 %, TAE 1X, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão 1 kb (P); ITS1 e ITS4 (570 pb) (1); F-1.2 e R-ASP2.1 (560 pb) (2); F-2 e R-2 (1709 pb) (3); F-ASP3 e R-2 (863 pb) (4); F-ASP2 e R-ASP6 (939 pb) (5)	212
Figura 28 - Alinhamento das sequências de <i>P. citrinum</i> e <i>P. steckii</i> para construir a sequência da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> com os <i>primers</i> utilizados na identificação	212
Figura 29 - Sequência genética de <i>P. sizovae</i> por comparação com as sequências de <i>P. steckii</i> e <i>P. citrinum</i> . Sequência do gene da L-asparaginase (negrito); íntrons do gene da L-asparaginase (sublinhado)	217
Figura 30 - Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase nativa de <i>P. sizovae</i>	218
Figura 31 - Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase parcial de <i>P. sizovae</i>	218
Figura 32 - Unidades formadoras de colônias das células de <i>E. coli</i> TOP10 quimicamente competentes transformadas com plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA em placas de Petri contendo ágar LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 µg/mL) e transformadas com o controle positivo pUC19 em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). NATIVE L-ASP pPICZαA 200 µL (A) e 20 µL (B); PARTIAL L-ASP pPICZαA 200 uL (C) e 20 µL (D); controle positivo pUC19 100 µL (E) e 25 µL (F)	219
Figura 33 - pDNAs extraídos das células de <i>E. coli</i> transformadas e os produtos de PCR purificados da reação com os primers 5'AOX1 e 3'AOX1 em gel de agarose 1,2 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão DNA 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA N ₁ (1); produto de PCR NATIVE L-ASP pPICZαA N ₁ purificado (2); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA N ₅ (3); produto de PCR NATIVE L-ASP pPICZαA N ₅ purificado (4); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA P ₁ (5); produto de PCR PARTIAL L-ASP pPICZαA P ₁ purificado (6); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA P ₅ (7); produto de PCR PARTIAL L-ASP pPICZαA P ₅ purificado (8).....	221

Figura 34 - Digestão de 1 µg dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI e SacI em gel de agarose 1 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. padrão DNA 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI (1); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com XbaI (2); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI/XbaI (3); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com SacI (4); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI (5); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com XbaI (6); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI/XbaI (7); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com SacI (8).....222

Figura 35 - Digestão de 5 µg dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA com a enzima de restrição SacI em gel de agarose 1 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA (1); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA (2)223

Figura 36 - Colônias de *K. phaffii* X-33 a partir de células transformadas após descongelamento contendo os pDNAs resistentes a Zeocina (A) NATIVE L-ASP pPICZαA e (B) PARTIAL L-ASP pPICZαA224

Figura 37 - Colônias de *K. phaffii* X-33 a partir de células transformadas a fresco contendo os pDNAs resistentes a Zeocina (A) NATIVE L-ASP pPICZαA e (B) PARTIAL L-ASP pPICZαA após 10 dias de incubação a 30°C224

Figura 38 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas após descongelamento com o pDNA NATIVE L-ASP pPICZαA resistentes a Zeocina (Nc 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ/lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA225

Figura 39 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas a fresco com o pDNA NATIVE L-ASP pPICZαA resistentes a Zeocina (Nf 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ/lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA.....226

Figura 40 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas após descongelamento com o pDNA PARTIAL L-ASP pPICZαA resistentes a Zeocina (Pc 1-8) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo

(B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut ⁺ : GS115/pPICZ/lacZ; controle Mut ^s : GS115 HSA.....	226
Figura 41 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de <i>K. phaffii</i> X-33 transformadas a fresco com o pDNA PARTIAL L-ASP pPICZαA resistentes a Zeocina (P _F 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut ⁺ : GS115/pPICZ/lacZ; controle Mut ^s : GS115 HSA.....	227
Figura 42 - Perfil cinético da produção da biomassa de <i>K. phaffii</i> X-33 transformada com NATIVE pPICZαA inoculada nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY sob indução de metanol, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Nc ₁ (A); Clone Nc ₁₀ (B); Clone Nf ₅ (C); Clone Nf ₇ (D).....	228
Figura 43 - Perfil cinético da produção da biomassa de <i>K. phaffii</i> X-33 transformada com PARTIAL pPICZαA inoculada nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY sob indução de metanol, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Pc ₂ (A); Clone Pc ₃ (B); Clone Pf ₆ (C); Clone Pf ₁₀ (D).....	229
Figura 44 - Curva de crescimento da atividade enzimática da L-asparaginase de <i>K. phaffii</i> X-33 transformada com PARTIAL pPICZαA inoculado nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Pc ₃ (A); clone Pf ₆ (B)	230
Figura 45 - Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes SDS-PAGE 12 %, 120 V das proteínas precipitadas no meio extracelular após cultivo de <i>K. phaffii</i> X-33 em meio de expressão BMMY coradas com nitrato de prata. Padrão comercial Precision Plus Protein Standards® Bio-Rad dual color (P); clone Pf ₆ após 6 horas de indução (1); clone Pf ₆ após 24 horas de indução (2); clone Pf ₆ após 48 h de indução (3); clone Pf ₆ após 72 horas de indução (4); controle negativo Pf ₁₀ (5)	231
Figura 46 - Avaliação da interferência dos meios de cultivo MM, BMM e BMMY na quantificação da atividade de L-asparaginase	233
Figura 47 - PCR de colônia dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33 integrados com NATIVE e PARTIAL L-ASP pPICZαA transformados a partir de células previamente congeladas e à fresco em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 como controle positivo (B).....	235

Figura 48 - PCR de colônia dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células previamente congeladas (Nc ₁ -Nc ₁₀) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)	236
Figura 49 - PCR de colônia dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células frescas (Nc ₁ -Nc ₉) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)	237
Figura 50 - PCR de colônia dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células previamente congeladas (Pc ₃ , Pc ₄ , Pc ₆ , Pc ₇ e Pc ₈) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)	238
Figura 51 - PCR de colônia dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células frescas (Pf ₁ -Pf ₁₅) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)	239
Figura 52 - Árvore filogenética baseada na sequência da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> comparada a proteínas que já possuem a estrutura cristalográfica elucidada. Distância evolucionária de Grishin utilizada como medida	242
Figura 53 - Domínios conservados da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> quando comparado com as moléculas do Protein Data Bank. Os triângulos presentes nas linhas indicadas pelas setas mostram os domínios conservados e associados com o sítio ativo e com as interfaces poliméricas da proteína	243
Figura 54 - Alinhamento das L-asparaginases cristalizadas depositadas em banco de dados com a enzima de <i>P. sizovae</i> . Em amarelo estão os resíduos conservados das interfaces homotetraméricas: sítio ativo (A); interface de homodímero [sítio de ligação	

do polipeptídeo] (B); interface de homotetrâmero [sítio de ligação do polipeptídeo] (C).
.....244

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de drogas citotóxicas direcionadas às leucemias	30
Tabela 2 - Fungos produtores de L-asparaginase.....	44
Tabela 3 - Fungos isolados do solo do Cerrado Brasileiro	53
Tabela 4 - Nome científico das plantas, nome popular e código atribuído aos fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro.....	54
Tabela 5 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva	59
Tabela 6 - Tamanho dos fragmentos dos fungos isolados <i>Penicillium</i> sp. 2DSST1 e <i>Fusarium</i> sp. DCFS10 e os respectivos genes utilizados na amplificação.....	69
Tabela 7 - Valores das variáveis do planejamento experimental Plackett-Burman ...	70
Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman	72
Tabela 9 - Valores das variáveis do planejamento experimental Delineamento Composto Central para o isolado <i>Penicillium</i> sp. 2DSST1	73
Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental Delineamento Composto Central para o isolado <i>Penicillium</i> sp. 2DSST1	74
Tabela 11 - Valores das variáveis do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional para o isolado <i>Fusarium</i> sp. DCFS10.....	75
Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional para o isolado <i>Fusarium</i> sp. DCFS10.....	76
Tabela 13 - Valores de índice de zona para os isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro usando vermelho de fenol como indicador que representa a extensão da produção de L-asparaginase após 48 h de incubação.....	80
Tabela 14 - Valores das atividades de L-asparaginase por espécies fúngicas isoladas do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro quando submetidas à método mecânico de rompimento celular.....	89
Tabela 15 - Comparação da eficiência dos métodos mecânico e físico para extração da L-asparaginase de <i>Penicillium</i> sp. 2DSST1	90
Tabela 16 - Sequências de fragmentos utilizadas na identificação multigênica das espécies <i>Penicillium sizovae</i> e <i>Fusarium proliferatum</i>	98
Tabela 17 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de <i>P. sizovae</i> segundo o planejamento experimental Plackett-Burman.	101

Tabela 18 - Efeito e significância das variáveis sobre a atividade total e específica de L-asparaginase pelo isolado <i>P. sizovae</i>	104
Tabela 19 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de <i>P. sizovae</i> segundo o planejamento experimental Delineamento Composto Central	110
Tabela 20 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de <i>F. proliferatum</i> segundo o planejamento experimental Plackett-Burman	112
Tabela 21 - Efeito e significância das variáveis sobre a atividade total e específica de L-asparaginase pelo isolado <i>F. proliferatum</i>	115
Tabela 22 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de <i>F. proliferatum</i> segundo o planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional.....	119
Tabela 23 - Parâmetros cinéticos no crescimento e produção de L-asparaginase por <i>P. sizovae</i> e <i>F. proliferatum</i>	124
Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos	127
Tabela 25 - Métodos cromatográficos de gel filtração testados para a purificação da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	145
Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	147
Tabela 27 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva	155
Tabela 28 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva com leitura em microplaca	156
Tabela 29 - Avaliação da atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais, atividade específica e fator de purificação de L-asparaginase nas frações de proteínas precipitadas por adição de acetona	159
Tabela 30 - Avaliação da atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de L-asparaginase nas frações de proteínas precipitadas por adição de sulfato de amônio.	162
Tabela 31 - Resumo das etapas de purificação da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i> .	167
Tabela 32 – Estudos sobre produção de L-asparaginase recombinante	173

Tabela 33 - Métodos testados para a extração do DNA genômico do fungo filamentososo <i>P. sizovae</i>	182
Tabela 34 - <i>Primers</i> degenerados desenhados e sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	185
Tabela 35 - Pares de <i>primers</i> testados para a identificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	188
Tabela 36 - Preparo da reação de PCR segundo diferentes fabricantes para a amplificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	188
Tabela 37 - Método da PCR segundo diferentes fabricantes para a amplificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	189
Tabela 38 - Protocolo de digestão dos pDNAs NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI, EcoRI/XbaI e SacI.....	201
Tabela 39 - Preparo do ensaio da quantificação da atividade de L-asparaginase em células e no meio de cultivo dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33.....	205
Tabela 40 - Preparo do ensaio da quantificação de L-asparaginase frente aos meios de cultivo utilizados no cultivo de <i>K. phaffii</i> X-33.....	207
Tabela 41 - PCR de colônia como triagem direta do fenótipo dos clones de <i>K. phaffii</i>	208
Tabela 42 - Quantificação do DNA genômico de <i>P. sizovae</i> em Nanodrop	210
Tabela 43 - Quantificação dos pDNAs nativo e parcial de <i>P. sizovae</i> após extração das células de <i>E. coli</i> TOP10 em Nanodrop.....	220
Tabela 44 - Fenótipos dos clones de <i>K. phaffii</i> X-33.....	240

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	Ácido L-aspartil- β -hidroxâmico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Anova	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOX	Álcool oxidase
Asn	L-asparagina
ASNase	L-asparaginase
APS	Persulfato de amônio
BCA	Ácido bicinconinico
BSA	Albumina de soro bovino
CCD	Central Composite Design
DCC	Delineamento Composto Central
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FE	Farmacopeia Europeia
Gln	L-glutamina
GLNase	Glutaminase
HMDS	Hexametildisilazano
IC	Meio de cultivo indutor do crescimento
Inca	Instituto Nacional do Câncer
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
LLA	Leucemia linfoblástica/linfocítica aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMC	Leucemia mielóide crônica
MCDM	Meio de cultivo Czapek Dox Modificado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBD	Plackett-Burman Design
PDA	Ágar batata dextrose
PEG	Polietilenoglicol
$P_{E,max}$	Produtividade máxima da enzima
$P_{X,max}$	Produtividade máxima de biomassa
Rename	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante
SisBiota Brasil	Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
Temed	Tetrametiletilenodiamina
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VC	Volume de coluna
$\mu_{E,max}$	Produtividade específica da enzima
μ_{max}	Velocidade específica máxima
$Y_{E/X}$	Fator de conversão de biomassa na enzima

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	25
CAPÍTULO I	27
1. REVISÃO DA LITERATURA	27
1.1. Leucemia.....	27
1.2. Leucemia linfoblástica aguda	28
1.3. Tratamento.....	29
1.4. L-asparaginase	30
1.5. L-asparaginase no mercado brasileiro	39
OBJETIVOS	42
CAPÍTULO II	43
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1. Preparo de meios de cultivo e soluções.....	50
2.2. Isolamento de fungos do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro	52
2.3. Triagem de fungos produtores de L-asparaginase.....	55
2.4. Triagem de fungos produtores de glutaminase	59
2.5. Avaliação dos cultivos com e sem pré-inóculo.....	61
2.6. Rompimento da célula fúngica para liberação de L-asparaginase	62
2.7. Identificação das espécies fúngicas selecionadas	67
2.8. Otimização do meio de cultivo para a produção de L-asparaginase pelos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro	69
2.9. Parâmetros cinéticos da curva de crescimento	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1. Seleção dos fungos produtores de L-asparaginase	78
3.2. Triagem de fungos produtores de glutaminase	87
3.3. Avaliação dos cultivos com e sem pré-inóculo.....	88

3.4.	Rompimento da célula fúngica para liberação de L-asparaginase	89
3.5.	Identificação das espécies fúngicas selecionadas	95
3.6.	Otimização do meio de cultivo para a produção de L-asparaginase pelos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro	99
3.7.	Parâmetros cinéticos da curva de crescimento	121
4.	CONCLUSÃO	125
CAPÍTULO III		126
1.	INTRODUÇÃO	126
2.	MATERIAL E MÉTODOS	140
2.1.	Preparo de reagentes e soluções	140
2.2.	Preparo do extrato bruto de <i>P. sizovae</i>	142
2.3.	Métodos de purificação não cromatográficos	143
2.4.	Métodos de purificação cromatográficos	144
2.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes	157
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
3.1.	Métodos de purificação não cromatográficos	159
3.2.	Métodos de purificação cromatográficos	164
4.	CONCLUSÃO	169
CAPÍTULO IV		170
1.	INTRODUÇÃO	170
2.	MATERIAL E MÉTODOS	176
2.1.	Preparo de Reagentes e Soluções	176
2.2.	Identificação do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	181
2.3.	Tradução proteica da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	190
2.4.	Clonagem do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	190
2.5.	Avaliação do fenótipo dos transformados em meio sólido	203
2.6.	Expressão de L-asparaginase em <i>K. phaffii</i> X-33 recombinante	203

2.7. Avaliação da interferência dos meios de cultivo na quantificação da atividade de L-asparaginase e proteínas totais	207
2.8. Confirmação do fenótipo dos transformados por PCR	208
2.9. Projeção da estrutura molecular da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	209
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	210
3.1. Identificação do gene L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	210
3.2. Tradução proteica da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	218
3.1. Clonagem do gene da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	219
3.2. Avaliação do fenótipo dos transformados em meio sólido	225
3.3. Expressão de L-asparaginase em <i>K. phaffii</i> X-33 recombinante	227
3.4. Avaliação da interferência dos meios de cultivo na quantificação da atividade de L-asparaginase e de proteínas totais	232
3.5. Confirmação do fenótipo dos transformados por PCR	234
3.6. Projeção da estrutura molecular da L-asparaginase de <i>P. sizovae</i>	240
4. CONCLUSÃO	247
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	248
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	251

INTRODUÇÃO

Os principais tipos de câncer em crianças de 0 a 14 anos são leucemia linfoblástica (ou linfocítica, linfoide) aguda (LLA), de cérebro e outros tumores do sistema nervoso central e neuroblastoma (NCI, 2020b). A maioria das células produz sua própria asparagina e não precisa obtê-la em sua dieta, entretanto algumas células sanguíneas dependem do sangue para o fornecimento de asparagina (GOODSELL, 2005). As células neoplásicas não sintetizam a L-asparagina ao contrário das células normais devido à ausência de L-asparagina sintetase, dependendo assim do fornecimento deste aminoácido. A L-asparaginase (ASNase) é utilizada como uma opção de tratamento padrão de quimioterapia de indução de remissão para LLA recém-diagnosticada e como profilaxia de quimioterapia sistêmica direta do sistema nervoso central para LLA de risco padrão e de alto risco (NCI, 2020b). A L-asparaginase catalisa a desaminação de L-asparagina em L-aspartato e amônia. Esta enzima é amplamente distribuída na natureza, encontrada não só em microrganismos, mas também em plantas e tecidos de vários animais, como peixes, mamíferos e aves. No entanto, os microrganismos são uma fonte melhor do que animais ou plantas, considerando sua capacidade de crescer facilmente em substratos simples e baratos (LOPES; OLIVEIRA-NASCIMENTO; RIBEIRO; TAIRUM *et al.*, 2015).

As preparações enzimáticas industrializadas são obtidas de bactérias, como a enzima derivada de *Escherichia coli* nas formas nativa, peguilada e recombinante e a enzima derivada de *Erwinia chrysanthemi* (PIETERS; HUNGER; BOOS; RIZZARI *et al.*, 2011). No entanto, efeitos adversos tais como reações anafilactóides e síndrome de trombose e hemorragia em crianças com leucemia e linfoma quando a asparaginase de *E. coli* e *Erwinia* foi administrada têm sido relatados desde os anos 80 (EVANS; TSIATIS; RIVERA; MURPHY *et al.*, 1982; PRIEST; RAMSAY; STEINHERZ; TUBERGEN *et al.*, 1982). Relatos de complicações trombóticas venosas em adultos submetidos a tratamento de indução para LLA com L-asparaginase de *E. coli* e *Erwinia* ainda são reportados (CARUSO; IACOVIELLO; DI CASTELNUOVO; STORTI *et al.*, 2007). Uma revisão sistemática da eficácia e segurança da L-asparaginase peguilada na terapia da LLA em crianças e adolescentes foi realizada para compará-la com L-asparaginase nativa de *E. coli* (MEDAWAR; MOSEGUI; VIANNA; COSTA, 2020). Dentre os estudos incluídos que

comparam os dois medicamentos (AVRAMIS; SENCER; PERICLOU; SATHER *et al.*, 2002; KURTZBERG; ASSELIN; BERNSTEIN; BUCHANAN *et al.*, 2011; PLACE; STEVENSON; VROOMAN; HARRIS *et al.*, 2015), foi observada uma tendência aumentada para hipersensibilidade com PEG-asparaginase, embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo ($p = 0,68$) entre os grupos. A hipersensibilidade varia desde reações alérgicas leves até choque anafilático e ocorre em aproximadamente 5-50 % dos pacientes tratados em vários ensaios clínicos (KEATING; HOLMES; LERNER; HO, 1993). Além disso, algumas asparaginases industrializadas foram descontinuadas, enquanto outras não estão disponíveis em todos os países, tornando a produção desta enzima importante para atender a demanda global de medicamentos utilizados como tratamento para LLA.

Nesse cenário, é importante encontrar novas fontes de microrganismos produtores de L-asparaginase que possam evitar os efeitos colaterais indesejados obtidos da L-asparaginase bacteriana com coatividade da glutaminase. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo produzir e purificar a L-asparaginase a partir de microrganismos eucariotos, como os fungos filamentosos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, na tentativa de reduzir esses efeitos adversos e abastecer o mercado nacional com o tratamento para LLA.

CAPÍTULO I

Revisão da literatura

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Leucemia

O câncer é a principal causa de morte por doença entre crianças. Os tipos mais comuns de câncer diagnosticados em crianças de 0 a 14 anos são leucemias, tumores cerebrais e outros tumores do sistema nervoso central e linfomas (NCI, 2020b). As leucemias compõem um grupo de neoplasias das células do sangue, caracterizadas pelo crescimento descontrolado e acúmulo de glóbulos brancos imaturos da linhagem mielóide ou linfóide. Na leucemia há um crescimento descontrolado de células malignas imaturas com a imortalidade de uma célula leucêmica semelhante a uma célula tronco, o que resulta em anemia. Esta peculiaridade leva a um risco aumentado de infecções pelo paciente. A proliferação das células leucêmicas as levará da medula óssea e circulação para a maioria dos tecidos no corpo, incluindo os gânglios linfáticos, fígado, baço, sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) e testículos (nos homens) (AVRAMIS, 2012). Outros tipos de câncer que começam nos linfócitos são conhecidos como linfomas (linfoma não-Hodgkin ou linfoma de Hodgkin). Embora leucemias afetam principalmente a medula óssea e o sangue, os linfomas afetam principalmente os gânglios linfáticos ou outros órgãos (mas também podem envolver a medula óssea) (ACS, 2018b).

As leucemias podem ser classificadas baseando-se nos tipos de glóbulos brancos que elas afetam: linfóides, também chamadas de linfocítica ou linfoblástica ou mielóides, também chamadas de mieloblástica, classificadas ainda quanto à velocidade de evolução e gravidade da doença como forma aguda, que significa que a leucemia pode progredir rapidamente, ou crônica (INCA, 2020). Existem mais de 12 tipos de leucemia, sendo as quatro principais: leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfocítica crônica (LLC) e LLA. A leucemia é o câncer mais comum em crianças e adolescentes, sendo responsável por quase 1 em cada 3 tipos de câncer. A maioria das leucemias infantis são LLA, seguido de LMA. As leucemias crônicas são raras em crianças (ACS, 2020).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (Inca), o número de casos novos de leucemia esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres. A mortalidade por leucemia, segundo o Atlas de Mortalidade por Câncer em 2018, foi de 7.218 mortes, sendo 3.902 homens e 3.316 mulheres (INCA, 2020). As formas mais frequentes de câncer na infância e na adolescência são as leucemias, principalmente a LLA, sendo também muito recorrentes os tumores de Sistema Nervoso Central (INCA, 2014). No Brasil, as leucemias também predominam como tumor mais frequente em crianças e adolescentes, onde a região norte do país apresentou os maiores percentuais para leucemia (acima de 39 %) e a maior incidência ocorreu na faixa etária de 1 a 4 anos, com percentual mediano de 31,6 % (INCA, 2008).

1.2. Leucemia linfoblástica aguda

A LLA resulta na produção descontrolada de blastos de características linfóides e no bloqueio da produção normal de glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. A doença se desenvolve a partir dos linfócitos primitivos, que podem se encontrar em diferentes estágios de desenvolvimento. Na maioria das vezes, a causa da LLA não é evidente, acredita-se que haja alguma relação com radiação devido ao aumento de casos no Japão pós-guerra. Os sinais e sintomas incluem cansaço, falta de ar, sinais de sangramento, infecções e febre, podendo ainda acometer o sistema nervoso causando aumento de gânglios, inflamação dos testículos, vômitos e dor de cabeça. O tratamento da LLA, realizado com quimioterapia, deve considerar a imunofenotipagem, a citogenética, a contagem inicial de glóbulos, as condições clínicas e o envolvimento ou não do sistema nervoso, testículos e gânglios (HAMERSCHLAK, 2008).

O risco médio ao longo da vida de uma pessoa de adquirir LLA é de cerca de 1 em 1.000, sendo ligeiramente maior em homens do que em mulheres e maior em brancos do que em negros. O risco de desenvolver LLA é maior em crianças menores de 5 anos de idade, diminui lentamente até os 20 anos e começa a aumentar novamente após os 50 anos, em que adultos correspondem a cerca de 4 em cada 10 casos de LLA. Embora a maioria dos casos de LLA ocorra em crianças, a maioria das mortes por LLA (cerca de 4 em 5) ocorre em adultos. As estimativas da *American Cancer Society* para LLA nos Estados Unidos para 2020 (incluindo crianças e adultos)

são de cerca de 6.150 novos casos de LLA (3.470 em homens e 2.680 em mulheres) e cerca de 1.520 mortes por LLA (860 em homens e 660 em mulheres) (ACS, 2018a). Embora as taxas de mortalidade por câncer nessa faixa etária tenham diminuído em 65 por cento de 1970 a 2016, o câncer continua sendo a principal causa de morte por doença entre crianças. ALL é o câncer mais comum diagnosticado em crianças e representa aproximadamente 25 % dos diagnósticos de câncer entre crianças menores de 15 anos. Um pico agudo na incidência de LLA é observado entre crianças de 2 a 3 anos, com taxas diminuindo para menos de 30 casos por 1 milhão aos 8 anos de idade (NCI, 2020a). O progresso constante no desenvolvimento de tratamentos efetivos levou a uma taxa de cura de mais de 80 % em crianças, criando oportunidades para abordagens inovadoras que preservariam ganhos passados na sobrevivência de pacientes sem leucemia, reduzindo os efeitos adversos dos regimes intensivos atuais (PUI; ROBISON; LOOK, 2008). O progresso tem sido incremental, a partir da introdução da quimioterapia combinada e tratamento do sistema nervoso central para a leucemia pré-sintomática a regimes de tratamento intensivos mais novos para pacientes com alto risco de recaída (PUI; EVANS, 1998).

1.3. Tratamento

O tratamento da leucemia é realizado em etapas: 1) indução de remissão, que tem a finalidade de obter a remissão completa, ou seja, um estado de aparente normalidade após a poliquimioterapia; 2) consolidação, que consiste em tratamento intensivo com quimioterápicos não empregados anteriormente; 3) reindução, caracterizada pela repetição dos medicamentos usados na fase da remissão; e 4) manutenção, em que o tratamento é mais brando e contínuo por vários meses (INCA, 2020). As principais classes de drogas citotóxicas direcionadas às leucemias (Tabela 1) incluem agentes alquilantes, antimetabólitos, antraciclinas e inibidores da topoisomerase, que têm como alvo danificar o DNA, enquanto os inibidores mitóticos têm como alvo a mitose e interrompem a divisão celular, e as asparaginases inibem a síntese de proteínas (AVRAMIS, 2012).

Tabela 1 - Principais classes de drogas citotóxicas direcionadas às leucemias

Classe de drogas citotóxicas	Medicamentos
Agentes alquilantes	ciclofosfamida
Corticosteróides	prednisona, prednisolona, dexametasona, hidrocortisona
Antimetabólitos	citarabina (citosina arabinósido ou ara-C), metotrexato (MTX), 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG)
Antraciclinas e inibidores da topoisomerase	adriamicina, daunorrubicina (daunomicina), doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, Vp-16, mitoxantrona, etoposídeo e congêneres relacionados
Inibidores mitóticos	vincristina, taxanos
Inibidores de proteínas	L-asparaginase, pegaspargase

Fonte: (ACS, 2019; AVRAMIS, 2012)

A asparaginase está listada na 21^a Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2019b) e 7^a Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da OMS para Crianças (OMS, 2019a) de 2019 como medicamento citotóxico para LLA. Entre outros medicamentos, como vincristina, corticosteroide e quimioterapia intratecal, a L-asparaginase é utilizada como uma opção de tratamento padrão de quimioterapia de indução de remissão para LLA recém-diagnosticada (NCI, 2020b).

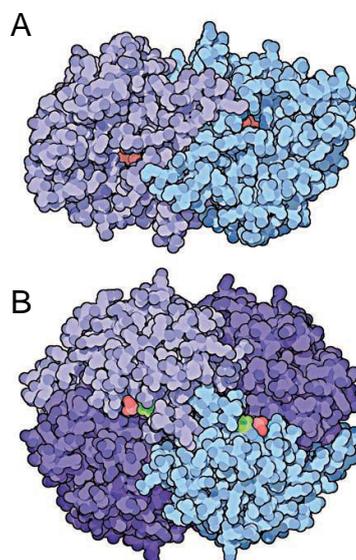
1.4. L-asparaginase

As células exigem um fornecimento constante do aminoácido asparagina para sintetizar proteínas. A maioria das células usa a asparagina sintetase, uma enzima composta de duas subunidades idênticas, para sintetizar a sua própria asparagina. Em humanos, esta enzima usa a glutamina para fornecer a amina e adicioná-la ao aspartato, formando o grupo amida característico da asparagina (Figura 1A) (GOODSELL, 2005). Entretanto, as células neoplásicas não podem sintetizar a L-

asparagina devido à ausência de L-asparagina sintetase. Estas células obtêm a asparagina necessária para o seu metabolismo do sangue.

A L-asparaginase (EC.3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase) catalisa a deaminação de L-asparagina em L-aspartato e amônia. A enzima bacteriana utilizada como tratamento para LLA é composta de quatro subunidades idênticas, um tetrâmero, que apresenta um sítio ativo capaz de ligar o substrato asparagina e usar um aminoácido treonina para realizar a reação de clivagem (Figura 1B). L-asparaginase também utiliza a glutamina como substrato, clivando o seu grupamento amina a uma taxa mais lenta, sendo esta determinada como a atividade glutaminase da enzima (GOODSELL, 2005). Esta enzima é amplamente distribuída na natureza, encontrada não só em microrganismos, mas também em plantas e tecidos de vários animais, como peixes, mamíferos e aves (fígado, pâncreas, cérebro, ovário ou testículos, rins, baço e pulmões). No entanto, os microrganismos são uma fonte mais importante de L-asparaginase do que animais ou plantas, considerando sua capacidade de crescer facilmente em substratos simples e baratos, podem ser cultivados facilmente e a extração e purificação de L-asparaginase a partir destes microrganismos são convenientes, possibilitando a produção em larga escala (ASTHANA; AZMI, 2003; LOPES; OLIVEIRA-NASCIMENTO; RIBEIRO; TAIRUM *et al.*, 2015).

Figura 1 - Asparagina sintetase (A) e asparaginase (B) de origem bacteriana com asparagina no sítio ativo (em vermelho) utilizando o aminoácido treonina (em verde) para realizar a reação de clivagem. Fonte: (GOODSELL, 2005)



As primeiras evidências da atividade inibitória tumoral de L-asparaginase foram descritas nas décadas de 50 e 60. Em 1953, Kidd et al. descreveram a ação inibitória do soro de porquinho-da-índia nas células de três linfomas transplantáveis de camundongos e ratos *in vivo* (KIDD, 1953a; b). Em 1961, Broome estudou a indução da resistência da linhagem celular tumoral 6C3HED crescidas em cultivo de tecido ao soro de porquinho-da-índia, e comparou diretamente a atividade de L-asparaginase em várias preparações de soro de porquinho-da-índia com suas propriedades inibitórias tumoral, evidenciando que a atividade L-asparaginase do soro de porquinho-da-índia é responsável pelo efeito anti-linfoma (BROOME, 1961). Como a identificação da enzima obtida pelo porquinho-da-Índia por trás da atividade da L-asparaginase se mostrou difícil, procurou-se enzimas de outra fonte (RIGOUIN; NGUYEN; SCHALK; LAVIE, 2017).

Os estudos da atividade L-asparaginase em microrganismos iniciaram quando Mashburn et al. em 1964 compararam os efeitos da asparaginase de *E. coli* e soro de porquinho-da-índia em dois tumores de camundongos, demonstrando que o tumor sensível ao soro é também inibido pela asparaginase de *E. coli* (MASHBURN; WRISTON, 1964). Em 1966, Roberts et al. isolaram asparaginase de *E. coli*, a qual foi capaz de causar regressão completa do linfoma Gardner 6C3HED em camundongos (ROBERTS; PRAGER; BACHYNSKY, 1966). No ano seguinte, Boyse et al. afirmaram que a L-asparaginase de *E. coli* é tão ativa quanto o soro do porquinho-da-índia contra leucemias sensíveis ao soro (BOYSE; OLD; CAMPBELL; MASHBURN, 1967).

Em 1966, Schwartz et al. descobriram que, dependendo das condições de crescimento, as células de *E. coli* podem expressar um ou dois tipos de asparaginase, devido a duas enzimas distintas expressas por *E. coli*, que diferem em várias propriedades, mais significativamente nas suas afinidades para a L-asparagina. A enzima com maior afinidade inibiu os linfomas em camundongos de forma relevante, enquanto a asparaginase com menor afinidade foi ineficaz, concluindo que a afinidade da asparaginase pelo seu substrato está relacionada ao seu grau de eficácia contra tumores sensíveis (SCHWARTZ; REEVES; BROOME, 1966). Embora seja amplamente distribuída na natureza, nem todas as fontes de L-asparaginase possuem atividade antitumoral. Atualmente, é sabido que *E. coli* pode expressar três L-asparaginases, conhecidas como tipo I, II e III, e que apenas a do tipo II possui a propriedade necessária para uso clínico capaz de esgotar a L-asparagina no sangue, ou seja, um K_M para L-asparagina na faixa micromolar baixa, cuja propriedade está

presente nas L-asparaginases de *E. coli* (K_M 15 μ M) e *E. chrysanthemi* (K_M 48 μ M) (NGUYEN; SU; LAVIE, 2016; RIGOUIN; NGUYEN; SCHALK; LAVIE, 2017).

A L-asparaginase II, eficaz contra o crescimento tumoral, é uma enzima localizada superficialmente, situada no espaço periplasmático entre a membrana plasmática bacteriana e a parede celular, não sendo liberada extracelularmente no meio de cultivo durante o crescimento normal (CEDAR; SCHWARTZ, 1967). O espaço periplasmático é um compartimento polivalente separado do citoplasma, cujo ambiente redutor distinto permite mecanismos mais eficientes e diversos de oxidação, dobramento e controle de qualidade de proteínas (MILLER; SALAMA, 2018). A estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas consiste em uma fina camada de peptidoglicano no espaço periplasmático entre as membranas lipídicas interna e externa, onde esta última contém lipopolissacarídeos (Figura 2). A estrutura da parede celular dos fungos é organizada em uma única membrana plasmática, cercada por uma parede celular que consiste de várias camadas dos polissacarídeos quitina, β -glucana e manana (na forma de manoproteínas) (BROWN; WOLF; PRADOS-ROSALES; CASADEVALL, 2015; CASADEVALL; NOSANCHUK; WILLIAMSON; RODRIGUES, 2009) (Figura 3). Dunlop et al. e Ferrara et al. relataram a presença de L-asparaginase II, uma glicoproteína da parede celular localizada no espaço periplasmático, a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja atividade foi mensurada pela reação de hidroxilaminólise (DUNLOP; MEYER; ROON, 1980; FERRARA; SEVERINO; VALENTE; PERALES *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas (A) e fungos (B). Fonte: (BROWN; WOLF; PRADOS-ROSALES; CASADEVALL, 2015)

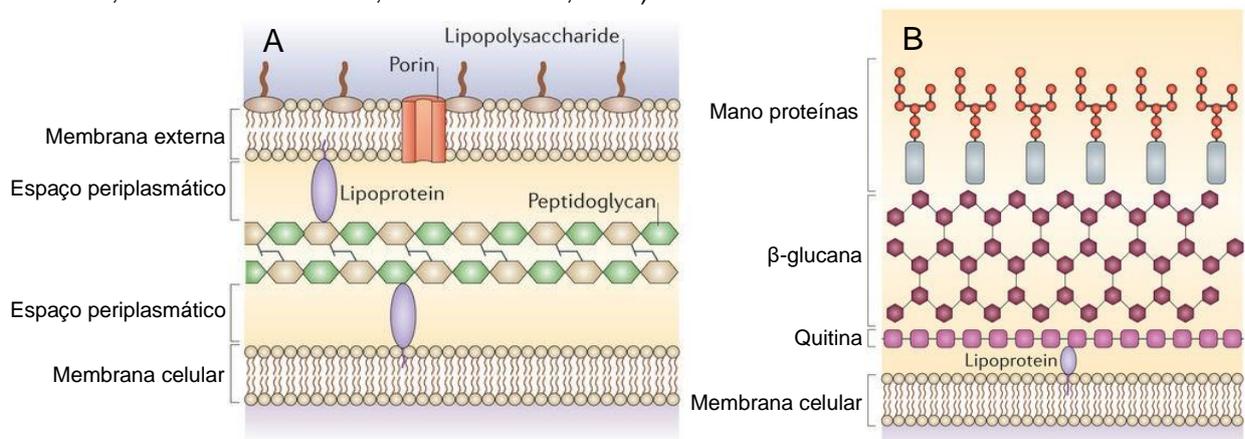
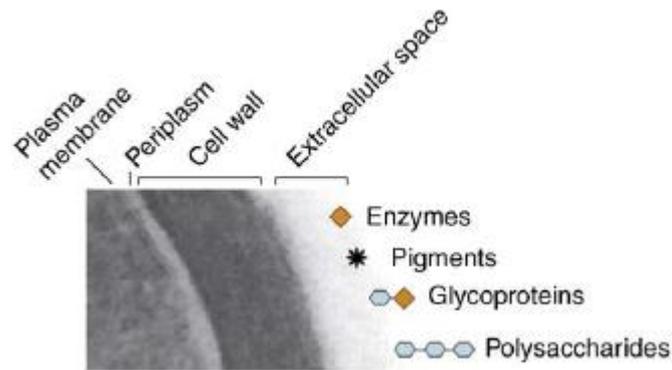


Figura 3 - Parede celular dos fungos. Fonte: (CASADEVALL; NOSANCHUK; WILLIAMSON; RODRIGUES, 2009)



A L-asparaginase tem sido utilizada na clínica desde a década de 1960, administrada via endovenosa ou intramuscular, como um componente principal na terapia de LLA, quando reconheceu-se que uma dose única de asparaginase pode atingir a remissão por 60 dias em 65 % das crianças com LLA (PUI, 2012; RIZZARI; CONTER; STARY; COLOMBINI *et al.*, 2013). Níveis séricos de atividade da enzima asparaginase de mais de 0,1 UI/mL foram associados à depleção de asparagina sérica (NCI, 2020a). A L-asparaginase é um biofármaco, sendo produzida a partir de microrganismos. As formulações enzimáticas industrializadas incluem asparaginase bacteriana nativa de *Escherichia coli*, comercializadas como: Crasnitin® da Bayer, Elspar® da Ovation Pharmaceuticals, Kidrolase® da EUSA Pharma, Leunase® da Sanofi-Aventis e Asparaginase medac® da Kyowa Hakko; asparaginase derivada de *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspase), nomeada de Erwinase® da EUSA Pharma (PIETERS; HUNGER; BOOS; RIZZARI *et al.*, 2011); asparaginase recombinante de *E. coli* comercializada como Spectrila® fabricada por Rentschler Biopharma SE (Laupheim, Alemanha) e importada e registrada por Laboratórios Bagó do Brasil S/A; asparaginase peguilada (pegaspargase, Peg-asparaginase), L-asparaginase derivada de *E. coli* conjugada covalentemente com monometoxipropilenoglicol sob nome comercial Oncaspar® fabricada por Exelead, Inc. (Indianapolis, Estados Unidos da América) e importada e registrada por Laboratórios Servier do Brasil Ltda.; e Calaspargase Pegol-mknl, aprovada em dezembro de 2018 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), cuja formulação é semelhante em estrutura à pegaspargase, exceto com um ligante diferente entre a enzima L-asparaginase e a porção polietilenoglicol (PEG), resultando em uma meia-vida mais longa (LI; JIN; LIU; CAO *et al.*, 2020).

As principais toxicidades associadas ao uso de asparaginase estão relacionadas à sua inibição da síntese proteica e mecanismos de hipersensibilidade, em que esta ocorre em aproximadamente 5-50% dos pacientes tratados em vários ensaios clínicos (KEATING; HOLMES; LERNER; HO, 1993). As manifestações clínicas das reações de hipersensibilidade incluem anafilaxia; reações alérgicas; edema; doença do soro; broncoespasmo; urticária e erupção cutânea; prurido e inchaço das extremidades; eritema - local ou generalizado; outras reações clinicamente relacionadas. Outras toxicidades incluem toxicidade de órgãos, pancreatite e hiperglicemia relacionada, glicosuria, cetoacidose, disfunção hepática, disfunção cerebral, síntese protéica diminuída, hipoalbuminemia, hipofibrinonemia, estado hipercoagulável – coagulopatias e alteração de fatores de coagulação (antitrombina III) (AVRAMIS, 2012).

Esses problemas podem ser abordados, em parte, escondendo a enzima do sistema imunológico, cobrindo-a com uma camada de moléculas neutras de PEG (GOODSELL, 2005). A modificação da enzima com uma ligação covalente de PEG está menos propensa a causar a formação de anticorpos, com meia-vida prolongada, se tornando menos imunogênica que as asparaginases de *E. coli* e *Erwinia* (KEATING; HOLMES; LERNER; HO, 1993). Sua posologia recomendada em bula é de 2500 U de pegaspargase (equivalentes a 3,3 mL de Oncaspar)/m² de área de superfície corpórea a cada 14 dias em pacientes com área de superfície corpórea ≥ 0,6 m² e com idade menor ou igual a 21 anos e 82,5 U de pegaspargase (equivalentes a 0,1 mL de Oncaspar)/kg de peso corpóreo a cada 14 dias em crianças com área de superfície corpórea < 0,6 m². A posologia recomendada em adultos com idade superior a 21 anos é de 2000 U de pegaspargase (equivalente a 2,67 mL de Oncaspar)/m² área de superfície corpórea a cada 14 dias. Entretanto, algumas reações adversas graves são descritas na bula do medicamento, que incluem: anafilaxia e reações graves de hipersensibilidade, trombose grave, pancreatite, intolerância a glicose, coagulopatia, hepatotoxicidade e função hepática anormal, efeitos no sistema nervoso central, mielossupressão e hiperamonemia (SERVIER, 2020).

Embora a peguilação da asparaginase estenda sua meia-vida biológica, ela pode ser responsável pela alta incidência de hiperamonemia sintomática em crianças com LLA recebendo PEG-asparaginase devido à superprodução de amônia por hidrólise de asparagina e glutamina no plasma (HEITINK-POLLE; PRINSEN; DE

KONING; VAN HASSELT *et al.*, 2013). Um ensaio clínico randomizado comparou a toxicidade e eficácia relativas de PEG-asparaginase intravenosa (15 doses de 2.500 UI/m² a cada duas semanas) e L-asparaginase nativa de *E. coli* intramuscular (30 doses de 25.000 UI/m² semanalmente) em crianças com LLA recém-diagnosticada. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,06$) quanto a frequência geral de toxicidades relacionadas à asparaginase entre os pacientes no grupo de PEG-asparaginase intravenosa (65/232 pacientes [28 %]) e os pacientes no grupo L-asparaginase de *E. coli* intramuscular (59/231 pacientes [26 %]) ou na frequência individual de alergia ($p = 0,36$), pancreatite ($p = 0,55$) ou complicações trombóticas ou hemorrágicas ($p = 0,26$). Os eventos adversos mais comuns de grau 3 ou piores foram infecções bacterianas ou fúngicas (47/232 pacientes [20 %] no grupo de PEG-asparaginase intravenosa vs 51/231 pacientes [22 %] no grupo de L-asparaginase *E. coli* intramuscular) e reações alérgicas relacionadas a L-asparaginase (14 [6 %] vs 6 [3 %]). A sobrevida livre de doença em 5 anos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,58$) entre os pacientes designados para PEG-asparaginase intravenosa (90 %, IC95 % 86-94) e aqueles designados para L-asparaginase de *E. coli* intramuscular (89 %, IC95 % 85-93). Ansiedade foi significativamente mais relatada pelos pacientes e pais no grupo L-asparaginase nativa de *E. coli* intramuscular do que no grupo PEG-asparaginase intravenoso (PLACE; STEVENSON; VROOMAN; HARRIS *et al.*, 2015).

A L-asparaginase de *Erwinia* é normalmente usada em pacientes que tiveram alergia a L-asparaginase de *E. coli* nativa ou peguilada (NCI, 2020a). Entretanto, a meia-vida da L-asparaginase de *Erwinia* (0,65 dias) é muito menor do que a da *E. coli* nativa (1,2 dias) ou da peguilada (5,7 dias) (ASSELIN; WHITIN; COPPOLA; RUPP *et al.*, 1993). Portanto, a meia-vida mais curta da preparação de *Erwinia* requer uma administração mais frequente para atingir depleção de asparagina adequada (NCI, 2020a). Ainda assim, efeitos adversos foram relatados com o uso da L-asparaginase de *Erwinia*. Ao avaliar a incidência e características clínicas de reações anafilactóides da asparaginase intravenosa em crianças com leucemia e linfoma, Evans *et al.* revelaram que 14,8 % dos pacientes (29/196) que receberam asparaginase de *E. coli* apresentaram uma reação anafilactóide enquanto 14 % dos pacientes (7/49) que receberam asparaginase de *Erwinia* apresentaram uma reação anafilactóide (EVANS; TSIATIS; RIVERA; MURPHY *et al.*, 1982). Adicionalmente, a formação de anticorpos anti-*Erwinia* asparaginase e a alteração subsequente da farmacocinética da

asparaginase de *Erwinia* durante terapia intravenosa e intramuscular foi reportada (ALBERTSEN; SCHRODER; JAKOBSEN; AVRAMIS *et al.*, 2002).

Outro fator que contribui para os efeitos colaterais tóxicos associados à asparaginase é a atividade da glutaminase. A atividade glutaminase da L-asparaginase pode causar efeitos adversos como reação alérgica, pancreatite, anormalidades na coagulação, alcalose respiratória, hiperglicemia, náusea e vômito (CACHUMBA; ANTUNES; PERES; BRUMANO *et al.*, 2016; WARRELL; CHOU; GORDON; TAN *et al.*, 1980). A atividade da glutaminase demonstrou ser importante para o tratamento eficaz em linhas leucêmicas que expressam asparagina sintetase, enquanto que apenas a atividade L-asparaginase seria necessária para a linha que não expressa asparagina sintetase (CHAN; LORENZI; ANISHKIN; PURWAHA *et al.*, 2014). Certos aminoácidos não essenciais, como L-glutamina (Gln) e L-asparagina (Asn), que são necessários para a função neuronal e sobrevivência de células malignas, estão em grande demanda para a biossíntese de proteínas e como fontes de carbono e nitrogênio em condições altamente proliferativas (AVRAMIS, 2012). Além disso, certas células do corpo podem ser sensíveis a uma deficiência de glutamina como ação da glutaminase, portanto a presença de glutaminase destrói a glutamina necessária para o crescimento das células normais (GREENBERG; BLUMENTHAL; RAMADAN, 1964). Entre as formulações de asparaginase relatadas, existem asparaginases com atividade de glutaminase não detectada, outras com atividade baixa a moderada e outras com atividades de glutaminase aumentadas. Das três asparaginases licenciadas pelo FDA dos EUA, todas elas produtos de fermentação, as asparaginases de *E. coli* têm atividade de glutaminase relativamente baixa, enquanto as asparaginase de *Erwinia* têm uma porção de glutaminase mais alta, aproximadamente 10 vezes maior que a de *E. coli* e, portanto, K_M e V_{MAX} mais favoráveis à desaminação da glutamina (AVRAMIS, 2012). Hiperamonemia (grau 3/4) foi encontrada apenas em pacientes tratados com *Erwinia* asparaginase (9 %) e em nenhum dos pacientes tratados com PEG-asparaginase em um estudo prospectivo acerca da incidência e o curso clínico de eventos adversos durante o uso muito prolongado de asparaginase em relação aos níveis de atividade da asparaginase em crianças com LLA (TONG; PIETERS; DE GROOT-KRUSEMAN; HOP *et al.*, 2014), o que está relacionado com a atividade de glutaminase da asparaginase de *Erwinia*. Adicionalmente, em níveis elevados, a glutamina é de fato um agente nocivo, pois grande parte da glutamina recentemente sintetizada é subsequentemente

metabolizada na mitocôndria pela glutaminase ativada por fosfato, produzindo glutamato e amônia. Dessa forma, a glutamina é transportada em excesso do citoplasma para a mitocôndria, servindo como um transportador de amônia, a qual interfere na função mitocondrial dando origem à produção excessiva de radicais livres e indução da transição de permeabilidade mitocondrial, dois fenômenos conhecidos por causar disfunção dos astrócitos, incluindo o inchaço celular (ALBRECHT; NOREMBERG, 2006). Uma vez que vários relatos sugerem que a depleção de glutamina se correlaciona com muitos dos efeitos colaterais desses biofármacos, variantes enzimáticas com coatividade reduzida de glutaminase podem ser clinicamente benéficas se sua atividade antileucêmica for preservada (NGUYEN; SU; ZHANG; ANTANASIJEVIC *et al.*, 2018).

Na busca de novas fontes microbianas de L-asparaginase, os fatores significativos para o uso bem-sucedido da enzima incluem alta afinidade para seu substrato asparagina, menos efeitos colaterais, nenhuma reação imunológica e depuração plasmática lenta (meia-vida prolongada) para minimizar a frequência de administração (SOUZA; DE FREITAS; CARDOSO; PESSOA *et al.*, 2017). A busca de outras fontes de asparaginase como organismos eucarióticos pode levar a uma enzima com menos efeitos adversos (SARQUIS; OLIVEIRA; SANTOS; COSTA, 2004). Devido à sua natureza eucariótica, as espécies de fungos têm a capacidade de replicar os efeitos das células humanas e podem ser usadas no tratamento do câncer com melhor sucesso do que outros microrganismos (ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI *et al.*, 2019).

As versões das L-asparaginases humanas do tipo selvagem conhecidas não são substitutos adequados para as enzimas bacterianas usadas clinicamente, pois possuem um valor de K_M muito alto para L-asparagina (RIGOUIN; NGUYEN; SCHALK; LAVIE, 2017). Cantor *et al.* (2009) observaram que o perfil de atividade da proteína 1 do tipo asparaginase humana (hASRGL1) é muito semelhante ao das enzimas designadas como isoaspartil aminopeptidases com atividade secundária de L-asparaginase, classificadas como a família de β -aspartil peptidase (EC 3.4.19.5), cujo conjunto de enzimas exibe K_M de L-asparagina na faixa milimolar (CANTOR; STONE; CHANTRANUPONG; GEORGIU, 2009). A enzima deve ter um K_M de L-asparagina na faixa micromolar para ser clinicamente relevante, tendo em vista que a concentração fisiológica de L-asparagina no sangue é em média 50 μM (OLLENSCHLÄGER; ROTH; LINKESCH; JANSEN *et al.*, 1988).

Além da utilização como medicamento antitumoral, a aplicação da asparaginase fornece um possível método alternativo para mitigação de acrilamida que deve ter um efeito muito limitado na formação geral de produtos Maillard. A asparaginase pode reduzir seletivamente o nível de asparagina livre removendo especificamente um dos precursores essenciais de acrilamida. A via predominante de formação da acrilamida é através da reação de Maillard entre o aminoácido asparagina e os açúcares redutores. O escurecimento não enzimático geralmente ocorre em temperaturas acima de 100°C e são responsáveis pela coloração e desenvolvimento de sabor de alimentos fritos e cozidos (HENDRIKSEN; KORNBRUST; OSTERGAARD; STRINGER, 2009). Comercialmente, existem duas preparações de asparaginase derivadas de fungos usadas pela indústria de alimentos: PreventASe® foi lançado em 2007 pela DSM (Heerlen, Holanda) e é uma forma recombinante da enzima derivada de *Aspergillus niger*; Acrylaway® é o nome comercial de uma asparaginase nativa obtida de *Aspergillus oryzae* e é fabricada pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca) (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

1.5. L-asparaginase no mercado brasileiro

Algumas formulações de asparaginases industrializadas foram descontinuadas, enquanto outras não estão disponíveis em todos os países, tornando a produção desta enzima importante para atender a demanda nacional de medicamentos utilizados como tratamento para LLA. No Brasil, a L-asparaginase fez parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) como outros agentes citotóxicos, classificados em Medicamentos utilizados no manejo das neoplasias até 2010, porém não consta nas relações de 2013 até 2020 (BRASIL, 2020b).

Em Nota Informativa Conjunta e nota oficial divulgada no site Portal Da Saúde, o Ministério da Saúde (MS) esclareceu que até 2012 a L-asparaginase era comprada pelos serviços do Sistema Único de Saúde (SUS) habilitados em oncologia. A empresa fornecedora do medicamento, Laboratórios Bagó do Brasil S/A, detinha os direitos de comercialização do produto Elspar da empresa Merck Sharp & Dohme Farmaceutica LTDA (número de registro 100290146, vencimento em 05/2012), porém em 2011 esta transferiu a tecnologia de produção para a empresa Lundbeck INC, que, por sua vez terceirizou a produção para a Oso Biopharmaceutical. Em agosto de 2012,

esta empresa anunciou que suspenderia a produção da L-asparaginase Elspar (número de registro 156260015, vencimento em 09/2013). Na época, o medicamento estava na lista dos antineoplásicos que são comprados centralizadamente pelo MS e distribuídos aos hospitais por meio das secretarias estaduais de saúde.

Em 2013, o MS, em parceria com a Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, assumiu a compra do medicamento após a distribuidora brasileira ter comunicado ao governo que a fabricação por empresa internacional havia sido interrompida. Foram investidos R\$ 17,6 milhões na compra de 52.300 frascos para suprir toda a demanda nacional pelo tratamento por um ano (BRASIL, 2013). Em 2013 e 2014 o MS adquiriu a L-asparaginase Aginasa®, produzida pela Medac Alemanha representada no Brasil pelos Laboratórios Bagó do Brasil S/A, a qual não possuía registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) devido à indeferimento desta pela ausência de estudos clínicos para demonstração de segurança e eficácia. Diante da indisponibilidade do medicamento no mercado brasileiro e do risco de desabastecimento, o MS importou a L-asparaginase conforme determina a legislação nacional para atender a uma demanda emergencial de seis meses (BRASIL, 2018b). Na ausência de uma empresa com registro no Brasil, em abril de 2016, uma cotação internacional foi realizada, conforme a legislação, para a aquisição emergencial do medicamento. A empresa Xetley, representante legal no Brasil do laboratório chinês Beijing S L Pharmaceutical Co, venceu a licitação ao oferecer menor preço do medicamento Leuginase, pois apresentou um valor 34,21 % inferior ao da última aquisição conforme lei de licitações (BRASIL, 2017a; b). Até 2017 o MS repassava mensalmente um valor médio da quimioterapia dos pacientes com LLA, que dura cerca de três anos.

Em janeiro de 2018 foi anunciado um novo modelo: a responsabilidade de compra do medicamento retornaria aos hospitais oncológicos. O pagamento é correspondente a cada etapa desse tratamento dividido por fases (indução, consolidação, intensificação e manutenção), em geral mais caro nas fases iniciais. Tendo em vista que o cálculo leva em conta o valor dos medicamentos utilizados e o custo do atendimento realizado, esse é compatível com o preço registrado da Peg-asparaginase, que foi aprovada para registro na Anvisa e precificação pela Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos no segundo semestre de 2017 (BRASIL, 2018a; MS, 2017). Cada ampola de Pegaspargase (750 U/mL, frasco de 5 mL) custa R\$ 5.387,83 (BRASIL, 2020a). As formulações que atualmente possuem registro

válido no Brasil pela Anvisa são a asparaginase Spectrila (Laboratórios Bagó do Brasil S/A, número de registro 156260031, vencimento em 01/2029) e pegaspargase Oncaspar (Laboratórios Servier do Brasil LTDA, número de registro 112780076, vencimento em 06/2027).

Tendo em vista o exposto acima, este trabalho tem como objetivo o estudo da produção e purificação de L-asparaginase a partir de fungos filamentosos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro como uma alternativa às asparaginase bacterianas. A produção dessa enzima a partir de espécies derivadas desse *hotspot* global de biodiversidade pode reduzir potencialmente os efeitos colaterais em pacientes devido à sua origem eucariótica e baixa atividade da glutaminase. Assim, a identificação de novas fontes dessa proteína de importância para a sociedade, para uso na área da saúde como melhoraria no tratamento de pacientes, leva a um avanço nas aplicações terapêuticas.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de diferentes amostras do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, frente à produção da enzima L-asparaginase. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) Realizar a triagem qualitativa em meio sólido para a produção de L-asparaginase dos fungos isolados do solo e fungos endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro;
- b) Realizar a triagem quantitativa em cultivo submerso para a produção de L-asparaginase dos fungos isolados do solo e fungos endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro;
- c) Otimizar a produção em meio líquido utilizando planejamento estatístico;
- d) Purificar a L-asparaginase do fungo selecionado como melhor produtor;
- e) Identificar o gene da L-asparaginase do fungo selecionado: extrair e manipular o DNA genômico e amplificar as regiões do DNA ribossômico; e
- f) Clonar o gene da L-asparaginase do fungo selecionado a partir do DNA genômico por técnicas moleculares e analisar a sequência, bem como obter esses genes sintéticos com códons otimizados para expressão na levedura *Komagataella phaffii*.

CAPÍTULO II

Processamento *upstream* da L-asparaginase

1. INTRODUÇÃO

O reino fungi é constituído de fungos, organismos eucariotos, heterotróficos unicelulares (leveduras) ou pluricelulares. Diferentes fungos produzem L-asparaginase, que possui potencial no tratamento da leucemia. Para isto, as condições de crescimento precisam ser otimizadas para melhorar o rendimento da enzima, a atividade e a forma de expressão da L-asparaginase para reduzir as características hidrolíticas da L-glutamina (SOUZA; DE FREITAS; CARDOSO; PESSOA *et al.*, 2017). A produção de L-asparaginase por fungos é relatada na literatura principalmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Fungos produtores de L-asparaginase

(continua)

Cultivo	Espécie	Isolado	Autor
CS	<i>Aspergillus</i> sp. IBBLA3	solo/musgo antártico	(ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI <i>et al.</i> , 2019)
CS	<i>A. nidulans</i>	NI	(DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977)
FES	<i>A. niger</i>	NI	(MISHRA, 2006)
CS	<i>A. niger</i>	amostra de água	(AKILANDESWARI; KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012)
FES	<i>A. niger</i> C4	solo	(UPPULURI; DASARI; SAJJA; JACOB <i>et al.</i> , 2013)
FES	<i>A. niger</i> LBA 02	NI	(DIAS; DE CASTRO; OHARA; NISHIDE <i>et al.</i> , 2015)
CS	<i>A. niger</i> IBBLA2	solo/musgo antártico	(ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI <i>et al.</i> , 2019)
CS	<i>A. ochraceus</i>	NI	(YADAV; SARKAR, 2014)
CS	<i>A. oryzae</i> CCT 3940	NI	(DIAS; SATO, 2016)
CS	<i>A. terreus</i>	solo marinho	(BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012)
FES	<i>A. terreus</i>	solo	(SIDDALINGESHWARA; LINGAPPA, 2011)
CS	<i>A. terreus</i> MTCC 1782	NI	(BASKAR; RENGANATHAN, 2009a; 2012; BASKAR; SRIHARINI; SRIPRIYA; RENGANATHAN, 2010)
FES	<i>Cladosporium</i> sp.	NI	(MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013)
CS	<i>Coprinopsis cinerea</i> IBBLA4	solo/musgo antártico	(ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI <i>et al.</i> , 2019)
CS	<i>Coprinopsis</i> sp. IBBLA5	solo/musgo antártico	(ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI <i>et al.</i> , 2019)

Tabela 2 - Fungos produtores de L-asparaginase

(continuação)

Cultivo	Espécie	Isolado	Autor
NI	<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i> MB-10	solo	(RAHA; DEY; ROY; CHAUDHURI <i>et al.</i> , 1990)
CS	<i>Eurotium</i> sp.	rizomas de <i>Curcuma longa</i>	(JALGAONWALA; MAHAJAN, 2014)
NI	<i>Flammulina velutipes</i>	NI	(EISELE; LINKE; BITZER; NA'AMNIEH <i>et al.</i> , 2011)
NI	<i>Fusarium</i> sp.	talo de <i>Sargassum wightii</i>	(THIRUNAVUKKARASU; SURYANARAYANAN; MURALI; RAVISHANKAR <i>et al.</i> , 2011)
CS	<i>Fusarium</i> sp. (SMGR-F1)	folha de mamão <i>Carica papaya</i>	(KUMAR; SEDOLKAR; TRIVENI; KUMAR <i>et al.</i> , 2016)
CS	<i>F. culmorum</i>	solo tropical	(MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015)
FES	<i>F. equiseti</i>	NI	(HOSAMANI; KALIWAL, 2011)
FES	<i>F. moniliforme</i>	NI	(TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012)
CS	<i>F. oxysporum</i>	NI	(YADAV; SARKAR, 2014)
FES	<i>F. oxysporum</i>	NI	(CHANAKYA; NAGARJUN; SRIKANTH, 2011)
CS	<i>F. oxysporum</i> (MKS1)	plantas da Malásia	(CHOW; TING, 2015)
CS	<i>F. solani</i>	<i>Tinospora cordifolia</i> (Willd.)	(UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016)
NI	<i>F. tricinctum</i>	NI	(SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971)

Tabela 2 - Fungos produtores de L-asparaginase

Cultivo	Espécie	Isolado	Autor
NI	<i>Mucor sp.</i>	esponja marinha	(MOHAPATRA; BAPUJI; BANERJEE, 1997)
		<i>Spirastrella sp.</i>	
CS	<i>M. hiemalis</i>	solo	(THAKUR; LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2014)
CS	<i>P. brevicompactum</i> NRC 829	NI	(ELSHAFEI; HASSAN; ABOUZEID; MAHMOUD <i>et al.</i> , 2012)
CS	<i>P. citrinum</i>	NI	(YADAV; SARKAR, 2014)
CS	<i>P. cyclopium</i>	NI	(SHAFEI; EL-REFAI; MOSTAFA; EL-REFAI <i>et al.</i> , 2015)
CS	<i>P. digitatum</i>	NI	(SHRIVASTAVA; KHAN; SHRIVASTAV; JAIN <i>et al.</i> , 2012)
CS	<i>P. simplicissimum</i> (PBL13)	plantas da Malásia	(CHOW; TING, 2015)
CS	<i>Rhizopus sps</i>	NI	(YADAV; SARKAR, 2014)
CS	<i>Talaromyces pinophilus</i>	rizomas de plantas da família Zingiberaceae	(KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D., 2016)
NI	<i>Trichoderma viride</i> Pers: SF Grey	solo marinho	(LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015)
CS	<i>Trichosporon asahii</i> IBBLA1	solo/musgo antártico	(ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI <i>et al.</i> , 2019)

CS: cultivo submerso; FES: fermentação em estado sólido; NI: não informado

(conclusão)

Na Tabela 2 pode ser observado que os fungos produtores de L-asparaginase podem ser isolados de amostras de água, de plantas, do solo marinho e terrestre. O isolamento de fungos de ambientes extremos pode levar a um avanço importante em aplicações terapêuticas com menos efeitos colaterais, tendo em vista que seus mecanismos de adaptação incluem a secreção de proteínas específicas para sua proteção, atividade enzimática elevada em temperaturas extremas e seus sítios ativos são maiores e mais acessíveis aos substratos. Fungos produtores de L-asparaginase livre de glutaminase e urease foram isolados de locais extremos de solo e musgo antártico (ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI *et al.*, 2019). A produção de L-asparaginase por fungos filamentosos isolados no Brasil foi reportada (SARQUIS; OLIVEIRA; SANTOS; COSTA, 2004). A triagem de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase isolados do bioma Caatinga brasileira foi realizada, em que a espécie *Aspergillus terreus* S-18 foi selecionada por ter apresentado a melhor razão L-asparaginase/Glutaminase dentre as estirpes testadas, significando que a afinidade de L-asparaginase por asparagina foi maior do que por glutamina (DA ROCHA; COSTA-SILVA; AGAMEZ-MONTALVO; FEITOSA *et al.*, 2019).

O Cerrado é um *hotspot* de biodiversidade global (MYERS; MITTERMEIER; MITTERMEIER; DA FONSECA *et al.*, 2000). A vegetação tropical da Savana brasileira é chamada de Cerrado e cobre cerca de 2 milhões de km² no centro do Brasil, representando cerca de 23 % da superfície terrestre do país. Localizada no centro do Brasil com *outliers* em São Paulo e no Nordeste, a região contínua do Cerrado Brasileiro é formada por uma área núcleo que compreende quase a totalidade de Goiás, oeste da Bahia, oeste de Minas Gerais e todo o leste do Mato Grosso, com sua área geográfica centro próximo à cidade de Goiás Velho, a oeste de Brasília. O Cerrado possui temperatura média anual de 20-26°C. Temperaturas extremas variam de 14°C a 44°C. A precipitação média por ano varia de 750 a 2000 mm e a precipitação média do mês mais seco (julho ou agosto) durante a estação seca do Cerrado varia de 5-40 mm, com uma média de 10 a 30 mm (EITEN, 1972). O Cerrado abrange três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, contribuindo com 43 % das águas superficiais do Brasil fora a Amazônia (STRASSBURG; BROOKS; FELTRAN-BARBIERI; IRIBARREM *et al.*, 2017). Foi estimado que o Cerrado possui 160.000 espécies de plantas, fungos e animais, dos quais os grupos numericamente mais importantes são insetos (90.000 espécies), fungos (40.000 espécies) e angiospermas

(10.000 espécies) (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). Os fungos isolados das plantas e solo do Cerrado podem ser uma fonte de L-asparaginase.

A produção de L-asparaginase em microrganismos é regulada principalmente por fontes de carbono e nitrogênio, as quais são essenciais para produzir níveis máximos da enzima (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012). O metabolismo é o processo químico através do qual todos os processos da vida dos fungos são realizados, fornecendo duas funções gerais: as funções anabólicas, que alteram os nutrientes em componentes estruturais e funcionais do organismo; e as funções catabólicas, que extraem energia química ou elementos nutritivos, como N e S a partir de nutrientes complexos para fornecer energia e materiais para reações anabólicas (GRIFFIN, 1994). Os eventos metabólicos que são importantes para as funções dos fungos em cultura pura têm sido chamados de metabolismo primário. As enzimas e metabólitos do metabolismo primário estão distribuídos entre os fungos.

O metabolismo dos compostos de carbono fornece a estrutura básica dos metabólitos intermediários para biossínteses e fornece a energia metabólica necessária e a redução de energia. Carboidratos que produzem glicose são as fontes de carbono e energia mais abundantes e amplamente utilizadas pelos fungos; portanto, o metabolismo do carbono é visto principalmente como o metabolismo da glicose (GRIFFIN, 1994). O carbono é o principal componente estrutural e funcional das células microbianas e desempenha um papel importante na nutrição nos fungos. A fonte de carbono é necessária para toda a biossíntese que leva à reprodução, formação de produtos e manutenção celular. A produção do metabólito primário por microrganismos é altamente influenciada pelo seu crescimento, que é determinado pela disponibilidade dos nutrientes nos substratos (YADAV; SARKAR, 2014).

Os mecanismos reguladores do metabolismo do nitrogênio dependem se as reações consideradas são anabólicas ou catabólicas, nas quais o amônio é um ponto focal do metabolismo do nitrogênio. As reações assimilatórias que levam do suprimento de nutrientes ao amônio podem ser consideradas catabólicas; Aqueles que levam de amônio aos metabólitos primários finais de crescimento e desenvolvimento podem ser considerados anabólicos (GRIFFIN, 1994). Os fungos apresentam uma grande especificidade para a fonte de nitrogênio presente no meio de cultivo, a qual tem uma profunda influência no metabolismo de microrganismos. Assim como fonte de carbono, o nitrogênio também é usado tanto para fins funcionais quanto estruturais por fungos (YADAV; SARKAR, 2014).

A produção de L-asparaginase é dividida em processamento *upstream* e *downstream*. O processamento *upstream* é a transformação de substratos no produto. O desenvolvimento do processo *upstream* inclui a seleção da linha de células, meios de cultivo, parâmetros do cultivo (pH, temperatura, suprimento de oxigênio etc.), seleção do processo (cultivo submerso/estado sólido, batelada, batelada alimentada, contínuo etc.) e otimização. A seleção da linhagem celular constitui a base do desenvolvimento de bioprocessos (meio de cultivo, tipo de processo e seus parâmetros, estratégia de purificação etc.) e afeta a característica da enzima produzida, influenciando diretamente no perfil de qualidade do produto. Além das espécies microbianas utilizadas, os rendimentos de produção de L-asparaginase dependem das condições de cultivo. Assim, a identificação da composição ideal dos meios de cultura, temperatura, pH, níveis de oxigênio e outros fatores de cultivo é de suma importância (BRUMANO; DA SILVA; COSTA-SILVA; APOLINÁRIO *et al.*, 2019).

Este capítulo tem como objetivo o processamento *upstream* da L-asparaginase, que visa avaliar a produção desta enzima expressa por fungos isolados do solo e fungos endofíticos isolados das plantas do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro em diferentes condições de cultivo a fim de selecionar o fungo considerado melhor produtor de L-asparaginase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo de meios de cultivo e soluções

- Ágar batata dextrose (Himedia®) 39 g
 - Água destilada q.s.p. 1 L
 - Ampicilina (Sigma-Aldrich) 0,01 %

- Ágar Czapek Dox modificado (Gulati et al. 1997)
 - Glicose 0,2 %
 - L-asparagina/NaNO₃ 1 %
 - KH₂PO₄ 0,152 %
 - KCl 0,052 %
 - MgSO₄.7H₂O 0,052 %
 - CuNO₃.3H₂O traços
 - ZnSO₄.7H₂O traços
 - FeSO₄.7H₂O traços
 - Ágar 2 %
 - Água destilada q.s.p. 1 L
 - Vermelho de fenol em etanol (2,5 %) pH 7 360 µL
 - Ajustar pH para 6,2 com NaOH 1M

- Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Acumedia®) 65 g
 - Extrato de malte (Acumedia®) 2 %
 - Água destilada q.s.p. 1 L

- Meio de cultivo indutor do crescimento
 - Caldo batata dextrose (Acumedia®) 24 g
 - Extrato de levedura (Himedia®) 1 %
 - Água destilada q.s.p. 1 L

- Meio de cultivo Czapek Dox modificado (Baskar et al. 2012)
 - L-prolina (Sigma) 1,71 %
 - NaNO₃ 1,99 %

L-asparagina (Sigma)	1,38 %
Glicose	0,65 %
K ₂ HPO ₄	0,0152 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,052 %
KCl	0,052 %
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001%
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001%
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,001%
Água destilada q.s.p.	1 L
Ajustar pH para 6,5 com KOH 5M	

- Solução de cloreto férrico/TCA/HCl

Solução A: Solução de cloreto férrico

Cloreto férrico	10 g
Água ultrapurificada q.s.p.	100 mL

Solução B: Solução de HCl/TCA

Ácido clorídrico 37 %	5,45 mL
Ácido tricloroacético (TCA)	20 mL
Água ultrapurificada q.s.p.	100 mL

Misturar soluções A e B

- Solução de hidroxilamina 1M

Solução A: Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina 2 M

Cloridrato de hidroxilamina	27,8 g
Água destilada q.s.p.	200 mL

Solução B: Solução estoque de hidróxido de sódio 2 M

NaOH	40 g
Água destilada	500 mL

Solução de hidroxilamina 1 M: Misturar a solução A com solução B (1:1) ajustando o pH em 7.

- Solução de L-asparagina 100 mM

L-asparagina (Sigma)	0,33 g
Água destilada q.s.p.	25 mL

- Solução de glutamina 100 mM

Glutamina (Sigma)	0,73 g
Água destilada q.s.p.	50 mL

- Solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM

β -hidroxamato aspártico (Sigma)	7,40 mg
Água ultrapurificada q.s.p.	10 mL

- Solução Tris-HCl 50 mM pH 8,6

Tris base	6,06 g
Água destilada q.s.p.	1 L

pH da solução foi ajustado em 8,6 com HCl 37 %.

2.2. Isolamento de fungos do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro

2.2.1. Fungos filamentosos do solo

Amostras de solo foram coletadas em Brasília – DF, Brasil (Cerrado) em frascos esterilizados contendo 10 mL de solução salina autoclavada. O solo recolhido foi submetido à diluição seriada em salina estéril e uma alíquota de cada diluição de solo foi inoculada em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (PDA), suplementado com ampicilina 0,01 % e incubados em estufa a 28°C até seu crescimento, por no mínimo 7 dias. Os fungos crescidos em placa foram repicados em novas placas para purificação dos isolados e posteriormente armazenados em solução de glicerol a 10 % em ultrafreezer a -80°C para criopreservação.

As 22 espécies de fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro avaliadas foram identificadas (SIQUEIRA, 2010) e encontram-se depositadas na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho (Tabela 3).

Tabela 3 - Fungos isolados do solo do Cerrado Brasileiro

Estirpes fúngicas
<i>Aspergillus sp.</i> 2DCSS6
<i>Aspergillus sp.</i> DCFS1
<i>Aspergillus sp.</i> DCFS9
<i>Aspergillus sp.</i> RCFS17
<i>Fusarium sp.</i> DCFS10
<i>Fusarium sp.</i> RCFS3
<i>Mucor sp.</i> DCFTP7
<i>Penicillium sp.</i> 2DMGSE2
<i>Penicillium sp.</i> 2DSSSE1
<i>Penicillium sp.</i> 2DSST1
<i>Penicillium sp.</i> 2DSST10
<i>Penicillium sp.</i> 2RCSS1
<i>Penicillium sp.</i> DCFF2
<i>Penicillium sp.</i> DCFF4
<i>Penicillium sp.</i> DCFS6
<i>Penicillium sp.</i> DCFT2
<i>Penicillium sp.</i> DCFT5
<i>Penicillium sp.</i> RCFS24
<i>Penicillium sp.</i> RCFS6
<i>Penicillium sp.</i> RCFS7
<i>Penicillium sp.</i> RCFT14
<i>Trichoderma sp.</i> RCFS21

2.2.2. Fungos endofíticos

As folhas foram coletadas no Campus Universitário Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília - DF, Brasil, e arredores entre os meses de agosto a dezembro de 2014 por alunas de mestrado e em março de 2017 por aluna de iniciação científica do grupo de pesquisa (PEREIRA, 2016; WERNECK, 2016).

O procedimento de esterilização de superfície da folha iniciou-se com a lavagem em água corrente e detergente líquido, com cuidado para que o tecido não fosse rompido e, em seguida, cada folha foi imersa em etanol 70°GL por 60 segundos.

A seguir, as folhas foram imersas, em sequência, por 60, 90 e 180 segundos em três recipientes distintos contendo hipoclorito de sódio (teor de cloro ativo a 2 %), foram novamente mergulhadas em etanol 70 °GL por 60 segundos e lavadas por imersão com agitação por 30 segundos em três recipientes distintos contendo água destilada previamente autoclavada. O excesso de água foi retirado das folhas com ajuda de papel de filtro autoclavado. Uma amostra da última água de lavagem das folhas foi utilizada para o controle negativo de crescimento microbiano. A impressão da folha foi feita na placa de Petri para controle negativo de contaminação de superfície.

Fragmentos das folhas foram cortados com auxílio de uma tesoura autoclavada, e então foram depositados em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar Sabouraud dextrose. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 5 dias. Repiques das colônias isoladas foram retirados à medida que cresciam e inoculados em novas placas de Petri, sendo incubados a 30 °C por 7 dias (MESQUITA, 2011). Todo o processo de repique e inoculação dos fungos isolados foi realizado em uma câmara de fluxo laminar. Os fungos endofíticos isolados foram armazenados em solução de glicerol 10 % em ultrafreezer a -80°C para criopreservação. Estes foram ativados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e extrato de malte 2 % e incubados em estufa a 28°C até seu crescimento, por no mínimo 7 dias. Os fungos endofíticos isolados estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 - Nome científico das plantas, nome popular e código atribuído aos fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro.

Nome científico	Nome popular	Código fungos isolados
<i>Sapindus saponaria</i>	Fruta-de-sabão	BR
<i>Eugenia dysenterica</i>	Cagaita	CAG, CAG1, CAG2, CAG3
<i>Calophyllum brasiliense</i>	Jacareúba/Guanandi	CAM01, CB02
<i>Eriotheca pubescens</i>	Paineira-do-cerrado	EP01, EP03, EP04
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiabeira	GOI3
<i>Tabebuia ochracea</i>	Ipê Amarelo	IPE2; IPE3; IPE5
<i>Ouratea hexasperma</i>	Vassoura-de-bruxa	OH01; OH03
<i>Caryocar brasiliense</i>	Pequi	PEQ02
<i>Pouteria torta</i>	Abiurana	PT02

Fonte: (PEREIRA, 2016; WERNECK, 2016)

2.3. Triagem de fungos produtores de L-asparaginase

As triagens qualitativa, em meio sólido, e quantitativa, em cultivo submerso, foram realizadas para a produção de L-asparaginase dos fungos isolados do solo e fungos endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro.

2.3.1. Triagem semi-quantitativa em meio sólido

A triagem semi-quantitativa inicial de fungos produtores de L-asparaginase foi realizada segundo Gulati *et al.* (1997) (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997). É geralmente observado que a produção de L-asparaginase é acompanhada por um aumento no pH dos filtrados do cultivo justificado pela quebra da L-asparagina liberando ácido aspártico e amônia, que alcaliniza o meio. O ensaio em meio sólido utiliza este princípio incorporando o indicador de pH vermelho de fenol em meio Czapek Dox modificado contendo L-asparagina como única fonte de nitrogênio nas placas teste, e esta é substituída por nitrato de sódio nas placas controle. O vermelho de fenol fica amarelo em pH ácido e em pH alcalino fica rosa, portanto, sugere-se que a região rosa formada ao redor do disco micelial inoculado esteja relacionada à produção de asparaginase pelo fungo.

O meio de cultivo Czapek Dox modificado (MCDM), pH 6,2, contém: 2 g/L glicose; 10 g/L L-asparagina; 1,52 g/L KH_2PO_4 ; 0,52 g/L KCl; 0,52 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; traços de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 g/L ágar. O meio foi suplementado (0,009 %) com solução estoque de vermelho de fenol (2,5 %) em etanol. As placas controle foram preparadas conforme descrito anteriormente, substituindo a L-asparagina por nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e vertidos em placas de Petri (20 mL).

Os isolados de fungos da coleção de cultura conservados em solução glicerol 10 % armazenados a -80°C foram ativados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose suplementado com ampicilina 0,01 % - fungos filamentosos do solo - e ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e extrato de malte 2 % - fungos endofíticos - e mantidos em estufa a 28°C até seu crescimento, por no mínimo 7 dias. Um disco de 8 mm do micélio de cada isolado foi transferido para uma placa de Petri contendo o ágar Czapek Dox modificado contendo L-asparagina e para uma placa controle contendo nitrato de sódio. As placas foram incubadas a 28°C e registros fotográficos

foram tomados após 48 horas de incubação. O diâmetro da colônia e o diâmetro da zona avermelhada, caso presentes, para todos os organismos de teste foram calculados medindo o diâmetro interno e externo referente ao crescimento e hidrólise do substrato dos microrganismos, respectivamente. O índice de zona foi calculado como a razão entre o diâmetro externo e o interno, conforme mostrado na Equação 1.

$$\text{Índice de zona} = \frac{\text{diâmetro da zona}}{\text{diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

2.3.2. Triagem quantitativa em cultivo submerso

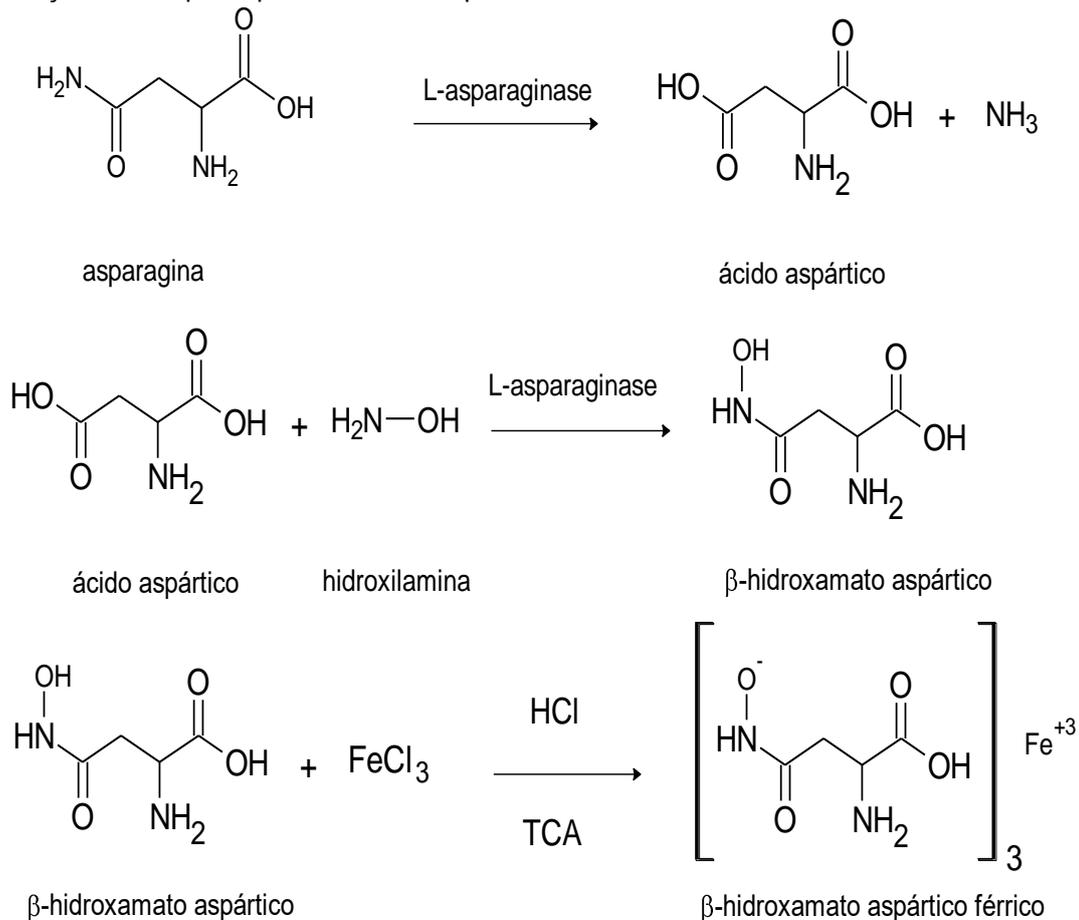
Um disco micelial de 8 mm de diâmetro dos fungos filamentosos isolados do solo e endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo indutor do crescimento (IC) - caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 % - autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 3 dias, segundo a metodologia utilizada por este grupo de pesquisa (ALMEIDA, 2015).

Após a incubação, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato em condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo. As biomassas foram transferidas separadamente para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado descrito por Baskar et al. (2012) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012) (L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 %; pH ajustado em 6,5 com KOH 5M, relação C:N 2,0) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 5 dias. Após a incubação, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro em funil de Büchner acoplado a um Kitassato em condição de baixa pressão criada por bomba de vácuo, o sobrenadante foi descartado e as biomassas foram congeladas a -20°C até pesagem das amostras para a realização do ensaio.

2.3.3. Quantificação da atividade de L-asparaginase pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico em biomassa

A atividade catalítica normal da asparaginase é hidrolisar a L-asparagina, produzindo aspartato e NH_3 . Esta enzima também decompõe o DL-ácido aspártico β -hidroxamato (um análogo tóxico da asparagina) *in vitro* produzindo L-aspartato e hidroxilamina e catalisando a formação de aspartato hidroxamato a partir de asparagina e hidroxilamina (DRAINAS; PATEMAN, 1977). Portanto, a atividade de L-asparaginase pode ser determinada pela quantificação do β -hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminólise efetuada também pela enzima na presença de hidroxilamina, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Mecanismo de reação da asparagina com hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β -hidroxamato aspártico férrico



A quantificação de L-asparaginase foi determinada no micélio pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico descrito por Drainas et al. (1977) (DRAINAS;

KINGHORN; PATEMAN, 1977) com modificações. As amostras de micélio (0,1 g) foram pesadas em balança analítica de precisão (Shimadzu) dentro de tubos cônicos de centrífuga de 5 mL, em duplicata, e foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina 100 mM e 0,2 mL de solução de hidroxilamina 1 M pH 7,0. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos a 200 rpm. Foi adicionado 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl e as amostras foram então centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 9.330 x g. O sobrenadante (1 mL) foi transferido para cubeta e a absorbância foi mensurada a 500 nm em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu).

O branco das amostras foi preparado conforme descrito para as amostras com a finalidade de eliminar a absorbância da coloração da amostra. Micélio (0,1 g) e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 foram incubados a 37°C por 30 minutos a 200 rpm. Os volumes de L-asparagina (0,2 mL) e solução de hidroxilamina (0,2 mL) foram substituídos por solução tampão.

2.3.4. Construção da curva padrão de β -hidroxamato aspártico em cubeta

A curva padrão foi construída através de diferentes concentrações da solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 e o reagente colorimétrico cloreto férrico/TCA/HCl utilizados no ensaio enzimático da L-asparaginase, preparados em tubos de centrífuga de 5 mL, em triplicata, conforme a Tabela 5. As misturas de soluções (1 mL) foram transferidas para cubetas e suas absorbâncias foram mensuradas em um espectrofotômetro.

Tabela 5 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva

Solução padrão	β -hidroxamato aspártico (μmol)	β -hidroxamato aspártico 5 mM (μL)	Tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0	0	2,00	0,5
Padrão 1	0,1	20	1,98	0,5
Padrão 2	0,25	50	1,95	0,5
Padrão 3	0,50	100	1,90	0,5
Padrão 4	0,75	150	1,85	0,5
Padrão 5	1,0	200	1,80	0,5
Padrão 6	1,5	300	1,70	0,5
Padrão 7	2,0	400	1,60	0,5
Padrão 8	3,0	600	1,40	0,5

A reação entre o β -hidroxamato aspártico produzido e o FeCl_3 produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de β -hidroxamato aspártico (μmol) é calculada a partir da absorbância obtida das amostras aplicada na equação da reta construída através da curva padrão, a quantidade de amostra utilizada e o tempo de reação do ensaio enzimático (30 minutos) segundo a Equação 2.

$$\frac{U}{g} \text{ de Lasparaginase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{massa da amostra}) \times (\text{tempo de reação})} \right] \quad (2)$$

Todas as análises enzimáticas na biomassa foram realizadas em duplicatas para cada experimento e os resultados são apresentados como distribuição de atividades enzimáticas para cada isolado. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxamato de ácido L-aspártico por minuto por grama de célula.

2.4. Triagem de fungos produtores de glutaminase

A partir da triagem realizada com fungos filamentosos isolados do solo e endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, as espécies que produziram os maiores teores de L-asparaginase através do ensaio quantitativo pelo

método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico - *Mucor sp.* DCFTP7, *Penicillium sp.* RCFT14, *Fusarium sp.* DCFS10, *Penicillium sp.* DCFS6, *Aspergillus sp.* DCFS1 e *Penicillium sp.* 2DSST1 – foram avaliadas quanto à atividade de glutaminase.

Um disco micelial de 8 mm de diâmetro das espécies selecionadas foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado descrito por Baskar et al. (2012) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012) suplementado com o meio de cultivo indutor do crescimento (L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 %; caldo batata dextrose 2,4 %; extrato de levedura 1 %; pH ajustado em 6,5 com KOH 5M) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 5 dias. Após a incubação, as culturas foram filtradas conforme descrito anteriormente e as biomassas foram congeladas a -20°C até pesagem das amostras para a realização do ensaio.

2.4.1. Quantificação da atividade de glutaminase pelo método do ácido γ -hidroxamato glutâmico

A atividade de glutaminase pode ser quantificada pela formação do correspondente γ -hidroxamato glutâmico.

As amostras de micélio (0,1 g) foram pesadas em balança analítica de precisão (Shimadzu) dentro de tubos cônicos de centrífuga de 5 mL, em duplicata, e foram adicionados 1,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de glutamina 100 mM e 0,2 mL de solução de hidroxilamina 1 M pH 7,0. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos a 200 rpm. Foi adicionada 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl e as amostras foram então centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 9.330 x g. O sobrenadante (1 mL) foi transferido para cubeta e a absorbância foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu).

O branco das amostras foi preparado conforme descrito para as amostras com a finalidade de eliminar a absorbância da coloração da amostra. Micélio (0,1 g) e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 foram incubados a 37°C por 30 minutos a 200 rpm. O volume de glutamina (0,2 mL) e solução de hidroxilamina (0,2 mL) foram substituídos por tampão. A atividade de L-asparaginase foi determinada nos mesmos cultivos para

fins comparativos pela quantificação do β -hidroxamato aspártico conforme descrito anteriormente.

Segundo o reportado por Ramakrishnan e Joseph em 1996, a atividade de glutaminase da asparaginase em presença de glutamina e hidroxilamina produz o hidroxamato correspondente, que em reação com o cloreto férrico em meio ácido produz um composto de cor roxa que absorve num comprimento de onda de 540 nm (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996). A quantidade de γ -hidroxamato glutâmico (μmol) é calculada a partir da absorbância obtida das amostras aplicada na equação da reta construída através da curva padrão, a quantidade de amostra utilizada e o tempo de reação do ensaio enzimático (30 minutos) segundo a Equação 3.

$$\frac{U}{g} \text{ de glutaminase} = \left[\frac{(\mu\text{mol de } \gamma\text{-hidroxamato glutâmico})}{(\text{volume de amostra}) \times (\text{tempo de reação})} \right] \quad (3)$$

Uma unidade de glutaminase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de γ -hidroxamato de ácido glutâmico por minuto por grama de célula. A significância estatística foi determinada pelo teste t não pareado, com alfa = 0,05. Cada isolado fúngico foi analisado individualmente usando o software GraphPad Prism v.5.01 para avaliar diferenças significativas entre os níveis de atividade da L-asparaginase e da glutaminase.

2.5. Avaliação dos cultivos com e sem pré-inóculo

A partir da triagem realizada com fungos filamentosos isolados do solo e endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, as espécies selecionadas com os maiores níveis de atividade de L-asparaginase com menores valores da atividade de glutaminase através dos ensaios quantitativos pelos métodos do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico e ácido γ -hidroxamato glutâmico, respectivamente – *Fusarium sp.* DCFS10, *Penicillium sp.* 2DSST1 e DCFS6 e *Mucor sp.* DCFTP7 – foram avaliadas quanto à produção de L-asparaginase quando os meios de cultivo indutor do crescimento (caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 %) e Czapek Dox modificado foram combinados.

Um disco micelial de 8 mm de diâmetro dos isolados selecionados foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo

Czapek Dox modificado descrito por Baskar et al. (2012) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012) suplementado com o meio de cultivo indutor do crescimento (L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 %; caldo batata dextrose 2,4 %; extrato de levedura 1 %; pH ajustado em 6,5 com KOH 5M) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 5 dias. Paralelamente, um disco micelial de 8 mm de diâmetro dos isolados selecionados foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo indutor do crescimento (caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 %) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 3 dias. Após a incubação, as culturas foram filtradas e as biomassas foram transferidas separadamente para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado descrito por Baskar et al. (2012) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012) (L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 %; pH ajustado em 6,5 com KOH 5M) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 5 dias. Após a incubação, as culturas foram filtradas e as biomassas foram congeladas a -20°C até pesagem das amostras para a realização do ensaio.

A quantificação de L-asparaginase foi determinada, em duplicata, no micélio pelo método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico descrito por Drinas et al. (1977) (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977) com modificações e expressas como U/g_{célula}. A análise estatística para comparação dos valores foi realizada através do teste t de student pelo software GraphPad Prism (versão 5.01).

2.6. Rompimento da célula fúngica para liberação de L-asparaginase

A L-asparaginase II não é liberada extracelularmente no meio de cultivo durante o crescimento normal por estar localizada superficialmente, situada no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a parede celular (CEDAR; SCHWARTZ, 1967). Sendo assim, dois métodos mecânicos (maceração e sonicação) de rompimento das células microbianas foram empregados com a finalidade de promover a liberação da enzima da célula.

Um disco micelial de 8 mm de diâmetro dos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro selecionados – *Penicillium* sp. 2DSST1, *Penicillium* sp. DCFS6, *Fusarium* sp. DCFS10 e *Mucor* sp. DCFTP7 - foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado descrito por Baskar et al. (2012) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012) (L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 % e pH ajustado em 6,5 com KOH 5M) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 30°C em agitador rotativo a 120 rpm por 5 dias. O meio de cultivo indutor do crescimento (caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 %) foi suplementado ao meio de cultivo Czapek Dox modificado para os isolados *Penicillium* sp. 2DSST1 e *Fusarium* sp. DCFS10. Os isolados *Penicillium* sp. DCFS6 e *Mucor* sp. DCFTP7 foram inoculados em meio de cultivo indutor do crescimento por 3 dias anterior ao inóculo em meio de cultivo Czapek Dox modificado por 5 dias. Após a incubação, as culturas foram filtradas conforme descrito anteriormente e as biomassas congeladas a -80°C.

2.6.1. Método mecânico por maceração

A biomassa congelada foi macerada em gral e pistilo previamente resfriados a -80°C, conforme descrito por Drainas et al. (1977) (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). A biomassa macerada foi transferida para béquer e homogeneizada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 (0,5 g_{célula}/mL) por 10 minutos com bastão de vidro mantidos em banho de gelo ou transferida para tubo de centrífuga de 50 mL e homogeneizada por pelo menos 1 minuto em vórtex.

A presença de inibidor de protease (Sigma-Aldrich) foi avaliada frente à presença de L-asparaginase, já que no processo de extração da enzima a liberação de proteases fúngicas pode degradar a L-asparaginase. O coquetel de inibidor de protease utilizado é uma mistura de inibidores de protease com ampla especificidade para a inibição de serina, cisteína, aspártica e metaloproteases para uso em extratos de fungos e leveduras. Uma alíquota do coquetel de inibidor de protease foi adicionada ao tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 (10 µL/mL) e micélio macerado.

2.6.2. Método físico por sonicação

A condição de cultivo para o fungo filamentoso *Penicillium* sp. 2DSST1 na qual obteve-se a maior atividade enzimática de L-asparaginase pelo planejamento experimental por Plackett-Burman Design foi selecionada para o estudo dos processos de rompimento celular – maceração e sonicação – para comparação dos resultados de atividade enzimática. Uma amostra da biomassa armazenada em um tubo de centrífuga de 50 mL, foi descongelada a temperatura ambiente e suspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 (0,5 g_{célula}/mL). A distância entre o fundo do tubo de centrífuga e a extremidade da ponta do sonicador foi mantida em aproximadamente 1 cm durante todo o processo. A mistura foi sonicada em desmembrador sônico (Fisher Scientific, modelo FB-120, Reino Unido - UK) a 120 W, 20 kHz, 40 % de amplitude e mantida em banho de gelo por 8 ciclos de 59 segundos em pulso e 30 segundos de repouso, para evitar superaquecimento da amostra e potencial degradação enzimática.

As amostras submetidas aos processos de extração por maceração ou sonicação foram centrifugadas a 3.100 x g por 15 minutos a 4°C. A quantificação da atividade de L-asparaginase foi determinada no sobrenadante, denominado extrato bruto.

2.6.3. Quantificação da atividade de L-asparaginase pelo método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico no extrato bruto

A quantificação de L-asparaginase foi determinada no extrato bruto pelo método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico descrito por Drainas et al. (1977) (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977) com modificações. Alíquotas do extrato bruto (0,1-1,6 mL) foram transferidas para tubos cônicos de centrífuga de 5 mL, em triplicata, e foram adicionados (0-1,6 mL) de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina 100 mM e 0,2 mL de solução de hidroxilamina 1 M pH 7,0. As amostras foram incubadas a 37°C em banho-Maria por 30 minutos. Foi adicionada 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl e as amostras foram então centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante (1 mL) foi transferido para cubeta e a absorbância foi mensurada a 500 nm em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu).

O branco das amostras foi preparado conforme descrito para as amostras com a finalidade de eliminar a absorvência da coloração da amostra. Os volumes de extrato bruto e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 utilizados nas amostras teste foram transferidos para tubos cônicos de centrífuga de 5 mL e incubados a 37°C em banho-Maria por 30 minutos. Os volumes de L-asparagina (0,2 mL) e solução de hidroxilamina (0,2 mL) foram adicionados após a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl.

A quantidade de β -hidroxamato aspártico (μmol) é calculada a partir da absorvência obtida das amostras aplicada na equação da reta construída através da curva padrão, a quantidade de amostra utilizada e o tempo de reação do ensaio enzimático (30 minutos) segundo a Equação 4. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxamato de ácido L-aspártico por minuto por mililitro (U/mL).

$$\frac{U}{mL} \text{ de } L - \text{asparaginase} = \frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume de amostra} \times \text{tempo de reação})} \quad (4)$$

2.6.4. Quantificação de proteínas totais no extrato bruto

A quantificação de proteínas totais nas amostras submetidas aos métodos de rompimento de células foi avaliada pela formulação baseada em ácido bicinonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação da proteína total utilizando o kit Pierce BCA (Thermo Scientific). Este método combina a redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} pela proteína em um meio alcalino com a detecção colorimétrica do cátion cuproso (Cu^{+1}) usando um reagente contendo um sal de sódio, BCA (SMITH; KROHN; HERMANSON; MALLIA *et al.*, 1985). 200 μL de reagente preparado a fresco foram adicionados a alíquotas de 25 μL do sobrenadante das amostras de célula lisadas pelo método mecânicos, em triplicata, em uma microplaca de 96 poços e incubados a 37°C por 30 minutos. O produto de reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso, o qual possui absorvência em 562 nm. As proteínas totais (mg/mL) foram quantificadas segundo a equação da reta construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão em diferentes concentrações (0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$) (THERMOSCIENTIFIC).

2.6.5. Avaliação das estruturas fúngicas por microscopia eletrônica de varredura

As biomassas fúngicas de *Penicillium* sp. 2DSST1 submetidas aos processos de rompimento celular por maceração e sonicação foram avaliadas por técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e comparadas frente ao controle de biomassa que não foi submetida a nenhum processo de rompimento celular.

A biomassa filtrada da espécie fúngica *Penicillium* sp. 2DSST1 foi descongelada a temperatura ambiente e a extração da enzima foi conduzida conforme descrito anteriormente. Amostras de células íntegras, maceradas e sonicadas foram pesadas (0,1 g) em tubos de centrífuga de 5 mL em duplicata.

As amostras foram preparadas para visualização em MEV conforme descrito por Das Murtey e Ramasamy (2016) (DAS MURTEY; RAMASAMY, 2016) com modificações. Para fixação, as células foram ressuspensas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com glutaraldeído 5 % em pH 7,2. Após uma hora em repouso a temperatura ambiente, as células foram centrifugadas a 1.500 g por pelo menos 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em pH 7,2 sem glutaraldeído por 10 minutos, centrifugado, o sobrenadante foi descartado e esta etapa foi repetida. O *pellet* foi ressuspensado em água destilada por 10 minutos, centrifugado, o sobrenadante foi descartado e esta etapa foi repetida.

Para desidratação, as células foram submersas em concentrações crescentes de etanol (35 %, 50 %, 75 %, 95 % e 100 %) por 10 minutos cada, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. As células foram submersas em etanol absoluto duas vezes.

Para a etapa de secagem das amostras, estas foram submersas em hexametildisilazano (HMDS), um composto orgânico altamente volátil empregado em técnicas de secagem ao ar livre. As células foram submersas em HMDS duas vezes por 15 minutos cada. Ao final do processo, uma amostra de cada replicata biológica (controle, macerado e sonicado) foi transferida para uma placa de 6 poços enquanto as outras amostras foram mantidas nos tubos de centrífuga de 5 mL utilizados desde o início do processo. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente dentro de capela de exaustão *overnight* (aproximadamente 12 horas) para a remoção do solvente residual.

As células úmidas foram montadas em um *stub* de amostra MEV com uma fita adesiva dupla face de carbono e deixadas para secar em um exaustor. As células secas foram pulverizadas com platina e depois fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura por pistola de emissão de campo Zeiss SIGMA (FEG-SEM) usando um detector de elétrons secundário Zeiss na lente.

2.7. Identificação das espécies fúngicas selecionadas

As espécies fúngicas selecionadas como melhores produtoras baseadas nos maiores títulos de L-asparaginase com menores títulos de Glutaminase foram identificadas por técnicas de biologia molecular em colaboração com as pesquisadoras Dra. Paula Monteiro de Souza da UnB e Dra. Léia Fávoro da Embrapa Agroenergia e suas sequências genéticas foram depositadas no GenBank.

2.7.1. Extração de DNA e amplificação por PCR

A extração do DNA genômico foi realizada usando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation) a partir de micélios cultivados em PDA, incubados a 28°C por 7 dias. A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas por espectrômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) e as preparações foram ajustadas para 20 ng/μL de molde de DNA.

A região de agrupamento do gene do RNA ribossômico (rDNA), incluindo a extremidade 3' do rDNA 18S, a região espaçadora transcrita interna (ITS) 1, o rDNA 5.8S, ITS2 e a extremidade 5' do rDNA 28S e as sequências β -tubulina, fator de alongamento-1 alfa (EF-1 α), calmodulina e da subunidade da RNA polimerase II (RPB2) de *Penicillium* sp. 2DSST1 e *Fusarium* sp. DCFS10 foram selecionadas como as regiões para análise. As reações de amplificação foram realizadas com os *primers* para cada gene utilizando GoTaq® DNA Polymerase (Promega Corporation) de acordo com as instruções do fabricante. O ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 e a extremidade 5' do 28rDNA foram amplificados em 1 fragmento usando o par de *primers* ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') / ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(GARDES; BRUNS, 1993; WHITE; BRUNS; LEE; TAYLOR, 1990). Para a amplificação por PCR para β -tubulina, EF-1 α , calmodulina e subunidade de RNA polimerase II, foram usados os seguintes pares de *primers*: Bt2a (5'-

GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') / Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')(GLASS; DONALDSON, 1995); EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') / EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3')(CARBONE; KOHN, 1999); cmd5 (5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3') / cmd6 (5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3')(HONG; GO; SHIN; FRISVAD *et al.*, 2005); e fRPB2-5F (5'-GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG-3') / fRPB2-7cR (5'-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT-3') (LIU; WHELEN; HALL, 2000). A PCR foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida de 35 ciclos de amplificação e extensão final a 72°C por 10 min. Para o par de *primers* ITS1-F/ITS-4, os ciclos de amplificação foram 94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s. Para o par de *primers* EF1-728F/EF1-986R, os ciclos de amplificação foram 95°C por 30 s, 58°C por 30 s e 72°C por 1 min. Para o par de *primers* Bt2a/Bt2b, os ciclos de amplificação foram 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min. Para o par de *primers* cmd5/cmd6, os ciclos de amplificação foram 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min. Para o par de *primers* fRPB2-5F/fRPB2-7cR, os ciclos de amplificação foram 95°C por 1 min, 47°C por 1 min e 72°C por 2 min. Os *amplicons* de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,0 % juntamente com marcador de massa molecular de DNA (gene GeneRuler de 1kb). Os produtos de PCR foram purificados usando o kit de purificação Pure Link PCR (Thermo Scientific).

2.7.2. Sequenciamento de DNA e análise filogenética

Os conjuntos de dados de sequência de nucleotídeos para cada gene das cepas de fungos foram alinhados manualmente com diferentes sequências de *Penicillium* e *Fusarium* disponíveis no banco de dados de nucleotídeos do GenBank para análise de taxonomia molecular, usando MEGA v.7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Os fragmentos utilizados foram as sequências ITS, calmodulina, β -tubulina e RPB2 para *Penicillium* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011; HOUBRAKEN; KOCSUBÉ; VISAGIE; YILMAZ *et al.*, 2020) e sequências ITS, β -tubulina e EF-1 α para *Fusarium* (WATANABE; YONEZAWA; LEE; KUMAGAI *et al.*, 2011) depositadas no GenBank e os fragmentos dos isolados em estudo (Tabela 6). As árvores filogenéticas foram reconstruídas para os dados concatenados usando Inferência Bayesiana (BI) pela pesquisadora Doutoranda Kellen Cruvinel membro

deste grupo de pesquisa. Os melhores modelos de substituição para cada partição foram determinados com MrModeltest (POSADA; BUCKLEY, 2004). MrBayes v.3.2.5 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2014) foi usado no portal web CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). A análise de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) foi realizada com um total de 10 milhões de gerações, amostrando a cada 1.000 gerações. Os primeiros 25 % das árvores amostradas foram descartadas como queimadas, com os valores de probabilidade posterior (PP) calculados com as demais árvores (RANNALA; YANG, 1996). A edição das árvores filogenéticas foi realizada na FigTree v.1.4 (RAMBAUT, 2018).

Tabela 6 - Tamanho dos fragmentos dos fungos isolados *Penicillium* sp. 2DSST1 e *Fusarium* sp. DCFS10 e os respectivos genes utilizados na amplificação.

Região gênica	Tamanho do fragmento (pb)	
	<i>Penicillium</i> sp. 2DSST1	<i>Fusarium</i> sp. DCFS10
ITS	570	453
β -tubulina (tub2)	472	312
Calmodulina (cmdA)	443	-
Fator de alongação 1 α (EF-1 α)	-	256
RNA polymerase II (rpb2)	930	-

(-): não utilizado.

2.8. Otimização do meio de cultivo para a produção de L-asparaginase pelos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro

Após definidos os fungos com maiores potenciais para produção de L-asparaginase, o processo de otimização da produção em meio líquido utilizando planejamento estatístico foi estudado. Os parâmetros fontes alternativas de nitrogênio e carbono e relação C:N, temperatura e tamanho de inóculo foram avaliados.

A partir da triagem realizada com fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, os isolados selecionados com maiores níveis de atividade de L-asparaginase – *Penicillium* sp. 2DSST1 e *Fusarium* sp. DCFS10 - foram avaliados frente a diferentes condições sob cultivo submerso utilizando diversas fontes de carbono e nitrogênio com a finalidade de otimizar o meio de cultivo para a produção de L-asparaginase.

2.8.1. Cultivo de produção para triagem de variáveis por Plackett-Burman Design

O desenho experimental Plackett-Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) é utilizado para identificar os fatores mais importantes de um sistema. É um método de triagem eficiente para identificar os fatores ativos utilizando a menor quantidade de corridas experimentais possível. Desta forma, as variáveis e níveis escolhidos para avaliação da produção de L-asparaginase deste estudo foram baseadas nas diversas fontes de nitrogênio, fontes de carbono, temperatura e tamanho de inóculo testados previamente em trabalhos de otimização de meio de cultivo para produção de L-asparaginase por fungos filamentosos conduzidos por Baskar et al. (2012), El-Refai et al. (2014) e Farag et al. (2015) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012; EL-REFAI; EL-SHAFAEI; MOSTAFA; EL-REFAI *et al.*, 2014; FARAG; HASSAN; BELTAGY; EL-SHENAWY, 2015). Doze variáveis independentes como L-prolina (X_1), L-asparagina (X_2), ureia (X_3), nitrato de sódio (X_4), sulfato de amônio (X_5), peptona (X_6), extrato de levedura (X_7), glicose (X_8), sacarose (X_9), extrato de malte (X_{10}), temperatura (X_{11}) e inóculo (X_{12}) foram consideradas para avaliar seus efeitos sobre a produção de L-asparaginase pelos fungos selecionados codificados 2DSST1 e DCFS10. As variáveis foram avaliadas em nível inferior (-1) e nível superior (+1), conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Valores das variáveis do planejamento experimental Plackett-Burman

Nome da variável	Unidades	-1	0	1
L-prolina	%	1	2	3
L-asparagina	%	1	2	3
Ureia	%	0	0,5	1
Nitrato de sódio	%	0	1,5	3
Sulfato de amônio	%	0	1,5	3
Peptona	%	0	1,5	3
Extrato de levedura	%	0	1,5	3
Glicose	%	0	0,5	1
Sacarose	%	0	0,5	1
Extrato de malte	%	0	1,5	3
Temperatura	°C	28	30	32
Inóculo	Unidade de disco micelial de 8 mm	1	3	5

A matriz do desenho experimental Plackett-Burman e a análise de dados foram determinadas pelo software Protimiza Experimental Design com 16 combinações das 12 variáveis a serem avaliadas com triplicata do ponto central, totalizando 19 corridas. Disco miceliais de 8 mm de diâmetro dos fungos filamentosos isolados do solo selecionados foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado (K_2HPO_4 0,152 %; KCl 0,052 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052 %; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001 %) preparados baseados no DPB apresentado na Tabela 8, autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados em agitador rotativo a 120 rpm pelo período de atividade máxima obtida segundo a curva de crescimento de cada isolado (48 horas para *Penicillium sp.* 2DSST1 e 96 horas para *Fusarium sp.* DCFS10). Após a incubação, as culturas foram filtradas conforme descrito anteriormente. As biomassas foram pesadas, congeladas a -80°C, e submetidos à extração da enzima para a realização do ensaio enzimático e quantificação de proteínas totais. As atividades de L-asparaginase e específica foram expressas como U/mL de extrato bruto e U/mg de proteína, respectivamente.

Os valores da relação Carbono:Nitrogênio (C:N) foram calculados a partir dos meios de cultivo combinados pela matriz dos planejamentos experimentais. A massa dos átomos de Carbono e Nitrogênio foi calculada de acordo com a fórmula molecular dos sais utilizados e de acordo com o volume do meio de cultivo (50 mL). Para as fontes de Carbono e Nitrogênio complexas - extrato de malte, extrato de levedura e peptona - duas amostras de cada substrato foram avaliadas quanto à composição química de Carbono (%), Hidrogênio (%) e Nitrogênio (%) realizada na Central Analítica da Universidade de São Paulo.

Tabela 8 – Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	X ₅ (%)	X ₆ (%)	X ₇ (%)	X ₈ (%)	X ₉ (%)	X ₁₀ (%)	X ₁₁ (°C)	X ₁₂ (disco)	C:N
1	3	1	0	0	3	0	0	1	1	0	32	1	2,27
2	3	3	0	0	0	3	0	0	1	3	28	5	3,91
3	3	3	1	0	0	0	3	0	0	3	32	1	2,82
4	3	3	1	3	0	0	0	1	0	0	32	5	1,66
5	1	3	1	3	3	0	0	0	1	0	28	5	0,95
6	3	1	1	3	3	3	0	0	0	3	28	1	1,76
7	1	3	0	3	3	3	3	0	0	0	32	1	1,53
8	3	1	1	0	3	3	3	1	0	0	28	5	2,05
9	3	3	0	3	0	3	3	1	1	0	28	1	2,65
10	1	3	1	0	3	0	3	1	1	3	28	1	2,23
11	1	1	1	3	0	3	0	1	1	3	32	1	2,54
12	3	1	0	3	3	0	3	0	1	3	32	5	2,26
13	1	3	0	0	3	3	0	1	0	3	32	5	2,46
14	1	1	1	0	0	3	3	0	1	0	32	5	2,56
15	1	1	0	3	0	0	3	1	0	3	28	5	3,02
16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	1	2,65
17	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21
18	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21
19	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21

X₁: L-prolina; X₂: L-asparagina; X₃: ureia; X₄: nitrato de sódio; X₅: sulfato de amônio; X₆: peptona; X₇: extrato de levedura; X₈: glicose; X₉: sacarose; X₁₀: extrato de malte; X₁₁: temperatura; X₁₂: tamanho de inóculo; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio

2.8.2. Cultivo de produção para otimização de meio de cultivo por Delineamento Composto Central

A partir do planejamento experimental por Plackett-Burman realizado com fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado Brasileiro, a espécie *Penicillium sp.* 2DSST1 selecionada foi avaliada pelo planejamento experimental Delineamento Composto Central (DCC) com a finalidade de otimizar o meio de cultivo para a produção de L-asparaginase.

As variáveis significativas (valor $p < 0,10$) com efeito positivo, segundo o planejamento experimental PB pelo software Protimiza Experimental Design, foram consideradas para planejamento experimental por DCC. Três variáveis independentes - peptona (X_1), extrato de levedura (X_2) e L-prolina (X_3) - foram consideradas para avaliar seus efeitos sobre a produção de L-asparaginase pelo isolado *Penicillium sp.* 2DSST1 (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores das variáveis do planejamento experimental Delineamento Composto Central para o isolado *Penicillium sp.* 2DSST1

Nome da variável	Unidades	-1	0	1
Peptona	%	3	4	5
Extrato de levedura	%	3	4	5
L-prolina	%	1	3	5

A matriz do desenho experimental DCC foi determinada pelo software Protimiza Experimental Design. O experimento consistiu em 8 combinações das 3 variáveis a serem avaliadas com 4 replicatas do ponto central, totalizando 12 corridas. Um disco micelial de 8 mm de diâmetro do isolado *Penicillium sp.* 2DSST1 foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado que foi preparado baseado no DCC apresentado na Tabela 10 com o meio mínimo, admitindo este o meio de cultivo no qual foi obtido o maior valor de atividade de L-asparaginase pelo planejamento experimental Plackett-Burman (L-asparagina 3 %; nitrato de sódio 3 %; sulfato de amônio 3 %; K_2HPO_4 0,0152 %; KCl 0,052 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052 %; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001 %) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 32°C em agitador rotativo a 120 rpm por 48 horas. Após a incubação, as culturas foram filtradas

conforme descrito anteriormente. As biomassas foram pesadas, congeladas a -80°C , e submetidos à extração da enzima para a realização do ensaio enzimático e quantificação de proteínas totais. As atividades de L-asparaginase e específica foram expressas como U/mL de extrato bruto e U/mg de proteína, respectivamente.

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental Delineamento Composto Central para o isolado *Penicillium* sp. 2DSST1

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	C:N
1	3	3	1	1,53
2	5	3	1	1,69
3	3	5	1	1,68
4	5	5	1	1,81
5	3	3	5	1,97
6	5	3	5	2,06
7	3	5	5	2,06
8	5	5	5	2,15
9	4	4	3	1,89
10	4	4	3	1,89
11	4	4	3	1,89
12	4	4	3	1,89

X₁: peptona; X₂: extrato de levedura; X₃: L-prolina; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio

2.8.3. Cultivo de produção para otimização de meio de cultivo por Delineamento Composto Central Rotacional

A partir do planejamento experimental por Plackett-Burman realizado com fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, a espécie *Fusarium* sp. DCFS10 selecionada foi avaliada pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com a finalidade de otimizar o meio de cultivo para a produção de L-asparaginase. As variáveis com efeito positivo segundo o planejamento experimental Plackett-Burman pelo software Protimiza Experimental Design – L-asparagina (X₁), peptona (X₂), glicose (X₃) e extrato de malte (X₄) - foram consideradas para planejamento experimental por DCCR (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores das variáveis do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional para o isolado *Fusarium sp.* DCFS10

Nome da variável	Unidades	-1	0	1
L-asparagina	%	3	4	5
Peptona	%	3	4	5
Glicose	%	1	2	3
Extrato de malte	%	3	4	5

A matriz do desenho experimental DCCR foi determinada pelo software Protimiza Experimental Design. O experimento consistiu em 24 combinações das 4 variáveis a serem avaliadas com 4 replicatas do ponto central, totalizando 28 corridas. Cinco discos miceliais de 8 mm de diâmetro do isolado *Fusarium sp.* DCFS10 foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado que foi preparado baseado no DCCR apresentado na Tabela 12 com o meio mínimo, admitindo este o meio de cultivo no qual foi obtido o maior valor de atividade de L-asparaginase pelo planejamento experimental Plackett-Burman (L-prolina 1 %; sulfato de amônio 3 %; K_2HPO_4 0,0152 %; KCl 0,052 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052 %; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001 %) autoclavados a 121°C por 20 minutos e incubados a 32°C em agitador rotativo a 120 rpm por 96 horas. Após a incubação, as culturas foram filtradas conforme descrito anteriormente. As biomassas foram pesadas, congeladas a -80°C e submetidas à extração da enzima para a realização do ensaio enzimático e quantificação de proteínas totais. As atividades de L-asparaginase e específica foram expressas como U/mL de extrato bruto e U/mg de proteína, respectivamente.

Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional para o isolado *Fusarium sp.* DCFS10

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	C:N
1	3	3	1	3	2,46
2	5	3	1	3	2,38
3	3	5	1	3	2,51
4	5	5	1	3	2,43
5	3	3	3	3	2,68
6	5	3	3	3	2,58
7	3	5	3	3	2,72
8	5	5	3	3	2,62
9	3	3	1	5	2,67
10	5	3	1	5	2,57
11	3	5	1	5	2,71
12	5	5	1	5	2,61
13	3	3	3	5	2,89
14	5	3	3	5	2,76
15	3	5	3	5	2,91
16	5	5	3	5	2,79
17	2	4	2	4	2,75
18	6	4	2	4	2,55
19	4	2	2	4	2,60
20	4	6	2	4	2,68
21	4	4	0	4	2,44
22	4	4	4	4	2,84
23	4	4	2	2	2,45
24	4	4	2	6	2,83
25	4	4	2	4	2,64
26	4	4	2	4	2,64
27	4	4	2	4	2,64
28	4	4	2	4	2,64

X₁: L-asparagina; X₂: peptona; X₃: glicose; X₄: extrato de malte; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio

2.9. Parâmetros cinéticos da curva de crescimento

Os parâmetros cinéticos de crescimento celular e atividade da L-asparaginase produzida pelos isolados selecionados foram avaliados antes e após a triagem das variáveis dos meios de cultivo. Um disco micelial (8 mm de diâmetro) dos isolados selecionados foi inoculado, em duplicata, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado (caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 %, L-prolina 1,71 %; NaNO₃ 1,99 %; L-asparagina 1,38 %; Glicose 0,65 %; K₂HPO₄ 0,0152 %; MgSO₄.7H₂O 0,052 %; KCl 0,052 %; ZnSO₄.7H₂O 0,001 %; FeSO₄.7H₂O 0,001 %; CuSO₄.5H₂O 0,001 %; pH ajustado em 6,5 com KOH 5M, relação C:N 2,0) e incubado a 30°C e 120 rpm por 120 horas. Posteriormente, os isolados selecionados foram cultivados em meio de cultivo em que o maior valor de atividade da L-asparaginase foi obtido de acordo com PBD, incubados a 32°C e 120 rpm por 120 horas. As culturas foram filtradas a cada 24 horas e o micélio foi pesado. A enzima foi extraída e a atividade da L-asparaginase foi determinada.

Os parâmetros cinéticos da produção de L-asparaginase na curva de crescimento, tais como a produtividade máxima de biomassa ($P_{X,max}$, Equação 5), produtividade máxima da enzima ($P_{E,max}$, Equação 6), velocidade específica máxima (μ_{max} , Equação 7), produtividade específica da enzima ($\mu_{E,max}$, Equação 8) e fator de conversão de biomassa na enzima ($Y_{E/X}$, Equação 9) foram calculados, em que X é a concentração da biomassa (g/L), E é a atividade enzimática (U/L), t é o tempo (h) e μ_m é a velocidade específica de crescimento.

$$P_{X,max} = \Delta X / \Delta t \quad (5)$$

$$P_{E,max} = \Delta E / \Delta t \quad (6)$$

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu_m \cdot (t - t_i) \quad (7)$$

$$Y_{E,max} = \frac{E}{X \times t} \quad (8)$$

$$Y_{\frac{E}{X}} = \frac{E}{X} \quad (9)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção dos fungos produtores de L-asparaginase

3.1.1. Triagem semi-quantitativa em meio sólido

A triagem dos fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro pelo método semi-quantitativo em meio sólido contendo L-asparagina revelou a formação de uma zona avermelhada em torno de 28 dos 40 isolados após 48 horas de incubação (Figura 5). Na metade destes (14/28) foi observado um diâmetro de zona duas vezes o diâmetro da colônia (índice > 2): duas espécies de *Aspergillus* (DCFS1 e *A. terreus* 2DCSS6), oito espécies de *Penicillium* (DCFS6, RCFS24, 2DSST1, 2DMGSE2, RCFS6, 2DSST10, RCFT14 e DCFF2), uma espécie de *Fusarium* (DCFS10) e três fungos endofíticos não identificados (CAG2, EP03 e EP01). Doze isolados (12/40) não cresceram em meio contendo L-asparagina, dos quais 10 isolados são fungos endofíticos (BR, CAG, CAG1, CAG3, CAM01, CB02, GOI3, IPE02, OH01, OH03, *Aspergillus sp.* DCFS9 e *Fusarium sp.* RCFS3). A presença de uma zona avermelhada nas placas controle contendo nitrato de sódio pode ser explicada pela assimilação deste sal pelos fungos transformando-o em amônia, conseqüentemente alcalinizando o meio. O primeiro passo na assimilação do nitrato é o influxo de nitrato nas células, seguido pelas atividades catalíticas da nitrato redutase e nitrito redutase que sequencialmente produz nitrito e amônio, este último convertido em nitrogênio orgânico para crescimento celular (UNKLES; WANG; WANG; GLASS *et al.*, 2004). Os índices de zona de todos os isolados estão apresentados na Tabela 13.

Figura 5 - Triagem semi-quantitativa da produção de L-asparaginase pelos fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro em meio sólido contendo uma única fonte de nitrogênio: L-asparagina como substrato da enzima (à esquerda) e nitrato de sódio como controle (à direita). 2DCSS6 (1); 2DMGSE2 (2); 2DSSE1 (3); 2DSST1 (4); 2DSST10 (5); 2RCSS1 (6); BR (7); CAG (8); CAG1 (9); CAG2 (10); CAG3 (11); CAM01 (12); CB02 (13); DCFF2 (14); DCFF4 (15); DCFS1 (16); DCFS6 (17); DCFS9 (18); DCFS10 (19); DCFT2 (20); DCFT5 (21); DCFTP7 (22); EP01 (23); EP03 (24); EP04 (25); GOI3 (26); IPE02 (27); IPE03 (28); IPE05 (29); OH01 (30); OH03 (31); PEQ02 (32); PT02 (33); RCFS3 (34); RCFS6 (35); RCFS7 (36); RCFS17 (37); RCFS21 (38); RCFS24 (39); RCFT14 (40)



Tabela 13 - Valores de índice de zona para os isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro usando vermelho de fenol como indicador que representa a extensão da produção de L-asparaginase após 48 h de incubação

(continua)

Espécie	Isolado	L-asparagina			NaNO ₃		
		Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	Índice da zona	Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	Índice da zona
<i>Aspergillus sp.</i>	DCFS1	50	11	4,55	0	11	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	DCFS6	40	10	4,00	10	10	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	RCFS24	50	13	3,85	20	11	1,82
<i>A. terreus</i>	2DCSS6	40	11	3,64	11	11	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	2DSST1	40	11	3,64	11	11	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	2DMGSE2	40	11	3,64	0	11	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	RCFS6	50	16	3,13	20	11	1,82
<i>Penicillium sp.</i>	2DSST10	45	15	3,00	25	12	2,08
NI	CAG2	45	16	2,81	10	10	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	RCFT14	40	15	2,67	20	11	1,82
<i>Fusarium sp.</i>	DCFS10	55	22	2,50	30	21	1,43
<i>Penicillium sp.</i>	DCFF2	30	12	2,50	45	45	1,00
NI	EP03	60	27	2,22	28	28	1,00
NI	EP01	55	25	2,20	25	25	1,00
NI	PEQ02	55	28	1,96	29	29	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	2DSSSE1	65	35	1,86	0	40	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	DCFF4	25	14	1,79	20	11	1,82
NI	IPE3	40	23	1,74	0	20	0,00
NI	EP04	40	25	1,60	40	30	1,33
<i>Penicillium sp.</i>	2RCSS1	50	50	1,00	50	50	1,00
<i>Penicillium sp.</i>	DCFT5	25	25	1,00	0	11	0,00

Tabela 13 - Valores de índice de zona para os isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro usando vermelho de fenol como indicador que representa a extensão da produção de L-asparaginase após 48 h de incubação

Espécie	Isolado	L-asparagina			NaNO ₃		
		Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	Índice da zona	Diâmetro da zona (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	Índice da zona
NI	IPE5	20	20	1,00	0	20	0,00
NI	PT02	20	20	1,00	0	20	0,00
<i>A. niger</i>	RCFS17	16	16	1,00	0	10	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	DCFT2	48	55	0,87	0	55	0,00
<i>Penicillium sp.</i>	RCFS7	50	60	0,83	0	55	0,00
<i>Mucor sp.</i>	DCFTP7	25	60	0,42	0	8	0,00
<i>Trichoderma sp.</i>	RCFS21	17	45	0,38	0	45	0,00
NI	BR	0	17	0,00	0	17	0,00
NI	CAG	0	10	0,00	0	10	0,00
NI	CAG1	0	11	0,00	0	11	0,00
NI	CAG3	0	11	0,00	0	11	0,00
NI	CAM01	0	11	0,00	0	11	0,00
NI	CB02	0	20	0,00	0	24	0,00
<i>Aspergillus sp.</i>	DCFS9	0	47	0,00	0	45	0,00
NI	GOI3	0	24	0,00	0	11	0,00
NI	IPE2	0	25	0,00	0	30	0,00
NI	OH01	0	17	0,00	0	15	0,00
NI	OH03	0	30	0,00	0	35	0,00
<i>Fusarium sp.</i>	RCFS3	0	8	0,00	14	11	1,27

NI: não identificado

(conclusão)

Os isolados de fungos do Cerrado Brasileiro apresentaram índices de zona maiores ou similares, em menor período de incubação, quando comparados aos dados encontrados na literatura. Ashok et al. (2019) examinaram e isolaram 50 espécies de fungos coletados do solo e musgos na Antártica, dos quais 30 isolados produziram L-asparaginase livre de glutaminase e urease usando o indicador vermelho de fenol. O valor máximo do índice de zona obtido foi de 5,8 após 96 horas de incubação para a cepa *Trichosporon asahii* IBBLA1, que produziu L-asparaginase livre de glutaminase e urease (ASHOK; DORIYA; RAO; QURESHI *et al.*, 2019). Doriya e Kumar (2016) isolaram 45 espécies de fungos dos solos de Vizag, Kanyakumari, Ghats Ocidental na Índia e de resíduos agrícolas e as examinaram quanto à produção de L-asparaginase. Seis isolados (*Curvularia sp.* S3.4, *Rhizopus sp.* W3, *Rhizopus sp.* W5, *Aspergillus sp.* C3, *Aspergillus sp.* C7 e *Aspergillus sp.* MTCC 1782) produziram índices de zona variando de 1,0 a 2,40 e 1,18 a 2,40 usando indicadores vermelho de fenol e azul de bromotimol, respectivamente, após 72 horas de incubação (DORIYA; KUMAR, 2016). Sarquis et al. (2004) avaliaram 26 cepas pertencendo aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* pelo método semi-qualitativo descrito por Gulati et al. (1997), a qual demonstrou que apenas as cepas do gênero *Aspergillus* apresentaram produção de asparaginase, selecionando *A. tamarisii* (cepa IOC 186) e *A. terreus* (cepa IOC 217) para aprofundamento dos estudos (SARQUIS; OLIVEIRA; SANTOS; COSTA, 2004). Gonçalves et al. (2016) avaliaram a produção de L-asparaginase a partir de 12 linhagens de fungos filamentosos cultivadas em ágar Czapek-Dox/corante azul de bromotimol, dentre os quais três linhagens - *Penicillium sp.* T6.2, *Penicillium sp.* T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2 – produziram um índice de zona maior que 1,0 após 72 horas em culturas inoculadas com conídios. Outra cepa, *Penicillium sp.* T9.1 também produziu índice de zona maior que 1,0, mas após 168 horas, enquanto *Penicillium sp.* T6.1 atingiu índice de zona 0,88 após 168 horas (GONÇALVES; MAIA; RUEDA; VANZELA, 2016). Thakur et al. (2014) observaram a formação de halo vermelho ao redor do fungo *Mucor hiemalis* após 72h de incubação (THAKUR; LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2014).

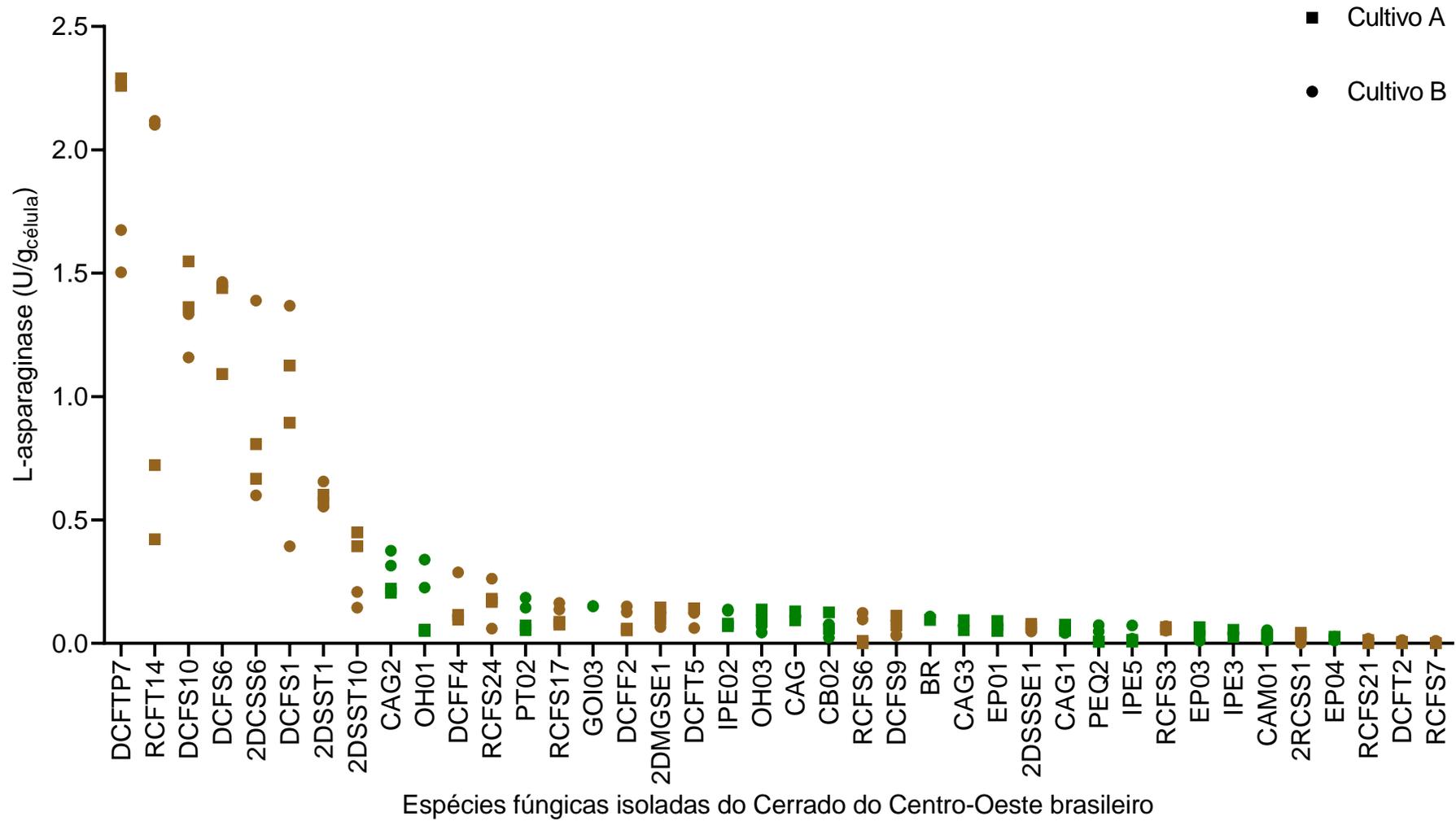
Chow e Ting (2015) avaliaram 89 fungos endofíticos, dos quais apenas 25 morfotipos produziram L-asparaginase. Cada morfotipo produziu diferentes tamanhos de diâmetro da zona rosa, variando de 4 a 37 mm com uma mediana de 12 mm (CHOW; TING, 2015). Yadav e Sarkar (2014) observaram a formação de uma zona avermelhada em torno dos discos de micélio dos fungos *Alternaria alternata* (18 mm),

Aspergillus ochraceus (13 mm), *Penicillium citrinum* (21 mm) e *Fusarium oxysporum* (24 mm) após 3-5 dias de incubação, no qual este último foi observado o maior halo e a maior produção de L-asparaginase em fermentação submersa (YADAV; SARKAR, 2014). Uzma et al. (2016) observaram a formação de uma zona avermelhada em torno dos discos de micélio inoculados por 5-7 dias em 11 dos 45 fungos endofíticos isolados de *Tinospora cordifolia* (Willd.), identificados molecularmente como *Fusarium solani* (25,00 ± 0,59 mm), *Mycelia sterilia* spp.1 (47,66 ± 1,30 mm), *Aspergillus* spp. (43,66 ± 0,78 mm), *Mycelia sterilia* spp.2 (34,66 ± 0,29 mm), *Cladosporium* spp. (54,00 ± 0,51 mm), *Penicillium* spp. (59,00 ± 0,51 mm), *Trichoderma asperellum* (69,00 ± 0,29 mm), *Aspergillus* sp. (23,66 ± 0,78 mm), *Aspergillus* sp. (24,00 ± 0,78 mm), *Aspergillus* sp. (36,00 ± 0,51 mm), *F. solani* (76,00 ± 0,51 mm), sendo este o maior halo obtido (UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016). Jalgaonwala et al. (2014) observaram a formação de uma zona avermelhada em torno do disco de micélio inoculados por 5-7 dias do fungo endofítico *Eurotium* sp. (23 mm) isolado dos rizomas de *Curcuma longa* (JALGAONWALA; MAHAJAN, 2014). As espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são as mais relatadas como produtoras de L-asparaginase na literatura, assim como as identificadas no presente estudo.

3.1.2. Triagem quantitativa em cultivo submerso

Os valores da atividade de L-asparaginase quantificada nas células das espécies fúngicas isoladas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro variaram entre 0 a 2,29 U/g_{célula} (Figura 6). Os maiores valores da atividade de L-asparaginase (> 0,5 U/g_{célula}) foram obtidos por sete espécies fúngicas isoladas do solo (7/40): *Mucor* sp. DCFTP7, *Penicillium* sp. RCFT14, *Fusarium* sp. DCFS10, *Penicillium* sp. DCFS6, *Aspergillus terreus* 2DCSS6, *Aspergillus* sp. DCFS1 e *Penicillium* sp. 2DSST1. Dentre estes, os isolados *Penicillium* sp. RCFT14, *Fusarium* sp. DCFS10, *Penicillium* sp. DCFS6, *Aspergillus terreus* 2DCSS6, *Aspergillus* sp. DCFS1 e *Penicillium* sp. 2DSST1 obtiveram elevados índices de zona pela triagem semi-quantitativa em meio sólido, corroborando com os resultados apresentados pela triagem quantitativa em cultivo submerso.

Figura 6 - Triagem quantitativa da produção de L-asparaginase quantificada nas células dos 40 fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro após cultivo submerso. As análises foram realizadas em duplicatas dentro de cada replicata (n = 4) e os resultados são apresentados como distribuição das atividades enzimáticas para cada isolado do solo (marrom) e isolado das plantas (verde)



Tendo em vista o objetivo do presente trabalho por buscar novas fontes produtoras de L-asparaginase, o isolado *Aspergillus terreus* 2DCSS6 foi excluído da seleção embora tenha apresentado um dos maiores valores de índice de zona pelo método semi-quantitativo e atividades de L-asparaginase pelo método quantitativo do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico por ser uma espécie amplamente estudada pela produção desta enzima (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012; BASKAR; RENGANATHAN, 2012; COSTA-SILVA; FLORES-SANTOS; FREIRE; VITOLO *et al.*, 2018; DA ROCHA; COSTA-SILVA; AGAMEZ-MONTALVO; FEITOSA *et al.*, 2019; FARAG; HASSAN; BELTAGY; EL-SHENAWY, 2015; LOUREIRO; BORGES; ANDRADE; TONE *et al.*, 2012; SARQUIS; OLIVEIRA; SANTOS; COSTA, 2004). Portanto, os isolados *Mucor sp.* DCFTP7, *Penicillium sp.* RCFT14, *Fusarium sp.* DCFS10, *Penicillium sp.* DCFS6, *Aspergillus sp.* DCFS1 e *Penicillium sp.* 2DSST1 foram selecionados para os experimentos posteriores.

Os fungos endofíticos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro foram excluídos deste estudo por apresentarem valores de atividade enzimática inferiores aos fungos isolados do solo ($< 0,5 \text{ U/g}_{\text{célula}}$). Chow e Ting (2015) avaliaram a produção de L-asparaginase por fungos isolados a partir de plantas associadas à atividade anticâncer. As atividades de L-asparaginase dos endófitos obtidas foram de 0,013 e 0,019 $\mu\text{M/mL/min}$ para *F. oxysporum* e *P. simplicissimum* neste estudo, respectivamente, no entanto, inferiores aos níveis produzidos por alguns fungos conhecidos do gênero *Fusarium* e *Penicillium sp.* Presumiram então que a diferença na quantidade de L-asparaginase produzida pode ser atribuída a vários fatores, que incluem os meios de cultura utilizados e as diferentes espécies de endófitos testados, embora do mesmo gênero (CHOW; TING, 2015).

Krishnapura *et al.* (2016) observou diminuição gradual da atividade da L-asparaginase ao longo do tempo em *Talaromyces pinophilus* e outros endófitos. A perda da capacidade de produção de L-asparaginase é talvez devido à degeneração da cepa (KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D., 2016). Fenômeno semelhante de degeneração de cepas endofíticas foi observado na produção de alcalóides do ergot a partir de fungos endofíticos *Acremonium coenophialum* (BACON, 1988). Wang *et al.* (2010) mencionaram que a produção de taxol da cepa de um fungo endofítico *Tubercularia sp.* TF5 se tornou indetectável devido a degeneração da cepa após repique laboratorial a longo prazo (WANG; LIU; LI; XU *et al.*, 2010). Portanto, é

possível inferir que a atividade L-asparaginase inferior dos fungos endofíticos é atribuída ao repique contínuo destes em laboratório, perdendo sua atividade enzimática.

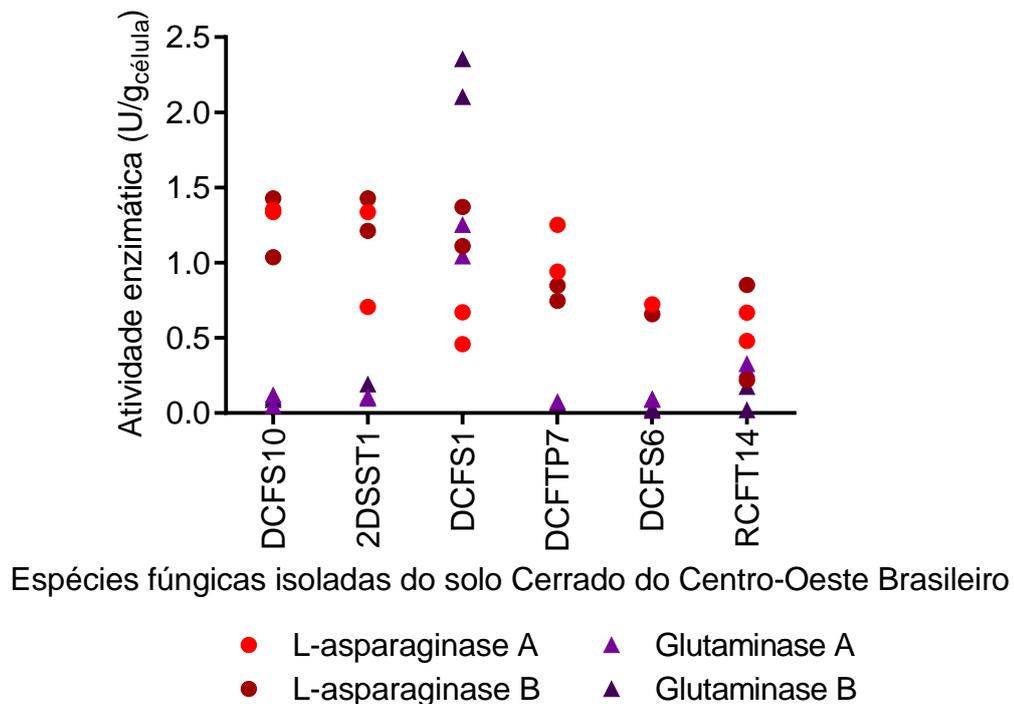
Os resultados de atividade enzimática obtidos no presente trabalho para a quantificação da atividade de L-asparaginase foram baseados na metodologia do β -hidroxamato aspártico. Drainas et al. (1977) mensuraram a atividade da asparaginase de três maneiras: Primeiro, por medição qualitativa (após separação cromatográfica em papel) do ácido aspártico produzido a partir da asparagina; segundo, medindo a produção de NH_3 , usando o reagente de Nessler (IMADA; IGARASI; NAKAHAMA; ISONO, 1973), da asparagina; em terceiro lugar, medindo a quantidade de hidroxamato aspártico produzido a partir de asparagina e hidroxilamina. Os autores demonstraram que os três métodos dão resultados semelhantes. Os extratos de tipos selvagens produzem a quantidade máxima de hidroxamato aspártico e NH_3 após o crescimento em condições ótimas, e uma grande banda de ácido aspártico na cromatografia em papel. Os autores empregaram o ensaio baseado na produção de hidroxamato aspártico, pois consideraram este método o mais conveniente e sensível (DRAINAS; PATEMAN, 1977).

Os resultados descritos na literatura para quantificação da atividade L-asparaginase utilizam a metodologia de Nesslerização, na qual o reagente de Nessler quantifica a amônia presente no ensaio. O método baseia-se na teoria de que a L-asparaginase cliva a L-asparagina em ácido aspártico e amônia, portanto, uma unidade internacional (UI) de L-asparaginase é a quantidade de enzima que libera um μmol de amônia em um minuto (IMADA; IGARASI; NAKAHAMA; ISONO, 1973). Entretanto, o meio de cultivo fermentado livre de células comumente utilizado como amostra para o ensaio enzimático contém aminoácidos (L-prolina) e sais (nitrato de sódio, sulfato de amônio, ureia, peptona e extrato de levedura) na sua composição utilizados como fontes de nitrogênio que, devido à clivagem por outras enzimas expressas pelos fungos como por exemplo proteases, nitrato redutase e nitrito redutase (UNKLES; WANG; WANG; GLASS *et al.*, 2004), produzem amônia no meio, a qual é quantificada durante o ensaio enzimático. Tais interferentes superestimam a produção de L-asparaginase quando o método de quantificação por Nessler é empregado, inviabilizando a comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com aqueles disponíveis na literatura (DE FREITAS; SOUZA; CRUVINEL; BARROS *et al.*, 2019).

3.2. Triagem de fungos produtores de glutaminase

Os valores da atividade de glutaminase comparada à L-asparaginase quantificada nas células das espécies fúngicas isoladas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os títulos de atividade das enzimas por *Penicillium* sp. RCFT14 ($p = 0,0821$) e *Aspergillus* sp. DCFS1 ($p = 0,3429$), este último tendo atividade da glutaminase superior à atividade da L-asparaginase. Por outro lado, os valores da atividade da L-asparaginase dos isolados *Fusarium* sp. DCFS10 ($p = 0,0022$), *Penicillium* sp. 2DSST1 ($p = 0,0224$) e DCFS6 ($p = 0,0056$), e *Mucor* sp. DCFTP7 ($p = 0,0278$) foram significativamente maiores do que os valores de atividade glutaminase, portanto, *Fusarium* sp. DCFS10, *Penicillium* sp. 2DSST1, *Penicillium* sp. DCFS6 e *Mucor* sp. DCFTP7 foram selecionados para experimentos posteriores devido aos valores mais altos da atividade da L-asparaginase com os valores mais baixos da atividade da glutaminase (Figura 7).

Figura 7 - Triagem quantitativa da produção de glutaminase quantificada nas células dos fungos isolados do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro após cultivo submerso com maiores níveis de atividade de L-asparaginase. As análises foram realizadas em duplicatas dentro de cada replicata ($n = 4$) e os resultados são apresentados como distribuição das atividades enzimáticas para cada isolado

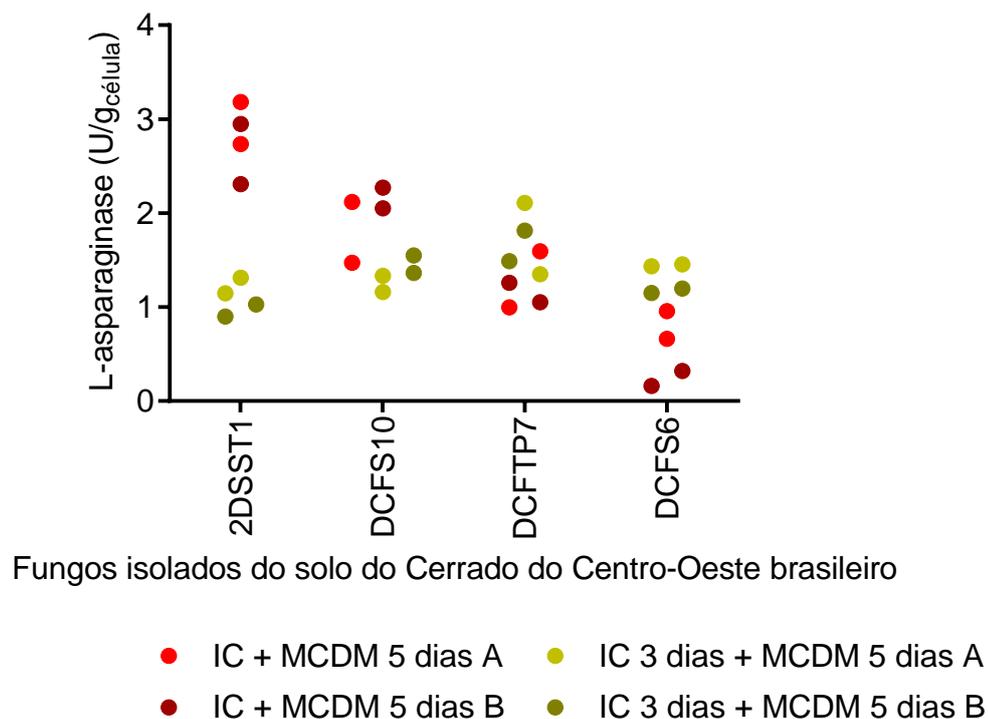


Tendo em vista que coatividade de glutaminase da L-asparaginase está relacionada com a ocorrência de efeitos colaterais tóxicos que incluem reação alérgica, pancreatite, anormalidades na coagulação, alcalose respiratória, hiperglicemia, náusea, vômito, hiperamonoanemia e neurotoxicidade (ALBRECHT; NORENBURG, 2006; CACHUMBA; ANTUNES; PERES; BRUMANO *et al.*, 2016; TONG; PIETERS; DE GROOT-KRUSEMAN; HOP *et al.*, 2014; WARRELL; CHOU; GORDON; TAN *et al.*, 1980), faz-se necessária a busca por uma fonte produtora de L-asparaginase com baixa atividade glutaminase.

3.3. Avaliação dos cultivos com e sem pré-inóculo

A produção de L-asparaginase pelos isolados selecionados com maiores níveis de atividade da L-asparaginase com menores valores de atividade da glutaminase foi avaliada quando estes isolados foram cultivados em IC – caldo batata dextrose 2,4 % e extrato de levedura 1 % - junto ao MCDM por 5 dias frente ao cultivo em IC por 3 dias e posteriormente transferido para MCDM por 5 dias (Figura 8).

Figura 8 - Comparação da atividade de L-asparaginase por fungos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro sob diferentes cultivos submersos em diferentes períodos de incubação. IC: meio de cultivo indutor do crescimento; MCDM: meio de cultivo Czapek Dox modificado



A análise estatística pelo teste t não-pareado revelou que a média dos valores de atividade enzimática é significativamente diferente ($p < 0,05$) para *Penicillium sp.* 2DSST1 e *Mucor sp.* DCFTP7, ou seja, a produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* 2DSST1 é incrementada quando este isolado é cultivado em meio de cultivo IC combinado ao meio de cultivo CDM por 5 dias e a produção de L-asparaginase por *Mucor sp.* DCFTP7 é incrementada quando este isolado é cultivado em meio de cultivo IC por 3 dias e posteriormente transferido para meio de cultivo CDM por 5 dias.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na média dos valores de atividade enzimática para *Fusarium sp.* DCFS10 e *Penicillium sp.* DCFS6 quando estes foram cultivados em meio de cultivo IC junto ou separado do meio de cultivo CDM.

3.4. Rompimento da célula fúngica para liberação de L-asparaginase

3.4.1. Método mecânico por maceração

A maceração do micélio congelado em gral e pistilo como método mecânico foi realizada e a atividade de L-asparaginase foi quantificada no extrato bruto e expressa como U/mL (Tabela 14).

Tabela 14 - Valores das atividades de L-asparaginase por espécies fúngicas isoladas do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro quando submetidas à método mecânico de rompimento celular

Espécie fúngica	U/mL
DCFS10	0,50
2DSST1	0,43
DCFTP7	0,06
DCFS6	0,02

A produção de pigmento alaranjado foi observada em todas as amostras em que foi utilizado o coquetel inibidor de protease. Os brancos das amostras obtiveram um aumento de aproximadamente 100 % em suas absorbâncias em comparação àqueles que não foram adicionados coquetel inibidor de protease. Esta observação pode ser explicada pela interação de um dos componentes do coquetel inibidor de protease, inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina, com o cloreto férrico utilizado

no ensaio enzimático. A fenantrolina reage com os íons Ferro II e Ferro III formando o íon complexo ferroso trifenantrolina vermelho (KOLTHOFF; LEUSSING; LEE, 1950).

A espécie fúngica *Mucor* sp. DCFTP7 foi identificada fenotipicamente pelo Professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) como *Mucor* spp. Semelhante aos outros membros da família Mucoraceae, são observadas infecções com uma variedade de estados patológicos que causam imunossupressão. Várias espécies de *Mucor* causam doenças em seres humanos, já que fungos deste gênero são oportunistas (RIBES; VANOVER-SAMS; BAKER, 2000). Adicionalmente, a atividade de L-asparaginase tem reduzido nesta espécie fúngica ao longo do tempo. Por estes motivos, a pesquisa no isolado *Mucor* sp. DCFTP7 foi descontinuada neste estudo.

Fusarium sp. DCFS10 e *Penicillium* sp. 2DSST1 foram selecionados para experimentos posteriores por terem produzido os valores mais altos da atividade da L-asparaginase com os valores mais baixos da atividade da glutaminase.

3.4.2. Método físico por sonicação

O rompimento celular do fungo filamentoso *Penicillium* sp. 2DSST1 pelo método físico por sonicação foi comparado ao método mecânico por maceração após o cultivo. A sonicação do micélio da espécie fúngica *Penicillium* sp. 2DSST1 como método físico foi realizada e a atividade enzimática de L-asparaginase e concentrações de proteínas totais foram quantificadas no sobrenadante do extrato bruto e comparadas com aquelas obtidas por maceração da amostra no mesmo cultivo (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação da eficiência dos métodos mecânico e físico para extração da L-asparaginase de *Penicillium* sp. 2DSST1

Método empregado	L-asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Maceração	2,35 ± 0,03	2,95 ± 0,05	0,80
Sonicação	0,48 ± 0,02	1,32 ± 0,02	0,36

A maceração da biomassa fúngica foi o método mais eficiente para a liberação de L-asparaginase. A atividade da L-asparaginase e a atividade específica *Penicillium*

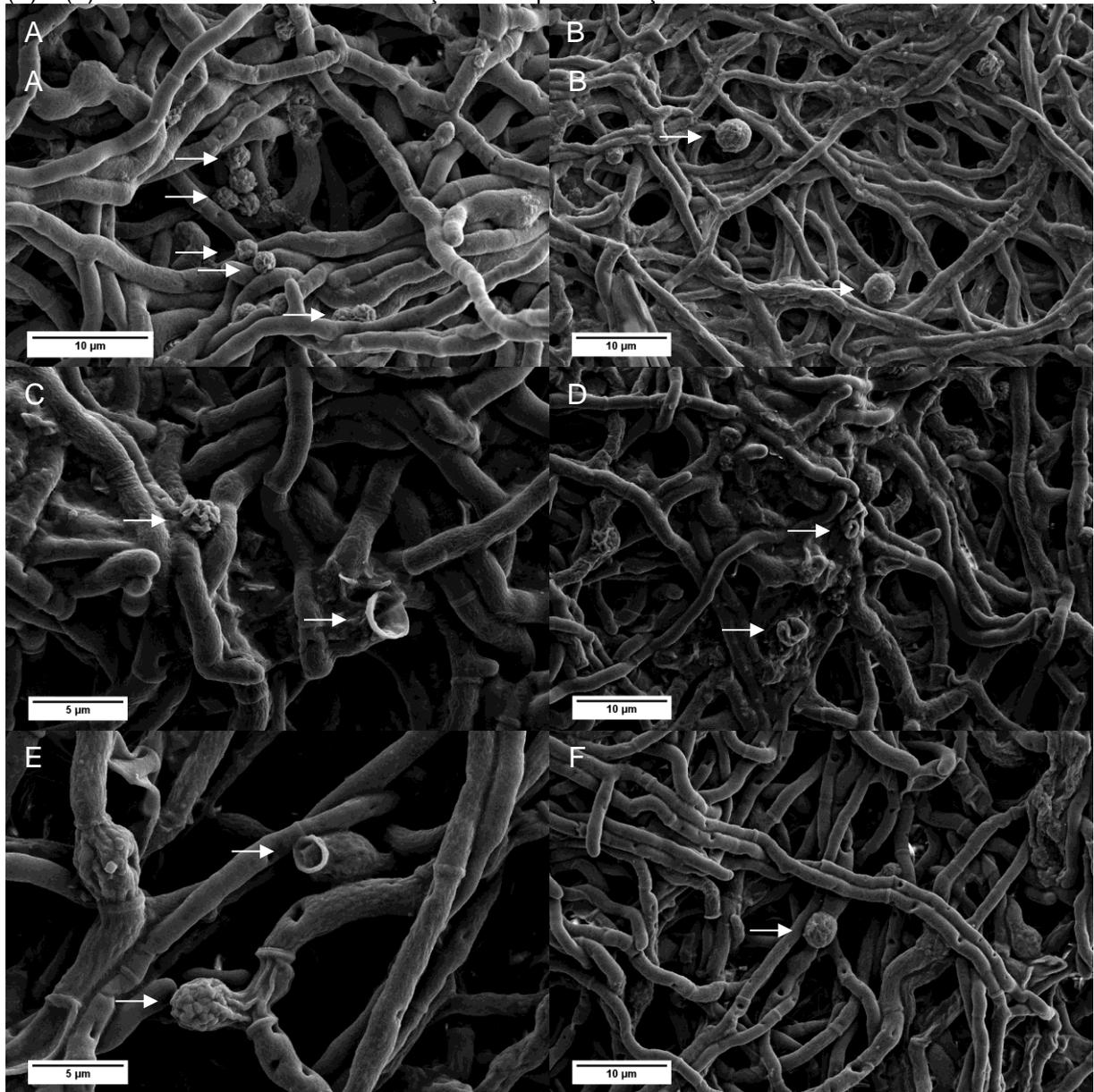
sp. 2DSST1 extraída pelo método de maceração foi 5 vezes e 2 vezes maior, respectivamente, do que os valores obtidos pelo método de sonicação, sugerindo que o método mecânico promoveu a ruptura das células fúngicas, liberando assim mais L-asparaginase quando comparado ao método de sonicação.

Ferrara et al. (2010) estudaram a extração de L-asparaginase do espaço periplasmático da levedura *Pichia pastoris* recombinante através do tratamento de congelamento seguido de descongelamento das células de levedura seguido de extração com tampão fosfato de potássio e tratamento alcalino com tampão fosfato de potássio contendo 10 mM cisteína em pH 11,5, os quais obtiveram atividades L-asparaginase quantificadas pelo método de β -hidroxamato aspartico de 13,274 U/mL (0,84 mg/mL de proteína) e 19,134 U/mL (1,22 mg/mL de proteína), respectivamente (FERRARA; SEVERINO; VALENTE; PERALES *et al.*, 2010). Costa-Silva et al (2018) avaliaram diferentes métodos de rompimento de célula microbiana para a liberação de L-asparaginase em uma cepa de *Aspergillus terreus*, que obteve $2,8 \pm 0,62$ U/mg de atividade específica quando o método de congelamento seguido de maceração das células foi empregado, utilizando o reagente de Nessler para quantificar a atividade enzimática. O maior rendimento de extração de proteínas da célula fúngica foi obtido pelo tratamento mecânico, que se revelou o mais eficaz para a desintegração de células de fungos filamentosos. Além disso, o método de congelamento e maceração foi o método mais simples e rápido utilizado para a liberação da L-asparaginase (COSTA-SILVA; FLORES-SANTOS; FREIRE; VITOLO *et al.*, 2018). Santos et al. (2018) utilizaram um sistemas de duas fases aquosas de sal de polímero com base em polietilenoglicol e tampão citrato, com líquidos iônicos como adjuvantes, combinados com a permeabilização da membrana celular usando n-dodecano e glicina para a purificação *in situ* de L-asparaginase periplasmática de células de *E. coli*. A extração foi realizada através da permeabilização celular por glicina e n-dodecano, seguida pela precipitação das proteínas contaminantes com sulfato de amônio. Sistemas aquosos de duas fases foram integrados como uma etapa final de purificação, sendo: tampão PEG 6000/citrato (15/15 % em peso), pH 7 sem líquidos iônicos e PEG 6000/tampão citrato (15/15 % em peso) com 5 % em peso de [C4mim] [CH₃SO₃] como adjuvante em pH 7 para o ATPS suplementado com líquidos iônicos (SANTOS; FLORES-SANTOS; MENEGUETTI; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2018).

3.4.3. Avaliação das estruturas fúngicas por microscopia

Alterações morfológicas de *Penicillium sp.* 2DSST1 submetidos a métodos mecânicos para rompimento de células fúngicas foram observados em MEV e comparados com uma amostra de controle (Figura 9). Foi possível visualizar a estrutura morfológica saudável de esporos e hifas no micélio de *Penicillium sp.* 2DSST1 na biomassa não tratada usada como controle (Figura 9A-B). Embora a ruptura dos conídios tenha sido observada nas duas amostras submetidas a métodos de extração mecânica (Figura 9C-E), não foi possível observar muitas alterações morfológicas na amostra sonicada quando comparado ao controle devido à presença de conídios intactos (Figura 9F), enquanto na amostra macerada os conídios que não foram rompidos se apresentaram enrugados (Figura 9C). Portanto, é possível inferir que o método de maceração parece ter um efeito prejudicial mais profundo nas células fúngicas em comparação à sonicação.

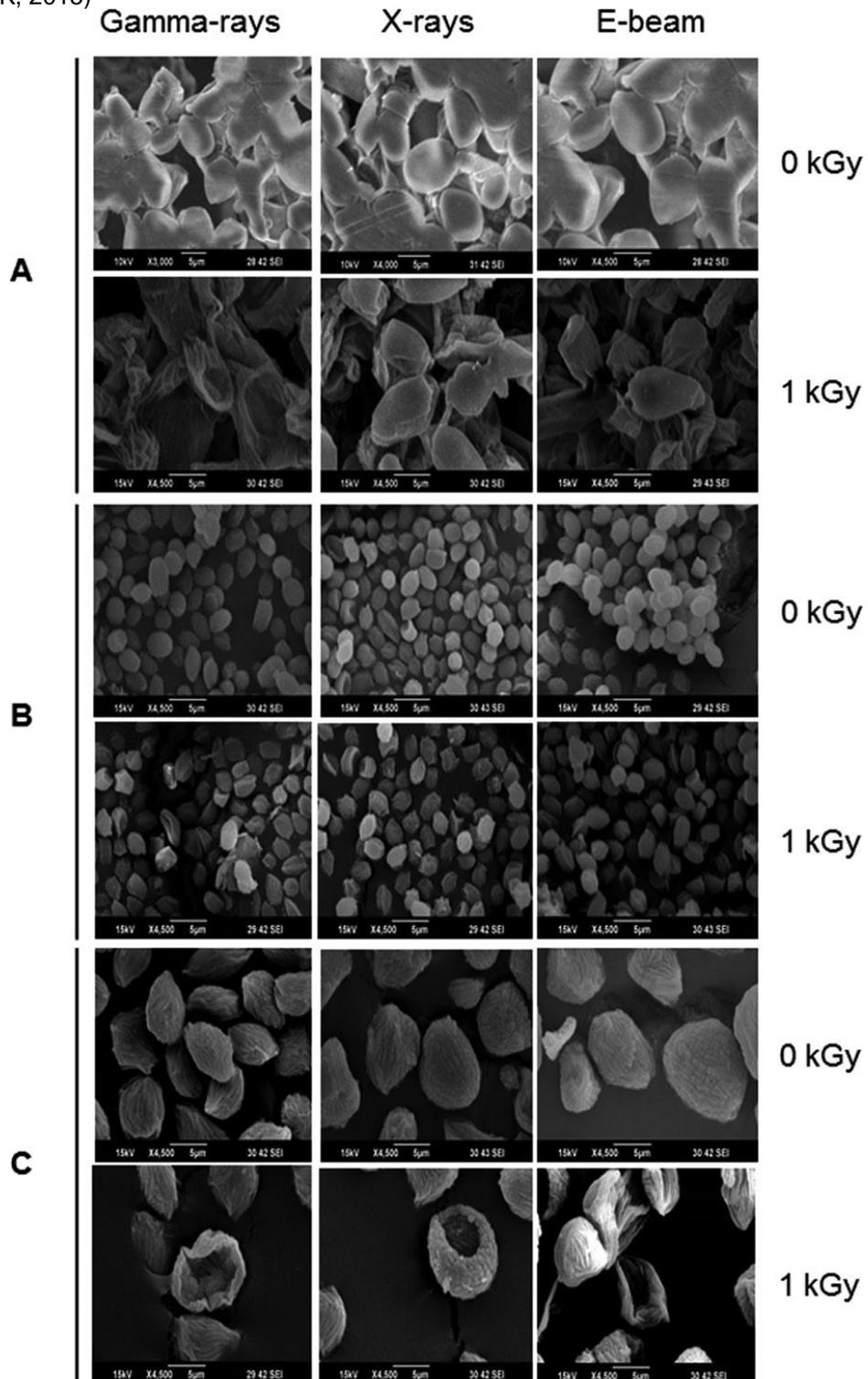
Figura 9 - Imagens de microscopia de varredura das amostras de biomassa de *Penicillium sp.* 2DSST1 (A) e (B) controle; (C) e (D) biomassa submetida a extração mecânica por maceração com gral e pistilo; (E) e (F) biomassa submetida a maceração física por sonicacão



Jeong et al. (2015) avaliou os efeitos de radiação ionizante em fungos patogênicos após colheita (JEONG; SHIN; CHU; PARK, 2015). Os esporos de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Rhizopus stolonifer* foram submetidos a irradiação de 1.0 kGy de raio-Gamma, raio-X e e-beam e as alterações morfológicas dos esporos fúngicos foram examinadas por análise das imagens obtidas por MEV. Os esporos expostos foram destruídos e exibiram um alto grau de esvaziamento na superfície dos esporos (Figura 10). Similarmente, a destruição e esvaziamento dos esporos de *Penicillium sp.* 2DSST1 foi observada em maior grau na amostra submetida a

rompimento celular por maceração e em menor grau na amostra submetida a sonicação.

Figura 10 - A morfologia da superfície dos esporos dos fungos foi analisada por MEV após irradiações (0 e 1,0 kGy). Os esporos expostos foram esmagados e exibiram um alto grau de esvaziamento na superfície dos esporos em *B. cinerea* (A), *P. expansum* (B), e *R. stolonifer* (C). Fonte: (JEONG; SHIN; CHU; PARK, 2015)



3.5. Identificação das espécies fúngicas selecionadas

As espécies de fungos selecionadas como melhores produtoras de L-asparaginase foram confirmadas por técnicas de biologia molecular. Após a análise com as sequências no Genbank e análise de agrupamento filogenético, foi estabelecido que as sequências de nucleotídeos deduzidas das cepas fúngicas eram altamente homólogas (100 %) com as sequências de rDNA ITS, calmodulina, β -tubulina e RPB2 relatadas de *Penicillium* e sequências ITS, β -tubulina e EF-1 α de *Fusarium*. As mesmas sequências de fragmentos foram utilizadas na identificação multigênica de espécies. Com base na análise multilocus, os isolados *Penicillium* sp. 2DSST1 (Figura 11) e *Fusarium* sp. DCFS10 (Figura 12) foram identificados como *Penicillium sizovae* (Figura 13A) e *Fusarium proliferatum* (Figura 13B), respectivamente. As novas sequências foram depositadas no GenBank sob números de acesso conforme a Tabela 16 e estarão disponíveis para consulta.

Figura 11 - *Penicillium sizovae* 2DSST1 crescido em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (A) frente (B) verso

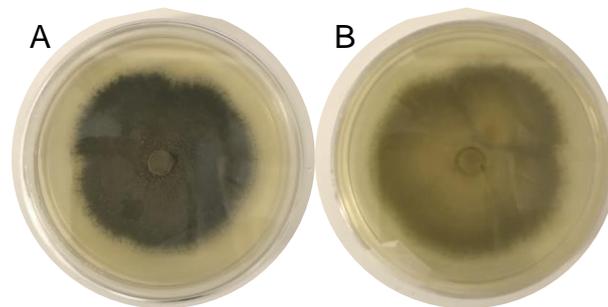


Figura 12 - *Fusarium proliferatum* DCFS10 crescido em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (A) frente (B) verso

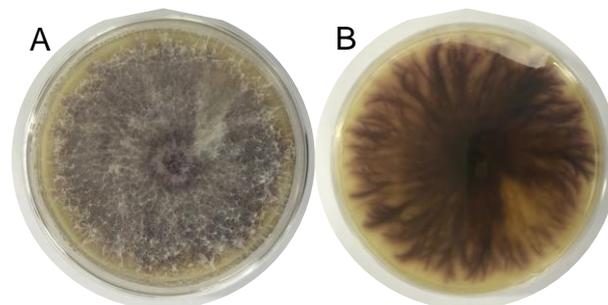
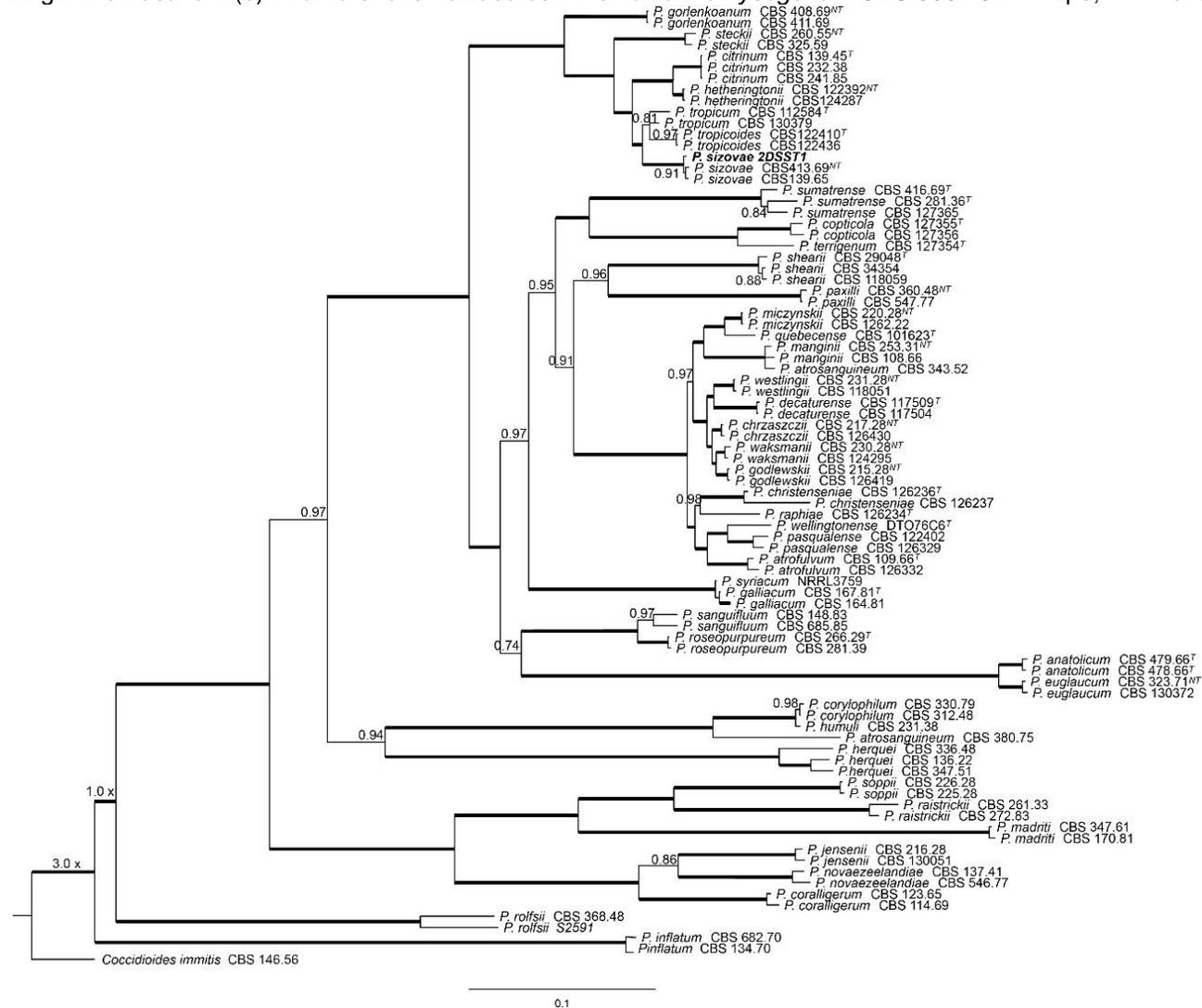


Figura 13 - Árvore filogenética bayesiana baseada em seqüências concatenadas. Os valores das probabilidades bayesianas posteriores são indicados nos nós e as linhas grossas indicam probabilidade posterior maior ou igual a 0,99. Os espécimes deste estudo estão destacados em negrito. Sequências ITS, calmodulina, β -tubulina e RPB2 de espécies de *Penicillium* da seção Citrina (a). A árvore foi enraizada com *Coccidioides immitis* CBS 146.56^T. Sequências ITS, β -tubulina e EF-1 α do gênero *Fusarium* (b). A árvore foi enraizada com *Penicillium chrysogenum* CBS 306.48^T. T = tipo; NT = novo tipo

A



B

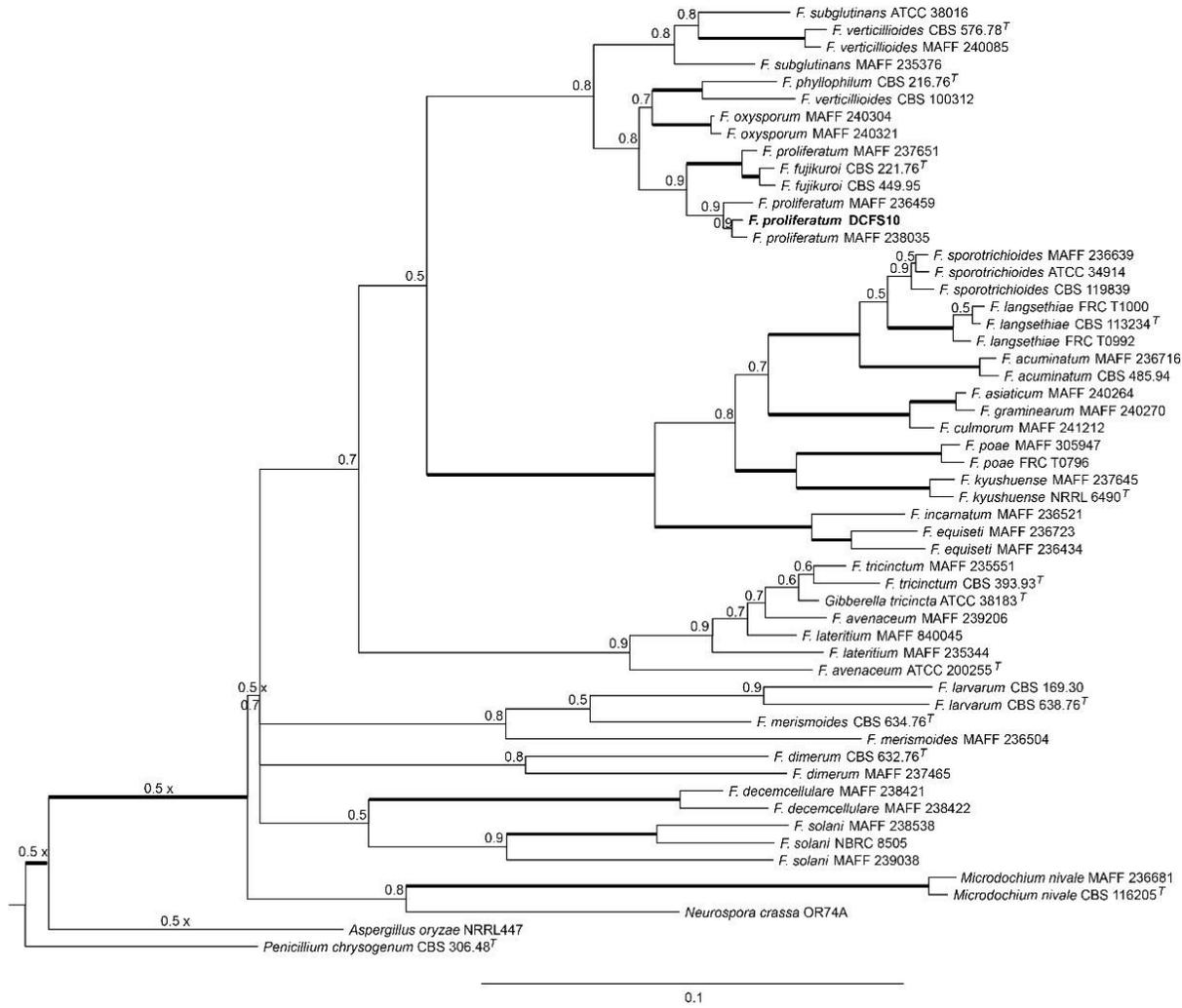


Tabela 16 - Sequências de fragmentos utilizadas na identificação multigênica das espécies *Penicillium sizovae* e *Fusarium proliferatum*

Identificação das sequências	Substrato	Coletado por	Estirpe	Hospedeiro	Nome <i>forward primer</i>	Nome <i>reverse primer</i>	NCBI
Seq1	Solo	Siqueira, F.G.	2DSST1	<i>Penicillium sizovae</i>	ITS1-F	ITS-4	MT790711
Seq2	Solo	Siqueira, F.G.	DCFS10	<i>Fusarium proliferatum</i>	ITS1-F	ITS-4	MT790712
Seq1	Solo	Siqueira, F.G.	2DSST1	<i>Penicillium sizovae</i>	cmd5	cmd6	MT815922
Seq2	Solo	Siqueira, F.G.	2DSST1	<i>Penicillium sizovae</i>	Bt2a	Bt2b	MT815923
Seq3	Solo	Siqueira, F.G.	2DSST1	<i>Penicillium sizovae</i>	fRPB2-5F	fRPB2-7cR	MT815924
Seq4	Solo	Siqueira, F.G.	DCFS10	<i>Fusarium proliferatum</i>	Bt2a	Bt2b	MT815925
Seq5	Solo	Siqueira, F.G.	DCFS10	<i>Fusarium proliferatum</i>	EF1-728F	EF1-986R	MT815926

Algumas espécies dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium* foram relatadas como produtoras de L-asparaginase: *Fusarium* sp. (KUMAR; SEDOLKAR; TRIVENI; KUMAR *et al.*, 2016), *F. culmorum* (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015), *F. equiseti* (HOSAMANI; KALIWAL, 2011), *F. moniliforme* (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012), *F. oxysporum* (CHANAKYA; NAGARJUN; SRIKANTH, 2011; YADAV; SARKAR, 2014), *F. solani* (UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016), *F. tricinctum* (SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971), *Penicillium brevicompactum* NRC 829 (ELSHAFEI; HASSAN; ABOUZEID; MAHMOUD *et al.*, 2012), *P. citrinum* (YADAV; SARKAR, 2014), *P. cyclopium* (SHAFEI; EL-REFAI; MOSTAFA; EL-REFAI *et al.*, 2015) e *P. digitatum* (SHRIVASTAVA; KHAN; SHRIVASTAV; JAIN *et al.*, 2012), *Penicillium* sp. T6.2 e *Fusarium* sp. T22.2 (GONÇALVES; MAIA; RUEDA; VANZELA, 2016). Entretanto, não existem relatos na literatura sobre produção desta enzima pelas espécies de fungos identificadas no presente trabalho, o que o torna inédito.

3.6. Otimização do meio de cultivo para a produção de L-asparaginase pelos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro

A partir da triagem realizada com fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, os isolados selecionados com maiores níveis de atividade de L-asparaginase e menores valores de atividade de glutaminase – *P. sizovae* e *F. proliferatum* - foram avaliados frente a diferentes condições sob cultivo submerso. Uma triagem inicial variáveis importantes à produção de L-asparaginase por cada espécie foi realizada com o emprego do planejamento experimental Plackett-Burman Design, seguido de otimização do meio de cultivo utilizando as variáveis selecionadas em planejamento experimental Delineamento Composto Central (DCC) ou Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

3.6.1. Triagem de variáveis por planejamento experimental Plackett-Burman de *P. sizovae*

O planejamento experimental Plackett-Burman foi empregado para identificar as variáveis que mais influenciam na produção de L-asparaginase como um método de triagem eficiente para identificar os fatores ativos utilizando a menor quantidade de

corridas experimentais possível. A otimização de meio de cultivo geralmente é um processo demorado e intensivo em mão-de-obra. O desenho experimental de Plackett-Burman provou ser uma ferramenta valiosa para a rápida avaliação dos efeitos dos vários componentes do meio de cultivo. Uma vez que este design é uma técnica preliminar de otimização, que testa apenas dois níveis de cada componente, não pode fornecer a quantidade ideal de cada componente requerido no meio (YU; HALLETT; SHEPPARD; WATSON, 1997). Esta técnica, no entanto, fornece indicações de como cada componente tende a afetar a atividade da L-asparaginase.

Os valores das atividades de L-asparaginase do isolado *P. sizovae* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman variaram entre 0 e $3,68 \pm 0,14$ U/mL (Tabela 17). O maior valor de atividade enzimática foi obtido na corrida número 7, em meio de cultivo composto por 1 % L-prolina; 3 % L-asparagina; 0 % ureia; 3 % nitrato de sódio; 3 % sulfato de amônio; 3 % peptona; 3 % extrato de levedura; 0 % glicose; 0 % sacarose; 0 % extrato de malte, incubado a 32°C inoculado com 1 disco de micélio de 8 mm de diâmetro, com relação de Carbono:Nitrogênio (C:N) de 1,53, a segunda menor relação C:N de todos os meios de cultivo do planejamento experimental Plackett-Burman. A relação C:N de 1,53 mostra que o isolado *P. sizovae* necessita de menor quantidade de carbono disponível no meio de cultivo para obter a maior produção de L-asparaginase.

O equilíbrio dos nutrientes em um meio de cultivo, especialmente a relação C:N, pode influenciar o crescimento e a esporulação do fungo (YU; HALLETT; SHEPPARD; WATSON, 1997). Foi possível observar redução da produção de biomassa fúngica nos meios de cultivo com as menores relações C:N. Não houve crescimento de biomassa no meio de cultivo com a menor relação C:N (0,95) representado pela corrida número 5 segundo o planejamento experimental Plackett-Burman, portanto, não foi possível quantificar a atividade enzimática e a concentração de proteínas totais. Houve pouco crescimento de biomassa no meio de cultivo em que todas as variáveis foram avaliadas no menor nível (-1) representado pela corrida número 16 segundo o planejamento experimental Plackett-Burman, composto apenas de baixas concentrações de L-prolina (1 %), L-asparagina (1 %) e sais do meio de cultivo Czapek Dox. Portanto, não houve amostra suficiente para a realização do ensaio da atividade de L-asparaginase em triplicata, apenas uma alíquota da amostra foi avaliada.

Tabela 17 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *P. sizovae* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman

(continua)

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	X ₅ (%)	X ₆ (%)	X ₇ (%)	X ₈ (%)	X ₉ (%)	X ₁₀ (%)	X ₁₁ (°C)	X ₁₂ (disco micelial)	C:N	L- asparaginase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	3	1	0	0	3	0	0	1	1	0	32	1	2,27	0,28 ± 0,03	3,03 ± 0,16	0,09
2	3	3	0	0	0	3	0	0	1	3	28	5	3,91	0,66 ± 0,02	3,21 ± 0,11	0,21
3	3	3	1	0	0	0	3	0	0	3	32	1	2,82	2,46 ± 0,10	2,40 ± 0,15	1,03
4	3	3	1	3	0	0	0	1	0	0	32	5	1,66	0,48 ± 0,05	2,42 ± 0,09	0,20
5	1	3	1	3	3	0	0	0	1	0	28	5	0,95	-	-	-
6	3	1	1	3	3	3	0	0	0	3	28	1	1,76	2,96 ± 0,08	3,64 ± 0,08	0,81
7	1	3	0	3	3	3	3	0	0	0	32	1	1,53	3,68 ± 0,14	4,23 ± 0,14	0,87
8	3	1	1	0	3	3	3	1	0	0	28	5	2,05	2,06 ± 0,03	3,16 ± 0,06	0,65
9	3	3	0	3	0	3	3	1	1	0	28	1	2,65	1,91 ± 0,13	6,61 ± 0,37	0,29
10	1	3	1	0	3	0	3	1	1	3	28	1	2,23	1,08 ± 0,01	3,51 ± 0,04	0,31
11	1	1	1	3	0	3	0	1	1	3	32	1	2,54	1,24 ± 0,04	3,97 ± 0,06	0,31
12	3	1	0	3	3	0	3	0	1	3	32	5	2,26	0,90 ± 0,04	3,41 ± 0,05	0,26
13	1	3	0	0	3	3	0	1	0	3	32	5	2,46	0,71 ± 0,01	3,17 ± 0,09	0,22
14	1	1	1	0	0	3	3	0	1	0	32	5	2,56	1,74 ± 0,09	3,83	0,46
15	1	1	0	3	0	0	3	1	0	3	28	5	3,02	0,33 ± 0,00	4,02 ± 0,10	0,08

Tabela 17 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *P. sizovae* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	X ₅ (%)	X ₆ (%)	X ₇ (%)	X ₈ (%)	X ₉ (%)	X ₁₀ (%)	X ₁₁ (°C)	X ₁₂ (disco micelial)	C:N	L- asparaginase (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	1	2,65	0,27	4,01 ± 0,15	0,07
17	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	1,82 ± 0,09	3,32 ± 0,08	0,55
18	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	1,33 ± 0,05	3,05 ± 0,06	0,44
19	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	1,18 ± 0,01	3,03 ± 0,16	0,39

X₁: L-prolina; X₂: L-asparagina; X₃: ureia; X₄: nitrato de sódio; X₅: sulfato de amônio; X₆: peptona; X₇: extrato de levedura; X₈: glicose; X₉: sacarose; X₁₀: extrato de malte; X₁₁: temperatura; X₁₂: tamanho de inóculo; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio; (-): não detectado. (conclusão)

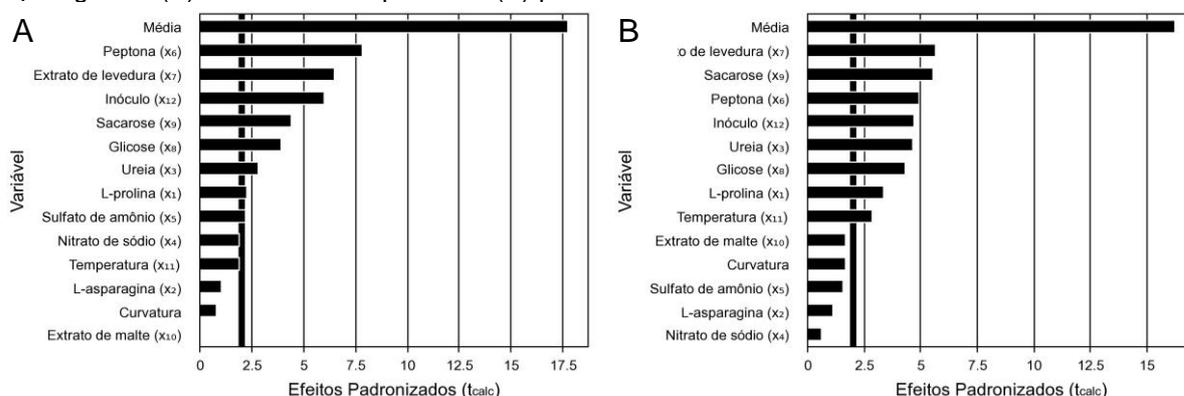
As variáveis com coeficiente de regressão positivo representam um aumento na atividade da L-asparaginase devido ao aumento da concentração das variáveis, enquanto que as variáveis com coeficiente de regressão negativa representam diminuição da atividade da L-asparaginase devido ao aumento da concentração das variáveis (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). Os resultados calculados pelo software Protimiza Experimental Design para as atividades enzimáticas Y_1 (U/mL) e atividades específicas Y_2 (U/mg) obtidas pelo isolado *P. sizovae* apresentados na Tabela 18 mostram que peptona, extrato de levedura, ureia, L-prolina, sulfato de amônio, temperatura e L-asparagina são as variáveis que induziram efeitos positivos sobre a produção de L-asparaginase, ou seja, estas aumentaram as atividades total e específica de L-asparaginase em seu nível mais alto, enquanto inóculo, sacarose e glicose apresentaram efeitos negativos, ou seja, diminuíram as atividades total e específica de L-asparaginase em seu nível mais alto. Extrato de malte obteve efeito negativo sobre a atividade de L-asparaginase e efeito positivo sobre a atividade específica da enzima. Nitrato de sódio obteve efeito positivo sobre a atividade de L-asparaginase e efeito negativo sobre a atividade específica da enzima, ou seja, quanto maior a concentração de nitrato de sódio, maior a atividade enzimática e menor a atividade específica, pela presença de mais proteínas no meio, provavelmente a aumentada produção de nitrato redutase para reduzir o substrato nitrato de sódio (UNKLES; WANG; WANG; GLASS *et al.*, 2004).

Tabela 18 - Efeito e significância das variáveis sobre a atividade total e específica de L-asparaginase pelo isolado *P. sizovae*

Nome	Atividade L-asparaginase (Y ₁ , U/mL)				Atividade específica (Y ₂ , U/mg)			
	Efeito	Erro padrão	t calculado	valor de p	Efeito	Erro padrão	t calculado	valor de p
Média	1,298707	0,073101	17,76591	1,04E-05	0,36625	0,022514	16,26774	1,6E-05
Curvatura	0,28921	0,367934	0,786039	0,467443	0,1875	0,113317	1,654644	0,158902
L-prolina (x ₁)	0,332434	0,146202	2,273795	0,072096	0,1525	0,045028	3,386799	0,019529
L-asparagina (x ₂)	0,152181	0,146202	1,040897	0,345615	0,05	0,045028	1,110426	0,317342
Ureia (x ₃)	0,40952	0,146202	2,801054	0,037946	0,21	0,045028	4,663789	0,005513
Nitrato de sódio (x ₄)	0,279405	0,146202	1,911089	0,114227	-0,0275	0,045028	-0,61073	0,568069
Sulfato de amônio (x ₅)	0,320546	0,146202	2,192487	0,079846	0,07	0,045028	1,554596	0,18076
Peptona (x ₆)	1,146298	0,146202	7,840503	0,000542	0,2225	0,045028	4,941395	0,004317
Extrato de levedura (x ₇)	0,945283	0,146202	6,465593	0,001318	0,255	0,045028	5,663172	0,002387
Glicose (x ₈)	-0,5733	0,146202	-3,92125	0,011168	-0,195	0,045028	-4,33066	0,007495
Sacarose (x ₉)	-0,64329	0,146202	-4,39998	0,007022	-0,25	0,045028	-5,55213	0,002605
Extrato de malte (x ₁₀)	-0,01042	0,146202	-0,07128	0,945936	0,075	0,045028	1,665639	0,156665
Temperatura (x ₁₁)	0,27613	0,146202	1,888687	0,117558	0,1275	0,045028	2,831586	0,036606
Inóculo (x ₁₂)	-0,87548	0,146202	-5,98811	0,001863	-0,2125	0,045028	-4,71931	0,005246

O valor de p é usado como uma ferramenta para verificar a significância de cada um dos coeficientes, o que, por sua vez, pode indicar o padrão das interações entre as variáveis. Quanto menor o valor de p , mais significativo é o coeficiente correspondente (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). O valor de $p < 0,1$ foi adotado neste trabalho, pois em delineamento de seleção de variáveis é mais prudente estabelecer um nível de significância de 10 % em lugar de 5 %, minimizando o risco de excluir algum fator importante para o processo na etapa seguinte de otimização de meio de cultivo (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Peptona, extrato de levedura, tamanho do inóculo, sacarose, glicose, ureia e L-prolina são variáveis significativas do modelo enquanto nitrato de sódio, L-asparagina e extrato de malte não são variáveis significativas do modelo tanto para atividade da L-asparaginase quanto para atividade específica. Sulfato de amônio é significativo para a atividade de L-asparaginase, mas não para a atividade específica, enquanto a temperatura não é significativa para a atividade de L-asparaginase, mas sim para a atividade específica (Figura 14).

Figura 14 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis frente às atividades de L-asparaginase (A) e atividades específicas (B) por *P. sizovae*



Os maiores níveis de atividade de L-asparaginase pelo planejamento experimental Plackett-Burman ($3,68 \pm 0,14$ U/mL, $2,96 \pm 0,08$ U/mL e $2,46 \pm 0,10$ U/mL) apresentaram os maiores níveis de atividade específica ($0,87$ U/mg_{proteína}, $0,81$ U/mg_{proteína} e $1,03$ U/mg_{proteína}, respectivamente), os quais foram obtidos através do cultivo do isolado *P. sizovae* em menor nível de inóculo (1 disco de micélio de 8 mm de diâmetro) na ausência de glicose e sacarose, corroborando com os resultados de efeitos negativos e significativos acima apresentados para estas variáveis. No estudo de Lincoln *et al.* (2015), a glicose não aumentou a atividade enzimática da L-asparaginase de *Trichoderma viride* Pers, provavelmente pelo fato de a glicose atuar

como repressora quando utilizada em maior concentração (LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015). A mesma repressão por glicose foi observada com L-asparaginase de *Streptomyces gulbargensis* por Amena et al. (2010) (AMENA; VISHALAKSHI; PRABHAKAR; DAYANAND *et al.*, 2010). A glicose provou ser uma fonte pobre de carbono para a produção de L-asparaginase por *E. aerogenes* no estudo de Mukherjee, Majumdar e Scheper (2000), em que os autores observaram que a glicose pode também diminuir o rendimento da enzima atuando como um repressor (MUKHERJEE; MAJUMDAR; SCHEPER, 2000). Barnes, Dorn e Vele (1977) observaram que a glicose causou significativa redução na atividade de L-asparaginase produzida por *E. coli* A-1 (BARNES; DORN; VELA, 1977). Warangkar e Khobragade (2009) observaram que o crescimento de *E. carotovora* na presença de glicose como fonte de carbono apresentou menor atividade enzimática quando comparado a outras fontes de carbono. Isto explica que a síntese de L-asparaginase na cepa isolada de *E. carotovora* foi quase completamente suprimida se a glicose fosse adicionada a uma concentração de 0,5 % ao meio de cultivo como *E. coli*-W e *E. coli* K-12. Isto pode ser devido à repressão catabólica causada pela glicose e inibição catabólica dos componentes envolvidos no transporte de lactato e pela síntese de L-asparaginase estimulada por lactato. Fontes de nitrogênio, como extrato de levedura, peptona, triptona, licor de macerado de milho e hidrolisado de caseína, mostraram-se potentes para a produção de L-asparaginase com atividade moderada (WARANGKAR; KHOBRADE, 2009).

El-Refai et al. (2014) aplicaram o planejamento experimental Plackett-Burman, no qual a maior atividade enzimática obtida por *Penicillium cyclopium* em meio de cultivo composto por sacarose 1 g/L; L-asparagina 0,5 g/L; $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,75 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,72 g/L; KCl 0,72 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 11,7 g/L em três dias de incubação. As variáveis que mostraram um efeito positivo para a atividade da asparaginase de *Penicillium cyclopium* foram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e KCl, enquanto a sacarose, L-asparagina, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e o tempo de incubação mostraram efeito negativo (EL-REFAI; EL-SHAFAI; MOSTAFA; EL-REFAI *et al.*, 2014). Similarmente ao encontrado neste estudo para a produção desta enzima por espécie do gênero *Penicillium*, as variáveis sulfato de amônio e sacarose mostraram efeitos positivo e negativo, respectivamente.

Baskar, Renganathan et al. (2009) conduziram alguns estudos de planejamento experimental para promover a atividade da L-asparaginase pelo fungo *Aspergillus*

terreus MTCC 1782 sob fermentação submersa. Ao aplicar o Plackett-Burman Design, L-asparagina (nível de confiança 98,7 %), farinha de milho (nível de confiança 88,3 %), ureia (nível de confiança 77,6 %) e cloreto de potássio (nível de confiança 77,6 %) foram encontrados como fatores mais importantes que influenciam a produção de L-asparaginase, entre os quais farinha de milho, ureia e L-asparagina demonstraram efeito positivo na produção de L-asparaginase (BASKAR; RENGANATHAN, 2009b). Ao avaliar o efeito de fontes de nitrogênio suplementares na produção de L-asparaginase e biomassa por *Latin Square Design*, uma ferramenta estatística eficaz para identificar a melhor fonte de carbono ou nitrogênio para a produção fermentativa de qualquer produto, cloreto de amônio foi o melhor para a atividade máxima de L-asparaginase (nível de confiança de 96,61%) com menor formação de biomassa (nível de confiança de 21,93%) quando comparado ao nitrato de sódio e ureia, usando pó de amendoim como substrato natural de baixo custo (BASKAR; RENGANATHAN, 2009a). Posteriormente, a ureia obteve um efeito maior (nível de confiança 98,61 %) na produção de L-asparaginase do que o cloreto de amônio (nível de confiança 61,18 %) e nitrato de sódio (nível de confiança 60,69 %) usando farinha de milho como substrato. Similarmente, a ureia (nível de confiança 32,26 %) obteve maior efeito do que o cloreto de amônio (nível de confiança 31,51 %) e nitrato de sódio (nível de confiança 20,13 %) na produção de biomassa por *A. terreus* em suas diferentes concentrações. O nitrato de sódio e o cloreto de amônio proporcionaram efeitos negativos em suas altas e baixas concentrações, respectivamente, diminuindo a produção de L-asparaginase nesses níveis. Nitrato de sódio e cloreto de amônio proporcionaram maior atividade de L-asparaginase a 0,3 % e 1,2 %, respectivamente. A produção de L-asparaginase foi reduzida quando ureia estava na sua baixa concentração e aumentou em sua maior concentração (1,6 %), confirmando que esta é a melhor fonte suplementar de nitrogênio para a produção máxima de L-asparaginase (BASKAR; SRIHARINI; SRIPRIYA; RENGANATHAN, 2010). Os efeitos de L-asparagina e das fontes nitrogênio (extrato de levedura e peptona) e diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose) foram estudados para a produção de L-asparaginase extracelular. As concentrações ótimas determinadas para L-asparagina, extrato de levedura, peptona e glicose, identificada como a melhor fonte de carbono, foram de 1%, 1% e 0,6% e 0,4%, respectivamente (BASKAR; RENGANATHAN, 2011a).

Dias e Sato (2016) otimizaram o meio de cultivo para máxima produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* CCT 3940. A melhor fonte de carbono para a produção de L-asparaginase foi glicose, seguida de lactose e sacarose. A menor atividade de L-asparaginase foi obtida usando extrato de malte e frutose como fontes de carbono. L-prolina, seguida de L-asparagina e L-tirosina foram as fontes de nitrogênio que promoveram a maior atividade de L-asparaginase. O planejamento experimental Plackett-Burman mostrou que a concentração do inóculo, o pH inicial do meio de cultura, a temperatura, a concentração de L-asparagina, a taxa de agitação (rpm) e a concentração do extrato de levedura foram as variáveis que tiveram um efeito positivo na atividade de L-asparaginase, dentre as quais concentração do inóculo ($p = 0,005$), o pH inicial do meio de cultura ($p = 0,037$) foram os fatores mais significativos (DIAS; SATO, 2016).

3.6.2. Otimização de meio de cultivo por planejamento experimental Delineamento Composto Central de *P. sizovae*

A otimização do meio de cultivo dos fungos em fermentação submersa visa ao aumento da atividade de L-asparaginase ao identificar o meio de cultivo ótimo para a produção enzimática. O Delineamento Composto Central (DCC) é um tipo de metodologia de superfície de resposta utilizado para obter dados que se ajustam a um modelo polinomial de segunda ordem. É uma técnica estatística eficiente para otimização de variáveis múltiplas para predizer as condições de melhor desempenho com a menor quantidade de experimentos (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). Baskar e Renganathan (2011 e 2012) aplicaram Central Composite Design como planejamento experimental por metodologia de superfície de resposta e algoritmo genético ligado à rede neural artificial para encontrar as melhores condições operacionais para a produção melhorada de L-asparaginase pela fermentação submersa de *Aspergillus terreus* MTCC 1782 (BASKAR; RENGANATHAN, 2011b; 2012) dos quais o meio de cultivo otimizado foi utilizado no presente trabalho como meio fermentativo de referência para a triagem da seleção dos fungos melhores produtores da enzima.

As variáveis significativas são fatores mais importantes que influenciam a produção de L-asparaginase e o nível ótimo dessas variáveis pode ser determinado por metodologia de superfície de resposta. Portanto, aquelas identificadas como

significativas ($p < 0,1$) com efeito positivo (peptona, extrato de levedura e L-prolina) foram consideradas para planejamento experimental DCC para otimização do meio de cultivo. Ureia não foi selecionada para otimização de meio de cultivo embora tenha sido uma variável significativa na produção de L-asparaginase com efeito positivo, pois esta variável estava no menor nível (0 %) no meio de cultivo no qual foi obtida o maior valor de atividade de L-asparaginase.

Os valores das atividades de L-asparaginase do isolado *P. sizovae* segundo o planejamento experimental DCC variaram entre $2,59 \pm 0,03$ U/mL e $3,68 \pm 0,12$ U/mL (Tabela 19). O maior valor de atividade enzimática foi obtido na corrida número 6, com o segundo maior valor de atividade específica (1,12 U/mg de proteína) em meio de cultivo composto por peptona 5 %; extrato de levedura 3 %; L-prolina 5 %; L-asparagina 3 %; nitrato de sódio 3 %; sulfato de amônio 3 %; K_2HPO_4 0,0152 %; KCl 0,052 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052 %; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001 %; com relação de C:N de 2,06, a segunda maior relação C:N de todos os meios de cultivo do planejamento experimental DCC. A relação C:N de 2,06 mostra que o isolado *P. sizovae* necessita de duas vezes mais carbono em relação ao nitrogênio disponível no meio de cultivo para obter a maior produção de L-asparaginase.

Tabela 19 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *P. sizovae* segundo o planejamento experimental Delineamento Composto Central

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	C:N	L- asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	3	3	1	1,53	3,60 ± 0,32	3,78 ± 0,07	0,95
2	5	3	1	1,69	2,59 ± 0,03	6,32 ± 0,57	0,41
3	3	5	1	1,68	3,31 ± 0,11	3,22 ± 0,08	1,03
4	5	5	1	1,81	3,57 ± 0,10	3,83 ± 0,03	0,93
5	3	3	5	1,97	3,51 ± 0,08	3,44 ± 0,10	1,02
6	5	3	5	2,06	3,68 ± 0,12	3,29 ± 0,28	1,12
7	3	5	5	2,06	3,42 ± 0,08	3,03 ± 0,05	1,13
8	5	5	5	2,15	3,07 ± 0,02	3,79 ± 0,05	0,81
9	4	4	3	1,89	3,52 ± 0,11	4,05 ± 0,29	0,87
10	4	4	3	1,89	3,49 ± 0,16	5,43 ± 0,11	0,64
11	4	4	3	1,89	3,03 ± 0,09	5,47 ± 0,22	0,55
12	4	4	3	1,89	2,98 ± 0,04	5,61 ± 0,14	0,53

X1: peptona; X2: extrato de levedura; X3: L-prolina; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio

Não houve aumento da atividade de L-asparaginase entre os planejamentos experimentais PB e DCC, entretanto a atividade específica de *P. sizovae* aumentou de 0,87 U/mg para 1,12 U/mg. Os resultados calculados pelo software Protimiza Experimental Design para as atividades enzimáticas Y₁ (U/mL) e atividades específicas Y₂ (U/mg) obtidas pelo isolado *P. sizovae* revelaram que coeficientes não são estatisticamente significativos. O valor de R² calculado é baixo, o que é justificado pelo fato das respostas nos pontos centrais apresentam valores bem menores e bem maiores que os esperados, assim como o fato das respostas terem pouca variação dentre os ensaios realizados, indicando que dentro da faixa estudada não há efeito das variáveis nas respostas. Logo, não foi possível otimizar o meio de cultivo para este isolado.

3.6.3. Triagem de variáveis por planejamento experimental Plackett-Burman de *F. proliferatum*

Os valores das atividades de L-asparaginase do isolado *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman variaram entre $0,04 \pm 0,01$ U/mL e $1,86 \pm 0,12$ U/mL (Tabela 20). O maior valor de atividade enzimática foi obtido na corrida número 13, em meio de cultivo composto por 1 % L-prolina; 3 % L-asparagina; 0 % ureia; 0 % nitrato de sódio; 3 % sulfato de amônio; 3 % peptona; 0 % extrato de levedura; 1 % glicose; 0 % sacarose; 3 % extrato de malte, incubado a 32°C inoculado com 5 discos de micélio de 8 mm de diâmetro, com relação C:N de 2,46, obtendo a maior atividade específica de 0,44 U/mg_{proteína}. A relação C:N de 2,46 mostra que o fungo necessita de aproximadamente duas vezes e meio mais carbono do que nitrogênio na composição do meio de cultivo para obter a maior produção enzimática. Os menores valores de atividade de L-asparaginase ($0,04 \pm 0,01$ U/mL) e atividade específica (0,01 U/mg) foram registrados no meio de cultivo com a menor relação C:N (0,95) representado pela corrida número 5 segundo o planejamento experimental Plackett-Burman.

Tabela 20 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman

(continua)

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	X ₅ (%)	X ₆ (%)	X ₇ (%)	X ₈ (%)	X ₉ (%)	X ₁₀ (%)	X ₁₁ (°C)	X ₁₂ (disco micelial)	C:N	L-asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	3	1	0	0	3	0	0	1	1	0	32	1	2,27	0,08 ± 0,01	3,06 ± 0,09	0,03
2	3	3	0	0	0	3	0	0	1	3	28	5	3,91	0,22 ± 0,01	2,42 ± 0,06	0,09
3	3	3	1	0	0	0	3	0	0	3	32	1	2,82	0,46 ± 0,04	3,45 ± 0,03	0,13
4	3	3	1	3	0	0	0	1	0	0	32	5	1,66	0,19 ± 0,01	2,57 ± 0,08	0,07
5	1	3	1	3	3	0	0	0	1	0	28	5	0,95	0,04 ± 0,01	3,53 ± 0,12	0,01
6	3	1	1	3	3	3	0	0	0	3	28	1	1,76	0,23 ± 0,00	3,97 ± 0,06	0,06
7	1	3	0	3	3	3	3	0	0	0	32	1	1,53	0,14 ± 0,01	4,53 ± 0,06	0,03
8	3	1	1	0	3	3	3	1	0	0	28	5	2,05	0,22 ± 0,00	4,42 ± 0,03	0,05
9	3	3	0	3	0	3	3	1	1	0	28	1	2,65	0,39 ± 0,03	3,98 ± 0,13	0,10
10	1	3	1	0	3	0	3	1	1	3	28	1	2,23	0,45 ± 0,01	4,15 ± 0,08	0,11
11	1	1	1	3	0	3	0	1	1	3	32	1	2,54	0,77 ± 0,01	4,02 ± 0,07	0,19
12	3	1	0	3	3	0	3	0	1	3	32	5	2,26	0,47 ± 0,01	3,38 ± 0,08	0,14
13	1	3	0	0	3	3	0	1	0	3	32	5	2,46	1,86 ± 0,12	4,26 ± 0,13	0,44
14	1	1	1	0	0	3	3	0	1	0	32	5	2,56	0,83 ± 0,01	4,14 ± 0,21	0,20
15	1	1	0	3	0	0	3	1	0	3	28	5	3,02	0,62 ± 0,02	3,93 ± 0,07	0,16

Tabela 20 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental Plackett-Burman

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	X ₅ (%)	X ₆ (%)	X ₇ (%)	X ₈ (%)	X ₉ (%)	X ₁₀ (%)	X ₁₁ (°C)	X ₁₂ (disco micelial)	C:N	L-asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	28	1	2,65	0,17 ± 0,00	3,78 ± 0,10	0,05
17	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	0,15 ± 0,00	2,55 ± 0,03	0,06
18	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	0,12 ± 0,00	3,75 ± 0,04	0,03
19	2	2	0,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,5	0,5	1,5	30	3	2,21	0,18 ± 0,00	3,63 ± 0,05	0,05

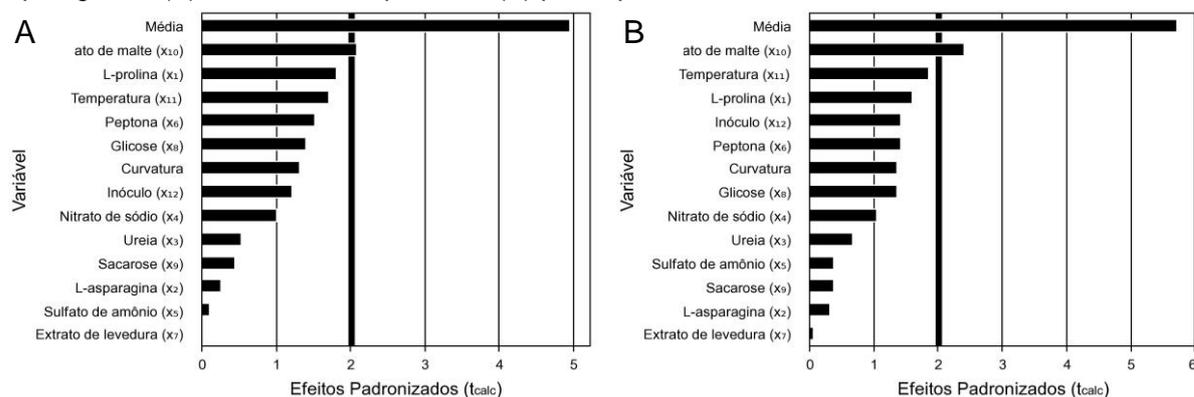
X₁: L-prolina; X₂: L-asparagina; X₃: ureia; X₄: nitrato de sódio; X₅: sulfato de amônio; X₆: peptona; X₇: extrato de levedura; X₈: glicose; X₉: sacarose; X₁₀: extrato de malte; X₁₁: temperatura; X₁₂: tamanho de inóculo; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio (conclusão)

Os resultados calculados pelo software Protimiza Experimental Design para as atividades enzimáticas Y_1 (U/mL) e atividades específicas Y_2 (U/mg) obtidas pelo isolado *F. proliferatum* apresentados na Tabela 21 mostram que extrato de malte, temperatura, peptona, glicose, inóculo e L-asparagina são as variáveis que apresentaram efeitos positivos sobre a produção de L-asparaginase, ou seja, estas aumentaram as atividades total e específica de L-asparaginase em seu nível mais alto, enquanto sulfato de amônio, sacarose, ureia, nitrato de sódio e prolina apresentaram efeitos negativos, ou seja, diminuíram as atividades total e específica de L-asparaginase em seu nível mais alto, corroborando com os resultados dos quais o meio de cultura apresentou a maior atividade de L-asparaginase e atividade específica. Extrato de levedura obteve efeito positivo sobre a atividade de L-asparaginase e efeito negativo sobre a atividade específica da enzima, ou seja, quanto maior a concentração de nitrato de sódio, maior a atividade enzimática e menor a atividade específica, pela presença de mais proteínas totais no meio. Extrato de malte foi a única variável significativa do modelo, tanto para atividade da L-asparaginase quanto para atividade específica Figura 15.

Tabela 21 - Efeito e significância das variáveis sobre a atividade total e específica de L-asparaginase pelo isolado *F. proliferatum*

Nome	L-asparaginase (Y ₁ , U/mL)				Atividade específica (Y ₂ , U/mg)			
	Efeito	Erro padrão	t calculado	Valor de p	Efeito	Erro padrão	t calculado	Valor de p
Média	0,447083	0,090148	4,959444	0,00425	0,11625	0,0203	5,726647	0,002272
Curvatura	-0,59808	0,453734	-1,31814	0,244611	-0,13917	0,102174	-1,36206	0,23133
L-prolina (x ₁)	-0,32715	0,180296	-1,8145	0,12932	-0,065	0,0406	-1,601	0,170276
L-asparagina (x ₂)	0,044922	0,180296	0,249155	0,813152	0,0125	0,0406	0,307884	0,770583
Ureia (x ₃)	-0,09688	0,180296	-0,53733	0,61408	-0,0275	0,0406	-0,67735	0,528254
Nitrato de sódio (x ₄)	-0,18047	0,180296	-1,00099	0,362781	-0,0425	0,0406	-1,04681	0,343131
Sulfato de amônio (x ₅)	-0,01927	0,180296	-0,10686	0,919055	-0,015	0,0406	-0,36946	0,726915
Peptona (x ₆)	0,27428	0,180296	1,521282	0,188673	0,0575	0,0406	1,416268	0,21587
Extrato de levedura (x ₇)	0,000364	0,180296	0,002018	0,998468	-0,0025	0,0406	-0,06158	0,953285
Glicose (x ₈)	0,253457	0,180296	1,405787	0,218781	0,055	0,0406	1,354691	0,233511
Sacarose (x ₉)	-0,08141	0,180296	-0,45155	0,670504	-0,015	0,0406	-0,36946	0,726915
Extrato de malte (x ₁₀)	0,374858	0,180296	2,079134	0,092163	0,0975	0,0406	2,401497	0,061507
Temperatura (x ₁₁)	0,309356	0,180296	1,715829	0,146849	0,075	0,0406	1,847306	0,123977
Inóculo (x ₁₂)	0,217269	0,180296	1,205072	0,282094	0,0575	0,0406	1,416268	0,21587

Figura 15 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados das variáveis frente às atividades de L-asparaginase (A) e atividades específicas (B) por *F. proliferatum*



É possível concluir que maiores concentrações de fontes de carbono, como glicose e extrato de malte, aumentaram a produção de L-asparaginase por *F. proliferatum*, diferente do observado por *P. sizovae*. Yadav e Sarkar (2014) constataram que a sacarose foi um indutor e uma fonte de carbono eficaz para a produção de asparaginase por *Fusarium oxysporum*, seguida de glicose em fermentação submersa (YADAV; SARKAR, 2014). Hosamani e Kaliwal (2011) observaram que a maior atividade de L-asparaginase por *Fusarium equiseti* usando fermentação em estado sólido foi obtida pela glicose (0,5 %), seguida de sacarose (0,75 %) e frutose (0,5 %), cujas atividades enzimáticas aumentaram em concentrações mais baixas e diminuíram em concentrações mais elevadas (1,25 % para as três fontes de carbono testadas) (HOSAMANI; KALIWAL, 2011). O meio de cultivo com maior atividade de L-asparaginase obtida pelo planejamento experimental por Plackett-Burman no presente estudo continha os maiores níveis de extrato de malte (3 %) e glicose (1 %) e o menor nível de sacarose (0 %), este último tendo apresentado efeito negativo na produção da enzima, similar ao observado por Hosamani e Kaliwal. Chanakya et al. (2011) estudaram a concentração ótima de glicose no meio de cultivo (0,1 a 0,5 % p/v) e a produção máxima de L-asparaginase por *Fusarium oxysporum* sob fermentação em estado sólido foi observada na concentração de 0,3 % (p/v) (CHANAKYA; NAGARJUN; SRIKANTH, 2011). Uzma et al. (2016) observaram que a glicose produziu a maior atividade de L-asparaginase sob fermentação submersa por *Fusarium solani* entre sacarose, lactose, maltose e amido em concentração fixa de 0,2 % (UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016).

Yadav e Sarkar (2014) observaram que a produção de L-asparaginase foi elevada em meio de cultivo contendo nitrato de sódio em comparação com demais

fontes de nitrogênio estudadas. O nitrato de potássio e o sulfato de amônio foram substratos pobres, pois mostraram atividade enzimática muito baixa, mas promoveram crescimento micelial do fungo (YADAV; SARKAR, 2014). Hosamani e Kaliwal (2011) observaram que a maior atividade de L-asparaginase por *Fusarium equiseti* usando fermentação em estado sólido foi obtida pelo sulfato de amônio (0,5 %), seguido de nitrato de amônio (0,25 %) e cloreto de amônio (0,5 %), cujas atividades enzimáticas aumentaram em concentrações mais baixas e diminuíram em concentrações mais elevadas (1,25 % para as três fontes de nitrogênio inorgânicas testadas). O mesmo perfil foi observado com extrato de levedura (0,5 %), o qual obteve a maior atividade de L-asparaginase, e peptona (0,75 %), pois a atividade enzimática aumentou em concentrações mais baixas e diminuiu em concentrações mais elevadas (1,25 % para as duas fontes de nitrogênio orgânicas testadas) (HOSAMANI; KALIWAL, 2011). Chanakya et al. (2011) estudaram a concentração ideal de extrato de malte no meio de cultivo (0,2 a 1,0 % p/v) e a produção máxima de L-asparaginase por *Fusarium oxysporum* sob fermentação em estado sólido foi observada na concentração de 0,8 % (p/v) (CHANAKYA; NAGARJUN; SRIKANTH, 2011). Uzma et al. (2016) observaram que nitrato de sódio e nitrato de amônio nas concentrações 0,1 %, 0,4 % e 0,5 % produziram as maiores atividades de L-asparaginase sob fermentação submersa por *Fusarium solani* entre peptona, extrato de levedura e nitrato de potássio em concentrações de 0,1-0,5 % (UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016).

Krishnapura e Belur (2016) observaram que a L-asparaginase é induzida pela adição de L-asparagina ao meio de cultivo, conseqüentemente, o aumento da concentração do indutor resultou em aumento da produção da enzima pelos microrganismos. Por outro lado, a produção enzimática foi reduzida quando a concentração de L-asparagina foi reduzida, o que indica que a presença de L-asparagina é essencial não apenas para a indução da produção de L-asparaginase, mas que a produção desta enzima durará somente enquanto a L-asparagina está presente no meio de cultivo. A glicose não pareceu contribuir diretamente para a produção enzimática, mas contribuiu para o crescimento de *Talaromyces pinophilus* e, portanto, para o aumento da produção de L-asparaginase (KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D., 2016). Uma revisão sistemática, cujo objetivo foi identificar a literatura disponível sobre a produção, otimização por meio de planejamento estatístico, purificação e caracterização de L-asparaginases fúngicas, demonstrou que PBD, CCD

e Algoritmo Genético Ligado a Rede Neural Artificial foram as ferramentas estatísticas mais utilizadas para avaliar a otimização de processos, dentre as quais a L-asparagina foi o aminoácido mais utilizado como fonte de nitrogênio e também um fator significativo como indutor de substrato para a produção de asparaginase (SOUZA; DE FREITAS; CARDOSO; PESSOA *et al.*, 2017). Embora não seja uma variável significativa, a L-asparagina teve efeito positivo sobre as atividades total e específica de L-asparaginase por *P. sizovae* e *F. proliferatum*. Os meios de cultivo nos quais os maiores níveis de atividade de L-asparaginase foram registrados pelos isolados selecionados continham L-asparagina no seu maior nível estudado (3 %).

3.6.4. Otimização de meio de cultivo por planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional de *F. proliferatum*

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um tipo de metodologia de superfície de resposta utilizado para obter dados que se ajustam a um modelo polinomial de segunda ordem. É uma técnica estatística eficiente para otimização de variáveis múltiplas para predizer as condições de melhor desempenho com a menor quantidade de experimentos (BASKAR; RENGANATHAN, 2012). As variáveis com efeito positivo segundo o planejamento experimental Plackett-Burman pelo software Protimiza Experimental Design – L-asparagina (X_1), peptona (X_2), glicose (X_3) e extrato de malte (X_4) - foram consideradas para planejamento experimental DCCR.

Os valores das atividades de L-asparaginase do isolado *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental DCCR variaram entre $1,16 \pm 0,03$ U/mL e $3,93 \pm 0,26$ U/mL (Tabela 22). O maior valor de atividade enzimática foi obtido na corrida número 13, com o segundo maior valor de atividade específica (0,95 U/mg de proteína) em meio de cultivo composto por L-asparagina 3 %; peptona 3 %; glicose 3 %; extrato de malte 5 %, L-prolina 1 %; sulfato de amônio 3 %; K_2HPO_4 0,0152 %; KCl 0,052 %; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052 %; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,001 %; com relação de C:N de 2,89, a segunda maior relação C:N de todos os meios de cultivo do planejamento experimental DCCR. A relação C:N de 2,89 mostra que o isolado *P. sizovae* necessita de aproximadamente três vezes mais carbono em relação ao nitrogênio disponível no meio de cultivo para obter a maior produção de L-asparaginase.

Tabela 22 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional

(continua)

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	C:N	L-asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
Meio 1	3	3	1	3	2,46	1,52 ± 0,09	3,64 ± 0,15	0,42
Meio 2	5	3	1	3	2,38	1,16 ± 0,03	2,70 ± 0,20	0,43
Meio 3	3	5	1	3	2,51	1,52 ± 0,16	3,24 ± 0,08	0,47
Meio 4	5	5	1	3	2,43	1,42 ± 0,03	3,11 ± 0,10	0,46
Meio 5	3	3	3	3	2,68	1,99 ± 0,28	4,33 ± 0,11	0,46
Meio 6	5	3	3	3	2,58	2,04 ± 0,10	4,63 ± 0,23	0,44
Meio 7	3	5	3	3	2,72	3,19 ± 0,31	4,70 ± 0,17	0,68
Meio 8	5	5	3	3	2,62	2,16 ± 0,11	4,79 ± 0,13	0,45
Meio 9	3	3	1	5	2,67	2,34 ± 0,21	4,19 ± 0,10	0,56
Meio 10	5	3	1	5	2,57	2,18 ± 0,11	3,22 ± 0,06	0,68
Meio 11	3	5	1	5	2,71	2,18 ± 0,34	4,52 ± 0,16	0,48
Meio 12	5	5	1	5	2,61	2,07 ± 0,08	3,21 ± 0,03	0,65
Meio 13	3	3	3	5	2,89	3,93 ± 0,26	4,15 ± 0,17	0,95
Meio 14	5	3	3	5	2,76	1,94 ± 0,02	2,78 ± 0,13	0,70
Meio 15	3	5	3	5	2,91	3,79 ± 0,06	4,36 ± 0,19	0,87
Meio 16	5	5	3	5	2,79	3,16 ± 0,02	4,11 ± 0,29	0,77

Tabela 22 - Atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de *F. proliferatum* segundo o planejamento experimental
 Delineamento Composto Central Rotacional

Corrida	X ₁ (%)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (%)	C:N	L-asparaginase (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)
Meio 17	2	4	2	4	2,75	3,00 ± 0,07	4,01 ± 0,18	0,75
Meio 18	6	4	2	4	2,55	1,60 ± 0,02	3,13 ± 0,08	0,51
Meio 19	4	2	2	4	2,60	3,13 ± 0,05	3,58 ± 0,09	0,87
Meio 20	4	6	2	4	2,68	3,32 ± 0,06	4,28 ± 0,18	0,77
Meio 21	4	4	0	4	2,44	2,53 ± 0,07	3,34 ± 0,14	0,76
Meio 22	4	4	4	4	2,84	1,85 ± 0,01	3,18 ± 0,02	0,58
Meio 23	4	4	2	2	2,45	3,79 ± 0,12	3,94 ± 0,11	0,96
Meio 24	4	4	2	6	2,83	2,74 ± 0,03	3,52 ± 0,16	0,78
Meio 25	4	4	2	4	2,64	3,59 ± 0,51	3,92 ± 0,31	0,92
Meio 26	4	4	2	4	2,64	2,08 ± 0,04	2,69 ± 0,21	0,77
Meio 27	4	4	2	4	2,64	3,80 ± 0,24	3,98 ± 0,06	0,96
Meio 28	4	4	2	4	2,64	2,51 ± 0,05	3,10 ± 0,42	0,81

X₁: L-asparagina; X₂: peptona; X₃: glicose; X₄: extrato de malte; C:N: valores da relação Carbono:Nitrogênio

(conclusão)

As atividades de L-asparaginase e específica de *F. proliferatum* dobraram entre os planejamentos experimentais PB ($1,86 \pm 0,12$ U/mL, $0,44$ U/mg) e DCCR ($3,93 \pm 0,26$ U/mL, $0,95$ U/mg). Os resultados calculados pelo software Protimiza Experimental Design para as atividades enzimáticas Y_1 (U/mL) e atividades específicas Y_2 (U/mg) obtidas pelo isolado *Fusarium sp.* DCFS10 revelaram que coeficientes não são estatisticamente significativos. Os valores experimentais divergem dos valores preditos. O valor de R^2 calculado é baixo, o que é justificado pelo fato das respostas nos pontos centrais apresentam valores distintos dos esperados, assim como o fato das respostas terem pouca variação dentre os ensaios realizados, indicando que dentro da faixa estudada não há efeito das variáveis nas respostas. Logo, não foi possível otimizar o meio de cultivo para este isolado.

Para realizar o DCCR a partir dos resultados obtidos pelo planejamento experimental por Plackett-Burman, Dias e Sato (2016) fixaram os fatores que proporcionaram um efeito negativo no ponto mínimo (-1) e os fatores que promoveram um efeito positivo e não foram significativos foram fixados no ponto central (0). As variáveis com efeito significativo a 95 % foram selecionadas para análise em DCCR. A máxima atividade de L-asparaginase foi obtida usando o meio de cultivo otimizado consistindo de prolina (2 %), glicose (0,5 %), L-asparagina (0,2 %), extrato de levedura (0,5%), KH_2PO_4 (0,152 %), KCl (0,052 %), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,052 %), $CuNO_3 \cdot 3H_2O$ (0,0001 %), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0001%) e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0001 %) ajustado em pH 8, concentração de esporos de 3×10^7 em 72 horas de fermentação a 150 rpm (DIAS; SATO, 2016).

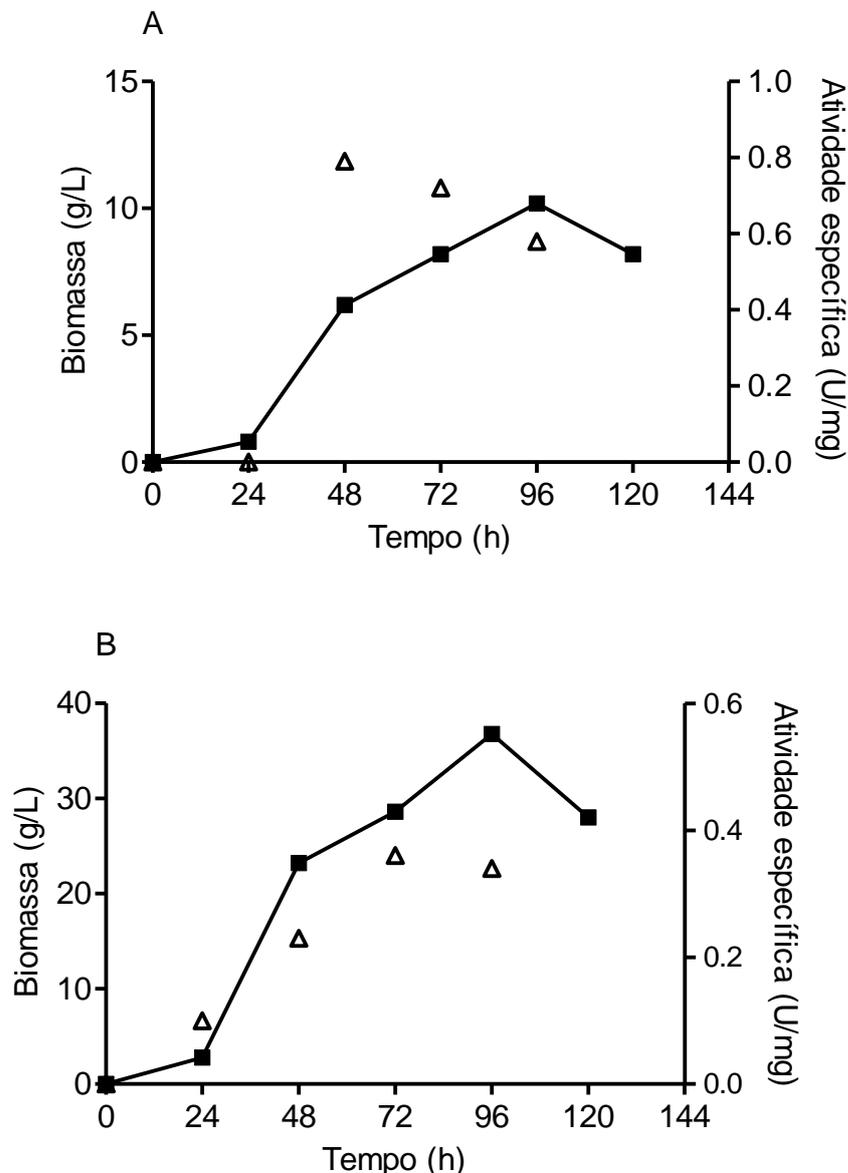
A distância intermembrana ou o tamanho do espaço periplasmático e se há uniformidade de espaçamento entre as membranas interna e externa em toda a célula são amplamente discutidas (MILLER; SALAMA, 2018). É possível inferir que o espaço periplasmático, local onde a L-asparaginase é produzida, possui espaço limitado, impossibilitando uma maior produção da enzima.

3.7. Parâmetros cinéticos da curva de crescimento

Os parâmetros cinéticos da curva de crescimento fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro selecionados como melhores produtores de L-asparaginase com baixa atividade glutaminase – *P. sizovae* e *F. proliferatum* – foram calculados.

A fase lag foi similar nas culturas com pequeno crescimento celular observado entre 0 e 24 horas. A taxa de crescimento celular máximo de 0,13 g/L.h e 0,48 g/L.h foi observado após 48 horas de cultivo para *P. sizovae* (Figura 16A) e *F. proliferatum* (Figura 16B), respectivamente. A L-asparaginase de *P. sizovae* foi indetectável em 24 horas. Os maiores níveis de atividade da L-asparaginase e atividade enzimática específica foram observadas após 48 he 72 h de cultivo para *P. sizovae* e *F. proliferatum*, respectivamente, durante a fase exponencial, mostrando que a produção de L-asparaginase está associada ao crescimento do fungo fazendo parte do seu metabolismo primário. É possível correlacionar o crescimento dos fungos, pelo aumento de sua biomassa, com a atividade de L-asparaginase obtida, concluindo que a enzima produzida é do metabolismo primário fúngico. Com a finalidade de confirmar que a produção de enzimas em microrganismos está associada à fase de crescimento, Yadav e Sarkar (2014) avaliaram a biomassa micelial de todos os isolados para a produção de L-asparaginase em fermentação submersa, cujos resultados demonstraram que a biomassa contribuiu para a produção de enzimas para todos os isolados fúngicos (YADAV; SARKAR, 2014). As atividades enzimáticas máxima das duas espécies de fungos no presente estudo foram obtidas em tempo inferior ao relatado na literatura. Dentre os estudos incluídos em uma revisão sistemática acerca da produção, otimização e purificação de L-asparaginase fúngica, esta produção é mais bem observada após 4 ou 5 dias de cultivo (SOUZA; DE FREITAS; CARDOSO; PESSOA *et al.*, 2017).

Figura 16 - Variação da biomassa (▪) após 120 h e atividade enzimática específica (Δ) após 96 h de incubação a 32°C e 120 rpm. *P. sizovae* (A) e *F. proliferatum* (B)



Os parâmetros cinéticos de crescimento fúngico e produção de L-asparaginase foram comparados quando os isolados foram cultivados em MCDM antes da triagem das variáveis (aPBD) e no meio de cultivo em que a maior atividade de L-asparaginase foi obtida por PBD (dPBD). As produtividades máximas de biomassa de ambos os isolados reduziram após a triagem das variáveis do meio de cultivo, o que é justificado pela redução das fontes de carbono, reduzindo assim a biomassa fúngica. A produtividade máxima da enzima foi aumentada 3 vezes por *F. proliferatum* e 4 vezes por *P. sizovae* após PBD. O rendimento específico da enzima foi aumentado 6 vezes por *F. proliferatum* e 5 vezes por *P. sizovae* após a triagem de variáveis de meio de

cultura. O fator de conversão de biomassa em enzima por *F. proliferatum* foi aumentado 6 vezes, enquanto *P. sizovae* aumentou 10 vezes (Tabela 23). A L-asparaginase é produzida como produto de metabolismo primário pelo fungo para metabolizar as fontes de Carbono e Nitrogênio pela L-asparaginase. Desta forma, a seleção das variáveis incrementou a quantidade de enzima produzida. Em relação a biomassa produzida, o aumento expressivo da quantidade de L-asparaginase implica que mais enzima será produzida por biomassa de fungo neste meio selecionado em relação ao anterior.

Tabela 23 - Parâmetros cinéticos no crescimento e produção de L-asparaginase por *P. sizovae* e *F. proliferatum*.

Parâmetro cinético	Símbolo	Unidade	<i>P. sizovae</i>		<i>F. proliferatum</i>	
			aPBD	dPBD	aPBD	dPBD
Produtividade máxima de biomassa	$P_{X,max}$	g(X)/L.h	1,41	0,13	0,70	0,48
Produtividade máxima de enzima	$P_{E,max}$	U/L.h	14,02	59,79	12,39	36,32
Velocidade específica máxima	μ_{max}	h^{-1}	0,08	0,09	0,08	0,09
Rendimento específico da enzima	$\mu_{E,max}$	U/g(X).h	1,89	9,64	2,00	12,97
Fator de conversão de biomassa na enzima	$Y_{E/X}$	U/g(U)	45,47	462,91	47,98	311,36

aPBD: antes do Plackett-Burman Design; dPBD: depois do Plackett-Burman Design.

Hosamani e Kaliwal (2011) detectaram atividade de L-asparaginase por *F. equiseti* a partir de 24 horas sob fermentação em estado sólido e atingiu o máximo com 48 horas. A atividade enzimática diminuiu em períodos de incubação mais longos, o que pode ser devido à depleção de nutrientes, acúmulo de produtos finais tóxicos, alteração no pH do meio, ou perda de umidade (HOSAMANI; KALIWAL, 2011). Chanakya et al. (2011) observou a produção máxima de L-asparaginase por *F. oxysporum* sob fermentação em estado sólido após 120 horas (CHANAKYA; NAGARJUN; SRIKANTH, 2011). Uzma et al. (2016) observou máxima atividade de L-asparaginase por *F. solani* sob fermentação submersa em meio de cultivo Czapek Dox modificado (pH 6) contendo 1 % asparagina em 6 dias de incubação, com declínio gradual na produção enzimática (UZMA; MURTHY K.; SRINIVAS, 2016).

4. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro para a produção de L-asparaginase de interesse industrial e farmacêutico. Das vinte e duas cepas fúngicas isoladas do solo e dezoito cepas fúngicas isoladas de folhas de plantas do Cerrado brasileiro selecionadas para produção de enzima, três isolados fúngicos do solo foram selecionados como maiores produtores de L-asparaginase com menor atividade de glutaminase: *P. sizovae*, *P. cerradense* e *F. proliferatum*. Os maiores níveis de atividade enzimática obtidos pela avaliação das variáveis do meio de cultivo que influenciam a atividade da L-asparaginase e a atividade enzimática específica por Plackett-Burman Design foram registrados em $3,68 \pm 0,14$ U/mL e $1,86 \pm 0,12$ U/mL para *P. sizovae* e *F. proliferatum*, respectivamente. Fontes de carbono como glicose, sacarose e extrato de malte foram consideradas repressoras da síntese enzimática por *P. sizovae*. Por outro lado, a produção de L-asparaginase por *F. proliferatum* foi aumentada com maiores níveis de fontes de carbono como glicose e extrato de malte e tamanho de inóculo. O Plackett-Burman Design melhorou a produtividade da enzima, o rendimento da enzima específica e o fator de conversão de biomassa na enzima dos isolados. O método de maceração da biomassa mostrou-se o melhor método mecânico de rompimento de células fúngicas para liberação de L-asparaginase, visto que promoveu maiores alterações morfológicas nas células de *P. sizovae* quando comparada às amostras sonicada e controle. Este estudo mostra o potencial de espécies fúngicas isoladas do solo do Cerrado brasileiro como fontes de L-asparaginase com baixa atividade da glutaminase. A triagem de nutrientes e condições de cultura, bem como a triagem de métodos eficientes de rompimento de células fúngicas, aumentaram o rendimento de L-asparaginase. Esses produtores de L-asparaginase de origem eucariótica com baixa atividade de glutaminase isolada de um *hotspot* de biodiversidade global podem levar a uma melhoria nas aplicações terapêuticas de LLA com efeitos colaterais reduzidos.

CAPÍTULO III

Processamento *downstream* de L-asparaginase

1. INTRODUÇÃO

Células microbianas são capazes de produzir bioprodutos, os quais geralmente são obtidos a partir de cultivos em meios líquidos, fazendo-se necessário segregar o produto do meio de cultivo até que ele atinja tal grau de isolamento que o torne adequado para o uso previsto. No estabelecimento de um processo de purificação, o grau de pureza da biomolécula-alvo desejado deve ser definido de tal forma a projetar um processo coerente com a aplicação. A L-asparaginase não possui limites de pureza estabelecidos e padronizados pelas agências reguladoras como a agência de controle de medicamentos da União Européia, a *European Medicines Agency* (EMA) ou características de pureza descritas em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira, a Farmacopeia Americana (USP) e Farmacopeia Europeia (FE). As preparações de L-asparaginase comercializadas mundialmente e no Brasil possuem qualidade questionável, uma vez que contém tipos e quantidades de impurezas desconhecidas, fazendo-se necessário o estabelecimento de padrões de qualidade (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

No processo da produção de L-asparaginase, o processamento *downstream* inclui todas as etapas necessárias para a purificação da enzima, como recuperação inicial, purificação e polimento. A integração de operações unitárias *downstream* é amplamente utilizada para a purificação de L-asparaginase através de passos de purificação de baixa resolução, isto é, precipitação fracionada, sistemas bifásicos aquosos, centrifugação e purificação baseada em membranas (diálise) e passos de purificação de alta resolução, como os processos cromatográficos (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

A variabilidade nas massas moleculares de L-asparaginase em diferentes microrganismos pode ser inferida às suas diversidades genéticas (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015). Estudos acerca da purificação da L-asparaginase foram publicados (Tabela 24). Neste trabalho um dos objetivos foi purificar a enzima L-asparaginase a partir da espécie de fungo filamentoso *P. sizovae* isolada do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro com a finalidade de obter um produto farmacêutico de alto grau de pureza para ser utilizado como medicamento antileucêmico.

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continua)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Spirulina maxima</i>	Sulfato de amônio (20–80 %) dialisado com tampão de fosfato 0,01 M pH 8,5	Cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-200. As frações ativas foram reunidas, dialisadas contra o tampão de fosfato 0,01 M, pH 8,5, e concentradas.	NI	NI	NI	(ABD EL BAKY; EL BAROTY, 2016)
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Sulfato de amônio, com atividade da L-asparaginase associada à fração precipitada na saturação de 40-60 % dialisado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,6	Cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S-200 (1 cm x 50 cm), 5mL/30 min. As frações ativas foram reunidas, dialisadas e concentradas. CM Sephadex C-50 que foi pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. Foi eluída com gradiente de NaCl (0,1-0,5 M) e tampão borato 0,1 M pH 7,0. As frações ativas foram coletadas, dialisadas e concentradas.	NI	NI	NI	(AMENA; VISHALAKSHI; PRABHAKAR; DAYANAND <i>et al.</i> , 2010)
<i>E. coli</i> transformada BL21 pLysS (DE3)	-	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow (5 cm x 15 cm) pré-equilibrada com tampão fosfato (0,01 mM, pH 7,0). Gradiente de NaCl de 50-200 mM, 4 mL/min. Fração dessalinizada em coluna Sephadex G-75 (3,0 x 70 cm), 3 mL/min.	35 kDa (aparente)	NI	NI	(BAHREINI; AGHAIYPOUR; ABBASALIPOURKABIR; GOODARZI <i>et al.</i> , 2014)
<i>A. terreus</i>	45 % de saturação com sulfato de amônio a pH 8,4. O sobrenadante foi levado à saturação de 85 % com sulfato de amônio dialisado com tampão de fosfato 0,1 M.	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose com tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2	94 kDa (aparente)	6	25°C	(BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Citrobacter</i>	Fracionamento da acetona. Precipitado suspenso em tampão borato de potássio 0,05 M frio pH 8,0. Fracionamento com sulfato de amônio. A fração de proteína que precipita entre 0,21 e 0,52 g de sulfato de amônio cristalino foi dissolvida em tampão de borato de potássio 0,05 M pH 8,0.	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE celulose (grau DE-I I; Whatman Biochemicals, Maidstone, Kent) de 8 L (15 x 45 cm) equilibrada com tampão borato de potássio 0,05 M, pH 8,0, 4 L/h e eluída com um gradiente de KCl 0-0,3 M em tampão borato. Cloreto de amônio foi adicionado às frações para dar uma concentração final de 0,1 M. Uma coluna 2 1 (7,5 x 40 cm) contendo uma suspensão de hidroxilapatita de cálcio empacotada misturada com suspensão de brushita empacotada foi equilibrada com tampão borato de potássio 0,05 M contendo cloreto de amônio 0,1 M, 250 mL/h. A coluna foi lavada com cloreto de amônio 0,1 M em tampão de borato de potássio pH 8,0 e eluída com um gradiente de fosfato de potássio 6 1 a 0,3 M em tampão borato contendo cloreto de amônio 0-1 M, pH 8,0. As frações ativas foram ultrafiltradas (Amicon) e aplicadas em colunas de 67 x 77 cm Sephadex G-200 (Pharmacia) equilibrada com tampão borato de potássio 0,05 M, pH 8,0. As frações ativas foram ultrafiltradas e aplicadas em coluna Sephadex G-25, lavada e eluída com água destilada, pH 8,0, 225 mL/h.	166 kDa	8-11	52°C	(BASCOMB; BANKS; SKARSTEDT; FLEMING <i>et al.</i> , 1975)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Streptomyces</i> spp.	Precipitação com 45 % de saturação com sulfato de amônio a pH 8,4. O sobrenadante foi levado à saturação de 85 % com sulfato de amônio. O precipitado foi dissolvido e dialisado em tampão Tris-HCl 1 M.	Cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-100 pré-equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,4 e e eluída em mesmo tampão contendo KCl 0,1 M, 5 mL/30 min.	NI	7-8	50°C	(BASHA; REKHA; KOMALA; RUBY, 2009)
<i>E. coli</i>	Precipitação com 50 % de saturação de sulfato de amônio, mantendo o pH 8,0 constante pela adição de álcali. A concentração de sulfato de amônio foi elevada à concentração de saturação. O precipitado foi dissolvido e dialisado em água e dialisado contra soro fisiológico. Esta fração foi dialisada contra tampão Tris-PO4 0,02 M, pH 8,0 e fracionada com álcool etílico em volumes de 1,5, 1,8, 2,5, 3,0 e 3,5. Os precipitados obtidos foram dissolvidos em solução salina fisiológica. A fração ativa precipitada de 2,5 volumes foi retida.	-	NI	NI	NI	(BILIMORIA, 1969)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>E. carotovora</i>	O pH do extrato livre de células foi ajustado para 5,5 usando HCl 0,1 N e a suspensão foi deixada por 45 min a 4°C com agitação contínua para precipitação parcial em proteínas contaminantes.	Cromatografia de gel filtração em coluna SP Sephadex equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e eluída em tampão fosfato de pH 5,5 e pH 6,3. A proteína foi eluída com o tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.	160 kDa (40,2 and 39,8 kDa, tetramérica)	NI	NI	(DEVI; AZMI, 2012)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>A. oryzae</i> CCT 3940	Precipitação com 80 % de saturação de sulfato de amônio. O precipitado de proteína foi ressuscitado em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0 e dialisado contra água destilada.	Coluna Q Sepharose Fast Flow de 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e eluída com o gradiente de NaCl 0-1,0 M no mesmo tampão, vazão: 1 mL/min a 20°C. As frações ativas foram reunidas, dialisadas contra água destilada e concentradas por liofilização. A fração liofilizada foi ressuspensa em tampão Tris-HCl, pH 7,0. Coluna SP Sepharose Fast Flow de 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e eluída com o gradiente linear de NaCl 0-1,0 M. As proteínas eluídas foram reunidas, coletadas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. A fração liofilizada foi ressuspensa em tampão Tris-HCl, pH 7,0. Coluna CM Sepharose Fast Flow de 1 mL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 e eluída com gradiente linear de NaCl 0-1,0 M. As frações ativas foram reunidas, dialisadas contra água destilada e concentrada por liofilização.	115 kDa	8	50°C	(DIAS; RUIZ; TORRE; SATO, 2016)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>A. fumigatus</i> WL002	Ultrafiltração usando cartucho de membrana (Amershem Biosciences) de 30 kDa para remover as proteínas de baixa massa molecular. Solução saturada de sulfato de amônio resfriada foi adicionada ao permeado para obter saturação de 20 a 80 %. As frações ativas foram dissolvidas e dialisadas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 9,0.	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose FF (25 x 2 cm) eluída com um gradiente de sal linear em tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 0-0,5 M, pH 10,0. As frações ativas foram reunidas e dialisadas contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Cromatografia de gel filtração em coluna Sephadex G-100 (20 x 1 cm) eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, fluxo: 0,5 mL/min.	35 kDa	9	50°C	(DUTTA; GHOSH; PRAMANIK, 2015)
<i>Flammulina velutipes</i>	A formação de espuma com brometo de cetiltrimetilamônio removeu essencialmente todas as proteínas abaixo de 75 kDa com uma perda de atividade de 30 %.	Cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna Superose 6 com tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,5.	85 kDa (subunidades de 13 kDa, proteína hexamérica)	7	40°C	(EISELE; LINKE; BITZER; NA'AMNIEH <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>P. brevicompactum</i> NRC 829	O extrato bruto foi aquecido a 50°C por 20 min, e resfriado em banho de gelo e os sedimentos formados foram removidos por centrifugação.	A fração ativa da etapa anterior foi aplicada em coluna Sephadex G-100 (1,5 x 50 cm) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, fluxo: 20 mL/h. As frações ativas foram reunidas, dialisadas contra tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0 e concentradas por liofilização. Coluna Sephadex G-200 pré-equilibrada (2,0 x 50 cm) com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, fluxo: 10 mL/h. As frações mais ativas foram reunidas e concentradas por liofilização.	94 kDa (aparente)	8	37°C	(ELSHAFEI; HASSAN; ABOUZEID; MAHMOUD <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. chrysanthemi</i> em <i>E. coli</i>	-	O meio de cultivo foi dialisado contra tampão de ligação (KH ₂ PO ₄ 20 mM, pH 7,5) contendo diferentes concentrações de NaCl (0,05-0,2 M) e ajustado para diferentes valores de pH (7,5-8,6) e carregado em L-Asp adsorvente, previamente equilibrado com tampão de ligação. A coluna foi mantida fechada para o sistema atingir o equilíbrio e exaustivamente lavada com tampão de ligação contendo NaCl 2 M ou com ddH ₂ O gelada. A ErL-asparaginase ligada foi eluída com L-Asp 20 mM dissolvida em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,5.	NI	NI	NI	(KARAMITROS; KONRAD, 2014)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Rhizomucor miehei</i>	-	Coluna de Ni-IDA (ácido de níquel-iminodiacetídeo) (1 cm x 5 cm; GE Life Sciences) pré-equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, NaCl 0,15 M, 20 mM imidazol). A proteína não adsorvida foi lavada com 15 CV de tampão A, seguido por 5 CV de tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M, NaCl 0,5 M, imidazol 50 mM), fluxo: 1,0 mL/min. As proteínas ligadas foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,6 M, imidazol 200 mM.	133,5 kDa (homodímero de 72 kDa)	7	45°C	(HUANG; LIU; SUN; YAN <i>et al.</i> , 2014)
<i>Talaromyces pinophilus</i>	Precipitação com 40-95 % de saturação de sulfato de amônio em incrementos de 5 %. Precipitados foram suspensos e dialisados em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4. A solução da enzima foi concentrada por diálise reversa em PEG6000.	Coluna Sephadex G-100 eluída com tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4, fluco: 1 mL/min a 18°C.	NI	NI	NI	(KRISHNAPURA, PRAJNA RAO; BELUR, PRASANNA D., 2016)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Cladosporium</i> sp.	Precipitação por adição de isopropanol, etanol, acetona e metanol gelado (1: 2). Os precipitados foram dissolvidos em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e dialisados com água.	A enzima precipitada com metanol foi passada através da coluna de troca catiônica DEAE celulose com tampão fosfato 50 mM, pH 7,2. As frações ativas foram reunidas, dialisadas com água destilada e concentradas em liofilizador. Coluna de Sepharose 6B (1,1 cm 9 100 cm) pré-equilibrada e eluída com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, fluxo: 0,4 mL/min. As frações ativas foram reunidas, concentradas e dialisadas contra água destilada.	117-120 kDa	6,3	30°C	(MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013)
<i>Trichoderma viride</i>	Precipitação com acetona. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 e liofilizado.	Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-celulose (2,0 x 25 cm) pré-equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 e eluída em gradiente linear de NaCl (0,1 - 1 M) em tampão fosfato, vazão: 0,2 mL/min. As frações ativas foram agrupadas e concentradas por liofilização.	99 kDa	7	37°C	(LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>A. terreus</i>	-	Coluna DEAE Sepharose Fast Flow (2,5 x 22,5 cm) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. As proteínas ligadas foram eluídas por aumentos graduais de NaCl (0,100 e 0,150 mM), fluxo: 120 mL/h. Frações ativas foram dialisadas. Coluna Sephacryl S-200 HR (1,0 x 58,0 cm) com o tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo NaCl 0,150 mM, fluxo: 9,6 mL/h. Frações ativas foram reunidas e dialisadas. Coluna Sephacryl S-200 HR (1,0 x 5,8 cm), fluxo: 6,0 mL/h. As frações foram reunidas, concentradas com PEG e dialisadas.	136 kDa	9	40°C	(LOUREIRO; BORGES; ANDRADE; TONE <i>et al.</i> , 2012)
<i>F. culmorum</i> ASP-87	Precipitação com 80 % de saturação de sulfato de amônio. O precipitado foi ressuspendido e dialisado em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2.	Coluna de DEAE celulose (1,5 x 15 cm) pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2. As proteínas não ligadas foram lavadas repetidamente por cinco vezes e então eluídas com o mesmo tampão contendo NaCl 1 M, fluxo: 1 mL/min. Amostras liofilizadas foram carregadas em coluna Sephadex G-100 (1,5 x 15 cm) pré-equilibrada com tampão fosfato 100 mM pH 7,0 e eluídas com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2.	90 kDa	8	40°C	(MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015)
<i>A. flavus</i>	Precipitação com sulfato de amônio saturação 80 %, amostras dialisadas.	Coluna Sephadex G-100-120 (Sigma) (60 cm x 2.2 cm) com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8.5. 2- Biologic LP-BIORAD com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5, fluxo: 0,5 mL/min durante 1 hora.	92 kDa	7	37°C	(PATRO; BASAK; MOHAPATRA; GUPTA, 2014)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>Rhodospiridium toruloides</i> CBSI 4	Extrato bruto foi concentrado em saco de diálise mantido em Sephadex G-200 seca.	Coluna PBE94 trocador de íons (20 x 0,8 cm), previamente equilibrada com 25 mM de tampão imidazol (pH 7,4) e eluída com 1:10 Polybuffer diluído pH 7,4 ajustado para 4; fluxo: 30 mL/h. Precipitação com 60-90 % de saturação de sulfato de amônio. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7. Coluna Sepharose 6B (140 x 0,8 cm) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7, fluxo 20 mL/h.	180 kDa (homodímero de 87 kDa)	8	40°C	(RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

(continuação)

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>F. tricinctum</i>	Precipitação com sulfato de amônio, fração a 75 % de saturação. O pH do extrato foi mantido a 7,5. Amostra foi dialisada em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,6 e concentrada em 30 % PEG.	Cromatografia DEAE em coluna 1 X 60 cm empacotada com Sephadex A-25 equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,6. A coluna foi desenvolvida com um gradiente formado pela adição gota a gota de 0,2 M de KCl. Amostra foi dialisada contra 1 % de glicina e incorporada em um sistema de separação Ampholine consistindo em 1% Ampholine (LKB, pH variando 3-10) em um gradiente de sacarose que foi carregado em uma coluna de eletrofocalização LKB No. 8102. A corrente foi aplicada inicialmente a 500 V, 26 mA e, posteriormente, aumentada para 1000 V. Frações ativas foram dialisadas em tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 6,8 e concentradas por ultrafiltração.	161/170 kDa	8	NI	(SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971)
<i>P. cyclopium</i>	Precipitação de forma sequencial utilizando acetona.	A fração de acetona (40-60%) foi aplicada em coluna Sephadex G-100 (2,5x30 cm) pré-equilibrada e eluída com tampão Tris 0,05 M pH 8, 25 mL/h.	55 kDa (aparente)	8	37°C	(SHAFEI; EL-REFAI; MOSTAFA; EL-REFAI <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 24 - Estratégias de purificação e caracterização de L-asparaginases de microrganismos

Microrganismo	Método não-cromatográfico	Método cromatográfico	Massa molecular	pH	Temperatura	Autor
<i>P. digitatum</i>	Precipitação com sulfato de amônio em pó fino a uma taxa de 1 g por minuto. A atividade da L-asparaginase foi associada à fração precipitada na saturação de 70-80 %. O precipitado foi dissolvido em 500 mL de solução salina tamponada com fosfato. A dessalinização da proteína precipitada foi realizada por cromatografia de filtração em gel com o uso de Sephadex G-25 no mesmo tampão 0,05 M a pH 7,4.	Coluna Sephadex G-100 (1x10 cm) em tampão fosfato 0,05 M a pH 7,4, 5mL/5 min.	NI	7	30°C	(SHRIVASTAVA; KHAN; SHRIVASTAV; JAIN <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. terreus</i>	Precipitação com sulfato de amônio	-		9	37°C	(SIDDALINGESHWARA; LINGAPPA, 2011)
<i>M. hiemalis</i>	3 volumes de acetona gelada foram adicionados a um volume do sobrenadante do centrifugado de células. O precipitado foi redissolvido em tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0) e submetido à liofilização.	Cromatografia de afinidade em coluna de lectina (concalvin A) - agarose equilibrada com tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0). Uma solução de sacarose 1 M foi aplicada à coluna e a fração ligada coletada.	96,32 kDa (aparente)	7	37°C	(THAKUR; LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2014)

NI: não identificado; (-): não realizado.

(conclusão)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo de reagentes e soluções

- Solução de cloreto férrico/TCA/HCl
 - Solução A: Solução de cloreto férrico
 - Cloreto férrico 10 g
 - Água ultrapurificada q.s.p. 100 mL
 - Solução B: Solução de HCl/TCA
 - Ácido clorídrico 37 % 5,45 mL
 - Ácido tricloroacético (TCA) 20 mL
 - Água ultrapurificada q.s.p. 100 mL
 - Misturar soluções A e B

- Solução de hidroxilamina 1M
 - Solução A: Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina 2 M
 - Cloridrato de hidroxilamina 27,8 g
 - Água destilada q.s.p. 200 mL
 - Solução B: Solução estoque de hidróxido de sódio 2 M
 - NaOH 40 g
 - Água destilada 500 mL
 - Solução de hidroxilamina 1 M: Misturar a solução A com solução B (1:1) ajustando o pH em 7.

- Solução de L-asparagina 100 mM
 - L-asparagina (Sigma) 0,33 g
 - Água destilada q.s.p. 25 mL

- Solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM
 - β -hidroxamato aspártico (Sigma) 7,40 mg
 - Água ultrapurificada q.s.p. 10 mL

- Solução Tris-HCl 50 mM pH 8,6
 - Tris base 6,06 g

Água destilada q.s.p. 1 L
 pH da solução foi ajustado em 8,6 com HCl 37 %.

- Tampão de amostra

Tampão tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 0,5 mL
 Docecil sulfato de sódio (SDS) 2 % 0,1 g
 Glicerol 25 % 1,43 mL
 Azul de bromofenol 0,01 % 0,5 mL
 Adicionar 50 µL de mercaptoetanol para 950 µL de tampão de amostra para uma concentração final de mercaptoetanol de 5 % anterior à aplicação nas amostras.

- Tampão de corrida

Tris base 3,03 g
 Glicina 14,41 g
 SDS 1 g
 Água purificada q.s.p. 1 L

- Gel de poliacrilamida 12 % separador

Água ultrapurificada 3,34 mL
 Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 2,5 mL
 Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 4 mL
 SDS 10 % 100 µL
 Tetrametiletlenodiamina (TEMED) 10 µL
 Persulfato de sódio (APS) 10 % 50 µL

- Gel de poliacrilamida 5 % concentrador

Água ultrapurificada 3,65 mL
 Tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8 1,25 mL
 Acrilamida/bis-acrilamida 30 % 1 mL
 SDS 10 % 60 µL
 Temed 6 µL
 APS 10 % 30 µL

- Solução fixadora

Etanol	100 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL

- Solução sensibilizadora

Etanol	75 mL
Tiosulfato de sódio (5 % m/v)	10 mL
Acetato de sódio	17 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL
Adicionar glutaraldeído (25 % m/v) antes do uso	

- Solução de nitrato de prata (2,5 % m/v)

Água ultrapurificada q.s.p.	25 mL
	250 mL

- Solução reveladora

Carbonato de sódio	6,25 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL
Adicionar formaldeído (37 % m/v) antes do uso	

- Solução de parada

EDTA-Na ₂ .2H ₂ O	3,65 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL

2.2. Preparo do extrato bruto de *P. sizovae*

O fungo filamentoso, isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, selecionado como melhor produtor de L-asparaginase – *P. sizovae* - foi inoculado (4 disco de micélio de 8 mm de diâmetro) em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio de cultivo Czapek Dox modificado (1 % L-prolina; 3 % L-asparagina; 0 % ureia; 3 % nitrato de sódio; 3 % sulfato de amônio; 3 % peptona; 3 % extrato de levedura; 0 % glicose; 0 % sacarose; 0 % extrato de malte), incubado a 32°C e 120 rpm por 48 horas. As culturas foram filtradas e a biomassa foi congelada a -80°C e

submetida à rompimento celular por maceração. A biomassa congelada foi macerada em gral e pistilo previamente resfriados a -80°C , conforme descrito por Drainas et al. (1977) (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). A biomassa macerada foi transferida para tubo de centrífuga de 50 mL e homogeneizada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 ($0,5 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{mL}$) por pelo menos 1 minuto em vórtex. O extrato bruto obtido foi utilizado para purificação de L-asparaginase empregando métodos não-cromatográficos e cromatográficos.

2.3. Métodos de purificação não cromatográficos

2.3.1. Precipitação de proteínas por solventes orgânicos

Acetona ou metanol (grau HPLC) foram adicionadas lentamente, por gotejamento através de uma bureta, à uma amostra de 5 mL do extrato bruto da espécie de fungo *P. sizovae* mantida em banho de gelo sob agitação constante a fim de obter uma porcentagem de concentração de 40 % de cada solvente. O extrato foi incubado em geladeira (4°C) por pelo menos 12 horas para permitir que a precipitação das proteínas fosse atingida até o equilíbrio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a $4.500 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado do *pellet* de proteínas precipitadas e seu volume foi mensurado. O volume de acetona ou metanol (mL) a serem adicionados ao sobrenadante para um incremento de 10 % de concentração foi calculado em relação ao volume do sobrenadante determinado. Este processo foi repetido sucessivamente em incrementos de 10 % até atingir 100 % da concentração de acetona ou metanol. As frações de proteínas precipitadas foram armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios experimentais.

O *pellet* de proteínas de cada fração foi ressuspendido em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 (2,5 mL), concentrando a amostra em duas vezes em relação ao volume inicial. A atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e cálculo da atividade específica foram determinados em cada fração.

2.3.2. Precipitação de proteínas por adição de sal solúvel

Sulfato de amônio (Sigma-Aldrich) sólido (0,53 g) previamente macerado em gral e pistilo foi adicionado lentamente à uma amostra de 5 mL do extrato bruto da

espécie de fungo *P. sizovae* mantida em banho de gelo sob agitação constante afim de obter uma porcentagem de saturação de 20 % a 0°C. Após completa dissolução do sal, o extrato foi incubado em geladeira (4°C) *overnight* ou por pelo menos 2 horas para permitir que a precipitação das proteínas fosse atingida até o equilíbrio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4.500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado do *pellet* e seu volume foi mensurado. A massa de sulfato de amônio (g) a ser adicionada ao sobrenadante para um incremento de 10 % de saturação a 0°C foi calculada em relação ao volume do sobrenadante determinado. Este processo foi repetido sucessivamente em incrementos de 10 % até atingir 100 % de saturação da concentração de sulfato de amônio a 0°C. As frações de proteínas precipitadas foram armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios experimentais.

O *pellet* de proteínas de cada fração foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 (2,5 mL) concentrando a amostra em duas vezes em relação ao volume inicial. A atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e cálculo da atividade específica foram determinados em cada fração.

2.4. Métodos de purificação cromatográficos

Métodos cromatográficos de gel filtração e troca iônica foram empregados com o objetivo de purificar a L-asparaginase de *P. sizovae*.

2.4.1. Cromatografia de gel filtração

O extrato bruto e frações ativas do fungo *P. sizovae* foram avaliados frente a diferentes metodologias de cromatografia de gel filtração (Tabela 25).

Tabela 25 - Métodos cromatográficos de gel filtração testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

Método	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
1	HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR 120,637 mL	1 mL	Eluente A + 0,1 M glicina	2	0,5	2 mL
2	HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR 120,637 mL	5 mL	Eluente A	1,5	0,5	2 mL
3	Sephadex G-100 8 mL	4 mL	Eluente A	1,75	0,57	2 mL
4	Sephadex G-100 7,5 mL	0,25 mL	Eluente A + 0,1 M glicina	2,7	0,52	2 mL
5	Sephadex G-100 45,216 mL	0,2 mL	Eluente A + 0,1 M glicina	0,75	0,52	2 mL
6	Sephacryl S-200 37 mL	0,4 mL	Eluente A	1,62	0,29	2 mL
7	Superdex 200 Increase 10/300 GL 23,562 mL	0,5 mL	Eluente A	1,1	0,25	2 mL
8	Superdex 200 Increase 10/300 GL 23,562 mL	0,1 mL	Eluente A	1,5	0,75	2 mL
9	Superdex 200 Increase 10/300 GL 23,562 mL	0,5 mL	Eluente A	1	0,75	2 mL

Eluente A: tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6.

O extrato bruto do fungo *P. sizovae* foi submetido à cromatografia de gel filtração segundo o método 9. A purificação de L-asparaginase foi conduzida em coluna cromatográfica Superdex 200 Increase 10/300 GL, de dimensões 1 cm x 30 cm (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. Uma alíquota de 500 µL do extrato bruto do fungo *P. sizovae* foi aplicada na coluna cromatográfica e a eluição isocrática foi conduzida com adição de solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. A eluição da amostra e da fase móvel foram conduzidas com fluxo de 0,75 mL/min a 25°C por um volume de coluna (VC). Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas quanto à atividade enzimática de L-asparaginase. A concentração de proteínas totais e atividade específica foram quantificadas nas frações ativas.

2.4.2. Cromatografia de troca iônica

O extrato bruto e frações ativas do fungo *P. sizovae* foram avaliados frente a diferentes metodologias de cromatografia de troca iônica (Tabela 26).

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
1	catiônica forte	HiTrap SP FF 0,962 mL	1 mL	100 % eluente C	5	0,5	2 mL
				100 % eluente D	5		
2	aniônica forte	HiTrap Q FF 5,027 mL	1 mL	100 % eluente C	4	0,5	2 mL
				gradiente C ao A	2		
				100 % eluente A	5		
3	aniônica forte	HiTrap Q FF 5,027 mL	0,5 mL	100 % eluente C	4	0,5	2 mL
				gradiente C ao A	2		
				100 % eluente A	5		
4	aniônica forte	HiTrap Q FF 0,962 mL	0,5 mL	100 % eluente E	4	0,5	2 mL
				gradiente E ao A	2		
				100 % eluente A	5		
5	aniônica forte	HiTrap Q FF 5,027 mL	1 mL	100 % eluente E	5	5	2 mL
				gradiente E ao A	10		
				100 % eluente A	5		
6	aniônica forte	HiTrap Q FF 5,027 mL	5 mL	100 % eluente E	5	5	2 mL
				gradiente E ao A	10		
				100 % eluente A	5		

(continua)

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

							(continuação)
Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
7	aniônica forte	HiTrap Q XL 5,027 mL	2 mL	100 % eluente A	5	5	2 mL
				gradiente A à 50 % B	20		
				100 % eluente B	5		
8	aniônica fraca	DEAE FF 12,6 mL	5 mL	100 % eluente A	1,6	0,63	2 mL
				100 % eluente A + 0,1 M NaCl	1,6		
				100 % eluente A + 0,2 M NaCl	1,6		
				100 % eluente A + 0,3 M NaCl	1,6		
				100 % eluente A + 0,4 M NaCl	1,6		
				100 % eluente B	1,6		
9	aniônica fraca	DEAE FF 12,6 mL	5 mL	100 % eluente A	1,6	0,63	2 mL
				100 % eluente A + 0,15 M NaCl	1,6		
				100 % eluente A + 0,2 M NaCl	1,6		
				100 % eluente B	1,6		
10	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	5	2	2 mL
				gradiente A à B	10		
				100 % eluente B	5		

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

							(continuação)
Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
11	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	2	2	2 mL
				gradiente A à B	4		
				100 % eluente B	2		
12	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	2	1	2 mL
				gradiente A à B	4		
				100 % eluente B	2		
13	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	2	1	5 mL
				25 % eluente A/75 % eluente B	2		
				100 % eluente B	2		
14	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	2	1	5 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	2		
				60 % eluente A/40 % eluente B	2		
				40 % eluente A/60 % eluente B	2		
				20 % eluente A/80 % eluente B	2		
100 % eluente B	2						

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

(continuação)

Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
15	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	5 mL	100 % eluente A	2	0,5	5 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	2		
				60 % eluente A/40 % eluente B	2		
				40 % eluente A/60 % eluente B	2		
				20 % eluente A/80 % eluente B	2		
100 % eluente B	2						
16	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	2 mL	100 % eluente A	2	0,5	5 mL
				60 % eluente A/40 % eluente B	2		
				40 % eluente A/60 % eluente B	2		
17	aniônica fraca	HiPrep DEAE FF 16/10 20,106 mL	2 mL	60 % eluente A/40 % eluente B	1	0,5	5 mL
				40 % eluente A/60 % eluente B	2		
18	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	1 mL	100 % eluente A	2	0,5	2 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	2		
				60 % eluente A/40 % eluente B	2		
				40 % eluente A/60 % eluente B	2		
				20 % eluente A/80 % eluente B	2		
100 % eluente B	2						

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

							(continuação)
Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
19	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	0,5 mL	100 % eluente A	5	0,25	2 mL
				gradiente A à B	10		
				100 % eluente B	5		
20	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	1 mL	100 % eluente A	4	0,5	2 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	4		
				60 % eluente A/40 % eluente B	4		
				40 % eluente A/60 % eluente B	4		
				20 % eluente A/80 % eluente B	4		
				100 % eluente B	4		
21	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	2 mL	100 % eluente A	6	1	2 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	6		
				60 % eluente A/40 % eluente B	6		
				40 % eluente A/60 % eluente B	6		
				20 % eluente A/80 % eluente B	6		
				100 % eluente B	6		

Tabela 26 - Métodos cromatográficos de troca iônica testados para a purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

Método	Cromatografia	Coluna cromatográfica	Volume amostra	Eluente	Volume de coluna	Fluxo (mL/min)	Volume frações
22	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	1 mL	100 % eluente A	6	0,5	2 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	6		
				60 % eluente A/40 % eluente B	6		
				40 % eluente A/60 % eluente B	6		
				20 % eluente A/80 % eluente B	6		
				100 % eluente B	6		
23	aniônica fraca	HiTrap DEAE FF 0,962 mL	1 mL	100 % eluente A	8	0,5	2 mL
				80 % eluente A/20 % eluente B	8		
				60 % eluente A/40 % eluente B	8		
				40 % eluente A/60 % eluente B	8		
				20 % eluente A/80 % eluente B	8		
				100 % eluente B	8		

Eluente A: tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6; eluente B: tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 + 0,5 M NaCl; eluente C: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,7; eluente D: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,3; eluente E: tampão fosfato citrato pH 3,0. (conclusão)

A purificação de L-asparaginase foi conduzida segundo o método 20, em coluna cromatográfica DEAE Fast Flow 1 mL, de dimensões 7 mm x 25 mm, (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. Uma alíquota de 1 mL da fração ativa obtida na cromatografia de gel filtração concentrada foi aplicada na coluna cromatográfica e a eluição gradiente foi conduzida em incrementos da força iônica com tampão Tris-HCl 50 mM NaCl 0,5 M pH 8,6. A eluição da amostra e da fase móvel foram conduzidas com fluxo de 0,5 mL/min a 25°C. Frações de 2 mL foram coletadas e analisadas quanto à atividade enzimática de L-asparaginase. A concentração de proteínas totais e atividade específica foram quantificadas nas frações ativas.

2.4.3. Quantificação da atividade de L-asparaginase pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico no extrato bruto e frações

A quantificação de L-asparaginase foi determinada no extrato bruto e frações pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico descrito por Drainas et al. (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977) com modificações para as etapas de purificação por métodos não cromatográficos. Alíquotas do extrato bruto e frações (0,1-1,6 mL) foram transferidas para tubos cônicos de centrifuga de 5 mL, em triplicata para os ensaios de métodos não cromatográficos e uma replicata para os ensaios de métodos cromatográficos, e foram adicionados (0-1,6 mL) de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina 100 mM e 0,2 mL de solução de hidroxilamina 1 M pH 7,0. As amostras foram incubadas a 37°C em banho-Maria por 30 minutos. Foi adicionada 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl e as amostras foram então centrifugadas a 4.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (1 mL) foi transferido para cubeta e a absorbância foi mensurada a 500 nm em espectrofotômetro.

O branco das amostras foi preparado conforme descrito para as amostras com a finalidade de eliminar a absorbância da coloração da amostra. Os volumes de extrato bruto e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 utilizados nas amostras teste foram transferidos para tubos cônicos de centrífuga de 5 mL e incubados a 37°C em banho-Maria por 30 minutos. Os volumes de L-asparagina (0,2 mL) e solução de hidroxilamina (0,2 mL) foram adicionados após a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl.

Para as etapas de purificação por métodos cromatográficos, o ensaio enzimático de quantificação da atividade de L-asparaginase foi adaptado com a finalidade de reduzir o volume de amostra utilizada nas frações obtidas. A adaptação do método segundo Drainas et al. (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977) foi realizada respeitando as concentrações dos reagentes em volumes proporcionais para uma reação com volume final de 250 μL . Alíquotas (160 μL) de cada fração obtida após as etapas cromatográficas foram transferidas para microtubos de centrifuga de 1,5 mL e foram adicionados 20 μL de L-asparagina 100 mM e 20 μL de solução de hidroxilamina 1 M pH 7,0. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Foi adicionada 50 μL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl e as amostras foram então centrifugadas a 2.880 x g por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante (200 μL) foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (EnSpire, número de série 23001468, Perkin Elmer, Cingapura).

O branco das amostras foi preparado conforme descrito para as amostras com a finalidade de eliminar a absorbância do reagente colorimétrico adicionado, substituindo o volume das frações proteicas pelo mesmo volume de tampão utilizado no ensaio enzimático (Tris-HCl 50 mM pH 8,6).

A quantidade de β -hidroxamato aspártico (μmol) é calculada a partir da absorbância obtida das amostras frente a curva padrão construída, o volume de amostra utilizado e o tempo de reação do ensaio enzimático (30 minutos). Uma unidade de L-asparaginase é definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxamato aspártico por minuto por mililitro de extrato bruto (U/mL).

2.4.4. Construção da curva padrão de β -hidroxamato aspártico em cubeta e microplaca

A curva padrão para o método de leitura em cubeta foi construída através de diferentes concentrações da solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 e o reagente colorimétrico cloreto férrico/TCA/HCl utilizados no ensaio enzimático da L-asparaginase, preparados em tubos de centrifuga de 5 mL, em triplicata, conforme a Tabela 27. As misturas de soluções (1 mL) foram transferidas para cubetas e suas absorbâncias foram mensuradas em um espectrofotômetro.

Tabela 27 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva

Solução padrão	β -hidroxamato aspártico (μ mol)	β -hidroxamato aspártico 5 mM (μ L)	Tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0	0	2,00	0,5
Padrão 1	0,1	20	1,98	0,5
Padrão 2	0,25	50	1,95	0,5
Padrão 3	0,50	100	1,90	0,5
Padrão 4	0,75	150	1,85	0,5
Padrão 5	1,0	200	1,80	0,5
Padrão 6	1,5	300	1,70	0,5
Padrão 7	2,0	400	1,60	0,5
Padrão 8	3,0	600	1,40	0,5

A curva padrão para o método de leitura em microplaca foi construída através de diferentes concentrações da solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 e o reagente colorimétrico cloreto férrico/TCA/HCl utilizados no ensaio enzimático da L-asparaginase, preparados em tubos de centrífuga de 1,5 mL, em triplicata, conforme a Tabela 28. As misturas de soluções (200 μ L) foram transferidas para uma microplaca de 96 poços e as absorbâncias foram mensuradas em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, Vermont – EUA; EnSpire, número de série 23001468, Perkin Elmer, Cingapura).

Tabela 28 - Preparo das soluções padrão de β -hidroxamato aspártico para a construção da curva com leitura em microplaca

Solução padrão	β -hidroxamato aspártico (μmol)	β -hidroxamato aspártico 5 mM (μL)	Tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 (μL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (μL)
Branco	0	0	200	50
Padrão 1	0,01	2	198	50
Padrão 2	0,025	5	195	50
Padrão 3	0,05	10	190	50
Padrão 4	0,075	15	185	50
Padrão 5	0,1	20	180	50
Padrão 6	0,15	30	170	50
Padrão 7	0,2	40	160	50
Padrão 8	0,3	60	140	50

A reação entre o β -hidroxamato aspártico produzido e o FeCl_3 produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm. A quantidade de β -hidroxamato aspártico (μmol) é calculada a partir da absorbância obtida das amostras aplicada na equação da reta construída através da curva padrão, a quantidade de amostra utilizada e o tempo de reação do ensaio enzimático (30 minutos). Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxamato de ácido L-aspártico por minuto por mililitro (U/mL).

2.4.5. Quantificação de proteínas totais no extrato bruto e frações

A quantificação de proteínas totais nas amostras submetidas à purificação foi avaliada pela formulação baseada em ácido bicinconínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação da proteína total utilizando o kit Pierce BCA (Thermo Scientific). Este método combina a redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} pela proteína em um meio alcalino com a detecção colorimétrica do cátion cuproso (Cu^{+1}) usando um reagente contendo um sal de sódio, BCA (SMITH; KROHN; HERMANSON; MALLIA *et al.*, 1985). 200 μL de reagente preparado a fresco foram adicionados a alíquotas de 25 μL do sobrenadante das amostras de célula lisadas pelo método mecânicos, em triplicata, em uma microplaca de 96 poços e incubados a 37°C por 30 minutos. O produto de

reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso, o qual possui absorvância em 562 nm. As proteínas totais (mg/mL) foram quantificadas segundo a equação da reta construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão em diferentes concentrações (0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 e 2000 µg/mL) (THERMOSCIENTIFIC).

A pureza da L-asparaginase foi dada pela razão entre a atividade enzimática (a , U/mL) e a massa de proteínas totais (P , mg), denominada atividade específica (Equação 10). O fator de purificação (FP) foi dado pela variação do valor de atividade específica (A_e , U/mg) (Equação 11).

$$A_e = a/P \quad (10)$$

$$FP = A_e/A_{e\text{inicial}} \quad (11)$$

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

O grau de pureza das amostras proteicas - extrato bruto e frações ativas - foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970). Géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio (APS) e tetrametiletenodiamina (Temed). O gel concentrador foi preparado a 5 % (v/v).

As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10 % e incubadas *overnight* em geladeira a 4°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.510 x g por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado 3 vezes com 1 mL de acetona a -20°C. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente até secagem da acetona residual. O *pellet* formado foi ressuscitado em 50 µL de tampão de amostra para as frações obtidas nas etapas de purificação e 250 µL de tampão de amostra para o extrato bruto. As amostras foram fervidas de 5 a 10 minutos a 95°C para desnaturação das proteínas. Uma alíquota de 10 a 20 µL das amostras concentradas foi aplicada sobre o gel concentrador. A eletroforese foi conduzida em sistema cuba vertical miniVE (GE Healthcare Bio-Science AB, Califórnia - EUA) com tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % (v/v)) com voltagem ajustada de 120 a 200 V. Foram utilizados como

marcador de massa molecular *kit* de baixa massa molecular (Low Molecular Weight GE Healthcare) contendo as proteínas fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (30,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

2.5.1. Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata

Ao final da corrida da amostra no gel de eletroforese, as bandas proteicas foram coradas segundo Blum et al. (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) usando o Kit PlusOne Silver Staining (GE Healthcare). Primeiramente, o gel foi incubado em solução fixadora por 24 horas. Em seguida, este foi incubado sob agitação em solução sensibilizadora por uma hora. Após 4 lavagens com água destilada por 15 minutos, cada, o gel foi incubado sob agitação na solução de nitrato de prata por uma hora. Após 2 lavagens com água destilada por 1 minuto, cada, o gel foi incubado em solução reveladora até aparecimento das bandas e a reação foi interrompida quando este foi transferido para a solução de parada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Métodos de purificação não cromatográficos

3.1.1. Precipitação de proteínas por solventes orgânicos

Na precipitação de proteínas por solventes orgânicos, o mecanismo de agregação está baseado na redução da constante dielétrica do meio, aumentando as interações eletrostáticas intermoleculares. Vantagens do uso de solventes incluem a facilidade de obtenção por meio de fermentação de fontes de biomassa renováveis, sua volatilidade, que permite pronta recuperação e reciclagem ao processo, sendo facilmente removidos do precipitado por secagem sob vácuo em baixa temperatura. A principal desvantagem dos solventes é a tendência de causarem mudanças na conformação das biomoléculas (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

O extrato bruto da espécie fúngica *P. sizovae* (5 mL) foi submetido a sucessivas adições de acetona ou metanol (40-100 %) com a finalidade de precipitar proteínas e avaliar qual porcentagem da concentração de solvente (*cut-off*) é necessária para precipitar a L-asparaginase como uma etapa de purificação não-cromatográfica. As atividades enzimáticas, quantificação de proteínas totais, atividades específicas e fatores de purificação foram avaliados em todas as frações obtidas (Tabela 29).

Tabela 29 - Avaliação da atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais, atividade específica e fator de purificação de L-asparaginase nas frações de proteínas precipitadas por adição de acetona

Amostra	Volume (mL)	Atividade enzimática (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Extrato bruto	5	17,43	21,38	0,81	1,00
0-40 %	2,5	0,76	9,39	0,08	0,10
40-50 %	2,5	6,80	6,60	1,03	1,26
50-60 %	2,5	7,24	1,35	5,37	6,59
60-70 %	2,5	1,72	0,90	1,91	2,34
70-80 %	2,5	0,13	0,63	0,21	0,26
80-90 %	2,5	0,02	0,36	0,06	0,07
90-100 %	2,5	0,01	0,46	0,03	0,04

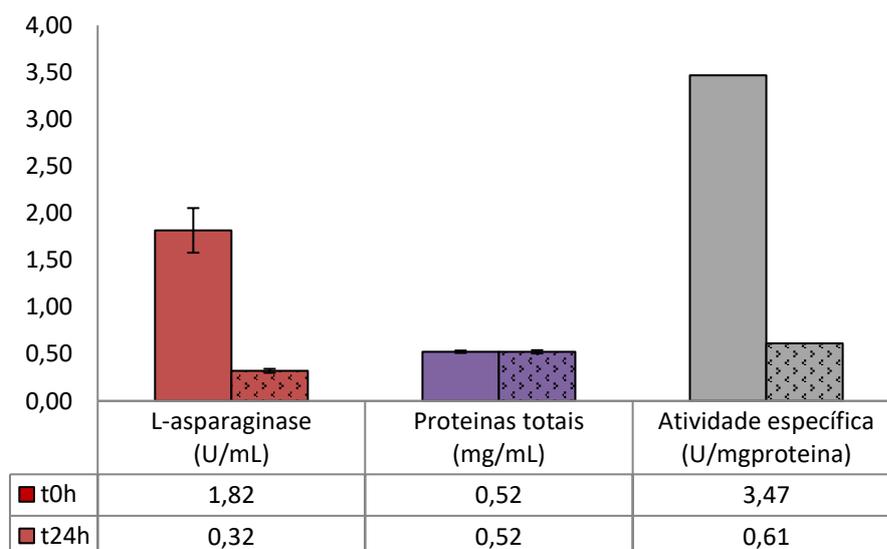
A maior atividade de L-asparaginase (7,24 U) foi observada no *cut-off* de 50-60 % da concentração de acetona, representando a maior atividade específica (5,37

U/mg) e o maior fator de purificação (6,59). As atividades enzimáticas reduziram nas concentrações superiores de acetona (70-100 %), indicando que a enzima L-asparaginase precipita em uma faixa de concentração de acetona entre 40-70 %.

Thakur et al. (2014) purificou parcialmente a L-asparaginase de *Mucor hiemalis* através da adição de 3 volumes de acetona gelada a um volume do extrato bruto. Após incubação em congelador, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido em solução tampão, liofilizado e submetido a cromatografia por afinidade (THAKUR; LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2014). Shafei et al. (2015) precipitou as proteínas do extrato bruto de *Penicillium cyclopium* de forma sequencial usando acetona em concentração de 60 %. A fração 40-60 % foi utilizada para dar continuidade as etapas de purificação por técnicas cromatográficas (SHAFEI; EL-REFAI; MOSTAFA; EL-REFAI *et al.*, 2015). As frações cujas maiores atividades enzimáticas de L-asparaginase foram obtidas no presente trabalho foram similares às encontradas por Shafei et al. (2015).

Entretanto, foi possível observar perda total da atividade enzimática a curto prazo (aproximadamente 2 horas) mesmo quando a fração de proteínas solubilizada estava armazenada em baixa temperatura (4°C). Para contornar este problema, glicina foi adicionada a uma concentração final de 0,1 M ao *pool* das proteínas precipitadas no *cut-off* de 40-60 % de acetona (Figura 17).

Figura 17 - Avaliação da influência da adição de glicina na estabilidade da enzima L-asparaginase em solução de proteínas precipitadas com 40-60 % de acetona após 24 horas de armazenamento



Diversos aditivos podem ser adicionados para exercerem efeitos estabilizantes em proteínas, dentre os quais compostos com naturezas químicas diversas, como monossacarídeos e polissacarídeos (sacarose, glicose, lactose e trealose), poliálcoois (gliceróis e propilenoglicol), polímeros neutros, aminoácidos e sais estabilizam termodinamicamente ou cineticamente a estrutura nativa da proteína. Esses compostos se excluem preferencialmente da superfície da proteína, estabilizando termodinamicamente a estrutura nativa dela, assim como protegem as proteínas contra a ruptura devido à formação de cristais de água durante o congelamento no caso da redução da temperatura de transição vítrea (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020). Ao purificar a L-asparaginase de *Rhodospiridium toruloides* CBSI 4, Ramakrishnan et al. (1996) observou que a perda de atividade pode ser superada mantendo o pH a 9 e com a adição de 250 mM de glicina (tampão de estabilização, 50 mM de Tris e 250 mM de glicina, pH 9) (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996). Entretanto, a avaliação da atividade de L-asparaginase e quantificação de proteínas totais na amostra precipitada com 40-60 % de acetona descongelada após armazenamento a -20°C por 24 horas resultou na redução de 76 % da atividade enzimática e atividade específica da enzima, demonstrando que embora a glicina tenha preservado a atividade de L-asparaginase por um período maior do que quando armazenada em sua ausência, ela ainda não foi suficiente para garantir a estabilidade prolongada da L-asparaginase após precipitação por acetona. Uma hipótese é que provavelmente resíduos de acetona permaneceram no meio, o que fez com a conformação da enzima ativa fosse afetada e conseqüentemente sua atividade enzimática após 24h. Os solventes orgânicos penetram no glóbulo de proteína, causando desnaturação por interferência com as zonas hidrófilas internas, importantes na manutenção da conformação da molécula (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

Embora o metanol tenha mostrado ser o melhor dentre os solventes (isopropanol, etanol, acetona e metanol) testados por Mohan e Manonmani (2013) para a precipitação de L-asparaginase purificada a partir de *Cladosporium* sp. (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013), a atividade de L-asparaginase não foi detectada em nenhuma das frações de proteínas precipitadas com metanol no presente estudo.

3.1.2. Precipitação de proteínas por adição de sal solúvel

Na precipitação de proteínas por sais – *salting out* - o mecanismo de agregação está baseado na atração entre as regiões hidrofóbicas das proteínas pela redução da camada de hidratação da proteína, pois as moléculas de água se tornam escassas ao serem empregadas na solvatação dos íons do sal adicionado. Uma vantagem da precipitação com sulfato de amônio é a ação estabilizante sobre as proteínas, pois a alta concentração salina evita proteólise e ação bacteriana (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

O extrato bruto da espécie fúngica *P. sizovae* (5 mL) foi submetido a sucessivas adições de sulfato de amônio (20-100 %) com a finalidade de precipitar proteínas e avaliar qual porcentagem da saturação de sal é necessária para precipitar a L-asparaginase como uma etapa de purificação não-cromatográfica. As atividades enzimáticas, quantificação de proteínas totais, atividades específicas e fatores de purificação foram avaliados em todas as frações obtidas (Tabela 30).

Tabela 30 - Avaliação da atividade de L-asparaginase, quantificação de proteínas totais e atividade específica de L-asparaginase nas frações de proteínas precipitadas por adição de sulfato de amônio.

Amostra	Volume (mL)	Atividade enzimática (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Extrato bruto	5	17,43	21,38	0,81	1,00
20 %	2,5	0,04	2,19	0,02	0,02
30 %	2,5	1,21	4,79	0,25	0,31
40 %	2,5	0,06	2,09	0,03	0,03
50 %	2,5	0,10	2,51	0,04	0,05
60 %	2,5	0,01	2,46	0,00	0,00
70 %	2,5	0,01	2,74	0,01	0,01
80 %	2,5	0,06	1,07	0,06	0,07
90 %	2,5	0,13	1,20	0,11	0,13
100 %	2,5	0,47	0,79	0,59	0,72

A maior atividade de L-asparaginase (1,21 U) e quantidade de proteínas totais (4,79 mg) foram observadas no *cut-off* de 20-30 % da saturação de sulfato de amônio. Entretanto, o *cut-off* da saturação de sulfato de amônio que resultou na maior atividade específica (0,59 U/mg) e maior fator de purificação (0,72) foi de 90-100 %. Em termos de atividade específica, a precipitação de L-asparaginase pela adição de sulfato de amônio foi aproximadamente 9 vezes inferior aquela obtida pela adição de acetona.

Um resultado similar foi observado por Lincoln et al. (2015) ao empregar precipitação por acetona para purificar parcialmente a L-asparaginase de *Trichoderma viride* Pers, justificando a preferência pela precipitação de acetona à precipitação por sulfato de amônio devido a um melhor rendimento (LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015).

A precipitação de proteínas pelo método *salting-out* através da adição de sulfato de amônio é um método não-cromatográfico comumente empregado como etapa de pré-purificação de L-asparaginase. Basha et al. (2009) e Balasubramanian et al. (2012) purificaram parcialmente a L-asparaginase de *Streptomyces* spp. S3 e *Aspergillus terreus*, respectivamente, elevando o extrato bruto a saturação de 45 % com sulfato de amônio e mantido *overnight* a 4°C. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi elevado a saturação de 85 % com sulfato de amônio, centrifugado e dialisado anterior a aplicação em coluna cromatográfica (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012; BASHA; REKHA; KOMALA; RUBY, 2009). Bilimoria (1969) purificou a L-asparaginase tipo II de *E. coli* através da adição de sulfato de amônio a uma concentração de 50 % de saturação mantendo o pH em 8.0 através da adição de alcali. Após agitação, o precipitado foi removido por centrifugação. A concentração de sulfato de amônio foi elevada a concentração de saturação e o precipitado obtido foi centrifugado. A maior parte da atividade da L-asparaginase tipo II estava presente neste precipitado, a qual foi dissolvida e dialisada repetidamente em água até completa remoção de sal (BILIMORIA, 1969). Dutta et al. (2015) precipitaram a L-asparaginase de *Aspergillus fumigatus* WL002 com sulfato de amônio em 60 % de saturação (DUTTA; GHOSH; PRAMANIK, 2015). Patro et al. (2014) e Dias et al. (2016) purificaram a L-asparaginase de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus oryzae* CCT 3940, respectivamente, através da precipitação de proteínas no extrato bruto por adição de sulfato de amônio em agitação constante até 80 % de saturação. O precipitado foi dialisado anterior a aplicação em coluna cromatográfica (DIAS; RUIZ; TORRE; SATO, 2016; PATRO; BASAK; MOHAPATRA; GUPTA, 2014). Meghavarnam e Janakiraman (2015) purificaram a L-asparaginase de *Fusarium culmorum* ASP-87 isolada do solo tropical submetendo o extrato bruto a precipitação por sulfato de amônio a uma saturação de 80 % (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015). Shrivastava et al. (2012) purificaram a L-asparaginase de *Penicillium digitatum*, cuja atividade enzimática estava associada a fração precipitada entre 70-80 % de saturação de sulfato de amônio (SHRIVASTAVA; KHAN; SHRIVASTAV; JAIN *et al.*, 2012). Scheetz et al. (1971)

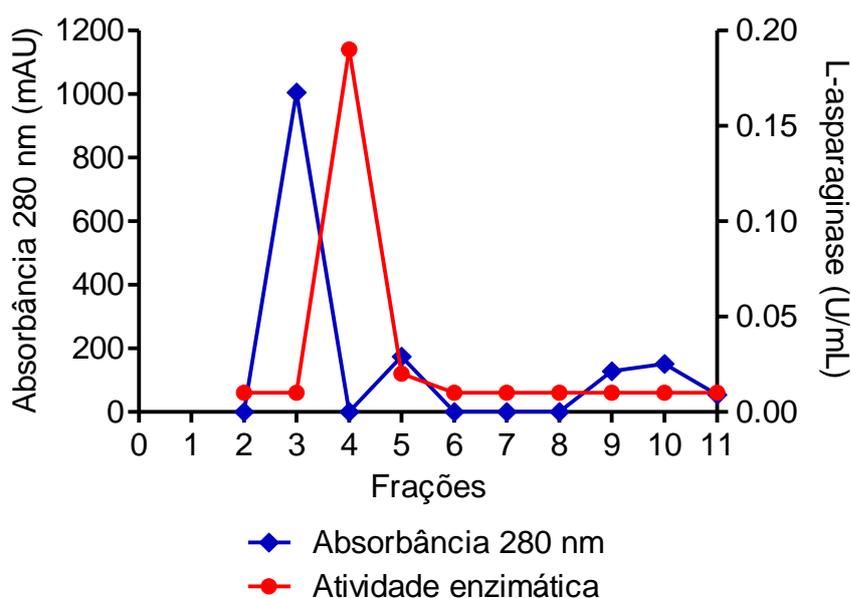
adicionaram sulfato de amônio sólido em agitação constante a fração do sobrenadante bruto de *Fusarium tricinctum* a saturação de 75 % (SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971).

3.2. Métodos de purificação cromatográficos

3.2.1. Cromatografia de gel filtração

O perfil cromatográfico do extrato bruto da espécie fúngica *P. sizovae* foi avaliado frente a diferentes metodologias por cromatografia de gel filtração. O melhor resultado foi obtido em coluna pré-empacotada Superdex 200 Increase 10/300 GL, 30 cm x 10 mm, volume de coluna de 23,532 mL (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), em fluxo de eluição de 0,75 mL/min a 25°C, método 9. A atividade de L-asparaginase foi detectada entre o primeiro pico e o segundo pico proteico, o que indica que a enzima eluiu da coluna no início da corrida, sugestivo de que a proteína possui alta massa molecular (Figura 18).

Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo filamentososo *P. sizovae* eluído em coluna de gel filtração Superdex 200 Increase 10/300 GL em eluição isocrática com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 e fluxo 0,75 mL/min a 25°C

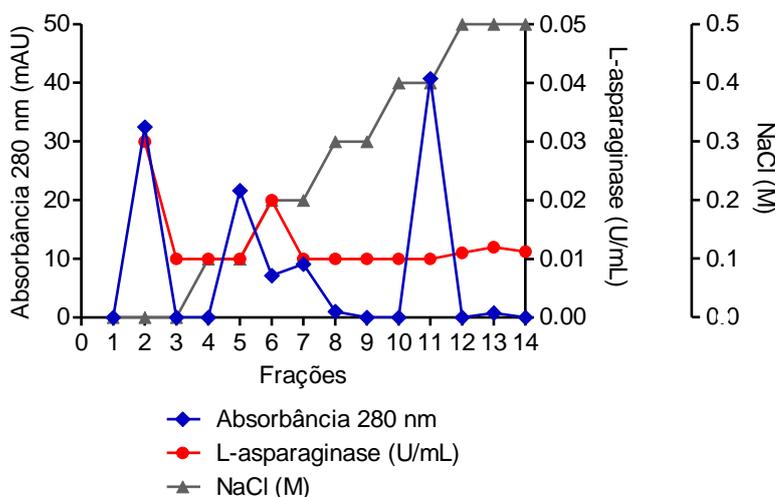


3.2.2. Cromatografia de troca iônica

O perfil cromatográfico do extrato bruto e frações ativas da espécie fúngica *P. sizovae* foi avaliado frente a diferentes metodologias por cromatografia de troca iônica. Os melhores resultados foram obtidos pelos métodos 8, 9 e 20. A fração ativa para atividade de L-asparaginase obtida pela cromatografia de gel filtração em coluna Superdex (Pico 1) foi eluída da coluna pré-empacotada do tipo aniônica Hitrap DEAE Sepharose Fast Flow, 7 mm x 25 mm, volume de coluna de 0,962 mL (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), em fluxo de eluição de 0,5 mL/min a 25°C, método 20. O pH do tampão de eluição utilizado nos métodos cromatográficos foi de 8,6, acima do ponto isoelétrico da L-asparaginase reportado na literatura de 5,3 (EISELE; LINKE; BITZER; NA'AMNIEH *et al.*, 2011). Neste pH, a proteína de interesse possui carga negativa e se liga à coluna trocadora de ânions, com carga positiva. Foi possível observar a eluição de proteínas à medida que a força iônica era incrementada através da adição NaCl à fase móvel (tampão tris-HCl 50 mM NaCl 0,5 M pH 8,6).

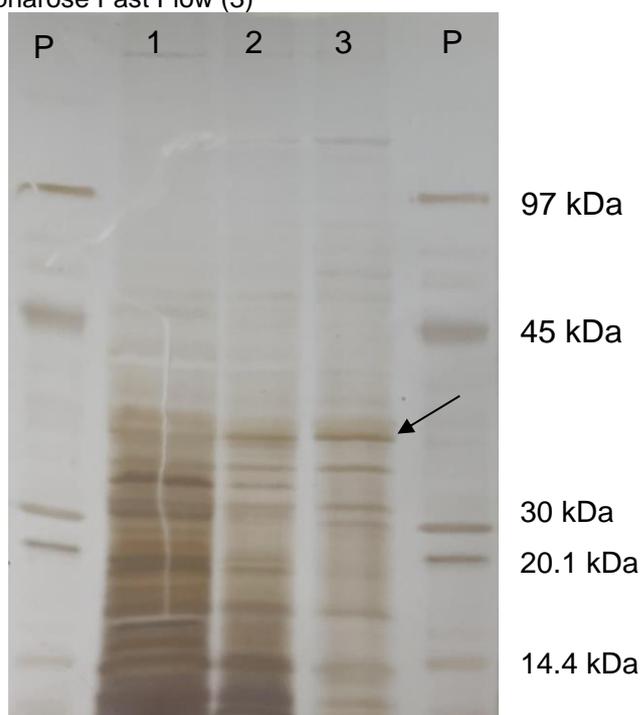
A atividade de L-asparaginase foi detectada entre o segundo e terceiro pico proteico, o que indica que a enzima eluiu quando a concentração de NaCl na fase móvel era de 0,2 M (Figura 19).

Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo filamentoso *P. sizovae* eluído em coluna de troca iônica do tipo aniônica HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow em gradiente de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 com concentração crescente de NaCl (0-0,5 M) e fluxo 0,5 mL/min a 25°C



O perfil proteico de cada etapa de purificação da L-asparaginase foi acompanhado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O extrato bruto da espécie fúngica *P. sizovae* e as frações ativas para L-asparaginase estão apresentados na Figura 20.

Figura 20 - Perfil eletroforético em condições desnaturantes de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12 %). Padrão de massa molar: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa) (P); extrato bruto do fungo *P. sizovae* (1); fração 4 da coluna gel filtração Superdex 200 Increase 10/300 GL (2); fração 6 da coluna aniônica HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow (3)



A atividade de L-asparaginase de *P. sizovae* foi mensurada após 2 etapas de purificação (Tabela 31). Na última etapa, após eluída em coluna de troca iônica aniônica DEAE Sepharose Fast Flow, a amostra apresenta-se clarificada com bandas proteicas com diferentes intensidades em SDS-PAGE. Pode se observar uma banda proteica bem definida de aproximadamente a 40,7 kDa, porém ainda não purificada. Outros contaminantes proteicos foram revelados no gel. O processo de purificação visa diminuir a população de proteínas contaminantes, mantendo as proteínas de interesse e, conseqüentemente, aumentando o rendimento da purificação. No presente estudo foi observada uma redução pronunciada nos fatores de purificação e rendimento ao longo do processo. Este efeito pode ser explicado pela sucessiva diluição da amostra durante as etapas cromatográficas e perdas da proteína de interesse por ter sido necessária a aplicação de diferentes operações de separação.

Tabela 31 - Resumo das etapas de purificação da L-asparaginase de *P. sizovae*

Etapas	Volume coletado (mL)	Atividade total (U)	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	0,5	4,16	3,03	1,37	1,00	100
Fração 4 Superdex	2	0,38	0,79	0,49	0,36	9,22
Fração 6 DEAE FF	2	0,14	0,33	0,44	0,32	3,48

Similar ao processo de purificação adotado neste estudo, a L-asparaginase de *A. flavus* foi purificada usando a coluna de gel filtração Sephadex G-100-120 em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 seguida de troca iônica pelo sistema biológico LP BIO-RAD (PATRO; BASAK; MOHAPATRA; GUPTA, 2014). A L-asparaginase de *A. terreus* foi purificada em coluna de troca aniônica fraca DEAE Sepharose FF seguida de coluna de gel filtração Sephacryl S-200 HR (LOUREIRO; BORGES; ANDRADE; TONE *et al.*, 2012). A L-asparaginase de *A. fumigatus* WL002 foi purificada com precipitação de proteínas por adição de sulfato de amônio, seguida de coluna DEAE Sepharose FF e coluna Sephadex G-100 (DUTTA; GHOSH; PRAMANIK, 2015). Da mesma forma, a L-asparaginase de *F. Culmorum* ASP-87 foi purificada através da adição de 80 % de sulfato de amônio seguido de cromatografia em coluna DEAE celulose e Sephadex G-100 (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015). A purificação da L-asparaginase de *Citrobacter* se deu pela precipitação em acetona, seguida de sulfato de amônio, cromatografia em coluna de troca aniônica fraca DEAE celulose e coluna de gel filtração Sephadex G-200 (BASCOMB; BANKS; SKARSTEDT; FLEMING *et al.*, 1975). Após precipitação por solventes orgânicos, a L-asparaginase de *Cladosporium* sp. foi purificada em coluna de troca catiônica DEAE celulose seguida de coluna de gel filtração Sepharose 6B (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). A coluna cromatográfica aniônica fraca DEAE FF utilizada neste estudo foi a coluna de escolha para purificação da L-asparaginase de *E. coli* transformada BL21 pLysS (DE3) em uma única etapa (BAHREINI; AGHAIYPOUR;

ABBASALIPOURKABIR; GOODARZI *et al.*, 2014). Outra trocadora aniônica fraca, DEAE-celulose, foi utilizada para purificar a L-asparaginase de *A. terreus* (BALASUBRAMANIAN; AMBIKAPATHY; PANNEERSELVAM, 2012), *Trichoderma viride* Pers: SF Grey (LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015). Outras colunas cromatográficas de gel filtração também foram utilizadas para a purificação da L-asparaginase de *Streptomyces gulbargensis* (AMENA; VISHALAKSHI; PRABHAKAR; DAYANAND *et al.*, 2010), *Streptomyces* spp. (BASHA; REKHA; KOMALA; RUBY, 2009), *P. brevicompactum* NRC 829 (ELSHAFEI; HASSAN; ABOUZEID; MAHMOUD *et al.*, 2012), *Talaromyces pinophilus* (KRISHNAPURA, PRAJNA RAO; BELUR, PRASANNA D., 2016), *P. cyclopium* (SHAFEI; EL-REFAI; MOSTAFA; EL-REFAI *et al.*, 2015), *P. digitatum* (SHRIVASTAVA; KHAN; SHRIVASTAV; JAIN *et al.*, 2012), *Spirulina maxima* (ABD EL BAKY; EL BAROTY, 2016), *Rhodospiridium toruloides* CBS14 (RAMAKRISHNAN; JOSEPH, 1996) e do basidiomiceto *Flammulina velutipes* (EISELE; LINKE; BITZER; NA'AMNIEH *et al.*, 2011). No entanto, sugere-se que este resultado diferente na sequência de purificação já anteriormente relatada, possa ser devido as diferenças na sequência de aminoácido e conseqüentemente nas características físico-químicas das L-asparaginases expressas por fungos.

4. CONCLUSÃO

O extrato bruto do fungo filamentoso *P. sizovae* isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro selecionado como melhor produtor de L-asparaginase com baixa atividade de glutaminase foi submetido à processo de purificação. Técnicas não cromatográficas de precipitação de proteínas por adição de solventes (acetona e metanol) ou sal solúvel (sulfato de amônio) foram empregadas, em que a não foi possível detectar atividade enzimática quando as proteínas foram precipitadas com metanol. Por outro lado, os maiores fatores de purificação foram obtidos quando acetona foi adicionada na faixa de 40-70 %. Entretanto, a atividade enzimática foi perdida, sugestivo de desnaturação da proteína por resíduos de solvente na amostra. Técnicas de purificação de alta resolução por cromatografia de exclusão molecular e troca iônica foram empregadas. Todavia, foi observada uma pronunciada redução do fator de purificação ao longo do processo, assim como a presença de proteínas contaminantes na amostra. Portanto, a L-asparaginase de *P. sizovae* foi parcialmente purificada.

CAPÍTULO IV

Clonagem da L-asparaginase de *P. sizovae* em *K. phaffii*

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante e engenharia de proteínas proporciona a produção de enzimas feitas sob medida para atender às necessidades dos usuários ou do processo, obtendo-se enzimas de qualidade superior às propriedades naturais. A expressão de proteínas mais barata, mais fácil e mais rápida pode ser realizada em sistemas procarióticos como *E. coli*, no entanto, essa bactéria não pode expressar proteínas muito grandes, além de não ser o sistema de escolha para proteínas ricas em S – S e que proteínas que requerem modificações pós-tradução, pois não pode realizar a glicosilação e remover as sequências S – S. Adicionalmente, as proteínas eucarióticas podem ser tóxicas para as bactérias. Geralmente, as proteínas menores que 30 kD são expressas em um sistema procariótico, enquanto aquelas que são maiores que 100 kD são expressas em um sistema eucariótico. As leveduras, organismos fúngicos eucarióticos unicelulares, são frequentemente usadas para produzir proteínas recombinantes que não são bem produzidas em *E. coli* devido a problemas de dobramento ou à necessidade de glicosilação. As cepas de levedura são geneticamente bem caracterizadas e conhecidas por realizarem muitas modificações pós-tradução. As duas cepas de levedura mais utilizadas são *S. cerevisiae* e a levedura metilotrófica *P. pastoris*, esta última renomeada em *Komagataella pastoris* ou *K. phaffii* (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A levedura metilotrófica possui a habilidade de utilizar o metanol como única fonte de carbono e energia. A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo na via de utilização do metanol: a oxidação de metanol à formaldeído e peróxido de hidrogênio. AOX é sequestrado dentro do peroxissomo junto com a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Parte do formaldeído gerado deixa o peroxissomo e é oxidado à formato pela formaldeído desidrogenase e dióxido de carbono pela formato desidrogenase, das quais estas reações são uma fonte de energia para células crescendo em metanol (CEREGHINO; CREGG, 2000).

As vantagens dos sistemas de expressão de levedura incluem: alto rendimento; estirpes de produção estável; durabilidade; custo-benefício; crescimento de alta densidade; alta produtividade; adequação para produção de proteína marcada

isotopicamente; crescimento rápido em meios quimicamente definidos sendo facilmente adaptadas aos processos de fermentação; processamento de produto semelhante a células de mamíferos; proteínas maiores que 50 kD podem ser produzidas; sequências de sinal podem ser removidas; pode lidar com proteínas ricas em S – S promovendo formação de ligação dissulfeto; produzem chaperonas para auxiliar no dobramento de certas proteínas; e pode glicosilar proteínas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

O processo de glicosilação pode ser definido como a adição enzimática de carboidratos a sítios específicos na superfície de proteínas e lipídios, transformando-os em glicoproteínas e glicolipídeos. A glicosilação de uma proteína pode ser diferente dependendo do meio em que as células são cultivadas. A glicosilação influencia a cinética da reação da enzima, solubilidade, meia-vida sérica, estabilidade térmica, atividade *in vivo*, imunogenicidade e ligação ao receptor. Quase todos os polipeptídeos eucarióticos excretados são glicosilados. Em alguns casos, uma proteína normalmente glicosilada é ativa sem a porção de carboidrato e pode ser produzida em bactérias. Nos casos em que a glicosilação é necessária para a estabilidade ou dobramento adequado, isso pode muitas vezes ser fornecido por células de levedura, fungo, inseto ou mamífero recombinante. Enzimas fúngicas que são excretadas freqüentemente mostram o mesmo tipo de glicosilação observada em proteínas secretadas em mamíferos, com açúcares D-manose covalentemente ligados a moléculas N-acetil-D-glucosamine ligadas à asparagina, embora carboidratos adicionais ligados ao oxigênio da serina ou treonina às vezes estejam presentes nas proteínas fúngicas. *P. pastoris* é capaz de adicionar frações de carboidratos ligadas a O e N às proteínas secretadas. A glicosilação é menos extensa em *P. pastoris* do que em *S. cerevisiae* devido a comprimentos de cadeia mais curtos de oligossacarídeos de alta manose ligados a N, geralmente até 20 resíduos em comparação com 50-150 resíduos em *S. cerevisiae*. Adicionalmente, *P. pastoris* carece de α -1,3-manosil transferase que produz ligações terminais α -1,3-manosil em *S. cerevisiae* e causa uma resposta altamente antigênica em pacientes (CEREGHINO; CREGG, 2000; DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A expressão heteróloga da L-asparaginase de alguns microrganismos já foi relatada na literatura (Tabela 32). Dentre os estudos de L-asparaginase fúngicas produzidas de forma recombinante, como *A. oryzae* (HENDRIKSEN; KORNBRUST; OSTERGAARD; STRINGER, 2009) e *A. terreus* (SAEED; ALI; SOUDAN; EMBABY *et*

al., 2018), nenhum estudo relatou a clonagem e expressão de uma L-asparaginase fúngica em levedura até o presente momento.

Tabela 32 – Estudos sobre produção de L-asparaginase recombinante

(continua)

Microrganismo	Autor
ASNase II (ansB) clonado em pAED4 transformado em <i>E. coli</i> BL21pLysS (DE3)	(BAHREINI; AGHAIYPOUR; ABBASALIPOURKABIR; GOODARZI <i>et al.</i> , 2014)
ASNase II clonado em pET-15 transformado em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(BARROS; BRUMANO; FREITAS; PESSOA JR <i>et al.</i> , 2020)
ASNase II (ASP3) de <i>S. cerevisiae</i> E1278b, X2180-1A, P40-2a, BMY344, BMY224 e MP38 clonado em pPM7, p1-XS, pEC22, pEC23 transformado em <i>E. coli</i> DH5 α	(BON; CARVAJAL; STANBROUGH; ROWEN <i>et al.</i> , 1997)
ASNase II (ans B2) de <i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC 1428 clonado em pHT43 transformado em <i>Bacillus subtilis</i> WB800N	(CHITYALA; VENKATA DASU; AHMAD; PRAKASHAM, 2015)
ASNase1 de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 (ScASNase1) clonada em pET15b-ASP1 transformada em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(COSTA; SCHULTZ; DE ARAUJO BIANCHI PEDRA; LEITE <i>et al.</i> , 2016)
ASNase (NSE1) das sementes de <i>L. japonicus</i> (Regel) Larsen cv. Gifu (B-129) clonado em PET101/D-TOPO transformado em <i>E. coli</i>	(CREDALI; GARCIA-CALDERON; DAM; PERRY <i>et al.</i> , 2013)
Gliap asparaginase clonado em pGEX-5X-I e pMAL-2c transformados em <i>E. coli</i>	(DIETERICH; LANDWEHR; REISSNER; SMALLA <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EGYII DSM 101801 clonado em pET28-a(+) transformado em <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	(EL-SHARKAWY; FARAG; EMBABY; SAEED <i>et al.</i> , 2016)

Tabela 31 – Estudos sobre produção de L-asparaginase recombinante

(continuação)

Microorganismo	Autor
ansB em <i>E. coli</i> NRRL JM103 (<i>E. coli</i> pAHZ12), em <i>E. aerogenes</i> NRRL B-427 (Ea[pBPGA]) e <i>P. aeruginosa</i> USDA B771 (pB-PGA)	(ERENLER; GECKIL, 2014)
ASNase II de <i>B. subtilis</i> 168 ATCC 23857 clonado em pMA0911 e pP43NMK transformados em <i>B. subtilis</i> WB600	(FENG; LIU; JIAO; GAO <i>et al.</i> , 2017)
ASP3 de <i>S. cerevisiae</i> YAE3R-D12 clonado em pPIC9 transformado em <i>P. pastoris</i> GS115 (<i>his4</i>)	(FERRARA; SEVERINO; MANSURE; MARTINS <i>et al.</i> , 2006)
ASNase selvagem de <i>E. chrysanthemi</i> NCPPB 1066 e mutantes desaminados clonados em pJ401 transformados em <i>E. coli</i> BL21	(GERVAIS; FOOTE, 2014)
<i>E. coli</i> YG 002 clonada em pET-15b transformados em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(GHOSHOON; BERENJIAN; HEMMATI; DABBAGH <i>et al.</i> , 2015)
ASNase de <i>E. chrysanthemi</i> NCPPB 1066 clonado em pANS30 em <i>E. coli</i> JM83 e clonado em pASN326 e pASN230 transformados em <i>E. carotovora</i> SCI193	(GILBERT; BLAZEK; BULLMAN; MINTON, 1986)
14270 ASNase de <i>S. thermoluteus</i> subsp. <i>fuscus</i> NBRC 14270 e SGR ASNase de <i>S. griseus</i> clonados em pTONA5a transformados em <i>S. lividans</i>	(HATANAKA; USUKI; ARIMA; UESUGI <i>et al.</i> , 2011)
ASNase de <i>A. oryzae</i> clonado em pMStr57 transformado em <i>A. oryzae</i> BECh2	(HENDRIKSEN; KORNBRUST; OSTERGAARD; STRINGER, 2009)
ASNase de <i>Withania somnifera</i> clonado em pRSET A transformado em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(OZA; PARMAR; PATEL; SUBRAMANIAN, 2011)

Tabela 31 – Estudos sobre produção de L-asparaginase recombinante

Microrganismo	Autor
ErA de <i>E. carotovora</i> NCYC 1526 clonado em pET22b transformado em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	(POURHOSSEIN; KORBEEKANDI, 2014)
ASNase II de <i>S. cerevisiae</i> (ASP3) clonado em pPIC9K transformado em <i>P. pastoris</i> KM71 (arg4 his4 AOX1::ARG4)	
rErAll de <i>E. carotovora</i> clonado em pET-30a(+) transformado em <i>E. coli</i> C43 (DE3)	(ROTH; NUNES; ROSADO; BIZARRO <i>et al.</i> , 2013)
ASNase de <i>A. terreus</i> transformado em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	(SAEED; ALI; SOUDAN; EMBABY <i>et al.</i> , 2018)
Was79 de <i>Wolinella succinogenes</i> clonado em pET28b+ transformado em <i>E. coli</i> BL21(DE3)	(SANNIKOVA; BULUSHOVA; CHEPEREGIN; GUBAYDULLIN <i>et al.</i> , 2016)

(conclusão)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo de Reagentes e Soluções

- Ágar Luria-Bertani (LB) 20 g
 - Água destilada 490 mL
 - Tetraciclina (5 µg/mL) 10 mL

- Ágar Luria-Bertani com baixa concentração de sal
 - Triptona água 2 g
 - Extrato de levedura 1 g
 - Água destilada 200 mL
 - pH ajustado em 7.5
 - Zeocina (100 mg/mL) 50 µL

- Ágar Luria-Bertani para controle pUC19
 - Água destilada 490 mL
 - Ampicilina (5 mg/mL) 10 mL

- Meio de cultivo Luria-Bertani para *E. coli* (LB) 12,5 g
 - Água destilada 490 mL
 - Tetraciclina (5 µg/mL) 10 mL

- Meio de cultivo Luria-Bertani para *E. coli* com baixa concentração de sal
 - Triptona água 2 g
 - Extrato de levedura 1 g
 - Água destilada 200 mL
 - pH ajustado em 7,5
 - Zeocina (100 mg/mL) 50 µL

- Solução estoque de base de nitrogênio para leveduras com sulfato de amônio, sem aminoácidos (YNB 10X)

- Solução de biotina 0,02 % (500 X B)

- | | |
|--|--------|
| Biotina | 20 mg |
| Água destilada autoclavada | 100 mL |
| Solução filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm e armazenada a 4°C. | |
- Solução de histidina 0,4 % (100 X H)

Histidina	400 mg
Água destilada autoclavada	100 mL
Solução filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm e armazenada a 4°C.	

 - Solução de dextrose 20 % (10 X D)

D-glicose	200 g
Água destilada	1 L
Solução foi autoclavada.	

 - Solução de metanol 5 % (10 X M)

Metanol 99 %	5 mL
Água destilada autoclavada	95 mL
Solução filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm e armazenada a 4°C.	

 - Solução de glicerol 10 % (10 X GY)

Glicerol	100 mL
Água destilada	900 mL
Solução foi autoclavada.	

 - Solução tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6

Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄) 1 M	132 mL
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) 1 M	868 mL
Solução foi autoclavada.	

 - Meio de cultivo mínimo contendo glicerol para *K. phaffii* (MGY)

Água destilada autoclavada	400 mL
Base de nitrogênio para leveduras 10 X	50 mL
Biotina 500 X	1 mL

- | | |
|---------------|-------|
| Glicerol 10 X | 50 mL |
|---------------|-------|
- Meio de cultivo mínimo contendo metanol para *K. phaffii* (MM)

Água destilada autoclavada	400 mL
Base de nitrogênio para leveduras 10 X	50 mL
Biotina 500 X	1 mL
Metanol 10 X	50 mL

 - Meio de cultivo mínimo tamponado para *K. phaffii*

Água destilada autoclavada	700 mL
Solução tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6	100 mL
Base de nitrogênio para leveduras 10 X	100 mL
Biotina 500 X	2 mL

Para preparo do meio de cultivo mínimo tamponado contendo glicerol (BMG), 50 mL de glicerol 10 X foi homogeneizado a 451 mL desta mistura. Para preparo do meio de cultivo mínimo tamponado contendo metanol (BMM), 50 mL de metanol 10 X foi homogeneizado a 451 mL desta mistura.

 - Meio de cultivo complexo tamponado para *K. phaffii*

Extrato de levedura	10 g
Peptona	20 g
Água destilada autoclavada	700 mL
Solução tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6	100 mL
Base de nitrogênio para leveduras 10 X	100 mL
Biotina 500 X	2 mL

Para preparo do meio de cultivo complexo tamponado contendo glicerol (BMGY), 50 mL de glicerol 10 X foi homogeneizado a 451 mL desta mistura. Para preparo do meio de cultivo mínimo tamponado contendo metanol (BMMY), 50 mL de metanol 10 X foi homogeneizado a 451 mL desta mistura.

 - Solução de cloreto férrico/TCA/HCl

Solução A: Solução de cloreto férrico	
Cloreto férrico	10 g
Água ultrapurificada q.s.p.	100 mL

Solução B: Solução de HCl/TCA

Ácido clorídrico 37 %	5,45 mL
Ácido tricloroacético (TCA)	20 mL
Água ultrapurificada q.s.p.	100 mL
Misturar soluções A e B	

- Solução de hidroxilamina 1M

Solução A: Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina 2 M

Cloridrato de hidroxilamina	27,8 g
Água destilada q.s.p.	200 mL

Solução B: Solução estoque de hidróxido de sódio 2 M

NaOH	40 g
Água destilada	500 mL

Solução de hidroxilamina 1 M: Misturar a solução A com solução B (1:1) ajustando o pH em 7.

- Solução de L-asparagina 100 mM

L-asparagina (Sigma)	0,33 g
Água destilada q.s.p.	25 mL

- Solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM

β -hidroxamato aspártico (Sigma)	7,40 mg
Água ultrapurificada q.s.p.	10 mL

- Solução Tris-HCl 50 mM pH 8,6

Tris base	6,06 g
Água destilada q.s.p.	1 L
pH da solução foi ajustado em 8,6 com HCl 37 %.	

- Tampão de corrida

Tris base	3,03 g
Glicina	14,41 g
SDS	1 g

Água purificada q.s.p.	1 L
• Gel de poliacrilamida 12 % separador	
Água ultrapurificada	3,34 mL
Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	4 mL
SDS 10 %	100 µL
Tetrametiletenodiamina (TEMED)	10 µL
Persulfato de sódio (APS) 10 %	50 µL
• Gel de poliacrilamida 5 % concentrador	
Água ultrapurificada	3,65 mL
Tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	1 mL
SDS 10 %	60 µL
Temed	6 µL
APS 10 %	30 µL
• Solução fixadora	
Etanol	100 mL
Ácido acético glacial	25 mL
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL
• Solução sensibilizadora	
Etanol	75 mL
Tiosulfato de sódio (5 % m/v)	10 mL
Acetato de sódio	17 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL
Adicionar glutaraldeído (25 % m/v) antes do uso	
• Solução de nitrato de prata (2,5 % m/v)	25 mL
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL

- Solução reveladora

Carbonato de sódio	6,25 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL
Adicionar formaldeído (37 % m/v) antes do uso	

- Solução de parada

EDTA-Na ₂ .2H ₂ O	3,65 g
Água ultrapurificada q.s.p.	250 mL

2.2. Identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

2.2.1. Extração do DNA genômico de *P. sizovae*

A extração do DNA genômico do fungo filamentoso *P. sizovae* foi avaliada frente a diferentes amostras e procedimentos (Tabela 33). Amostras de diferentes massas de *P. sizovae* (0,1 ou 0,2 g) foram utilizadas na tentativa de extrair o DNA genômico: biomassa filtrada do meio de cultivo íntegra criopreservada (-80°C); biomassa filtrada do meio de cultivo macerada em gral e pistilo pelo método de extração por força mecânica; e micélio crescido em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA mantido em estufa a 32°C por 5 ou 6 dias raspado cuidadosamente com auxílio de um bisturi descartável. Dois tipos de esferas foram testados frente a sua efetividade em liberar o DNA fúngico: esferas de vidro e esferas de zircônia preenchidas até a marcação de 0,2 mL em tubo de centrífuga de 2 mL para onde as amostras foram transferidas. Dois equipamentos que promovem a agitação das esferas junto às amostras de fungo foram testados: vórtex, por período de agitação de 5 minutos e FastPrep FP120 (Savant Instruments, Holbrook, Nova Iorque - EUA), um instrumento de rompimento de amostras projetado para homogeneizar, moer ou lisar amostras biológicas de maneira rápida e eficiente, em velocidade 6.0, por 4 ciclos de 30 segundos em pulso com intervalos entre os pulsos a fim de evitar o superaquecimento e consequente degradação da amostra.

Tabela 33 - Métodos testados para a extração do DNA genômico do fungo filamentoso *P. sizovae*

Método	Amostra	Esfera	Equipamento
1	0,1 g da biomassa íntegra	vidro	vórtex
2	0,1 g da biomassa macerada	-	-
3	0,1 g do micélio crescido em placa BDA	vidro	vórtex
4	0,2 g da biomassa íntegra	zircônia	FastPrep
5	0,2 g da biomassa íntegra	zircônia	vórtex
6	0,2 g da biomassa íntegra	vidro	FastPrep
7	0,2 g da biomassa íntegra	vidro	vórtex
8	0,2 g da biomassa macerada	-	-
9	micélio crescido em placa BDA	Zircônia	FastPrep

2.2.2. Purificação do DNA genômico de *P. sizovae*

O DNA das amostras foi isolado utilizando o kit *Plant/Fungi Isolation Kit* (Norgen BioTek Corporation, Thorold, ON – Canadá). O lisado foi preparado através da adição de uma alíquota de 500 µL da solução tampão de lise L (*Lysis Buffer L*) à amostra e incubado a 65°C por 10 minutos com agitação temporária pela inversão dos tubos. Após o período de incubação, uma alíquota de 100 µL da solução tampão de ligação I (*Binding Buffer I*) foi adicionada à amostra, homogeneizada em vórtex e incubada em banho de gelo por 5 minutos. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 14.000 x g. O lisado foi transferido para coluna de filtração (*Filter Column*) acoplada ao tubo coletor (*collection tube*) e centrifugado por 2 minutos a 14.000 x g. O sobrenadante obtido no tubo coletor foi transferido para um novo tubo de centrífuga de 1,5 mL previamente autoclavado. Etanol 70 % foi adicionado em mesmo volume de amostra coletada e a mistura foi homogeneizada em vórtex.

O lisado clarificado foi totalmente transferido para uma coluna de rotação (*spin column*) previamente acoplada a um tubo coletor e centrifugado por 1 minuto a 10.000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna de rotação foi reacoplada ao tubo coletor.

A coluna foi lavada através da adição de uma alíquota de 500 µL da solução WN, previamente homogeneizada com 24 mL de etanol absoluto, e centrifugada por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna de rotação foi reacoplada ao tubo coletor. Uma alíquota de 500 µL da solução de lavagem A, previamente homogeneizada com

90 mL de etanol absoluto, foi adicionada à coluna e centrifugada por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna de rotação foi reacoplada ao tubo coletor. Uma alíquota adicional de 500 µL da solução de lavagem A foi adicionada à coluna e centrifugada novamente por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna de rotação foi reacoplada ao tubo coletor. A coluna foi centrifugada por 2 minutos a 14,000 x g a fim de secar totalmente a resina. O tubo coletor foi descartado.

A eluição do DNA foi preparada posicionando a coluna de rotação em um novo tubo de eluição de 1,7 mL. Uma alíquota de 100 µL da solução tampão B (*Elution Buffer B*) foi adicionada à coluna e incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 10,000 x g.

O DNA genômico de *P. sizovae* purificado foi quantificado em equipamento Nanodrop em triplicata para avaliar a concentração e pureza do DNA, sendo esta verificada pelas relações 260/280 e 260/230, nas amostras com alíquota de 1 µL.

O DNA genômico de *P. sizovae* foi diluído em 10, 100 e 300 vezes com água livre de nuclease e duas reações de PCR com os *primers* ITS1 e ITS4 foram realizadas com temperaturas de anelamento de 55°C e 50°C. A pureza das amostras foi verificada em gel de agarose 1,2 %. As amostras de gDNA foram armazenadas a -20°C.

2.2.3. Construção de *primers* degenerados

Uma busca na base de dados GenBank para sequências genéticas de L-asparaginase de espécies fúngicas do gênero *Penicillium* foi realizada, na qual foi encontrado o genoma completo de três estirpes fúngicas - *Penicillium citrinum* DSM1997, *Penicillium citrinum* JCM22607 e *Penicillium steckii* MLKD01000003 – genealógicamente próximas a espécie *P. sizovae* por se tratarem de espécies da sessão *Citrina* segundo a filogenia do gênero *Penicillium* (HOUBRAKEN; SAMSON, 2011). O genoma completo destas estirpes foi comparado através do software ClustalX 2.1 com sequências do gene da L-asparaginase tipo II já identificadas em outras espécies fúngicas e descritas na base de dados GenBank.

O pareamento das sequências de L-asparaginase identificadas revelou a presença bases nitrogenadas não-homólogas entre as espécies fúngicas *P. citrinum* e *P. steckii*. Por este motivo, *primers* degenerados que compreendem diferentes trechos do gene da L-asparaginase – sequência anterior ao início do gene da L-

asparaginase, regiões flanqueadoras, íntrons e sequência posterior ao gene da L-asparaginase - foram desenhados e sintetizados (Eurofins Genomics UK Limited, Wolverhampton, Reino Unido) sendo 7 *primers forward* (F) e 6 *primers reverse* (R) e dois primers de identificação da espécie fúngica (ITS1 e ITS4) (Tabela 34).

Tabela 34 - *Primers* degenerados desenhados e sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

(continua)

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Temperatura anelamento (°C)	Score máximo de anelamento	Observações
F1.1	CTACCCAATYCCYTCCAAC	19	52.6%	56.7	4	5' CTACCCAATYCCYTCCAAC 3' CAACCTYCCYTAACCCATC
F1.2	AACAARGCGGAACCAACG	18	52.8%	54.8	6	5' AACAARGCGGAACCAACG 3' GCAACCAAGGCGRAACAA
F1.3	AACCAACGCTKCRCGATG	18	55.6%	56.0	6	5' AACCAACGCTKCRCGATG 3' GTAGCRCKTCGCAACCAA
F2	GACARTCGRTACGATAAGC	19	47.4%	54.5	8	5' GACARTCGRTACGATAAGC 3' CGAATAGCATRGCTRACAG
F3	AATCATATTGCSGAYGAAGG	20	42.5%	54.2	8	5' AATCATATTGCSGAYGAAGG : : 3' GGAAGYAGSCGTTATACTAA
F-ASP1	CTAGGCATTTGTRTTTARAGC	21	38.1%	54.0	10	5' CTAGGCATTTGTRTTTARAGC 3' CGARATTTTRTGTTTACGGATC
F-ASP2	TGAGGGTTCAAGTATCCAC	19	47.4%	54.5	10	5' TGAGGGTTCAAGTATCCAC : : : : : 3' CACCTATGAACTGGGAGT
F-ASP3	AGGAATCCCATTTCATTGC	20	45%	55.3	10	5' AGGAATCCCATTTCATTGC 3' CGTTACCTTTACCCTAAGGA
F-ASP4	GGATGCGATGCGATCATTC	19	52.6%	56.7	11	5' GGATGCGATGCGATCATTC : : 3' CTTACTAGCGTAGCGTAGG
F-ASP5	GAKGTGATATCTTCACTTCC	20	42.5%	52.4	14	5' GAKGTGATATCTTCACTTCC : : 3' CCTTCACTTCTATAGTGKAG
F-ASP6	CGTYGAGCTTGAATCTGAG	19	50%	55.6	12	5' CGTYGAGCTTGAATCTGAG : : 3' GAGTCTAAGTTCGAGYTG
F-ASP7	GGAAGGGTATGATTCATCTG	20	45%	55.3	9	5' GGAAGGGTATGATTCATCTG : : 3' GTCTACTTAGTATGGGAAGG

Tabela 33 - *Primers* degenerados desenhados e sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

(continuação)

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Temperatura anelamento (°C)	Score máximo de anelamento	Observações
F-ASP8	CAACCCATTTCGCATTGGTG	19	52.6%	56.7	14	5' CAACCCATTTCGCATTGGTG ::: 3' GTGGTTACGCTTACCCAAC
R-ASP1	GACTATTGCTRCRAAGTC	19	47.4%	54.5	10	5' GACTATTGCTRCRAAGTC 3' CTGAARCGRTC GTTATCAG
R-ASP2.1	TGCYAGTGGATACTTGAACC	20	47.5%	56.3	8	5' TGCYAGTGGATACTTGAACC : : 3' CCAAGTTCATAGGTGAYCGT
R-ASP2.2	CCACTCATATTGKYAGTGG	19	50%	55.6	13	5' CCACTCATATTGKYAGTGG : : 3' GGTGAYCGTTATACTCACC
R-ASP3	TKCCMTTGTTCAGACGTCG	18	55.6%	56	16	5' TKCCMTTGTTCAGACGTCG 3' GCTGCAGACTGTTMCKKT
R-ASP4	TTCTAGGAGAGATGATCTC	20	45%	55.3	22	5' TTCTAGGAGAGATGATCTC : : 3' CTCTAGTAGAGAGGATCCTT
R-ASP5	GAYACTTTGGAGGAAACTGC	20	47.6%	56.3	14	5' GAYACTTTGGAGGAAACTGC ::: 3' CGTCAAAGGAGGTTTCAYAG
R-ASP6	CAGGCTCAGATTCAAGCTC	19	52.6%	56.7	10	5' CAGGCTCAGATTCAAGCTC 3' CTCGAACTTAGACTCGGAC
R-ASP7	CACCAATGCGAATGGGTTG	19	52.6%	56.7	8	5' CACCAATGCGAATGGGTTG 3' GTTGGGTAAGCGTAACCAC
R-ASP8	ATGGTGYCAATWAARAGCTTCC	22	40.9%	56.5	10	5' ATGGTGYCAATWAARAGCTTCC 3' CCTTCGARAAWTAACYGTGGTA
R1	TTAAGAATGGCATAAATCGTTG	22	31.8%	52.8	9	5' TTAAGAATGGCATAAATCGTTG : : : : 3' GTTGCTAAATACGGTAAGAATT
R2	GAAGYAGTACGATAAGATCAC	21	40.5%	54.9	10	5' GAAGYAGTACGATAAGATCAC 3' CACTAGAATAGCATGAYGAAG

Tabela 33 - *Primers* degenerados desenhados e sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Temperatura anelamento (°C)	Score máximo de anelamento	Observações					
R3.1	ATTCCACGTAATAGRCAWACC	21	40.5%	54.9	10	5' ATTCCACGTAATAGRCAWACC 3' CCAWACRGATAATGCACCTTA					
R3.2	CTAGWAGATTCACAATTCCAC	21	38.1%	54.0	10	5' CTAGWAGATTCACAATTCCAC 3' CACCTTAACACTTAGAWGATC					
M	R	W	S	Y	K	V	H	D	B	N	
AC	AG	AT	GC	CT	GT	AGC	ACT	AGT	GCT	AGCT	

(conclusão)

Pares de *primers forward* e *reverse* foram testados em reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação de diferentes regiões onde o gene da L-asparaginase se encontra no genoma do fungo *P. sizovae* (Tabela 35).

Tabela 35 - Pares de *primers* testados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

Primers		Amplicon
Forward	Reverse	(pb)
F1.2	RASP2.1	560
F2	R2	1709
FASP3	R2	863
FASP2	RASP6	939

Inicialmente as reações foram realizadas utilizando o kit de PCR do fabricante New England Labs para testar a amplificação das regiões e posteriormente foram confirmadas utilizando o kit de PCR do fabricante ThermoFisher com uma enzima de alta fidelidade para uma reação de volume final de 50 μ L (Tabela 36).

Tabela 36 - Preparo da reação de PCR segundo diferentes fabricantes para a amplificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

Reagentes	New England Labs	Thermo Fisher
Água livre de nuclease	38,75 μ L	18 μ L
Tampão Taq standard	1X (5 μ l)	-
2X Phusion Green Hot Start II High Fidelity Master Mix	-	1X (25 μ L)
dNTPs	200 μ M (1 μ L)	-
<i>Primer forward</i> (10 μ M)	0,2 μ M (1 μ L)	0,5 μ M (2 μ L)
<i>Primer reverse</i> (10 μ M)	0,2 μ M (1 μ L)	0,5 μ M (2 μ L)
DNA	3 μ L	3 μ L
<i>Taq</i> polimerase	1,25 U (0,25 μ L)	-

(-): não utilizado.

As temperaturas e tempos de cada etapa da PCR foram respeitadas conforme recomendado por cada fabricante, mantendo apenas a temperatura de anelamento dos *primers* e tempo de extensão em ambos os experimentos (Tabela 37).

Tabela 37 - Método da PCR segundo diferentes fabricantes para a amplificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

Etapa PCR	New England Labs		ThermoFisher	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	95	05:00	98	00:30
Desnaturação	95	00:30	98	00:10
Anelamento	52	00:30	52	00:30
Extensão	68	02:00	72	01:10
Entensão final	68	05:00	72	10:00

Após confirmação da amplificação dos primers testados, os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific). A solução tampão de ligação foi misturada a cada produto de PCR obtido na proporção 1:1. O volume total de cada amostra foi transferido para a coluna de purificação GeneJet e estas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Os filtrados foram descartados e 700 µL do tampão de lavagem foi adicionado às colunas. Estas foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições. Os filtrados foram descartados e as colunas foram centrifugadas por um minuto adicional nas mesmas condições. As colunas foram transferidas para novos tubos de centrífuga de 1,5 mL e 50 µL do tampão de eluição foram adicionados. As colunas foram centrifugadas por um minuto nas mesmas condições. Após eluição das amostras, estas foram armazenadas a -20°C e as colunas foram descartadas.

As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,2 % utilizando 5 µL de cada amostra e 2 µL de tampão de amostra. Para o sequenciamento das regiões amplificadas do genoma do fungo *P. sizovae* que compreendem o gene da L-asparaginase, 2 µL de cada *primer* utilizado (*forward* ou *reverse*) foram adicionados à 15 µL dos seus respectivos produtos de PCR purificados. Estes foram enviados para sequenciamento por serviço da empresa Eurofins Genomics através do kit Mix2Seq.

O sequenciamento de cada trecho dos produtos de PCR amplificados e purificados foram alinhadas por homologia às sequências da L-asparaginase identificadas segundo o genoma completo dos fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium steckii* pelo software ClustalX 2.1.

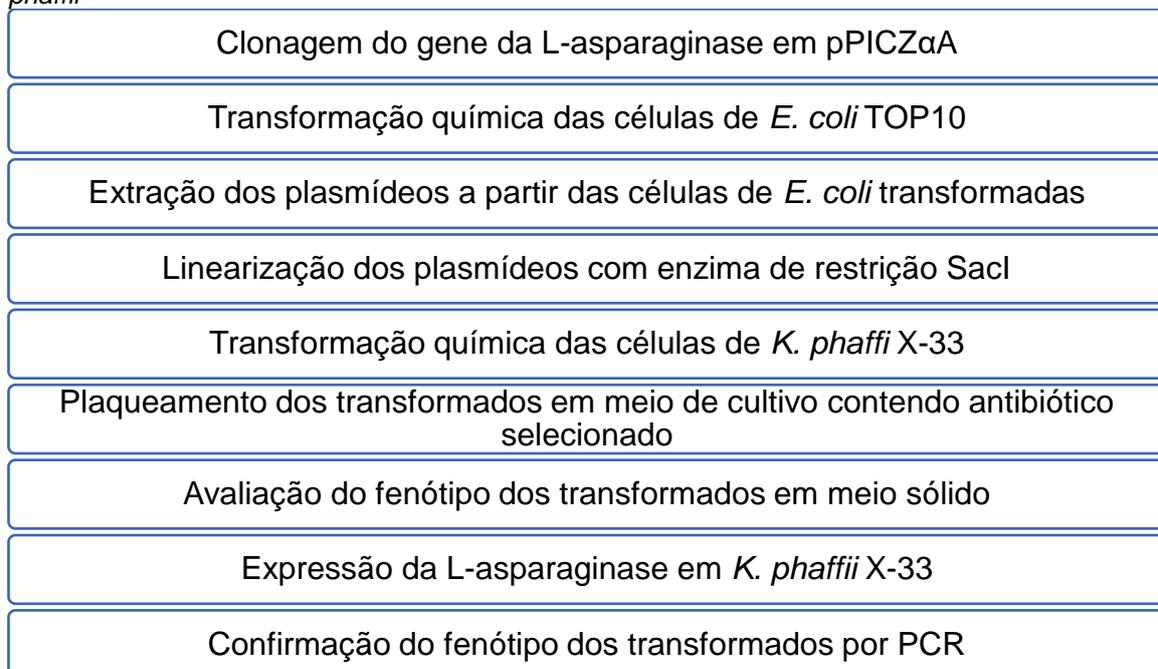
2.3. Tradução proteica da L-asparaginase de *P. sizovae*

As sequências de nucleotídeos dos genes nativo e parcial da L-asparaginase de *P. sizovae* foi traduzida em sua respectiva sequência de aminoácidos através da ferramenta online ExPASy Bioinformatics Resource Portal. O ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular da L-asparaginase de *P. sizovae* foram computados através da inserção das respectivas sequências proteicas na ferramenta “Compute pI/Mw tool” da plataforma online Swiss-Model ExPASy.

2.4. Clonagem do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

O processo experimental geral para a clonagem do gene da L-asparaginase de *P. sizovae* em *Komagataella phaffii* foi realizado de acordo com o EasySelect™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) para expressão de proteínas recombinantes usando pPICZ e pPICZα em *Pichia pastoris* e as etapas estão delineadas na Figura 21. O kit de expressão Invitrogen usa *K. phaffii* X-33 (AW, 2012; MATTANOVICH, 2021; STURMBERGER; CHAPPELL; GEIER; KRAINER *et al.*, 2016).

Figura 21 - Diagrama das etapas da expressão heteróloga da L-asparaginase de *P. sizovae* em *K. phaffii*



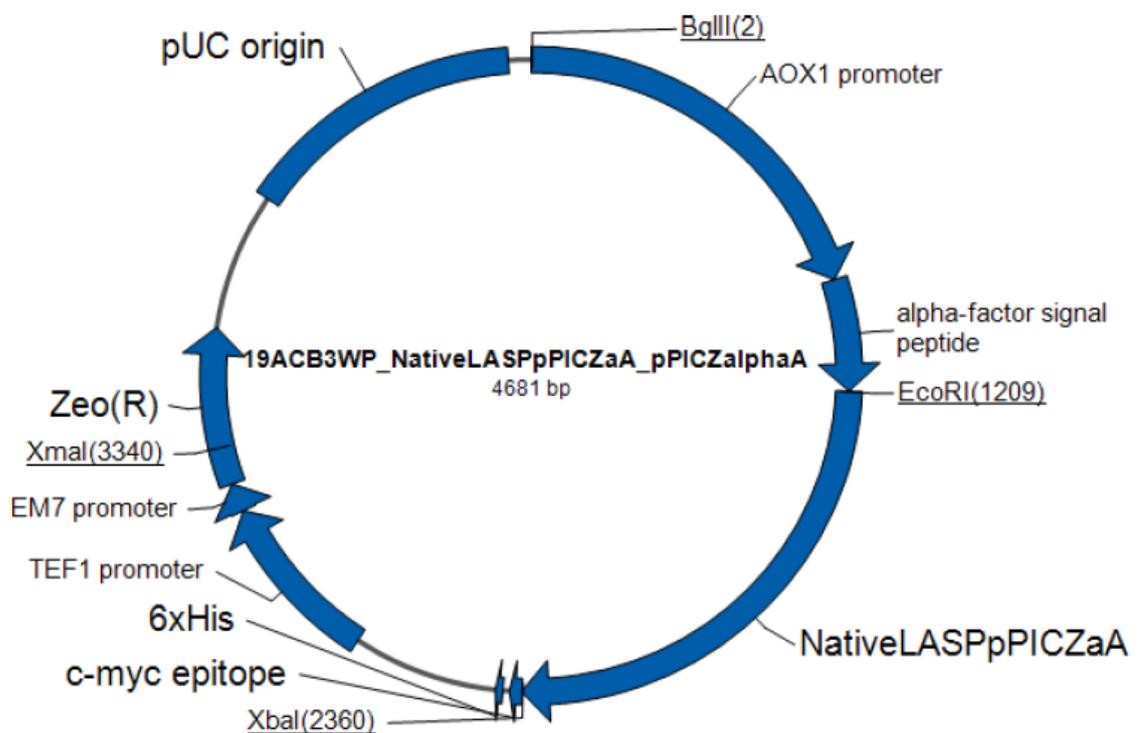
Após a identificação do gene da L-asparaginase do fungo *P. sizovae*, foi encomendada, por serviço da Invitrogen, a construção do vetor pPICZ α A contendo o gene nativo da L-asparaginase de *P. sizovae* – nomeado NATIVE L-ASP pPICZ α A - sem os códons de iniciação e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' antes do sítio de restrição XbaI para tornar a sequência de proteína em *frame* com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZ α A (1.143 bases). Foi solicitada a adição dos sítios de restrição EcoRI na terminação 5' e XbaI na terminação 3' (Figura 22).

Figura 22 - Sequência da construção do vetor pPICZαA (1.143 bases) contendo: mRNA 5'AOX1 (azul claro); sítio de ligação 5'AOX1 (rosa); sequência do sinal fator α (amarelo); sítio de restrição EcoRI (cinza); o gene parcial da L-asparaginase de *P. sizovae* – nomeado NATIVE L-ASP pPICZαA - sem os primeiros 20 códons (códon de iniciação e 19 códons referentes à sinalização de membrana) e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' para tornar a sequência de proteína em *frame* com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZαA (verde); sítio de restrição Xba I (cinza); epítipo c-myc (roxo); cauda polihistidina (vermelho); sítio de ligação 3'AOX1 (azul escuro)

1 AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTC
71 ACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACC GTTGCAAACGCAGGACCTCCAC
141 TCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCG
211 CTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACCCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTG
281 GCGAGGTTTCATGTTTGTATTATTCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGA
351 GGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCAAAACCTGACAGTTTAAACGCT
421 GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCT
491 AACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAAACTTCAAAAAGTCGGCATACCGTTGTCTTGTGGTATTGATTGAC
561 GAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGCTTCTGAACCCGGTGCACCTG
631 TGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCC
701 AAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACT
771 TGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT
841 ACTTTCATAATTCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTTGATTTAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGA
911 AGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAG
981 CATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGC
1051 TGTCATCGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT
1121 AACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGA
1191 AAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGTGTCAATTAAGAGCTTCTCGTAGCGTTGGCTACTTTTGCTTGCA
1261 GAGTTCGGCTTCGCCCCGTGTATGGCCGTGGAACCAATGGCACAGGTTTTGTTTTACCAATGCGAAT
1331 GGTCTGAATTTACCCAGATGAATCATACCCTTCTTAATATAACCATTTTTGCTACAGGAGGAACAATTG
1401 CAGGCTCAGATTCAAGCTCAACGGCAACGACAGGCTACACTTCTGGAGCGGTTGGCGTTCTGTCTAAT
1471 CGATGCCGTTCCATCCATGCTCGATATTGCAAATGTCGCGGGTGTCCAGACAGCAAATGTTGGAAGTGAA
1541 GATATCACATCTGACATCTTAATTTCACTATCAAAGCAGATCAACAAGTTTGTCTGCGACGATCCAACCA
1611 TGGCTGGGGCTGTTGTTACTCATGGAACCGATACTTTGGAGGAAACTGCTTTTTTCTTGCAGCTACGAT
1681 CAATTGTGGTAAACCCGTCATCATTGTTGGCGCCATGCGTCCTTCAACCGCCATCTCAGCTGATGGACCC
1751 TTCAATCTCCTTGAATCCGTTACCGTCGCAGCATCTCCGAAGGCTAAGAACC GCGGTGCCATGATTGTCA
1821 TGAATGATCGCATCGCATCCGCTTACTACACGACCAAGACCAACGCAACACCATGGATACGTTCAAAGC
1891 AATGGAAATGGGATACTTAGGAGAAATGATCTCTAATACCCATTCTTTTTCTACCCCCCGTACAGCCG
1961 ACGGGAAAGAAGGACTTCAACATTGCCAACGTCACGGAAATTCGAGAGTTGATATTCTTCTCTTATG
2031 AGGATATGCATAATGACACCTTGTACAATGCCATCGAAAGTGGCGCAAAGGGCATCGTGATTGCAGGGGC
2101 TGGGGCCGAGGAGTCAACAAGTCATTCAACTATGCCATTGAAGACGCTATCAATCGCCTCGGAATCCCA
2171 ATAATCAAAGTATGCGTACGGTCAATGGTGAAGTGCCATTGTCTAGACGTCGAAAGCACCAGTGCCACTC
2241 ATATTGCCAGTGGATACTTGAACCCTCAAAAATCCCGTATATTACTGGGACTATTGCTAGCGAAGTCGAG
2311 CAACATCACTGAGATTGCTTCAACCTTTTCTTAAATACAAATGCCCTA TCTAGAACA AAAACTCATCTCA
sítio de restrição Xba I

gene no vetor de expressão. A cauda do epítipo *myc* do terminal C (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) permite a detecção da proteína de fusão pelo anticorpo Anti-*myc* ou anticorpo Anti-*myc*-HRP. A cauda de poli-histidina C-terminal permite a purificação da proteína de fusão recombinante em resina quelante de metal. A terminação da transcrição AOX1 (TT) é o sinal de terminação da transcrição nativa e de poliadenilação do gene AOX1 (~260 pb) que permite o processamento eficiente de mRNA de 3', incluindo poliadenilação, para maior estabilidade do mRNA. Promotor do gene fator de alongamento da transcrição 1 (TEF1) de *Saccharomyces cerevisiae* impulsiona a expressão do gene *Shle* em *K. phaffii*, conferindo resistência a Zeocina™. O promotor procariótico sintético constitutivo (EM7) impulsiona a expressão do gene *Shle* em *E. coli*, conferindo resistência a Zeocina™. O gene *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* é o gene de resistência a Zeocina™. A extremidade 3' do gene *CYC1* de *Saccharomyces cerevisiae* permite processamento eficiente de mRNA 3' do gene *Shle* para maior estabilidade. A origem pUC permite a replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli* (Figura 23).

Figura 23 - Mapa do plasmídeo pPICZαA construído contendo a sequência de L-asparaginase nativa de *P. sizovae*



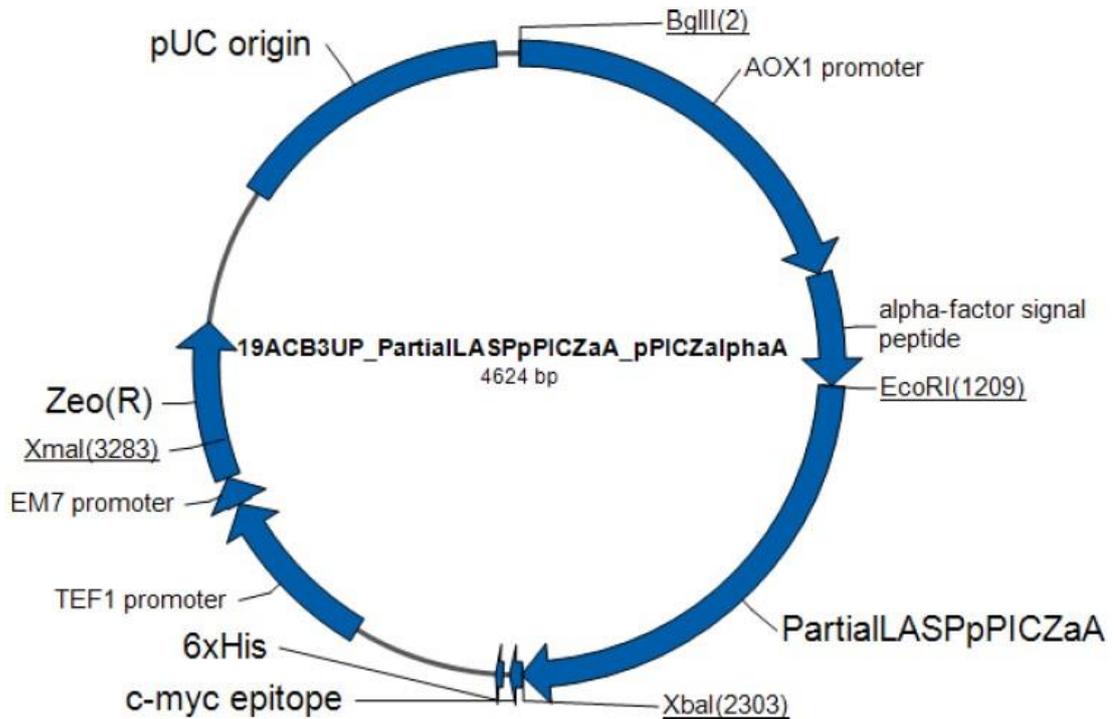
Adicionalmente, foi solicitada a construção do vetor pPICZ α A contendo o gene parcial da L-asparaginase de *P. sizovae* – nomeado PARTIAL L-ASP pPICZ α A - sem os primeiros 20 códons (códon de iniciação e 19 códons referentes à sinalização de membrana) e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' antes do sítio de restrição XbaI para tornar a sequência de proteína em *frame* com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZ α A (1,086 bases). Foi solicitada a adição dos sítios de restrição EcoRI na terminação 5' e XbaI na terminação 3' (Figura 24, Figura 25).

Figura 24 - Sequência da construção do vetor pPICZαA (1.086 bases) contendo: mRNA 5'AOX1 (azul claro); sítio de ligação 5'AOX1 (rosa); sequência do sinal fator α (amarelo); sítio de restrição EcoRI (cinza); o gene parcial da L-asparaginase de *P. sizovae* – nomeado PARTIAL L-ASP pPICZαA - sem os primeiros 20 códons (códon de iniciação e 19 códons referentes à sinalização de membrana) e de terminação, sem os íntrons, com adição das bases 'TA' para tornar a sequência de proteína em frame com a cauda de histidina quando usando o vetor de expressão pPICZαA (verde); sítio de restrição Xba I (cinza); epítipo c-myc (roxo); cauda polihistidina (vermelho); sítio de ligação 3'AOX1 (azul escuro)

1 AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGTCCATTCTC
71 ACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCAC
141 TCCTCTTCTCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCG
211 CTCATTCCAATTCTTCTATTAGGCTACTAACCCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTG
281 GCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGA
351 GGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACACTGACAGTTTAAACGCT
421 GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCT
491 AACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGAC
561 GAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTCTATCGTTTGAACCCGGTGCACCTG
631 TGCCGAAACGCAAATGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCC
701 AAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACT
771 TGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT
841 ACTTTCATAATTGC **GACTGGTTCCAATTGACAAGC** TTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAACCTTGAGA
911 AGATCAAAAAACAACCTAATTATTCGAAACG**ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGAG**
981 **CATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAATTCGGCTGAAGC**
1051 **TGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAAT**
1121 **AACGGGTTATTGTTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGA**
1191 **AAAGAGAGGCTGAAGCT** **GAATTC** **TCGCCCCGCTGTATGGCCGTGGAACCAATGGCACAGGGTTTGT**
1261 **CACCAATGCGAATGGTCTGAATTTACCCAGATGAATCATACCCTTCTAATATAACCATTTTTGCTACA**
1331 **GGAGGAACAATTGCAGGCTCAGATTCAAGCTCAACGGCAACGACAGGCTACACTTCTGGAGCGGTTGGCG**
1401 **TTCTGCTCTAATCGATGCCGTTCCATCCATGCTCGATATTGCAAATGTCGCGGGTGTCCAGACAGCAA**
1471 **TGTTGGAAGTGAAGATATCACATCTGACATCTTAATTTCACTATCAAAGCAGATCAACAAGTTTGTCTGC**
1541 **GACGATCCAACCATGGCTGGGGCTGTTGTTACTCATGGAACCGATACTTTGGAGGAAACTGCTTTTTTCC**
1611 **TTGACGCTACGATCAATTGTGGTAAACCCGTCATATTGTTGGCGCCATGCGTCCTTCAACCGCCATCTC**
1681 **AGCTGATGGACCCTTCAATCTCCTTGAATCCGTTACCGTCGCAGCATCTCCGAAGGCTAAGAACC**
1751 **GCCATGATTGTCATGAATGATCGCATCGCATCCGCTTACTACACGACCAAGACCAACGCCAACCCATGG**
1821 **ATACGTTCAAAGCAATGGAAATGGGATACTTAGGAGAAATGATCTCTAATACCCATTCTTTTTCTACCC**
1891 **CCCCGTACAGCCGACGGGAAAGAAGGACTTCAACATTGCCAACGTCACGGAAATTCGAGAGTTGATATT**
1961 **CTCTTCTTATGAGGATATGCATAATGACACCTTGTACAATGCCATCGAAAGTGGCGCAAAGGGCATCG**
2031 **TGATTGCAGGGGCTGGGGCCGAGGAGTCAACGTCATTCAACTATGCCATTGAAGACGCTATCAATCG**
2101 **CCTCGGAATCCCAATAATTCAAAGTATGCGTACGGTCAATGGTGAAGTGCCATTGTCAGACGTCGAAAGC**
2171 **ACCAGTGCCACTCATATTGCCAGTGGATACTTGAACCCTCAAAAATCCCGTATATTACTGGGACTATTGC**
2241 **TAGCGAAGTCGAGCAACATCACTGAGATTGCTTCAACCTTTTCTCTTAATACAAATGCC** **TA** **TCTAGAACA**
2311 **AAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCT** **G** **AATAGCGCCGTCGAC** **CATCATCATCATCATCA** **T** **TGAGTTTGTAGC**
epítipo c-myc cauda polihistidina

2381 CTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCA
 2451 AGA**GGATGTCAGAATGCCATTTGC**CTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCT
 2521 ATATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATCTCG
 2591 CAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTCC
 2661 CACTCCTCTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTT
 2731 CAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAA
 2801 AACACCCAAGCACAGCATACTAAATTTTCCCTCTTCTTCTCTAGGGTGTGCTTAATTACCCGTAATAA
 2871 AGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCTCGTTTCTTTTTCTTCTGCGAAAAAGGCAATAAAAAATTTTAA
 2941 TCACGTTTCTTTTTCTTGAAATTTTTTTTTTAGTTTTTTTCTTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAA
 3011 GTTAATAAACGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATTACAACCTTTTTTACT
 3081 TCTTGTTCAATAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATA
 3151 GTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCG
 3221 GTGCTCACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACT
 3291 TCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCA
 3361 GGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCCG
 3431 GAGGTCGTGCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGG
 3501 GGCGGGAGTTGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACA
 3571 CGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTGATATCATGTA
 3641 ATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCCCCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGA
 3711 CAACCTGAAGTCTAGGTCCTATTTATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATATTTT
 3781 AAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAA
 3851 GGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAG
 3921 GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCCTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
 3991 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGG
 4061 AAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCG
 4131 GGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGC
 4201 TGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC
 4271 CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTAT
 4341 GTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTA
 4411 TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC
 4481 CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT
 4551 CCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA
 4621 GATC

Figura 25 - Mapa do plasmídeo pPICZ α A construído contendo a sequência de L-asparaginase parcial de *P. sizovae*



2.4.1. Transformação das células de *E. coli* TOP10

As células de *E. coli* TOP10 quimicamente competentes foram transformadas segundo o manual do fabricante One Shot TOP10 (Invitrogen, Califórnia - EUA). Três microtubos contendo as células *E. coli* TOP10 quimicamente competentes foram descongeladas em banho de gelo. Os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A (5 μ g) e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (5 μ g) foram solubilizados em água livre de nuclease (5 μ L), obtendo concentração final de 1 μ g/ μ L. A partir desta solução, foi feita uma diluição 1:1000 obtendo a concentração final de 1 ng/ μ L. A partir desta solução, 1 ng de cada plasmídeo (1 μ L) foi adicionado em um microtubo contendo as células de *E. coli* quimicamente competentes. Para o controle pUC19, 10 pg do DNA foi adicionado em um microtubo contendo as células de *E. coli* quimicamente competentes. Os microtubos foram levemente agitados para homogeneizar a mistura e posteriormente incubados em gelo por 30 minutos. As células foram incubadas em banho-maria a 42°C por 30 segundos e em seguida incubadas em gelo por 2 minutos. 250 μ L de meio de cultivo S.O.C. foi adicionado em cada microtubo e estes foram incubados a 37°C por uma hora a 225 rpm. Alíquotas de 20 e 200 μ L da transformação dos

plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A foram adicionadas em placas de Petri contendo ágar Luria-Bertani (LB) com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL), previamente aquecidos a 37°C. Para o controle pUC19, o mix de transformação foi diluído 1:10 em meio de cultivo LB e alíquotas de 25 e 100 μ L foram adicionadas em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL), previamente aquecidos a 37°C. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C *overnight*.

Cinco unidades formadoras de colônias (UFCs) das placas de Petri incubadas com 20 μ L de células contendo os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A (N₁, N₂, N₃, N₄ e N₅) e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (P₁, P₂, P₃, P₄ e P₅) foram selecionadas e inoculadas, separadamente, em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultivo LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL). As células foram incubadas a 37°C *overnight* a 212 rpm.

Duas dentre as cinco UFCs de NATIVE L-ASP pPICZ α A (N₁ e N₅) e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (P₁ e P₅) foram selecionadas para a realização dos próximos experimentos após atingirem densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de aproximadamente 1,9. Estoques de 850 μ L das células cultivadas foram homogeneizadas com 150 μ L de glicerol em criotubos e congelados em freezer a -80°C.

Uma reação de PCR dos plasmídeos extraídos utilizando os primers 5'AOX1 e 3'AOX1 foi realizada para confirmar a presença do DNA nos plasmídeos. A reação de PCR foi realizada segundo o manual do fabricante para Phusion Green Hot Start II High Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific) e os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific) conforme descrito anteriormente. Os produtos de PCR purificados foram quantificados em Nanodrop, diluídos a uma concentração final de 10 ng/ μ L e enviados para sequenciamento. Um gel de agarose 1,2 % foi preparado para confirmar a presença dos pDNAs extraídos das células de *E. coli* transformadas e dos produtos de PCR purificados da reação dos plasmídeos extraídos utilizando os primers 5'AOX1 e 3'AOX1.

2.4.2. Extração dos plasmídeos a partir das células de *E. coli* transformadas

A extração dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A a partir das células transformadas de *E. coli* TOP10 foi realizada segundo o manual do fabricante Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen Strasse, Alemanha).

O cultivo bacteriano de *E. coli* contendo cada um dos plasmídeos foi realizado crescendo os transformados em placas de Petri contendo meio de cultivo LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL) por aproximadamente 20 horas de incubação a 37°C.

Uma UFC de *E. coli* contendo cada um dos plasmídeos (N₁ e P₁) foi inoculada em tubo de centrífuga de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultivo LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL) e incubado a 37°C por aproximadamente 8 horas em agitação constante a 300 rpm. O cultivo inicial foi diluído 1:1.000 (500 μ L) em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio de cultivo LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL) e incubado a 37°C por aproximadamente 16 horas em agitação constante a 275 rpm.

Após atingirem OD₆₀₀ de 1,825 e 1,844 para N₁ e P₁, respectivamente, cada um dos cultivos bacterianos de *E. coli* foi dividido em dois frascos de centrífuga de fundo chato de 250 mL, cada, e estes foram centrifugados a 6.000 x g em ultracentrífuga (Sorvall RC-6 Plus, Osterode - Alemanha) por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Cada *pellet* de células dividido em dois frascos de centrífuga foi ressuscitado em 5 mL de solução tampão P1 e as células foram reunidas novamente. Uma alíquota de 10 mL de solução tampão de lise P2 foi adicionada e homogeneizada por inversão do tubo 6 vezes e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma alíquota de 10 mL de solução tampão P3 pré-resfriada a 4°C foi adicionada e homogeneizada por inversão do tubo 6 vezes e incubado em gelo por 20 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 x g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de policarbonato e centrifugados a 20.000 x g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes contendo os pDNAs foram aplicados às colunas Qiagen-tip pré-equilibradas com 10 mL de solução tampão QBT. As colunas Qiagen-tip foram lavadas duas vezes com 30 mL de solução tampão QC. Os pDNAs foram eluídos das colunas com 15 mL de solução tampão QF em tubos de centrífuga de 50 mL. Os pDNAs foram precipitados com 10,5 mL de isopropanol e centrifugados a 3.745 x g por uma hora a 4°C. Os pDNAs foram lavados com etanol

70 % e centrifugados novamente a 3.745 x g por uma hora a 4°C. Os pellets de pDNAs foram secados a temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente a 37°C para evaporação de solvente residual. Os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA foram ressuspensos em 50 µL e 100 µL de água livre de nuclease, respectivamente, e quantificados em Nanodrop. Os pDNAs foram enviados para sequenciamento para confirmar a sequência genética.

Suspensões dos pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA foram preparadas na concentração de trabalho de 1 µg/µL e congelados a -20°C.

2.4.3. Linearização dos plasmídeos

A linearização dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA foi realizada com as enzimas de restrição EcoRI (Thermo Scientific), XbaI (Thermo Scientific), EcoRI/XbaI e SacI (Invitrogen ThermoFisher Scientific) segundo a Tabela 38.

Tabela 38 - Protocolo de digestão dos pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI, EcoRI/XbaI e SacI

Reagente	EcoRI	XbaI	EcoRI/XbaI	SacI	SacI
Água livre de nuclease	16 µL	16 µL	15 µL	16 µL	80 µL
Tampão	2 µL 1X EcoRI	2 µL 1X Tango	2 µL 1X Tango	2 µL 10X Anza	10 µL 10X Anza
pDNA (1 µg/µL)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	5 µL
Enzima(s)	1 µL	1 µL	1 µL cada	1 µL	5 µL
Volume total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	100 µL

Para a reação de digestão com as enzimas EcoRI e XbaI, as misturas foram incubadas a 37°C por 2 horas e posteriormente incubadas a 65°C por 20 minutos para inativação das enzimas. Para a reação de digestão com a enzima SacI, a mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e posteriormente incubada a 80°C por 20 minutos para inativação da enzima. Após confirmação da linearização dos pDNAs, o processo de digestão com SacI foi escalonado em 5 vezes, para linearizar 5 µg de cada pDNA.

Para a confirmação da linearização dos plasmídeos, uma alíquota de 5 μL de cada reação de digestão foi homogeneizada com 1 μL de 6X TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Vilnius - Lithuania) e aplicada em gel de agarose 1 % (0,5 g) contendo 5 μL do corante SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, California – EUA) em TAE 1X (50 mL). A eletroforese foi conduzida a 100 V, 200 mA, por 45 minutos.

2.4.4. Transformação das células de *K. phaffii*

A transformação das células de *K. phaffii* foi realizada segundo o manual do fabricante *Pichia EasyComp Kit Transformation kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad - California). O kit *Pichia EasyComp* produz células de *K. phaffii* quimicamente competentes.

A linhagem selvagem de *K. phaffii* X33 foi inoculada em uma placa de Petri contendo ágar extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) e incubada a 30°C por 2 dias. Uma UFC de *K. phaffii* X-33 foi inoculada em 10 mL de meio de cultivo YPD e incubada a 30°C em agitação constante de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. As células foram diluídas a fim de obter OD₆₀₀ de 0,1 em 10 mL de YPD. As células foram incubadas a 30°C em agitação constante de 250 rpm por aproximadamente 4 horas. As células foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos a 5°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 10 mL da solução I. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL da solução I e alíquotas de 100 μL foram transferidas para tubos de centrífuga de 1,5 mL. As células competentes foram congeladas a -80°C.

Os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A linearizados (100 μL) foram precipitados com 10 μL de acetato de sódio 3M e 250 μL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e incubada a -80°C por uma hora. Os pDNAs foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os pDNAs foram lavados com etanol 70 %. As amostras foram novamente centrifugadas e mantidas em cabine de fluxo laminar para evaporação do solvente residual. Os pDNAs foram suspensos em 5 μL de água livre de nuclease (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A transformação das células de *K. phaffii* X-33 competentes foi realizada tanto com as células descongeladas, previamente armazenadas em freezer -80°C, quanto com células frescas, recém competentes. Alíquotas de 50 μL das células de *K. phaffii*

X-33 foram transferidas para tubos de centrifuga de 1,5 mL. Os 5 µL de cada pDNA linearizado e precipitado (NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA) foi homogeneizado às células. 1 mL da solução II foi adicionada à mistura de células e pDNA e a reação de transformação foi incubada por 1 hora a 30°C com homogeneização dos tubos a cada 15 minutos. As células receberam tratamento de choque térmico em placa de aquecimento a 42°C por 10 minutos. As células contendo cada um dos pDNAs foram divididas em dois tubos de 1,5 mL (525 µL cada) e 1 mL de meio de cultivo YPD foi adicionado em cada tubo. As células foram incubadas a 30°C por 1 hora para permitir a expressão de resistência a Zeocina. As células foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuscitado em 500 µL da solução III e as células contendo o mesmo pDNA foram reunidas em um só microtubo. As células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. As células foram ressuscitadas em 100 µL da solução III e toda a transformação foi transferida para placas de Petri contendo YPDS suplementado com Zeocina. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 10 dias.

2.5. Avaliação do fenótipo dos transformados em meio sólido

Após crescimento das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas resistentes a Zeocina, 8 a 10 UFCs de cada um dos clones contendo os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA foram selecionados e transferidos para novas placas de Petri contendo ágar YPD para isolar os transformados resistentes à Zeocina. As colônias selecionadas também foram riscadas em placas de Petri contendo ágar MMH e MDH para a confirmação do fenótipo Mut⁺ ou Mut^s. As linhagens de *K. phaffii* GS115/HSA e GS115/pPICZ/*lacZ* foram utilizadas como controle para diferenciação dos fenótipos Mut^s e Mut⁺, respectivamente. As placas de Petri foram incubadas a 30°C por 2 dias e registros fotográficos foram tomados.

2.6. Expressão de L-asparaginase em *K. phaffii* X-33 recombinante

Os clones de *K. phaffii* X-33 contendo os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA – Nc1, Nc10, Nf5 e Nf7 - e PARTIAL L-ASP pPICZαA – Pc2, Pc3, Pf6 e Pf10 - foram selecionados para a expressão da enzima em meio líquido.

Uma triagem inicial foi conduzida para avaliar 3 meios de cultivo utilizados para crescimento celular – MGY, BMGH, BMGY - seguidos de 3 meios de cultivo de indução da expressão – MM, BMM e BMMY, respectivamente, frente a expressão de L-asparaginase.

Os organismos em questão, crescido em placas de Petri contendo ágar YPD, foram inoculados em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo MGY, BMG, BMGY a 30°C e 275 rpm. Após aproximadamente 40 horas de incubação nos meios de cultivo MGY ($OD_{600} \sim 5-6$), BMG ($OD_{600} \sim 12-13$) e BMGY ($6 < OD_{600} < 15$), as culturas foram centrifugadas entre 1.500 a 3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 25 mL de meio de cultivo MM, BMM e BMMY, respectivamente, em frascos Erlenmeyer de 250 mL previamente autoclavados para indução da expressão. Metanol 100 % foi adicionado a uma concentração final de 0,5 % a cada 24 horas para manter a indução. Alíquotas de 1 mL do cultivo de expressão foram transferidas para tubos de centrífuga de 1,5 mL após 6, 24, 48 e 72 horas. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL para avaliação da expressão secretada da enzima no meio de cultivo enquanto o *pellet* de células foi utilizado para avaliação da expressão intracelular da enzima. Os tubos contendo apenas as células de *K. phaffii* foram pesados para quantificar a biomassa produzida ao longo do tempo. Ambos os tipos de amostra foram armazenados a -80°C até a realização dos ensaios. A atividade de L-asparaginase foi quantificada nos meios intracelular (células) e extracelular (meio de cultivo), enquanto a quantificação de proteínas totais e visualização de proteínas secretadas por SDS-PAGE foi avaliada apenas no meio extracelular.

2.6.1. Quantificação da atividade de L-asparaginase nos clones

A atividade de L-asparaginase pode ser determinada pela quantificação do β -hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminólise efetuada também pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina. A quantificação de L-asparaginase foi determinada nas células e no meio de cultivo pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA) descrito por Drainas et al. (1977) (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977) com modificações, de acordo com a Tabela 39.

Tabela 39 - Preparo do ensaio da quantificação da atividade de L-asparaginase em células e no meio de cultivo dos clones de *K. phaffii* X-33

Reagentes	Ensaio com células	Ensaio com meio de cultivo	Concentração final
Volume de amostra	Células obtidas em 1 mL de cultivo	80 µL de meio de cultivo	-
Tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6	750 µL	80 µL	37,5 mM
L-asparagina 100 mM	100 µL	20 µL	10 mM
Hidroxilamina 1 M pH 7	100 µL	20 µL	100 mM
Solução de cloreto férrico/TCA/HCl	250 µL	50 µL	-
Volume final	1,250 mL	250 µL	-

Após 30 minutos de incubação das amostras a 37°C em banho-maria, a solução de cloreto férrico/TCA/HCl foi adicionada sobre as amostras e estas foram então centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante (200 µL) foi transferido para microplaca de 96 poços e a absorbância foi mensurada a 500 nm em leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek Instruments, Vermont - EUA). Os resultados obtidos foram apresentados na forma de média aritmética da triplicata das amostras com os respectivos desvios padrão.

2.6.2. Quantificação de proteínas totais no meio extracelular

A quantificação de proteínas totais nas amostras dos clones de *K. phaffii* X-33 contendo o gene da L-asparaginase PARTIAL L-ASP pPICZαA cultivados nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY foi avaliada pela formulação baseada em ácido bicinconínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação da proteína total utilizando o kit Pierce BCA (Thermo Scientific). Este método combina a redução de Cu⁺² a Cu⁺¹ pela proteína em um meio alcalino com a detecção colorimétrica do cátion cuproso (Cu⁺¹) usando um reagente contendo um sal de sódio, BCA (SMITH; KROHN; HERMANSON; MALLIA *et al.*, 1985). 200 µL de reagente preparado a fresco foram adicionados a alíquotas de 25 µL do sobrenadante dos meios de cultivo, em triplicata, em uma microplaca de 96 poços e incubados a 37°C por 30 minutos. O produto de

reação de cor púrpura deste ensaio é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso, o qual possui absorvância em 562 nm. As proteínas totais (mg/mL) foram quantificadas segundo a equação da reta construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão em diferentes concentrações (0; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500 e 2000 µg/mL) (THERMOSCIENTIFIC).

2.6.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

As proteínas secretadas no meio extracelular pelos clones de *K. phaffii* X-33 P=6 - cultivado no meio de cultivo BMMY após 6 h, 24 h, 48 h e 72 h de indução - e P=10 - cultivado em meio de cultivo BMMY após 72 h de indução - foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970) (LAEMMLI, 1970). Géis de poliacrilamida foram formados por copolimerização de acrilamida e bis-acrilamida na presença de persulfato de amônio (APS) e tetrametiletilenodiamina (Temed). O gel concentrador foi preparado a 5 % (v/v).

Alíquotas de 50 µL do meio extracelular foram homogeneizadas à igual volume (50 µL) de tampão de amostra de Laemmli 2x (Bio-Rad Laboratories, Califórnia – EUA, Tris-HCl 65,8 mM pH 6,8; glicerol 26,3 % (m/v); SDS 2,1 %; azul de bromofenol 0,01 %) contendo β-mercaptanol 5 % e fervidas a 95°C por 10 minutos para desnaturação das proteínas presentes na amostra. Uma alíquota de 20 µL das amostras foi aplicada sobre o gel concentrador. A eletroforese foi conduzida em sistema cuba vertical (Bio-Rad Laboratories, PowerPac300, Califórnia - EUA) com tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % (v/v)) com voltagem ajustada em 120 V. O kit Precision Plus Protein Standards dual color 10–250 kD (Bio-Rad Laboratories, Califórnia - EUA) foi utilizado como marcador de massa molecular.

2.6.4. Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata

Ao final da corrida da amostra no gel de eletroforese, as bandas proteicas foram coradas segundo Blum et al. (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) usando o Kit PlusOne Silver Staining (GE Healthcare). Primeiramente, o gel foi incubado em solução fixadora por 24 horas. Em seguida, este foi incubado sob agitação em solução sensibilizadora por uma hora. Após 4 lavagens com água destilada por 15 minutos,

cada, o gel foi incubado sob agitação na solução de nitrato de prata por uma hora. Após 2 lavagens com água destilada por 1 minuto, cada, o gel foi incubado em solução reveladora até aparecimento das bandas e a reação foi interrompida quando este foi transferido para a solução de parada.

2.7. Avaliação da interferência dos meios de cultivo na quantificação da atividade de L-asparaginase e proteínas totais

Um ensaio enzimático foi realizado para verificar a interferência dos meios de expressão utilizados no cultivo dos clones de *K. phaffii* X-33 frente a quantificação da atividade de L-asparaginase utilizando o método do ácido L-aspartil- β -hidroxamato. Para isto, os três meios de cultivo de expressão utilizados – MM, BMM e BMMY – foram avaliados anterior e posterior ao cultivo com as células de *K. phaffii* X-33 através da adição da mesma quantidade de enzima em todas as amostras. A enzima nativa do extrato bruto do fungo *P. sizovae* em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 foi utilizada nas amostras e como controle positivo do experimento (Tabela 40).

Tabela 40 - Preparo do ensaio da quantificação de L-asparaginase frente aos meios de cultivo utilizados no cultivo de *K. phaffii* X-33

Reagentes	Controle positivo	Meio de cultivo novo	Meio de cultivo pós-cultivo
Tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6	150 μ L	70 μ L	70 μ L
Extrato bruto contendo enzima nativa	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Meio de cultivo MM, BMM ou BMMY	-	80 μ L	80 μ L
L-asparagina 100 mM	20 μ L	20 μ L	20 μ L
Hidroxilamina 1 M pH 7	20 μ L	20 μ L	20 μ L
Solução de cloreto férrico/TCA/HCl	50 μ L	50 μ L	50 μ L

O ensaio enzimático foi conduzido conforme o item 2.6.1. Quantificação da atividade de L-Asparaginase nos clones para ensaio com meio de cultivo segundo a Tabela 39. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de média aritmética da triplicata das amostras com os respectivos desvios padrão.

Adicionalmente, o ensaio da quantificação de proteínas totais foi realizado para verificar a interferência dos meios de cultivo utilizados no cultivo do clone de *K. phaffii*

X-33 frente a quantificação de proteínas totais utilizando o método BCA. Para isto, uma alíquota (25 µL) dos três meios de cultivo de expressão utilizados – MM, BMM e BMMY – foram avaliados anterior e posterior ao cultivo com as células de *K. phaffii* X-33. O ensaio foi conduzido conforme o item 2.6.2. Quantificação de proteínas totais no meio extracelular.

2.8. Confirmação do fenótipo dos transformados por PCR

A confirmação da presença do gene da L-asparaginase e do fenótipo dos transformados foi realizada através da triagem direta por PCR dos clones de *K. phaffii* utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 e os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo da presença de gDNA extraído. Após o crescimento das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas resistentes a Zeocina, estas foram repicadas em novas placas de Petri contendo ágar YPD suplementado com Zeocina para isolamento dos clones. Após o crescimento das colônias de clones de *K. phaffii* X-33 isoladas, uma UFC foi transferida com auxílio de um palito de dente previamente autoclavado para um microtubo de centrífuga de 1,5 mL contendo 10 µL de solução de hidróxido de sódio 0,02 M. A mistura foi homogeneizada e aquecida a 99°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras de DNA foram centrifugadas a 12.000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota do sobrenadante obtido foi utilizada na reação de PCR conforme descrito na Tabela 41 para um volume final de reação de 20 µL.

Tabela 41 - PCR de colônia como triagem direta do fenótipo dos clones de *K. phaffii*

Reagente	Concentração (Volume)
Água livre de nuclease	7 µL
2X Phusion Green Hot Start II High Fidelity Master Mix	1X (10 µL)
<i>Forward primer</i>	0,5 µM (1 µL)
<i>Reverse primer</i>	0,5 µM (1 µL)
gDNA	1 µL

Gel de agarose 0,8 % foi preparado para a visualização das amostras de DNA utilizando o corante SYBR safe (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA).

2.9. Projeção da estrutura molecular da L-asparaginase de *P. sizovae*

As sequências proteicas das duas isoformas da L-asparaginase de *P. sizovae* – nativa e parcial - foram projetadas em suas estruturas moleculares tri-dimensionais através da ferramenta online Swiss-Model ExPASy em colaboração com o Professor Maurício Homem de Mello do Laboratório de Toxicologia “*in silico*” da UnB. Um alinhamento da sequência de aminoácidos, proteína-proteína, na base de dados de proteínas não redundantes (nr) foi realizado. Para encontrar as proteínas que já possuem estrutura cristalográfica definida e que mais se assemelham em termos de estrutura primária com a L-asparaginase de *P. sizovae*, foi realizado um Blast™ com a mesma sequência, mas comparando com o banco de dados “Protein Data Bank proteins (pdb)”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação do gene L-asparaginase de *P. sizovae*

3.1.1. Extração do DNA genômico de *P. sizovae*

O DNA genômico do fungo filamentososo *P. sizovae* foi avaliado frente a diferentes amostras e metodologias. Dentre as amostras e procedimentos testados, a metodologia que promoveu a extração do DNA genômico, confirmada por visualização de banda de DNA em gel de agarose, foi aquela em que uma amostra do micélio do fungo crescido em placa contendo meio de cultivo BDA foi agitada vigorosamente em equipamento FastPrep com esferas de zircônia (método 9).

A quantificação do DNA genômico extraído de *P. sizovae* foi avaliada em equipamento Nanodrop a fim de quantificar sua concentração nas amostras e pureza. Os ácidos nucléicos têm absorvância máxima em 260 nm. A proporção desse máximo de absorvância para a absorvância a 280 nm tem sido usada como medida de pureza nas extrações de DNA e RNA, em que uma proporção 260/280 de aproximadamente 1,8 é geralmente aceita como “pura” para DNA, ou seja, contaminação com proteínas ou outros compostos fenólicos dentro do aceitável (THERMOSCIENTIFIC, 2012). Portanto, a quantificação de DNA realizada em triplicata mostrou-se satisfatória, com os valores da razão 260/280 em valor aproximado de 1,8 (Tabela 42).

Tabela 42 - Quantificação do DNA genômico de *P. sizovae* em Nanodrop

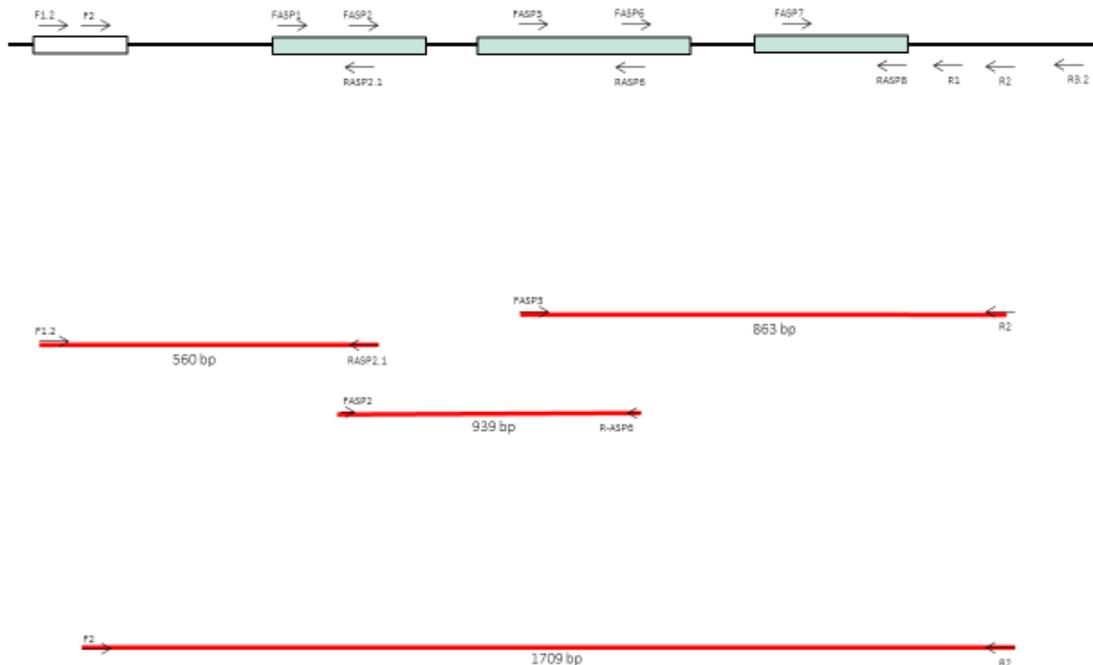
Amostra	Concentração			
	de DNA (ng/ μ L)	A260	260/280	260/230
<i>P. sizovae</i>	159,837	3,1967	1,88	1,57
<i>P. sizovae</i>	157,401	3,1480	1,87	1,56
<i>P. sizovae</i>	156,003	3,1201	1,83	1,54

3.1.2. Construção de *primers* degenerados

A partir dos genomas completos de *P. citrinum* DSM1997, *P. citrinum* JCM22607 e *P. steckii* MLKD01000003 encontrados na base de dados GenBank, a

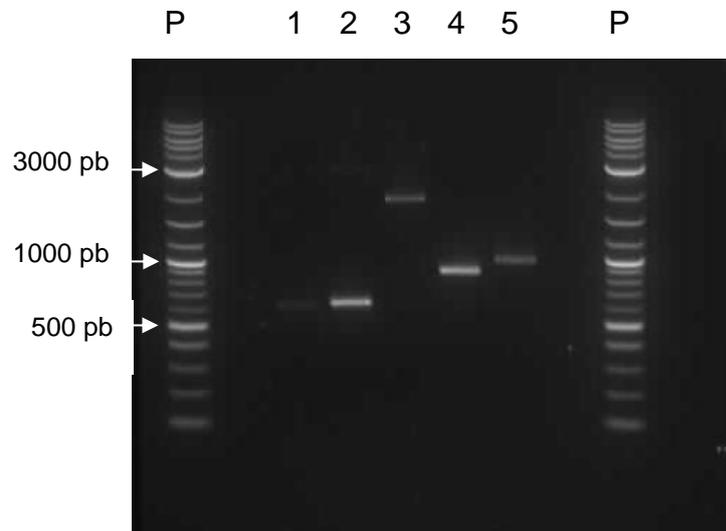
sequência do gene da L-asparaginase destas estirpes foi identificada por homologia à outras sequências do gene da L-asparaginase já descritas em outras espécies de fungos e publicadas na base de dados. Desta forma, *primers* degenerados foram desenhados e testados na amplificação de regiões do DNA genômico de *P. sizovae*, devido a proximidade taxonômica desta espécie com *P. citrinum* e *P. steckii* (Figura 26).

Figura 26 - Alinhamento dos primers degenerados sintetizados para a identificação do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*



A PCR realizada com os *primers* degenerados desenhados a partir das sequências da L-asparaginase de *P. citrinum* e *P. steckii* revelou a amplificação de diferentes regiões que compreendem a sequência do gene em questão em *P. sizovae*, em que foram obtidos produtos de PCR com o tamanho esperado (Figura 27).

Figura 27 - Produtos de PCR purificados a partir da amplificação do DNA genômico de *P. sizovae* com *primers* degenerados usados na identificação do gene da L-asparaginase em gel de agarose 1,2 %, TAE 1X, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão 1 kb (P); ITS1 e ITS4 (570 pb) (1); F-1.2 e R-ASP2.1 (560 pb) (2); F-2 e R-2 (1709 pb) (3); F-ASP3 e R-2 (863 pb) (4); F-ASP2 e R-ASP6 (939 pb) (5)



Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de *P. citrinum* e *P. steckii* para construir a sequência da L-asparaginase de *P. sizovae* (Figura 28).

Figura 28 - Alinhamento das sequências de *P. citrinum* e *P. steckii* para construir a sequência da L-asparaginase de *P. sizovae* com os *primers* utilizados na identificação

F1.2

```

Pcitrinum      -----GATCAGTCGACAAACTACCCAATCCCTTCCAACAAGGCGGAACCAACGCTTC
Psizovae      -----
Psteckii      CTGAAAATGATCAATCAGCAAACCTACCCAATTCCCTCCAACAAAGCGGAACCAACGCTGC
                ***** ** ***** ** ***** ***** *

Pcitrinum      ACGATGGTCGACAGTCGCCTATTGCCGACCATGAAGGACATCTCCGTAAAGATCTACCTC
Psizovae      -----CCGTAAGGACCTGCCTA
Psteckii      GCGATGGCCGACAGTCACCTATTGCGGATCATGAGGGAAACCTGCGAAAGGATCTACCTG
                **.*.*.* **.*.*

F2
Pcitrinum      AAGATGTAAAGGAGCACAATAAAGATATGGACAATCGATACGATAAGCCATACAATCATA
Psizovae      AGGATGTAAAGGAGCACAATAAAGATATGGACAATCGGTACGATAAGCCATACAATCATA
Psteckii      AGGATGTAAAGGAACACAATAAAGAGATGGACAGTCGGTACGATAAGCCATATAATCATA
                *.******.****** *****.***.****** *****

```


Pcitrinum TGACCGTGCGCATACTTTGAATAATTGGAATTCCAAGGCGATTGATAGCGTCTTCAATAG
Psizovae TGACCGTACGCATACTTTGAATTATTGGGATTCCGAGGCGATTGATAGCGTCTTCAATGG
Psteckii TCACAGTACGCATACTTTGGATTATCGGGATTCCGAGGCGGTTGATGACGTCCTCCATGG
* *.**.*.*****.***:* **.*.*****.*****.*****..***** **.*.*.*

Pcitrinum CATAGTTGAATGATGTTGTGACGCCTCTGCTCCAGCTCCTGCAATCTACGACTAGTCAG
Psizovae CATAGTTGAATGACGTTGTGACTCTCCGGCCCCAGCCCCTGCAATCTACGACCAGTCAG
Psteckii CATAATTGAATGATGTTGTACACCTCCGGCCCCGGCCCCTGCAATCTACGAACAGTCAG
****.*.***** ***** ** ***** ** *.*.* *****.*****.*****

Pcitrinum TTATTGAACAAAATTC-ACAGAAAATGTGCTTATGTCAATTGTGAAAGTGTAACTACCA
Psizovae CTGTTAACAACATTT-ACGGGAAATATTTTTCTGTCAATTCTGAAAGGATGACCTACCA
Psteckii CTATTGAACAATTTTTGACAGAAATGTACTTCTGCCTAATTTGAATGGATGACCTACCA
..*.***** :** **.*.*.*.* **.*.* *:*:* *****.* *.*.*****

Pcitrinum CGATGCCCTTTGCGCCACTATCGATGGCATTGTACAAGGTGTCATTGTGCATATCCTCGT
Psizovae CGATGCCCTTTGCGCCACTTTCGATGGCATTGTACAAGGTGTCATTATGCATATCCTCAT
Psteckii CAATGCCCTTTGACCACCTTCAACCGGTTGTATAAGGTGTCGTTATGCATATCCTCAT
..*****.*.*****:*.*.* **.*.***** *****.*.*.*****.*.*

Pcitrinum AAGAGAAGAGGATATCAACTCTCGGAATTTCCGTGACGTTGGCAATATCGAAGTTCTTCT
Psizovae AAGAGAAGAGAATATCAACTCTCGGAATTTCCGTGACGTTGGCAATGTGAAAGTCTTCT
Psteckii AGGAGAAGAGAATATCGACTCTCGGATTTCTTGACGTTGAAATATCAAAGTCTTCT
..*****.*.*****.*.*****.*.***** *****.*.***.* *.*.***** *****

Pcitrinum TTCCCGTCGGCTGTACGGGAGGGTAGAAAAAGAATGGAGTATTAGAGATCATCTCCTCA
Psizovae TTCCCGTCGGCTGTACGGGGGGTAGAAAAAGAATGGGGTATTAGAGATCATTTCTCCTCA
Psteckii TTCCCGTTGGCTGTACAGGAGGGTAGAAAAAGAATGGTGTATTAGAGATCATCTCCTCA
***** *****.*.*.***** ***** ***** *****

F-ASP3m

Pcitrinum **GGAATCCCATTTCATTGC**TTTAAACGTATCAATGGTATTGGCGTTGGTCTTGGTCGTGT
Psizovae **AGTATCCCATTTCATTGC**TTTGAACGTATCCATGGTGTGGCGTTGGTCTTGGTCGTGT
Psteckii **GGAATCCCATTTCATTGC**TTTGAATGTATCCATGGTGTAGCGTTGGTCTTAGTTGTGT
..*****.*.*****.*.* *****.*.*****.*.*.*****.*.* *****

Pcitrinum AGTAGGCGGATGCGATGCGATCATTCATGACGATCATGGCACCGCGTTCTTGGCCTTCG
Psizovae AGTAAGCGGATGCGATGCGATCATTCATGACAATCATGGCACCGCGTTCTTAGCCTTCG
Psteckii AGTAAGCGGATGCGATGCGATCATTCATAACAATCATGGCACCGGATTTCTTGGCCTTCG
****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****

Pcitrinum GGGATGCTGCGACTGTAACAGACTCAAGGAGATTGAAGGGCCCATCGGCTGAGATGGCGG
Psizovae GAGATGCTGCGACGGTAACGGATTCAAGGAGATTGAAGGGTCCATCAGCTGAGATGGCGG
Psteckii TAGATGCCGCGACAGTAACTGATTCGAGAAGATTGAAGGGTCCGTCGGCTGAGATGGCGG
..***** ***** ***** ** *.*.*.***** ***** *.*.*.*****

Pcitrinum TCGAAGGGCGCATGGCGCCAACGATGATGACGGGTTTACCACAATTGATTGTAGCGTCEA
 Psizovae TTGAAGGACGCATGGCGCCAACAATGATGACGGGTTTACCACAATTGATCGTAGCGTCAA
 Psteckii TCGAAGGGCGCATAGCGCCAACAATGATAACCGGTTTACCACAATTGACCGTAGCATCCA
 * *****.*****.*****.*****.*** *****.*****.*****.*** *

Pcitrinum GGAAAAAGGCAGTTTCTCCAAAGTGTGAGTGCCATGAGTGACAACCTGCTCCAGCCATGG
 Psizovae GGAAAAAGGCAGTTTCTCCAAAGTATCGGTTCCATGAGTAACAACAGCCCAGCCATGG
 Psteckii AGAAAAAGGCAGTTTCTCCAAAGTATCGGTTCCATGAGTGACAACAGCTCCAGCCATGG
 .*****.*****.*****.***.*** *****.*****.*****.*** *****

Pcitrinum TTGGATCGTCGCAGACAAGCTTATTGATCTGCTTTGACAGTGAAATTAGAATGTCGGAGG
 Psizovae TTGGATCGTCGCAGACAAGCTTATTGATCTGCTTTGATAGTGAAATTAAGATGTCAGATG
 Psteckii TTGAATCATCGCAGACAAGCTTATTGATCTGTTTTGATAGTGAAATGAGGATGTCGGATG
 ..*****.***.***** ***** ***** *..*****.*** *

Pcitrinum TGATATCTTCACTTCCAACATTTGCTGTCTGAACACCCGCTACATTTGCAACGTCGAGCA
 Psizovae TGATATCTTCACTTCCAACATTTGCTGTCTGGACACCCGCGACATTTGC **AAATATCGAGCA**
 Psteckii TGATATCTTCACTTCCCACATTTGCTGTCTGGACACCCGCTACATTTGCAATATCGAGCA
 *****.*****.*****.*****.***** ***** ***** ***** *****

Pcitrinum TAGATGGAACAGCATCGATTAGAGCACGAACGCCAACCGCTCCAGAAGGTGAGCCTGTTG
 Psizovae **GGATGGAACGGCATCGATTAGAGCACGAACGCCAACCGCTCCAGAAGGTGAGCCTGTCG**
 Psteckii TGGATGGGACGGCATCAATTAGAGCACGAACCTCCAACCGCTCCAGAGGTGAGCCTGTCG
 *.*****.***.*****.*****.***** *****.*****.*****.***** *

F-ASP6

Pcitrinum TTGCC**CGTTGAGCTTGAATCTGAG**CCTGCAATTGTCCCTCCTAAGAGGTGTTAGGAAAATA
 Psizovae TTGCC**CGTTGAGCTTGAATCTGAG**CCTGCAATTGTCCCTCCTAGGGAGTTTTAGATAAAAA
 Psteckii TGGCCGTC**GAGCTTGAATCTGAGCCTG**CTATAGTTCCTCCTATAAGGTGTCAGTAAAATA
 * *****.*****.*****.*****.***** *****.*****.*****.***** *

R-ASP6

Pcitrinum TTAGCATTTGAACGCAGAATTGGATATAGGGGGCCAAACGAACCTGTAGCAAAGATGGTT
 Psizovae TTAGGATAGAAACGTG-----GGATAAAGGAGTCGGACTGACCTGTAGCAAATGTT
 Psteckii CTAGCATAATTACATG-----GGAGAACCGGTTGGACTAACCTGTAGCAAATGTT
 *** **: **: . *.: :* *. * ..** .*****.*****

F-ASP7

Pcitrinum ACATTA**GGAAGGGTATGATTCATCTG**AGTGAAATTCAACCCATTTCGATTGGTGAAAACA
 Psizovae ATATTA**GGAAGGGTATGATTCATCTG**GGTGAAATTCAAGACCATTTCGATTGGTGAAAACA
 Psteckii ATATTA**GGAAGGGTATGATTCATCTG**GGTGAAATTCAACCCATTTCGATTGGTGAAAACG
 * *****.*****.*****.*****.***** *****.*****.*****.***** *

Pcitrinum AACCTGTGCCAATGGCTCCACGGCCATATAGCAAGGGCGATGCCGAACCTCTGACAAGCA
 Psizovae AACCTGTGCCAATGGTTCCACGGCCATACAGCAGGGGCGAAGCCGAACCTCTGACAAGCA
 Psteckii AACCTGTACCATTGGCGCCACGACTATACAGCAGGGGCGAAGCCGAGCTCTGCCAAGCA
 *****.***:*** *****.*** *****.*****:*****.*****.*****

Figura 29 - Sequência genética de *P. sizovae* por comparação com as sequências de *P. steckii* e *P. citrinum*. Sequência do gene da L-asparaginase (negrito); íntrons do gene da L-asparaginase (sublinhado)

5' AATCGTTGACATGGATTGAATTGGCTGAACCCAGTCTGATCAGGCCTTTTCACGATGGTGTCAAT
 TAAGAGCTTCCTCGTAGCGTTGGCTACTTTTGCTTGTGTCAGAGTTTCGGCTTCGCCCTGCTGTATGGCC
 GTGGAACCAATGGCACAGGGTTTGTTCACCAATGCGAATGGTCTGAATTCACCCAGATGAATCAT
 ACCCTTCCTAATAAACCATTTTTGCTACAGGTCAGTCCGACTCCTTTATCCCACGTTTCTATCCTAA
 TTTTTATCTAAAACTCCCTAGGAGGAACAATTGCAGGCTCAGATTCAAGCTCAACGGCAACGACAGGC
 TACTTTCTGGAGCGGTTGGCGTTCGTGCTCTAATCGATGCCGTTCCATCCATGCTCGATATTGCAAA
 TGTCGCGGGTGTCCAGACAGCAAATGTTGGAAGTGAAGATATCACATCTGACATCTTAATTTCACTAT
 CAAAGCAGATCAACAAGTTTGTCTGCGACGATCCAACCATGGCTGGGGCTGTTGTTACTCATGGAACC
 GATACTTTGGAGGAACTGCTTTTTTCTTGACGCTACGATCAATTGTGGTAAACCCGTCATCATTGT
 TGGCGCCATGCGTCCTTCAACCGCCATCTCAGCTGATGGACCCTTCAATCTCCTTGAATCCGTTACCG
 TCGCAGCATCTCCGAAGGCTAAGAACCGCGGTGCCATGATTGTCATGAATGATCGCATCGCATCCGCT
 TACTACACGACCAAGACCAACGCCAACACCATGGATACGTTCAAAGCAATGGAAATGGGATACTTAGG
 AGAAATGATCTCTAATACCCATTCTTTTTCTACCCCCCGTACAGCCGACGGGAAAGAAGGACTTCA
 ACATTGCCAACGTCACGGAAATCCGAGAGTTGATATTCTTCTCTTATGAGGATATGCATAATGAC
 ACCTTGTACAATGCCATCGAAAGTGGCGCAAAGGGCATCGTGGTAGGTCATCCTTTCAGAATTGACAG
 AAAAAATTTCCCGTAAATGTTGTTTAAACAGCTGACTGGTTCGTAGATTGCAGGGCTGGGGCCGGAGG
 AGTCACAACGTCATTCAACTATGCCATTGAAGACGCTATCAATCGCCTCGGAATCCAATAATTCAA
 GTATGCGTACGGTCAATGGTGAAGTGCCATTGTGACGCTCGAAAGCACCAGTGCCACTCATATTGCC
 AGTGGATACTTGAACCCTCAAAAATCCCGTATATTACTGGGACTATTGCTAGCGAAGTCGAGCAACAT
 CACTGAGATTGCTTCAACCTTTTCTCTTAATACAAATGCCTAGACTAGTGTGGCAGAGAAGATTGC
 AAAACCGATGACATATAGGCCACTCTTTGACTTGACCCCTACATACCCACGTAGGTAGTTACAAAA
 CATTGATACTAGCAGTAAATAGAGAGTAACTTCGCAGAACATTATTTATTGATCTTTCCTTCCCCTAT
 TCCCCATGTCATAATGGAGAAAGACGTACTAGTACAGTATAATTTGAGACAGACAGGGAGATTGCAGA
 ACCAGTAGAATTATCCAACCTAAATGACATAAAAACCTTGCACCAGTATAATCTCGCTACACATAACG
 AACATCTGCAGATCGTCCAATCTATTTCTTCTCCAACCGCCTTCGACATTCCCTTCGTCCGCGATA
 TGATTGTATGGCTTATCGTACCGATTGTCCATATCTTTATTGTGCTCCTTTACATCCTTAGGCAGGTC
 CTTACGG3'

3.2. Tradução proteica da L-asparaginase de *P. sizovae*

A sequência predita de nucleotídeos da L-asparaginase de *P. sizovae* nativa contruída foi traduzida, com retirada dos íntrons, em sequências de aminoácidos que constituem esta proteína (Figura 30).

Figura 30 - Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase nativa de *P. sizovae*
 MVSIKSFLVALATFACQSSASPLLYGRGTNGTGFVFTNANGLNFTQMNHTLPNITIFA
 TGGTIAGSDSSSTATTGYTSGAVGVRLIDAVPSMLDIANVAGVQTANVGSEEDITSDI
 LISLSKQINKFVCDDPTMAGAVVTHGTDLEETAFFLDATINCGKPVIIVGAMRPSTAI
 SADGPFNLLESVTVAASPKAKNRGAMIVMNDRIASAYTTKTNANTMDTFKAMEMG
 YLGEMISNTPFFFYPPVQPTGKKDFNIANVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNAIESGA
 KGIVIAGAGAGGVTTSFNYAIEDAINRLGIPIIQSMRTVNGEVPLSDVESTSATHIASG
 YLNPQKSRILLGLLLAKSSNITEIASTFSLNTNA-

A sequência predita de nucleotídeos da L-asparaginase de *P. sizovae* parcial contruída foi traduzida, com retirada dos íntrons e dos primeiros 19 aminoácidos, em sequências de aminoácidos que constituem esta proteína (Figura 31).

Figura 31 - Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase parcial de *P. sizovae*
 MSPLLYGRGTNGTGFVFTNANGLNFTQMNHTLPNITIFATGGTIAGSDSSSTATTGY
 TSGAVGVRLIDAVPSMLDIANVAGVQTANVGSEEDITSDILISLSKQINKFVCDDPTM
 AGAVVTHGTDLEETAFFLDATINCGKPVIIVGAMRPSTAISADGPFNLLESVTVAAS
 PKAKNRGAMIVMNDRIASAYTTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFFYPPV
 QPTGKKDFNIANVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNAIESGAKGIVIAGAGAGGVTTSF
 NYAIEDAINRLGIPIIQSMRTVNGEVPLSDVESTSATHIASGYLNPQKSRILLGLLLAKS
 SNITEIASTFSLNTNA-

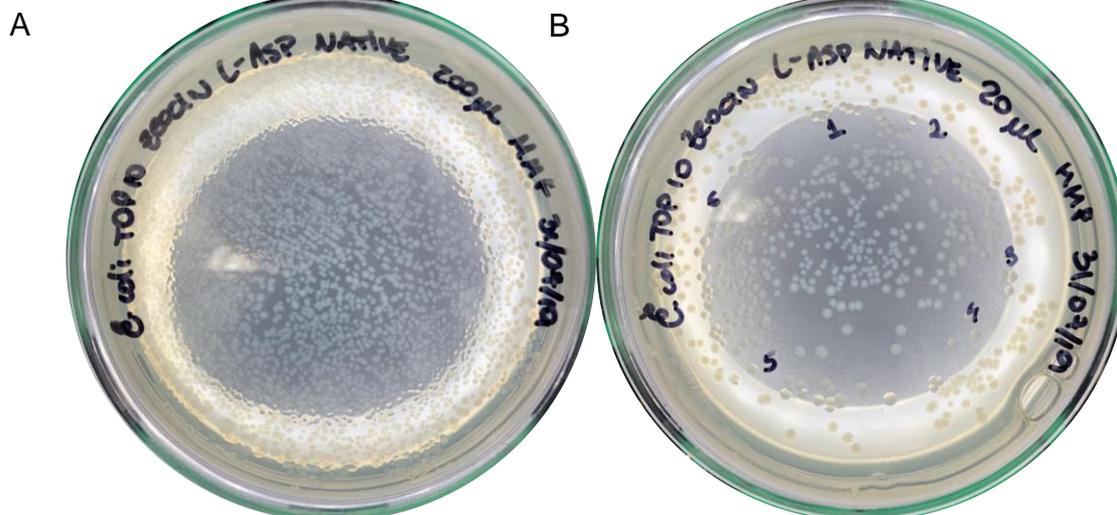
A computação do pI teórico da L-asparaginase nativa de *P. sizovae* é de 4,93 e sua massa molecular teórica é de 40073,46 Da. Por se tratar de uma proteína tetramérica, estima-se que sua massa molecular seja de 160,292 kDa. A massa molecular estimada no presente estudo é similar àquelas purificadas de *Citrobacter* 166 kDa (BASCOMB; BANKS; SKARSTEDT; FLEMING *et al.*, 1975), *E. carotovora* 160 kDa (DEVI; AZMI, 2012) e *F. tricinctum* 161/170 kDa (SCHEETZ; WHELAN; WRISTON, 1971).

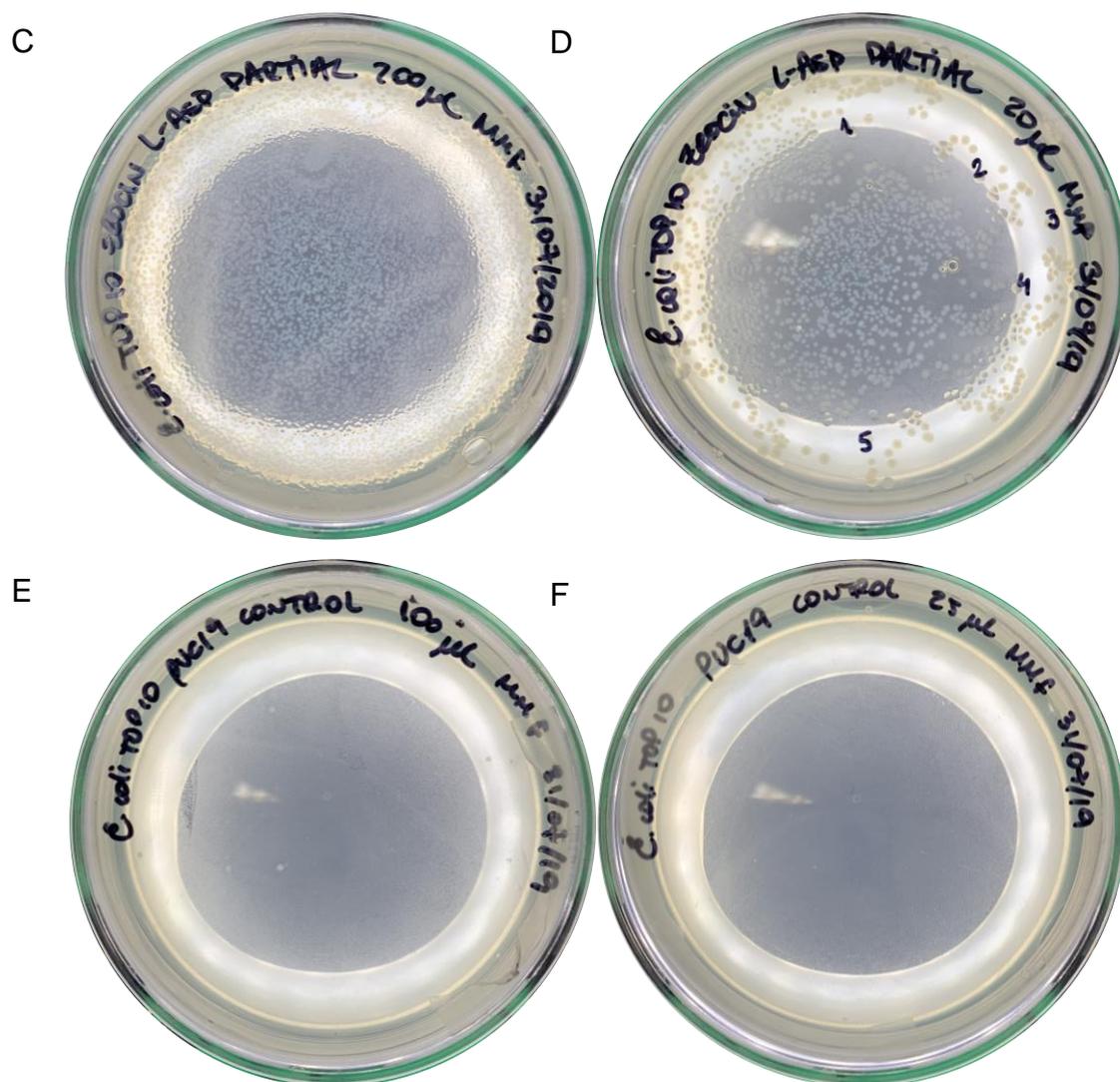
3.1. Clonagem do gene da L-asparaginase de *P. sizovae*

3.1.1. Extração dos plasmídeos a partir das células de *E. coli* transformadas

As células de *E. coli* TOP10 quimicamente competentes foram transformadas com os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A e o controle positivo pUC19. A incubação de 200 e 20 μ L das células *E. coli* TOP10 quimicamente competentes transformadas com os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A (Figura 32 A e B) e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (Figura 32 C e D) em placas de Petri contendo ágar LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL) resultou em centenas de UFCs, impossibilitando sua contagem. A incubação de 100 e 25 μ L das células *E. coli* TOP10 quimicamente competentes transformadas com o controle pUC19 (Figura 32 E e F) em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) resultou em 13 UFC e 1 UFC, respectivamente.

Figura 32 - Unidades formadoras de colônias das células de *E. coli* TOP10 quimicamente competentes transformadas com plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A em placas de Petri contendo ágar LB com baixa concentração de sal suplementado com Zeocina (25 μ g/mL) e transformadas com o controle positivo pUC19 em placas de Petri contendo ágar LB suplementado com ampicilina (100 μ g/mL). NATIVE L-ASP pPICZ α A 200 μ L (A) e 20 μ L (B); PARTIAL L-ASP pPICZ α A 200 μ L (C) e 20 μ L (D); controle positivo pUC19 100 μ L (E) e 25 μ L (F)





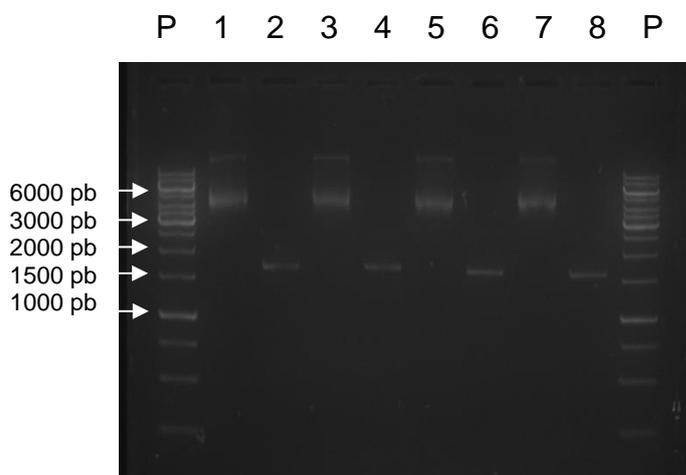
Os pDNAs NATIVE1 e PARTIAL 1 foram quantificados em Nanodrop em triplicata (Tabela 43).

Tabela 43 - Quantificação dos pDNAs nativo e parcial de *P. sizovae* após extração das células de *E. coli* TOP10 em Nanodrop

Amostra	Concentração			
	de DNA (ng/µL)	A260	260/280	260/230
Native 1	6615,841	132,3168	1,88	2,27
Native 1	7070,470	141,4094	1,90	2,28
Native 1	6463,701	129,2740	1,88	2,26
Partial 1	4126,912	82,5382	1,86	2,25
Partial 1	4730,280	94,6056	1,87	2,29
Partial 1	5169,648	103,3930	1,87	2,26

Um gel de agarose 1,2 % foi preparado para confirmar a presença dos pDNAs extraídos das células de *E. coli* transformadas e dos produtos de PCR purificados da reação dos plasmídeos extraídos utilizando os primers 5'AOX1 e 3'AOX1 (Figura 33). É possível observar bandas entre 4.000 e 5.000 pb das linhas 2, 4, 6 e 8 respectivas aos pDNAs extraídos das células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A (4.681 pb) N₁, N₅ e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (4.624 pb) P₁ e P₅, respectivamente. É possível observar bandas entre 1.500 e 2.000 pb das linhas 3, 5, 7 e 9 respectivas aos produtos de PCR purificados da reação dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A (1.571 pb) N₁, N₅ e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (1.514 pb) P₁ e P₅ extraídos utilizando os primers 5'AOX1 e 3'AOX1, respectivamente.

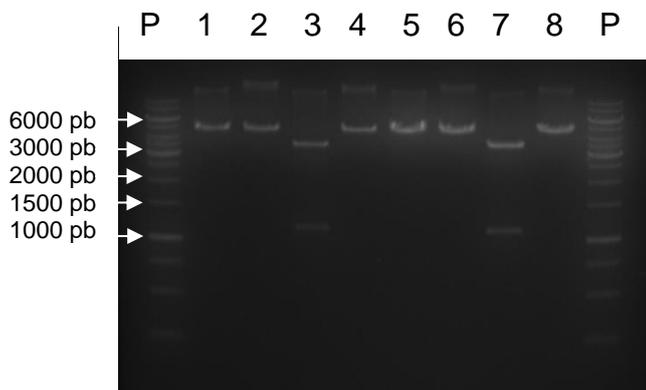
Figura 33 - pDNAs extraídos das células de *E. coli* transformadas e os produtos de PCR purificados da reação com os primers 5'AOX1 e 3'AOX1 em gel de agarose 1,2 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão DNA 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZ α A N₁ (1); produto de PCR NATIVE L-ASP pPICZ α A N₁ purificado (2); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZ α A N₅ (3); produto de PCR NATIVE L-ASP pPICZ α A N₅ purificado (4); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZ α A P₁ (5); produto de PCR PARTIAL L-ASP pPICZ α A P₁ purificado (6); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZ α A P₅ (7); produto de PCR PARTIAL L-ASP pPICZ α A P₅ purificado (8)



3.1.2. Linearização dos plasmídeos

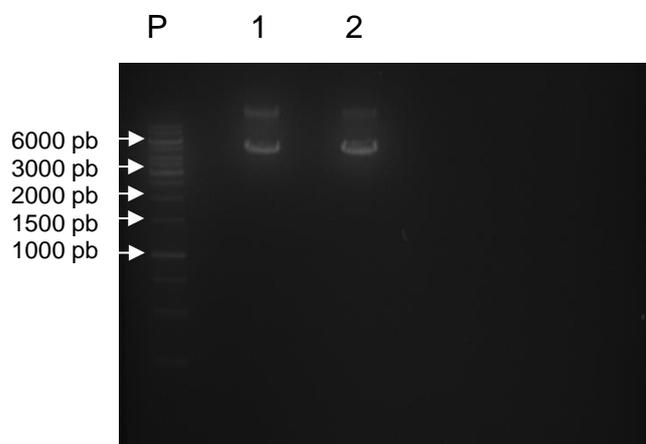
Os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZ α A e PARTIAL L-ASP pPICZ α A foram linearizados com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI, EcoRI/XbaI e SacI (Figura 34).

Figura 34 - Digestão de 1 µg dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI e SacI em gel de agarose 1 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. padrão DNA 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI (1); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com XbaI (2); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI/XbaI (3); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA digerido com SacI (4); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI (5); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com XbaI (6); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com EcoRI/XbaI (7); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA digerido com SacI (8)



Após a reação de digestão, foi possível observar a linearização dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA através da presença de uma banda em 4.681 pb e 4.624 pb, respectivamente, com as enzimas de restrição EcoRI, XbaI e SacI. Ao utilizar as enzimas EcoRI/XbaI para dupla digestão, foi possível observar a presença de duas bandas, uma em 3.530 pb e outra em 1.151 pb ou 1.094 para os plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA, respectivamente. Após confirmação da linearização dos pDNAs, o processo de digestão com SacI foi escalonado em 5 vezes para linearizar 5 µg de cada pDNA (Figura 35).

Figura 35 - Digestão de 5 µg dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA com a enzima de restrição SacI em gel de agarose 1 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 45 minutos. Padrão 1 kb (Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder) (P); plasmídeo NATIVE L-ASP pPICZαA (1); plasmídeo PARTIAL L-ASP pPICZαA (2)



Foi possível observar a linearização dos plasmídeos NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA através da presença de uma banda em 4.681 pb e 4.624 pb, respectivamente, confirmando a linearização dos pDNAs.

3.1.3. Transformação das células de *K. phaffii*

As células de *K. phaffii* X-33 transformadas com os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA após descongelamento (Figura 36) e transformadas a fresco (Figura 37) resultaram no crescimento de colônias em placas de Petri contendo ágar YPD suplementado com Zeocina.

Figura 36 - Colônias de *K. phaffii* X-33 a partir de células transformadas após descongelamento contendo os pDNAs resistentes a Zeocina (A) NATIVE L-ASP pPICZαA e (B) PARTIAL L-ASP pPICZαA

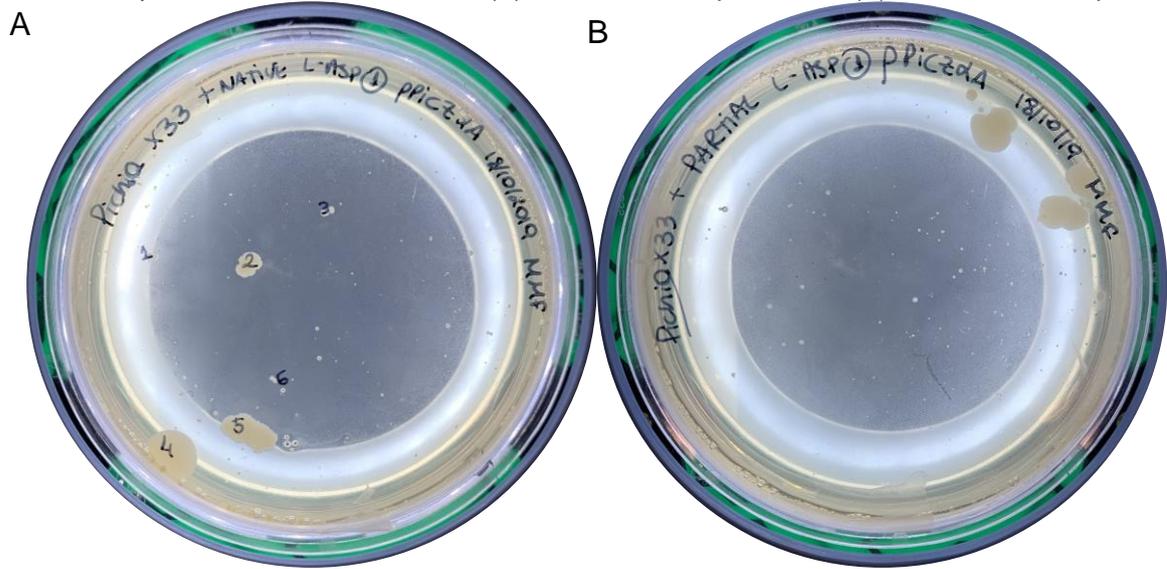
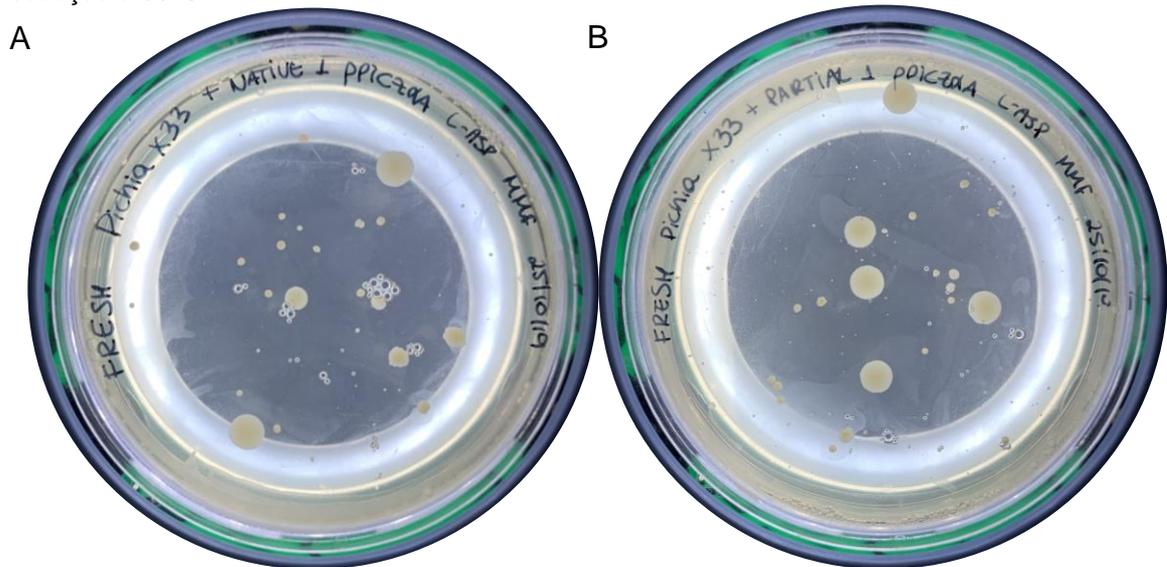


Figura 37 - Colônias de *K. phaffii* X-33 a partir de células transformadas a fresco contendo os pDNAs resistentes a Zeocina (A) NATIVE L-ASP pPICZαA e (B) PARTIAL L-ASP pPICZαA após 10 dias de incubação a 30°C



Após 10 dias de incubação a 30°C, foi observado o crescimento de 10 UFCs e 8 UFCs de *K. phaffii* X-33 transformadas com os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA, respectivamente, após descongelamento das células de *K. phaffii* X-33. Foi observado o crescimento de mais de 20 UFCs de *K. phaffii* X-33 transformadas com os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZαA e PARTIAL L-ASP pPICZαA, respectivamente, após transformação das células de *K. phaffii* X-33 a fresco. Embora colônias de *K. phaffii* X-33 resistentes a Zeocina tenham crescido tanto nas células transformadas após descongelamento quanto para as células transformadas a fresco,

foi possível observar um aumento na quantidade de colônias produzidas nas células de *K. phaffii* X-33 que foram transformadas a fresco em relação aquelas transformadas após descongelamento, confirmando que a transformação é mais eficiente em células de *K. phaffii* X-33 preparadas a fresco.

3.2. Avaliação do fenótipo dos transformados em meio sólido

Os clones de *K. phaffii* X-33 transformados após descongelamento das células e à fresco com os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZ α A (Figura 38 e Figura 39) e PARTIAL L-ASP pPICZ α A (Figura 40 e Figura 41) resistentes a Zeocina selecionados foram avaliados quanto ao seu crescimento em placas de Petri contendo ágar MMH e MDH para a avaliação do fenótipo Mut⁺ ou Mut^s.

Figura 38 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas após descongelamento com o pDNA NATIVE L-ASP pPICZ α A resistentes a Zeocina (Nc 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ/lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA

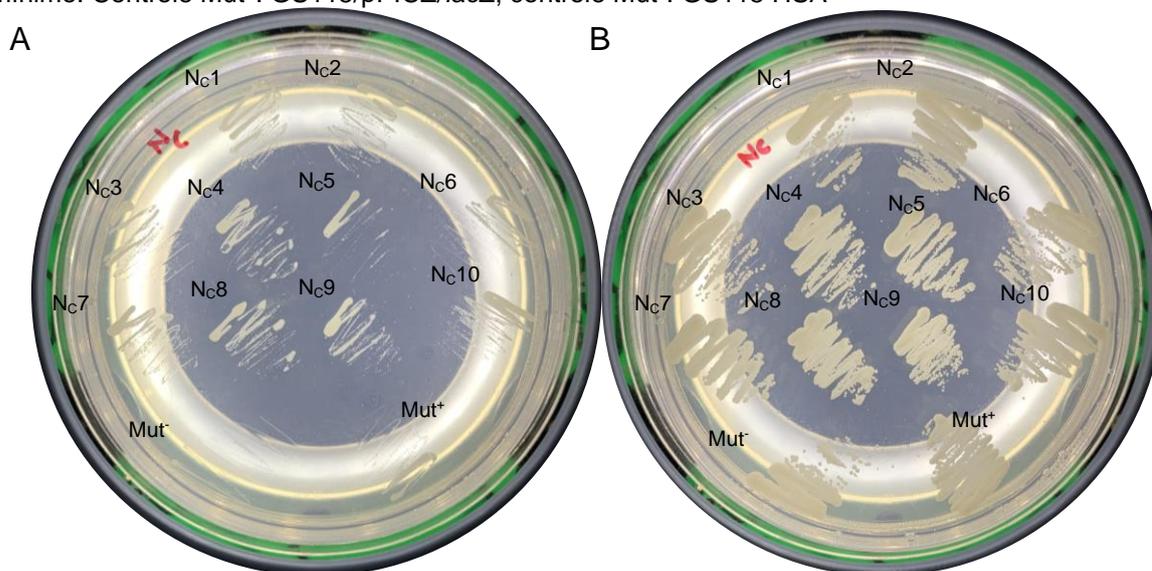


Figura 39 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas a fresco com o pDNA NATIVE L-ASP pPICZ α A resistentes a Zeocina (N_F 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ//lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA

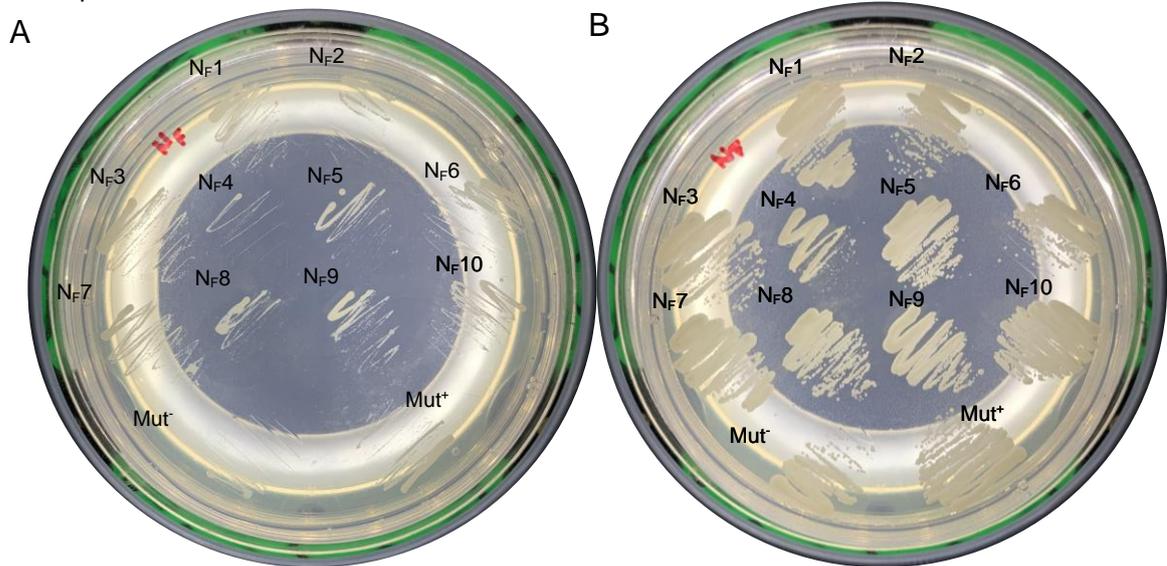


Figura 40 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas após descongelamento com o pDNA PARTIAL L-ASP pPICZ α A resistentes a Zeocina (P_c 1-8) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ//lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA

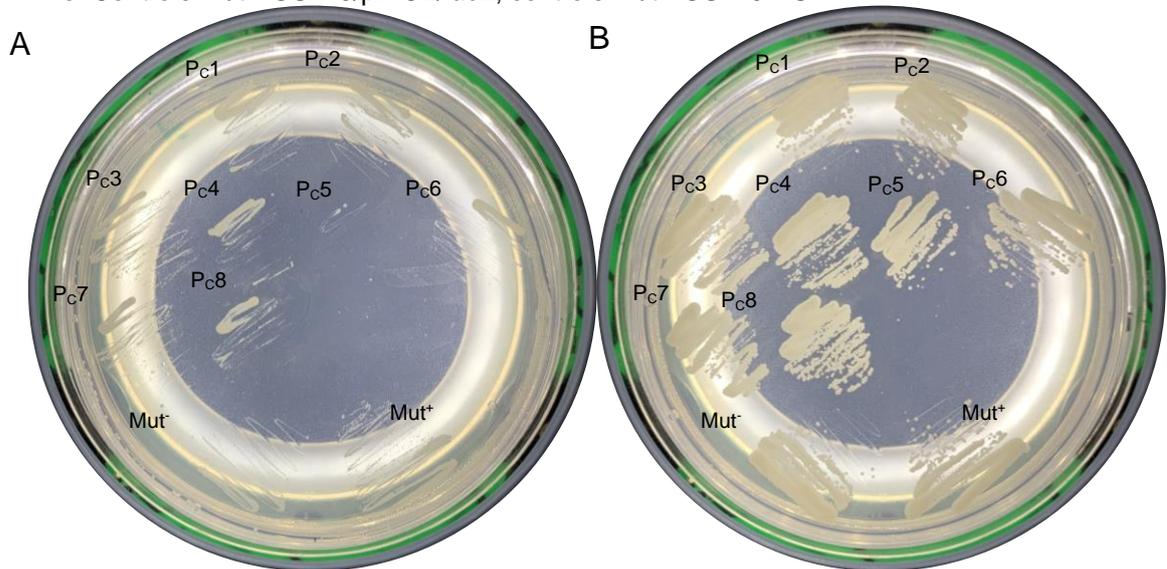
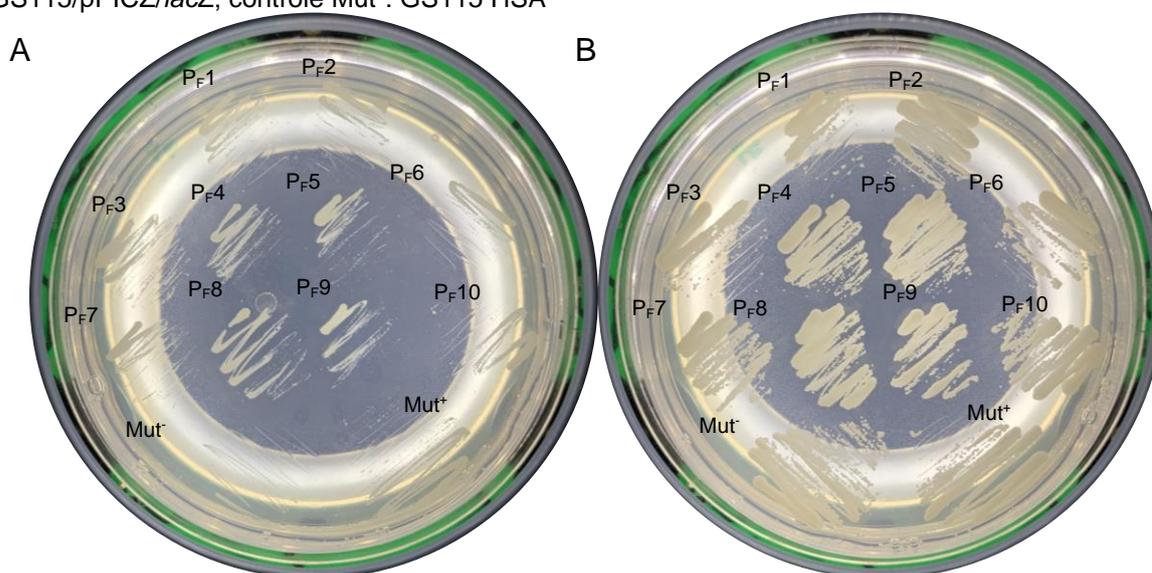


Figura 41 - Confirmação do fenótipo Mut das colônias de *K. phaffii* X-33 transformadas a fresco com o pDNA PARTIAL L-ASP pPICZ α A resistentes a Zeocina (P_F 1-10) após 2 dias de incubação a 30°C (A) ágar contendo metanol em meio mínimo (B) ágar contendo dextrose em meio mínimo. Controle Mut⁺: GS115/pPICZ//lacZ; controle Mut^s: GS115 HSA



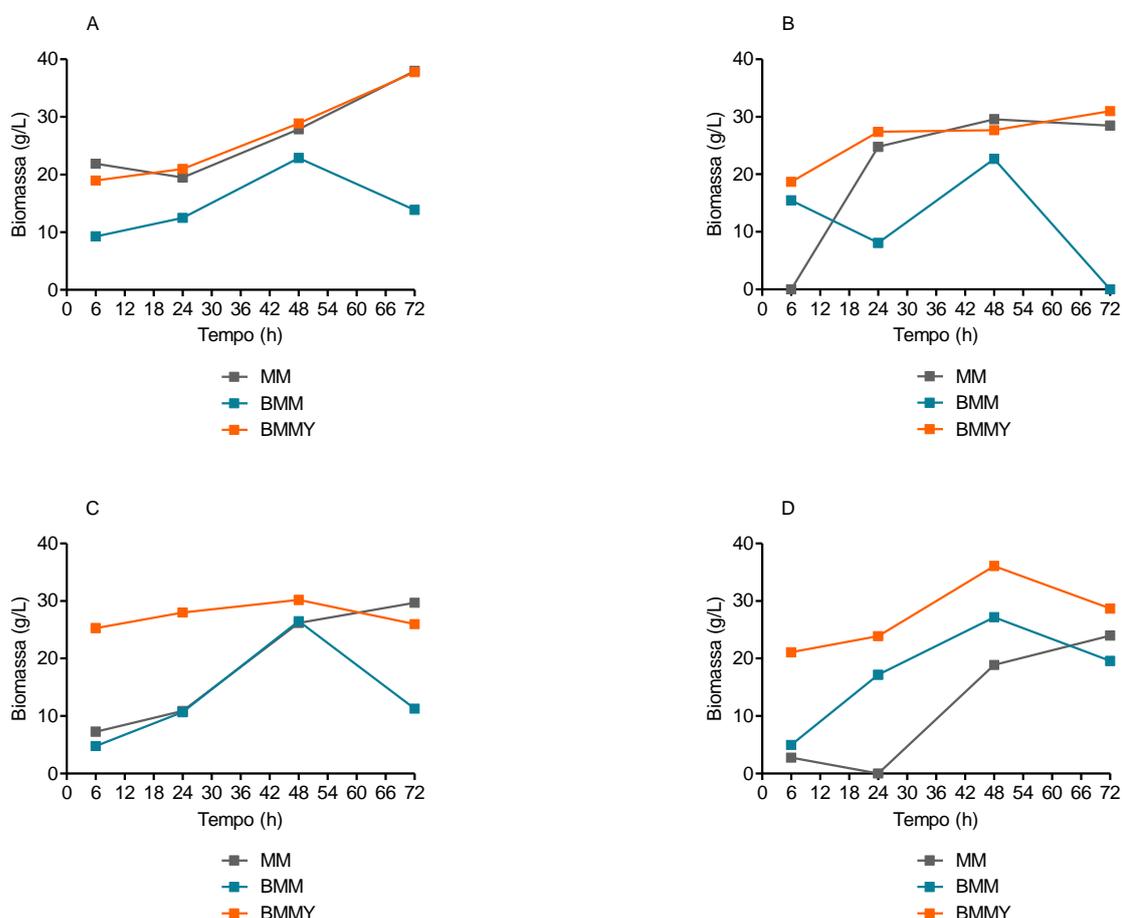
Os clones de *K. phaffii* X-33 transformados com os pDNAs NATIVE e PARTIAL L-ASP pPICZ α A selecionadas (Nc1-10, N_F1-10, P_C1-4,6-8 e N_F1-10) foram confirmadas como Mut⁺ por apresentarem crescimento em meio mínimo contendo metanol como fonte de carbono, comparado ao controle GS115/pPICZ//lacZ. O clone de *K. phaffii* X-33 transformado com o pDNAs PARTIAL L-ASP pPICZ α A P_C5 foi confirmado como Mut^s por não ter apresentado crescimento em meio mínimo contendo metanol como fonte de carbono.

3.3. Expressão de L-asparaginase em *K. phaffii* X-33 recombinante

Os clones de *K. phaffii* X-33 contendo os pDNAs NATIVE L-ASP pPICZ α A – Nc1, Nc10, Nf5 e Nf7 - e PARTIAL L-ASP pPICZ α A – P_C2, P_C3, P_F6 e P_F10 - foram selecionados para a expressão da enzima em meio líquido. A triagem inicial testando os clones de *K. phaffii* X-33 transformados buscou determinar o meio de cultivo a ser utilizado na expressão de L-asparaginase.

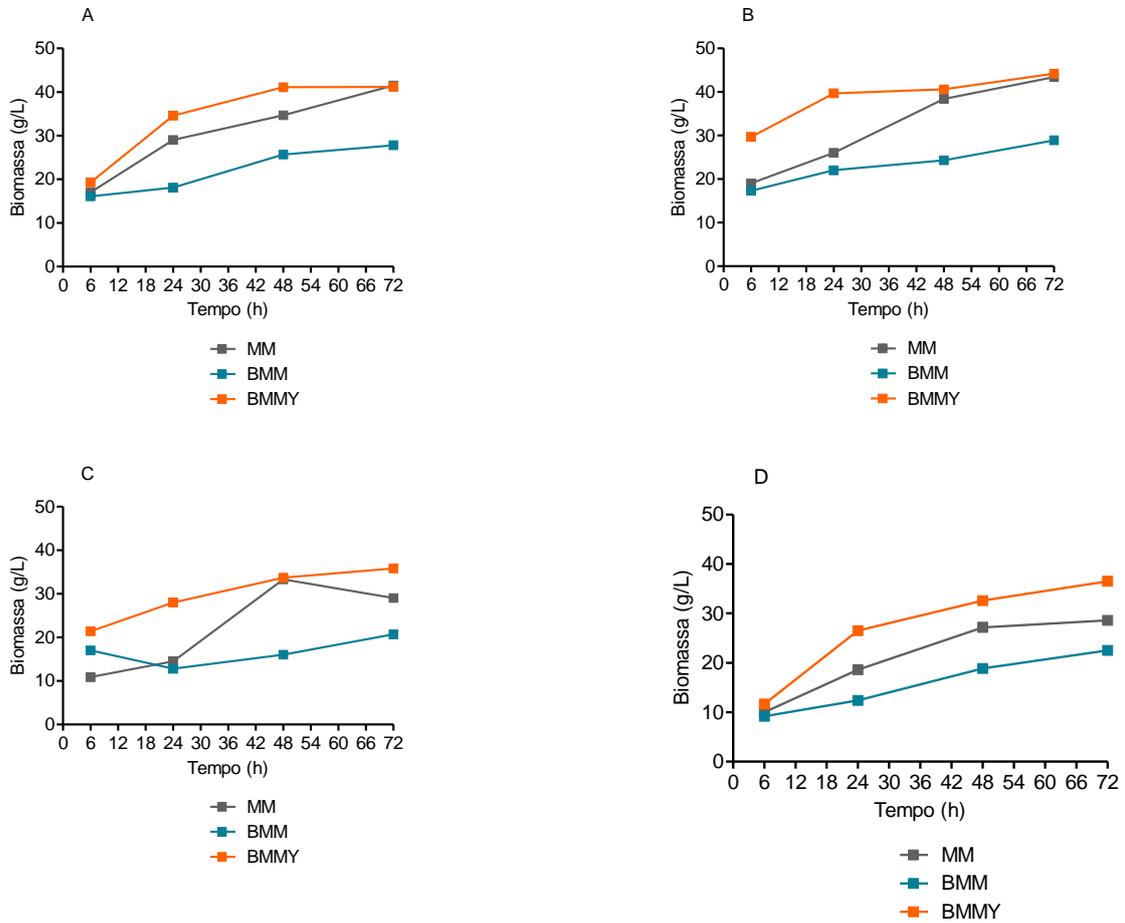
A quantificação da biomassa produzida na presença dos meios de cultivo MM, BMM e BMMY utilizados na indução revelou que a maior quantidade de biomassa foi produzida quando os clones Nc₁ (Figura 42A), Nc₁₀ (Figura 42B), Nf₅ (Figura 42C) e Nf₇ (Figura 42D) foram cultivados nos meios de cultivo BMMY e MM, com menor biomassa produzida no meio de cultivo BMM (exceto para o clone Nf₇).

Figura 42 - Perfil cinético da produção da biomassa de *K. phaffii* X-33 transformada com NATIVE pPICZ α A inoculada nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY sob indução de metanol, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Nc₁ (A); Clone Nc₁₀ (B); Clone Nf₅ (C); Clone Nf₇ (D)



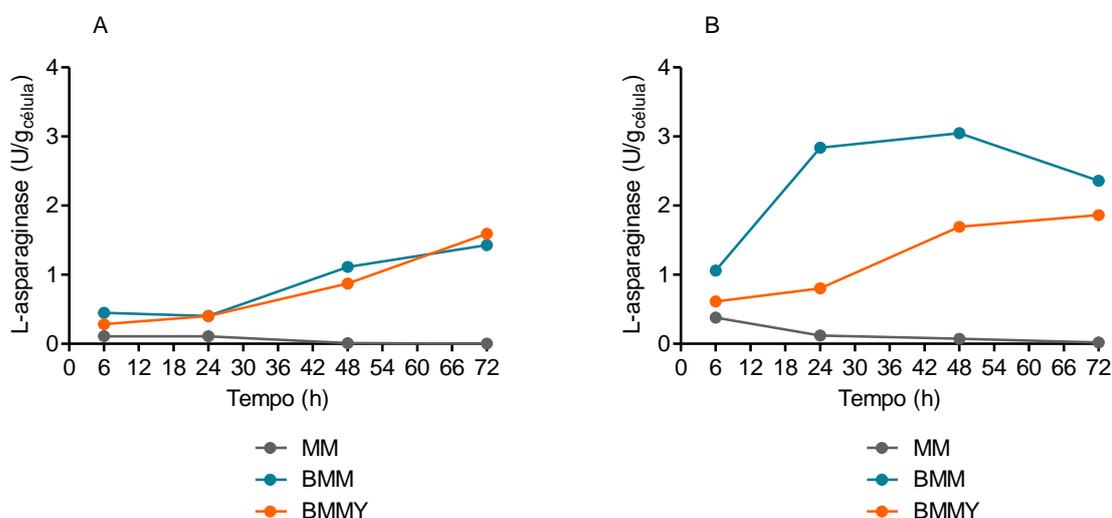
A quantificação da biomassa produzida na presença dos meios de cultivo MM, BMM e BMMY utilizados na indução revelou que a maior quantidade de biomassa foi produzida quando os clones Pc₂ (41,2 mg/mL, Figura 43A), Pc₃ (44,2 mg/mL, Figura 43B), Pf₆ (35,8 mg/mL, Figura 43C) e Pf₁₀ (36,5 mg/mL, Figura 43D) foram cultivadas no meio de cultivo BMMY, seguido de MM e BMM, após 72 horas de indução da expressão com metanol na fase exponencial de crescimento celular.

Figura 43 - Perfil cinético da produção da biomassa de *K. phaffii* X-33 transformada com PARTIAL pPICZ α A inoculada nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY sob indução de metanol, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Pc₂ (A); Clone Pc₃ (B); Clone Pf₆ (C); Clone Pf₁₀ (D)



A atividade de L-asparaginase quantificada no meio intracelular confirmou a atividade biológica da enzima nas células dos clones Pc₃ (Figura 44A) e Pf₆ (Figura 44B), enquanto não foi detectada atividade enzimática nos clones Pc₂ e Pf₁₀.

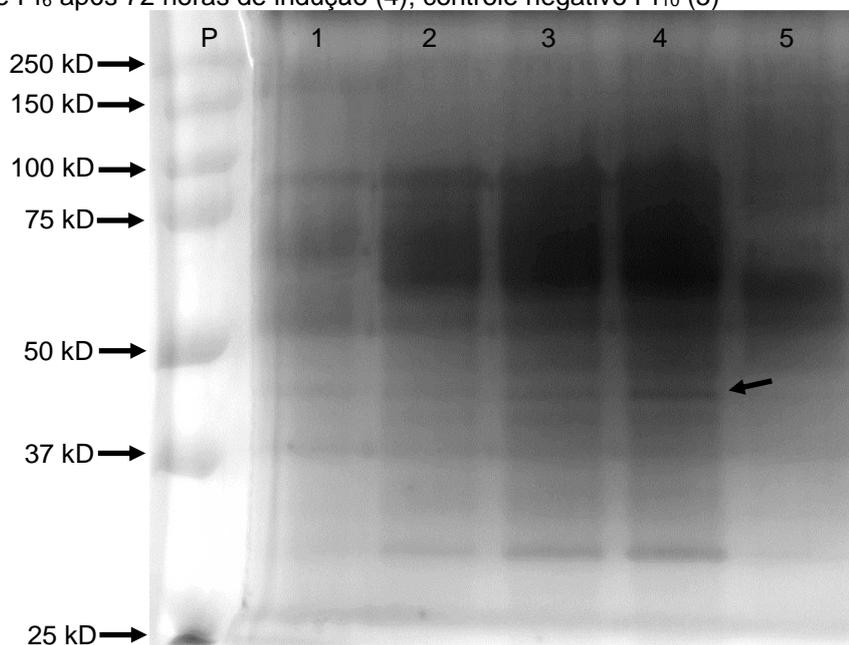
Figura 44 - Curva de crescimento da atividade enzimática da L-asparaginase de *K. phaffii* X-33 transformada com PARTIAL pPICZ α A inoculado nos meios de cultivo MM, BMM e BMMY, incubados a 30°C, 275 rpm, por 72 horas. Clone Pc3 (A); clone Pf6 (B)



O maior valor de atividade de L-asparaginase quantificado pelo clone Pc₃ foi obtido quando este foi cultivado no meio de expressão BMMY, apresentando atividade máxima de 1,59 U/g_{célula}, próximo ao valor de 1,43 U/g_{célula} obtido quando foi cultivado no meio de expressão BMM. Por sua vez, o valor máximo de atividade de L-asparaginase quantificado pelos clones testados foi obtido pelo clone Pf₆ quando este foi cultivado no meio de expressão BMM, apresentando atividade máxima de 3,05 U/g_{célula} após 48 horas de cultivo, sendo este o clone selecionado para os ensaios seguintes.

Não foi observada atividade de L-asparaginase no meio extracelular, quantificada no meio de cultivo para nenhum dos clones testados com as sequências nativa e parcial da enzima. Embora os clones da sequência genética de L-asparaginase parcial não tenham apresentado atividade enzimática no meio extracelular, foi possível observar um aumento discreto nas absorbâncias das amostras em relação ao branco das amostras para os clones Pc₃ e Pf₆. A escolha do vetor pPICZ α A teve como objetivo secretar a proteína de interesse através da adição do peptídeo sinal α , além da remoção dos primeiros 20 aminoácidos sinalizadores na sequência genética da L-asparaginase de *P. sizovae*. Um gel de poliacrilamida em condições desnaturantes SDS-PAGE foi preparado com amostras de proteínas secretadas pelo clone Pf₆ em meio extracelular após 6, 24, 48 e 72 horas de cultivo em comparação a um clone com vetor vazio Pf₁₀ como controle negativo (Figura 45).

Figura 45 - Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes SDS-PAGE 12 %, 120 V das proteínas precipitadas no meio extracelular após cultivo de *K. phaffii* X-33 em meio de expressão BMMY coradas com nitrato de prata. Padrão comercial Precision Plus Protein Standards® Bio-Rad dual color (P); clone Pf₆ após 6 horas de indução (1); clone Pf₆ após 24 horas de indução (2); clone Pf₆ após 48 h de indução (3); clone Pf₆ após 72 horas de indução (4); controle negativo Pf₁₀ (5)



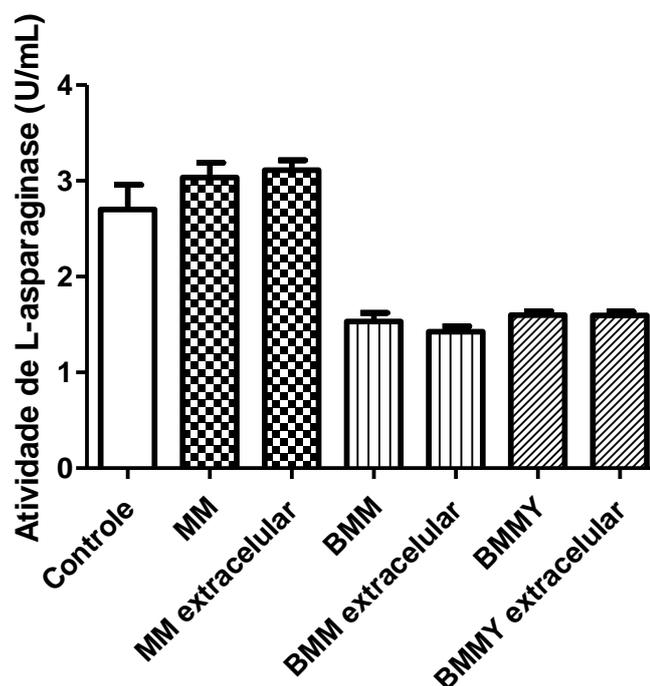
A análise do gel de poliacrilamida mostrou a presença de uma proteína expressa pelo clone PF6 que não foi expressa pelo controle negativo PF10 entre 50 e 37 kDa, o que sugere a presença de L-asparaginase no meio extracelular apesar da sua atividade enzimática não ter sido detectada em ensaio quantitativo. Ferrara et al. (2006) clonou e expressou o gene ASP3, que codifica a asparaginase tipo II periplasmática, regulada por nitrogênio, de *S. cerevisiae* na levedura *Pichia pastoris*. Em seu estudo, nenhuma atividade de asparaginase foi detectada no sobrendante do cultivo, entretanto os ensaios usando suspensões de células inteiras mostraram que a enzima estava endereçada ao espaço periplásmico, apesar da sequência do sinal de secreção (FERRARA; SEVERINO; MANSURE; MARTINS *et al.*, 2006). Similarmente, Rodrigues et al. (2019) clonou e expressou o mesmo gene ASP3 em *Pichia pastoris*, e observou apenas a atividade de L-asparaginase periplasmática. A atividade da enzima extracelular foi nula, apesar da sua presença confirmada por SDS-PAGE, similar ao observado no presente estudo (RODRIGUES; PILLACAPULLO; TORRES-OBREQUE; FLORES-SANTOS *et al.*, 2019). As proteínas geralmente requerem proteínas auxiliares específicas, chaperonas, para auxiliar em seu dobramento correto e para protegê-las da desnaturação e agregação. É provável que as chaperonas conservadas dentro do espaço periplasmático seriam

responsáveis pela proteção das proteínas contra o estresse de dobramento (ALLEN; PHAN; WAKSMAN, 2009). A eficiência da secreção depende não apenas da presença de motivos que direcionam a proteína heteróloga para o meio de cultura, mas também da natureza da estrutura da proteína. O sinal do fator α de *S. cerevisiae* é comumente usado para direcionar a secreção de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. Como a L-asparaginase II é uma enzima periplásmica, é possível que um domínio ainda não identificado de sua estrutura proteica possa interagir com a parede celular, impedindo a secreção da enzima (FERRARA; SEVERINO; MANSURE; MARTINS *et al.*, 2006). Portanto, é possível que a enzima secretada no ambiente extracelular por *P. pastoris* possa ter sofrido alguma modificação para uma forma inativa (RODRIGUES; PILLACA-PULLO; TORRES-OBREQUE; FLORES-SANTOS *et al.*, 2019). Adicionalmente, Roldán *et al.* (2019) avaliaram a expressão extracelular em Glycoswitch® usando duas construções de cepas diferentes contendo o gene *asnB* que codifica para L-asparaginase de *E. chrysanthemi* com e sem His-tag, em que a modelagem tridimensional da proteína sugere que estruturas adicionais (His-tag) podem afetar adversamente a conformação nativa e o enovelamento da L-asparaginase e, portanto, a expressão e secreção celular desta enzima (ROLDÁN; LIMA; CABARCA; PESSOA *et al.*, 2019).

3.4. Avaliação da interferência dos meios de cultivo na quantificação da atividade de L-asparaginase e de proteínas totais

Um ensaio enzimático foi realizado para verificar a interferência dos meios de cultivo utilizados no cultivo do clone de *K. phaffii* X-33 frente a quantificação da atividade de L-asparaginase utilizando o método do ácido L-aspartil- β -hidroxamato (Figura 46).

Figura 46 - Avaliação da interferência dos meios de cultivo MM, BMM e BMMY na quantificação da atividade de L-asparaginase



Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre valores da atividade de L-asparaginase quantificados nos meios de cultivos MM, BMM e BMMY antes e após o cultivo com *K. phaffii* X-33. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na quantificação da atividade enzimática entre o controle positivo da enzima nativa em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,6 e o meio de cultivo MM. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da atividade de L-asparaginase quantificados nos meios de cultivo BMM e BMMY. Entretanto, houve redução significativa na quantificação da atividade enzimática entre o controle positivo e os meios de cultivo BMM e BMMY. Os valores foram reduzidos a aproximadamente metade daquele quantificado no controle, o que demonstra que os meios de cultivo tamponados com fosfato de potássio subestimam a atividade enzimática quando o método do ácido L-aspartil- β -hidroxamato é utilizado para quantificação de L-asparaginase no meio extracelular.

É possível que a baixa atividade de L-asparaginase no meio extracelular dos clones avaliados Pc₃ e Pf₆ tenha sofrido interferência dos meios de cultivos utilizados e conseqüentemente ocasionado significativa redução na quantificação enzimática.

Adicionalmente, amostras de cada meio de expressão após o cultivo com *K. phaffii* X-33 foram avaliadas frente a quantificação de proteínas totais pelo método do

BCA. Foi observado que o meio de cultivo BMMY produziu uma intensa coloração púrpura, indicativa de presença de proteínas (dados não foram quantificados). Esta interação pode ter resultado da redução das proteínas presentes no extrato de levedura que constitui o meio de cultivo BMMY, o que torna este meio de cultivo um interferente na quantificação de proteínas totais.

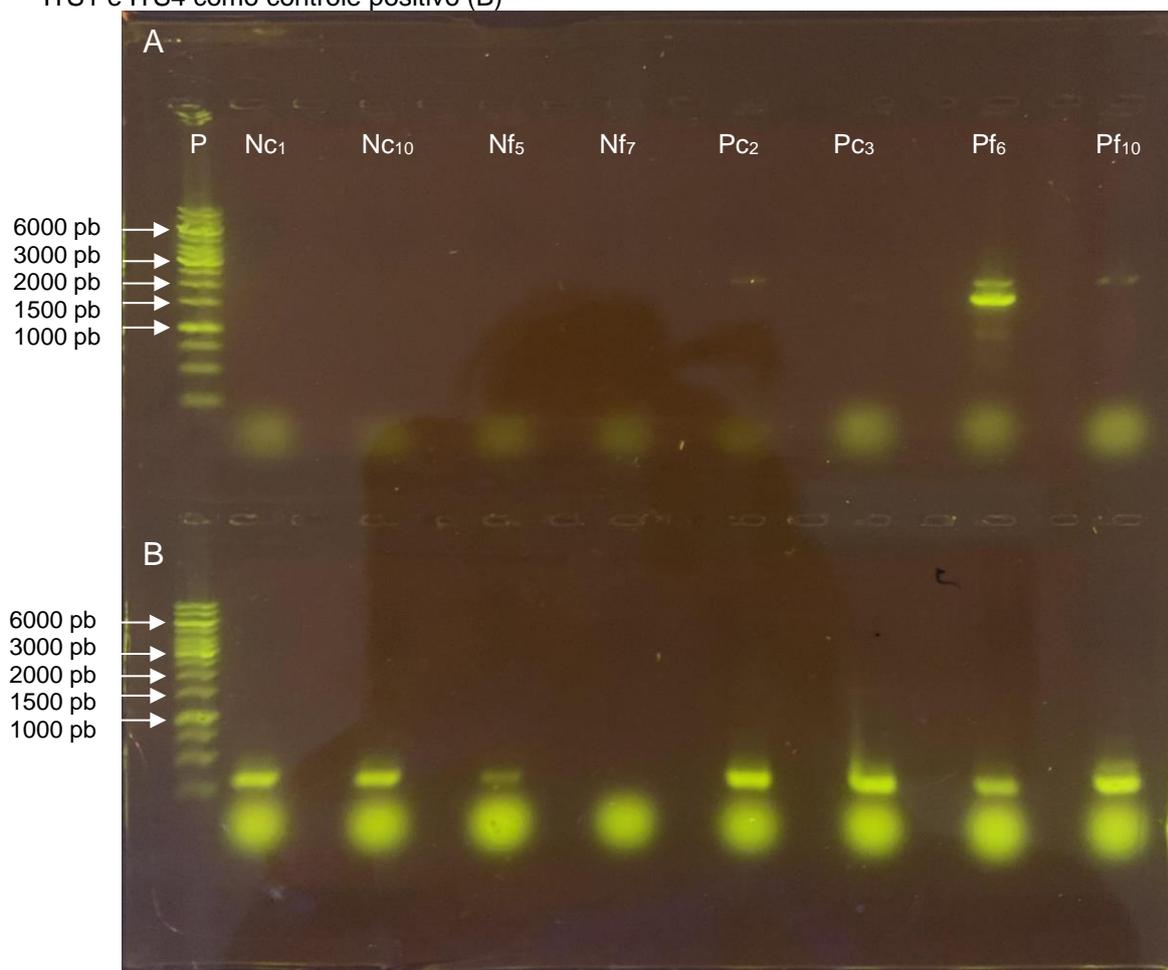
3.5. Confirmação do fenótipo dos transformados por PCR

O método da PCR de colônia para triagem direta do fenótipo dos clones de *K. phaffii* promoveu a lise de células, em que o gDNA foi utilizado diretamente como *template* para a PCR. A análise dos integrantes de *K. phaffii* por PCR revelou a presença de clones contendo a L-asparaginase com fenótipo Mut⁺ e Mut⁻, assim como identificou clones contendo o plasmídeo sem o gene de L-asparaginase. Para integrantes Mut⁺ é possível visualizar duas bandas: uma correspondente ao tamanho do gene da L-asparaginase (1.183 pb para a enzima nativa e 1.089 pb para a enzima parcial) com o tamanho do produto de PCR pPICZαA utilizando o *primer* 5' AOX1 (588 pb) e a outra correspondendo ao gene AOX1 (aproximadamente 2,2 kb). A amplificação da região ITS1 e ITS4 foi utilizada como controle positivo de extração de gDNA.

Um teste inicial de PCR de colônia para confirmação do fenótipo dos transformados selecionados para expressão da L-asparaginase (Nc₁, Nc₁₀, Nf₅, Nf₇, Pc₂, Pc₃, Pf₆ e Pf₁₀) foi realizada a fim de validar o experimento (Figura 47). Todos os clones testados, exceto Nf₇, amplificaram a região ITS com o uso dos *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo, comprovando a extração do gDNA no preparo nas amostras. Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZαA transformados a partir das células previamente congeladas (Nc) e à fresco (Nf), não possível visualizar nenhuma banda correspondente à presença do pDNA. Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZαA transformados a partir das células previamente congeladas (Pc) e à fresco (Pf), os clones Pc₂ e Pf₁₀ apresentaram uma banda discreta em 2,2 kb, sugestiva de integração do plasmídeo sem o gene da L-asparaginase. O clone Pc₃ apresentou uma banda discreta em aproximadamente 1.677 pb, considerado como Mut^s, enquanto o clone Pf₆ apresentou duas bandas: uma com aproximadamente 2,2 kb e outra com aproximadamente 1.677 pb, correspondentes aos tamanhos dos genes AOX1 e L-

asparaginase amplificado com o *primer* 5' AOX1, respectivamente, identificado como Mut⁺.

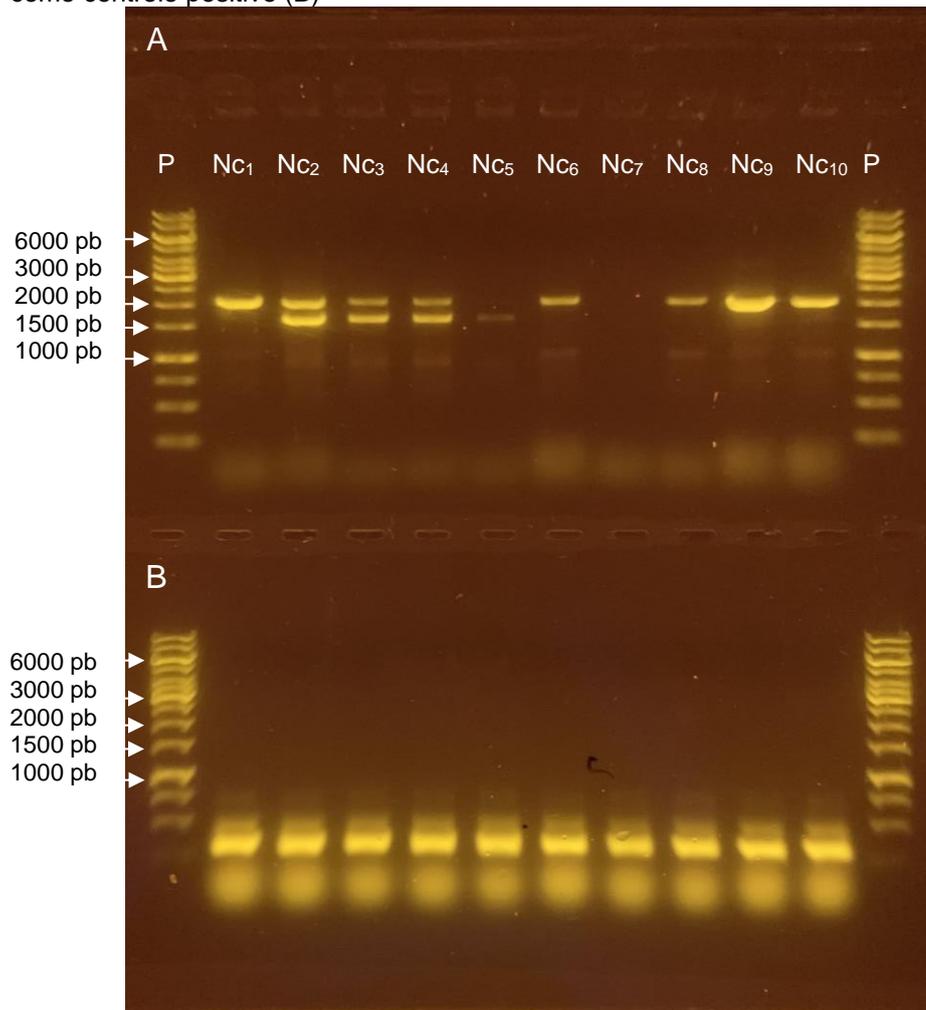
Figura 47 - PCR de colônia dos clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE e PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células previamente congeladas e à fresco em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)



Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir das células previamente congeladas (Nc), apenas 3/10 clones (Nc₂, Nc₃ e Nc₄) foram identificados como Mut⁺ por terem apresentado duas bandas na visualização do gel: uma com aproximadamente 2,2 kb e outra com aproximadamente 1.771 pb, correspondentes aos tamanhos dos genes AOX1 e L-asparaginase amplificado com o *primer* 5' AOX1, respectivamente. O clone Nc₅ foi identificado como Mut^s por ter apresentado apenas uma banda na visualização do gel com aproximadamente 1.771 pb. Os clones Nc₁, Nc₆, Nc₈, Nc₉ e Nc₁₀ integraram o

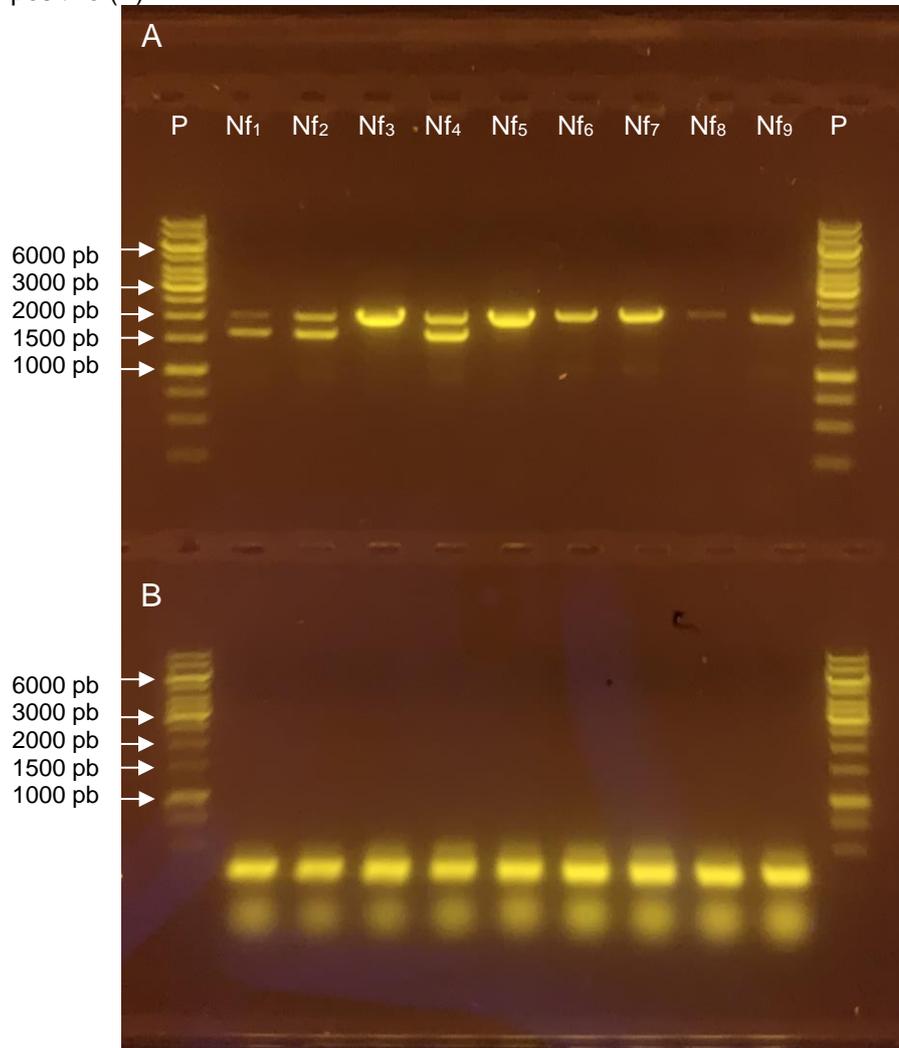
plasmídeo, porém não integraram o gene da L-asparaginase no genoma da *K. phaffii* X-33 (Figura 48).

Figura 48 - PCR de colônia dos clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células previamente congeladas (Nc₁-Nc₁₀) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)



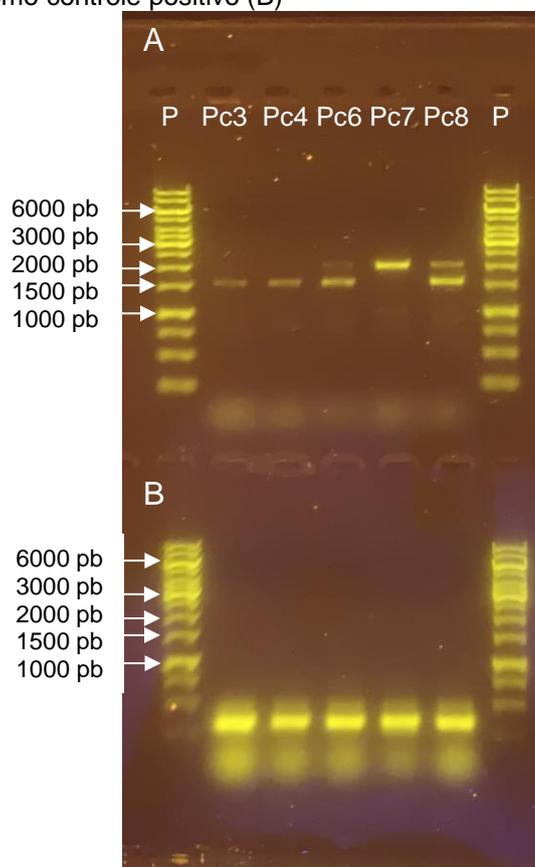
Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir das células frescas (Nf), apenas 3/9 (Nf₁, Nf₂ e Nf₄) foram identificados como Mut⁺ por terem apresentado duas bandas na visualização do gel: uma com aproximadamente 2,2 kb e outra com aproximadamente 1.771 pb, correspondentes aos tamanhos dos genes AOX1 e L-asparaginase amplificado com o *primer* 5' AOX1, respectivamente. Os clones Nf₃, Nf₅, Nf₆, Nf₇, Nf₈ e Nf₉ integraram o plasmídeo, porém não integraram o gene da L-asparaginase no genoma da *K. phaffii* X-33 (Figura 49).

Figura 49 - PCR de colônia dos clones de *K. phaffii* X-33 integrados com NATIVE L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células frescas (Nc₁-Nc₉) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)



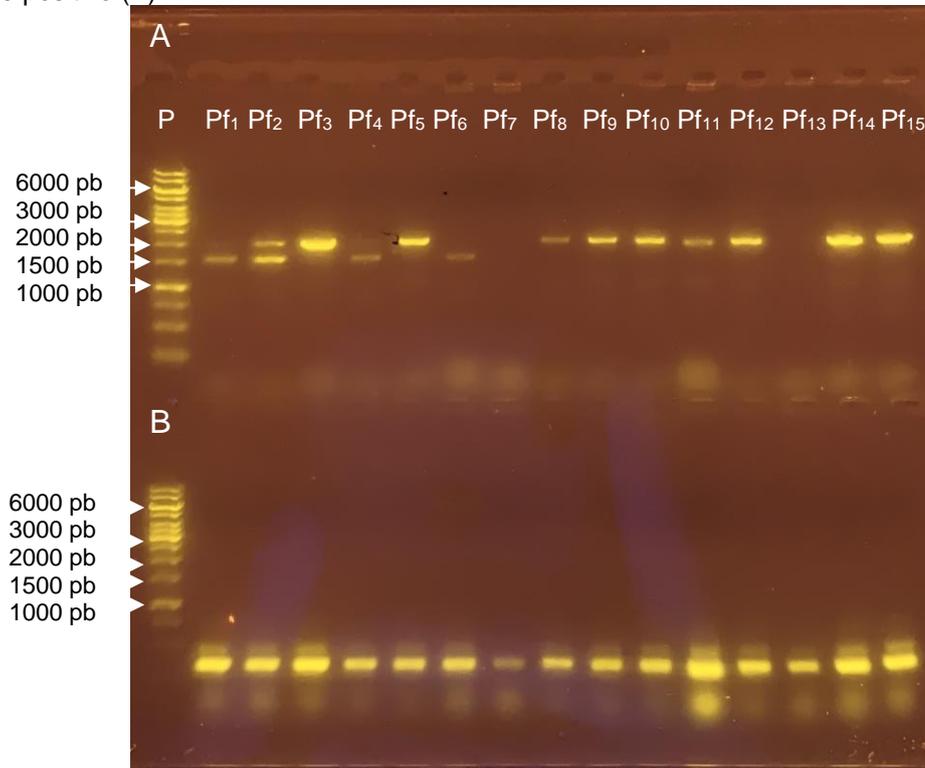
Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir das células previamente congeladas (Pc), apenas 2 clones (Pc₆ e Pc₈) foram identificados como Mut⁺ por terem apresentado duas bandas na visualização do gel: uma com aproximadamente 2,2 kb e outra com aproximadamente 1.677 pb, correspondentes aos tamanhos dos genes AOX1 e L-asparaginase amplificados com o *primer* 5' AOX1, respectivamente. Os clones Pc₃ e Pc₄ foram identificados como Mut^s por terem apresentado apenas uma banda na visualização do gel com aproximadamente 1.677 pb. O clone Pc₇ integrou o plasmídeo, porém não integrou o gene da L-asparaginase no genoma da *K. phaffii* X-33 (Figura 50).

Figura 50 - PCR de colônia dos clones de *K. phaffii* X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células previamente congeladas (Pc₃, Pc₄, Pc₆, Pc₇ e Pc₈) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)



Dentre os clones de *K. phaffii* X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir das células frescas (Pf), três (Pf₁, Pf₂ e Pf₄) foram identificados como Mut⁺ por terem apresentado duas bandas na visualização do gel: uma com aproximadamente 2.2 kb e outra com aproximadamente 1.677 pb, correspondentes aos tamanhos dos genes AOX1 e L-asparaginase amplificado com o *primer* 5' AOX1, respectivamente. Não foi possível observar duas bandas indicativas de fenótipo Mut⁺ no clone Pf₆ neste experimento, ao contrário do observado no experimento anterior. Os clones Pf₃, Pf₅, Pf₈, Pf₉, Pf₁₀, Pf₁₁, Pf₁₂, Pf₁₄ e Pf₁₅ integraram o plasmídeo, confirmado pela presença de uma banda em 2.2 kb, porém não integraram o gene da L-asparaginase no genoma da *K. phaffii* X-33 (Figura 51).

Figura 51 - PCR de colônia dos clones de *K. phaffii* X-33 integrados com PARTIAL L-ASP pPICZ α A transformados a partir de células frescas (Pf₁-Pf₁₅) em gel de agarose 0,8 %, 1X TAE, 100 V, 200 mA, 40 minutos. Padrão 1 kb Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (P); Produtos de PCR utilizando os *primers* 5' e 3' AOX1 (A). Produtos de PCR utilizando os *primers* ITS1 e ITS4 como controle positivo (B)



A Tabela 44 apresenta um resumo dos fenótipos de todos os transformados de *K. phaffii* X-33 confirmados por PCR de colônia.

Tabela 44 - Fenótipos dos clones de *K. phaffii* X-33

Clone	Fenótipo	Clone	Fenótipo
Nc ₁	NI	Pc ₃	Mut ^s
Nc ₂	Mut ⁺	Pc ₄	Mut ^s
Nc ₃	Mut ⁺	Pc ₆	Mut ⁺
Nc ₄	Mut ⁺	Pc ₇	NI
Nc ₅	Mut ^s	Pc ₈	Mut ⁺
Nc ₆	NI	Pf ₁	Mut ⁺
Nc ₇	-	Pf ₂	Mut ⁺
Nc ₈	NI	Pf ₃	NI
Nc ₉	NI	Pf ₄	Mut ⁺
Nc ₁₀	NI	Pf ₅	NI
Nf ₁	Mut ⁺	Pf ₆	Mut ⁺
Nf ₂	Mut ⁺	Pf ₇	-
Nf ₃	NI	Pf ₈	NI
Nf ₄	Mut ⁺	Pf ₉	NI
Nf ₅	NI	Pf ₁₀	NI
Nf ₆	NI	Pf ₁₁	NI
Nf ₇	NI	Pf ₁₂	NI
Nf ₈	NI	Pf ₁₃	NI
Nf ₉	NI	Pf ₁₄	NI
		Pf ₁₅	NI

NI: não integrado

3.6. Projeção da estrutura molecular da L-asparaginase de *P. sizovae*

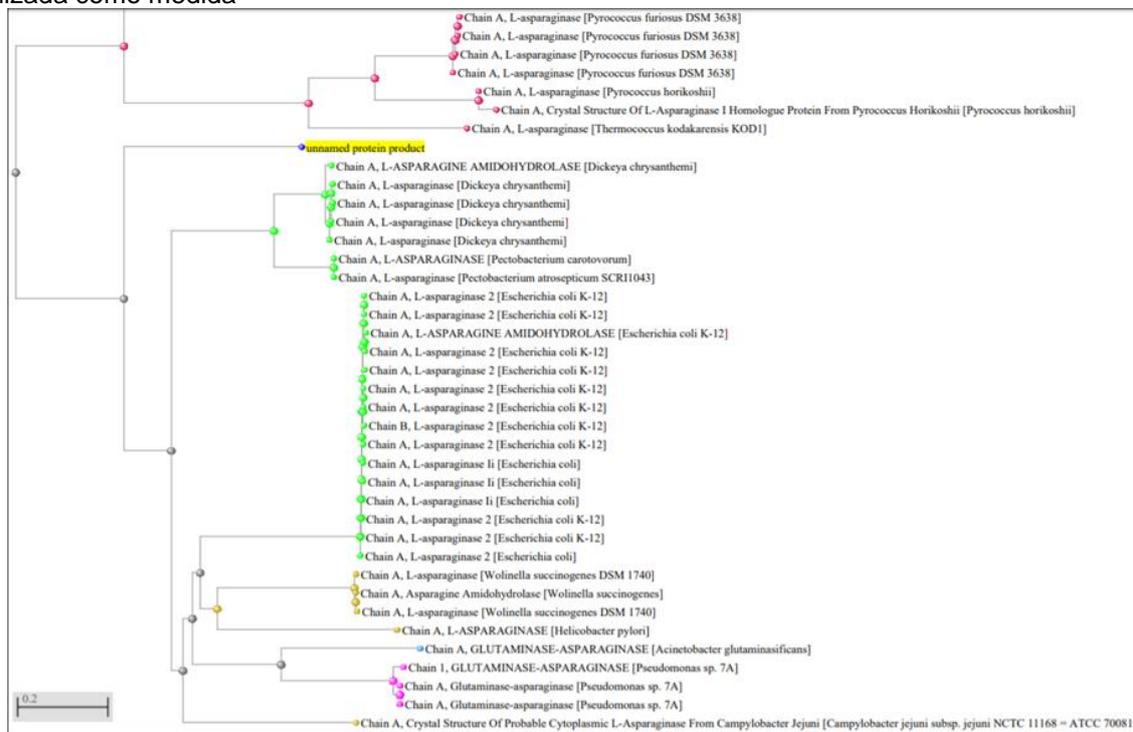
As seqüências de proteínas das L-asparaginases foram analisadas e revelaram que o fungo filamentoso *P. sizovae* contém uma enzima com homologia com seus representantes bacterianos.

Ao realizar um alinhamento da seqüência de aminoácidos, proteína-proteína, na base de dados de proteínas não redundantes (nr), a maior identidade (95,29 %) encontrada foi com uma proteína hipotética de *P. steckii*. Essa identidade está relacionada ao número de aminoácidos em comum entre as duas seqüências, e no caso da L-asparaginase de *P. steckii*, esta ainda não foi identificada até a atual data.

Todas as outras principais proteínas encontradas no banco de dados de proteínas não redundantes se encontram na mesma situação. Até mesmo a árvore filogenética dessa específica proteína sequenciada não demonstra proximidade com outras proteínas que já tenham sido identificadas além da predição baseada em sequências genômicas nesse banco de dados.

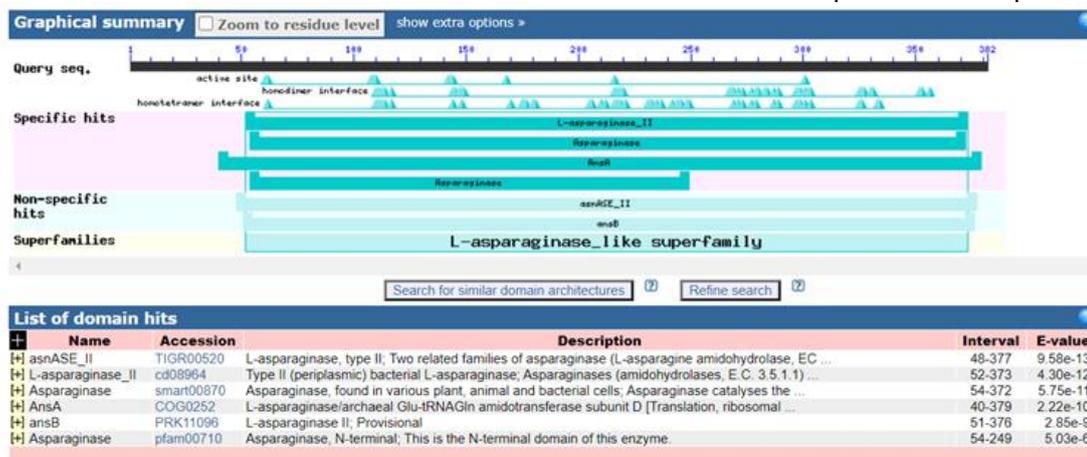
A comparação com proteínas que já tenham sido mais bem estudadas, com alguma característica estrutural já elucidada foi realizada para fins de determinação de estrutura secundária ou terciária. Foi observada queda de similaridade entre as sequências, entretanto, dentre as proteínas já cristalizadas, as mais próximas são aquelas com atividade de L-asparaginase ou glutaminase, o que denota conservação do sítio catalítico. A L-asparaginase cristalizada mais similar à sequência de *P. sizovae* é a sintetizada pelo microrganismo *Dickeya chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*). A árvore filogenética baseada na comparação da proteína sequenciada do *P. sizovae* e das outras proteínas que já possuem estrutura cristalográfica definida, mostra uma maior distância evolutiva, quando comparado com as proteínas obtidas no banco de dados de proteínas não redundantes (Figura 52), mas possui maior correlação com o percentual de similaridade obtido com as proteínas do Protein Data Bank (pdb).

Figura 52 - Árvore filogenética baseada na sequência da L-asparaginase de *P. sizovae* comparada a proteínas que já possuem a estrutura cristalográfica elucidada. Distância evolucionária de Grishin utilizada como medida



Existem diversos pontos conservados na proteína de *P. sizovae* quando comparado com as moléculas do *Protein Data Bank*. Os domínios conservados de sítios ativos (comparação com as estruturas do *Protein Data Bank* de melhor *match*), de interfaces homodimérica e homotetramérica estão apresentados na Figura 53. Pelo grau de conservação observado nessas estruturas, pode-se inferir que a L-asparaginase de *P. sizovae* deve ter atividade de asparaginase tipo II (periplasmática, com maior atividade de L-asparaginase em relação à atividade de glutaminase). Além disso, é provável que seja, assim como diversas das L-asparaginases identificadas, um dímero-dímero, ou seja um tetrâmero.

Figura 53 - Domínios conservados da L-asparaginase de *P. sizovae* quando comparado com as moléculas do Protein Data Bank. Os triângulos presentes nas linhas indicadas pelas setas mostram os domínios conservados e associados com o sítio ativo e com as interfaces poliméricas da proteína



As afirmativas sobre os sítios ativos e sobre as interfaces poliméricas são baseadas na comparação dos resíduos conservados e comparados com as estruturas que são conhecidas das proteínas já cristalizadas. A Figura 54 mostra o alinhamento e os resíduos conservados da L-asparaginase de *P. sizovae* e as outras asparaginases já conhecidas de outros microrganismos. A B demonstra que existe um razoável grau de conservação em alguns sítos, mas não todos os já descritos nas proteínas já elucidadas, o que pode denotar diferença de atividade. A proteína de maior similaridade (pdb 1HFJ_A), baseada em uma só cadeia, é a L-asparaginase de *Dickeya chrysanthemi* (na imagem aparece a sinonímia *Pectobacterium chrysanthemi*), um tetrâmero.

Figura 54 - Alinhamento das L-asparaginases cristalizadas depositadas em banco de dados com a enzima de *P. sizovae*. Em amarelo estão os resíduos conservados das interfaces homotetraméricas: sítio ativo (A); interface de homodímero [sítio de ligação do polipeptídeo] (B); interface de homotetrâmero [sítio de ligação do polipeptídeo] (C).

Feature 1	##	###	####	#					
query	52	PNITIFATG	IAGSD	[13].VGVRALIDAVPSML	[3].NVAGVQTANV	ES	EDITSDILISLSKQINKFV	[5].MAG	136
1HFJ_A	5	PNVILATG	IAGSA	[13].LGVDTLINAVPEVK	[3].NVRGEQFSNMAS	EN	MTGDVWLKLSQRVNEEL	[4].VDG	88
1DJP_A	3	ANVILATG	IAGAG	[13].VGVDKLIAGVPELA	[3].NVRGEQVMQIAS	ES	ITNDLLKLGKRVNELA	[4].VDG	86
ACJ75594	2	KKVVILTTG	IAMVK	[8].DKGSALISEIPSLK	[4].KIEVREFSNIPS	HMT	PQKMWELSRIDEIQ	[4].VIG	81
EEX68565	3	KHIYILATG	IAGKA	[13].IGIADLLAAVPELR	[3].DVEGEQIASIDS	KMT	SAIWLRAARCKELL	[4].VDG	86
EEG08105	34	PNVILATG	IAGTG	[13].VGVDKMIESVPELK	[3].NVRGEQVQIAS	ES	MTNDVWLKLAQRVNEEL	[4].VDG	117
EEU48991	44	PNITIFATG	IAGSA	[13].LGIKVLIDAVPELC	[3].NVRGEQVQIANV	ES	SDITSTILTNLTHQIQQL	[4].TGG	127
ACZ12201	20	PNVVILATG	IAGSG	[13].TGVDKLLQAVPELK	[3].NLSGEQVAQVAS	QD	ISTDIWLKLAQRVNSLL	[4].VDG	103
EAY64500	41	PRIAVLATG	IAGAA	[13].LGVNFLVDVAPALA	[3].RIDAEQVASIDS	KDL	ALPLWNTLAARDALM	[4].IDG	124
ACB74433	13	PRIRLATG	IAGAQ	[12].FSDALVAAPPQLA	[3].RLDVEQVAALGS	QD	DEGWLQLAARTEAAL	[4].IAG	95
Feature 1		###	#						
query	137	AVVTHG	DTLEETAFFLDATINC	GPVIVG	MRPSTAISADGPFNLL	LESV	TVAAS	[5].RGMIVMNDRIASAYTT	216
1HFJ_A	89	WVTHG	DTVEESAYFLHLTVKSDKPVV	FVA	MRPATAISADGPMNLL	EAV	RVAGD	[5].RGMVIVINDRIGSARYIT	168
1DJP_A	87	IVITHG	DTLEETAYFLNLVQKTDKPIV	VVGM	MRPGTAMSDGMLNLYNAV	AVASN	[5].KGVLTVMNDEIQSGRDVSK	166	
ACJ75594	82	VVTHG	DTLEETSILLDLTLKSEKPVV	CTA	MNRNIGELGTDGPRNVYSSV	LVLS	[5].MGMVCLNDEIHAAREVT	161	
EEX68565	87	WVTHG	DTMEETAYFLHLTVHSKAP	IVLTG	MRPATALSADGPMNLLQAV	RVAAT	[5].QGVIVLDGTIESARDAV	166	
EEG08105	118	WVTHG	DTIETAYFLDLTVKSKPVV	IVG	MRPSTAISADGPIINLYNAV	LLAGS	[5].KGVLTVDQINAGRDVTK	197	
EEU48991	128	VVTHG	DTLEESSFFLDLVQSDKPVV	VVGM	MRPATAISADGPIINLLSAVK	LAAS	[5].RGALITLNDRIASARYIT	207	
ACZ12201	104	WVTHG	DTMEETAYFLNLVKS	KPVV	MVGM	MRPGTAMSDGPMNLYDAV	LTAGS	[5].KGMIVLNDRIIAARDVQ	183
EAY64500	125	IVITHG	DTLEETAYALHLVVRGDKPVV	LVTA	MRPATALSADGPMNLLNAV	TVAAH	[5].QGVLVAFNRIHGARDVTK	204	
ACB74433	96	IVVTHG	DTMEETAFFLNLVRS	AKPVV	LVGM	MRPATAISADGPMNLYNAV	AVAAH	[5].RGLVVANDEIHFAREVA	175
Feature 1		###	#						
query	217	TNANTMDTFKA	[3].GYLGEMI	[3].PFFFYPPVQPTGKKD	[8].IPRVDILFSY	[2].MHN	DTLYNAIESGA	289	
1HFJ_A	169	TNASTLDTFRA	[3].GYLGVII	[3].IYYQNRIDKLHITRS	[9].LPKVDILVGY	[2].DPEY	LYDAAIQHG	242	
1DJP_A	167	SINIKTEAFKS	[2].GPLGMVV	[3].SYWFRLP	AKRHTVNS	[9].LPQVD	IAIYSY	[2].VTD	239
ACJ75594	162	TYTSNVATFDS	[3].GPLGIVD	[3].VIFFRKSL	TREKILV	[3].EERVAL	IKTF	[2].DDG	229
EEX68565	167	MHTALDITFQS	[3].GALGSVH	[3].PVFYRGP	LRRHTAQS	[9].LPRVA	ILYAH	[2].DDG	240
EEG08105	198	TNTSTADTFKT	[3].GFLGYMQ	[3].PHFYRLP	VRKHTAET	[9].LPQVD	IVYGY	[2].MNR	271
EEU48991	208	TNANALDITFKA	[3].GYLGAFF	[3].PVFYWYPP	VRPLGHY	[11].LPKVD	VLVGY	[2].VDPE	283
ACZ12201	184	TDSEI	IDITFKA	[3].GYLQIV	[3].VVFKNPL	LNKHTYES	[9].LPRVD	INVGY	257
EAY64500	205	TSTYAVDAFQS	[3].GALGWVQ	[3].VEFARRV	TRTRDITQL	[5].WPPVE	VVASY	[2].VTR	274
ACB74433	176	TNTYQLGTFRA	[3].GLAGVWN	[3].LHLYAPP	VRRHTCTS	[9].LPRVD	IVYAY	[2].MRE	249
Feature 1		#							
query	290	[1].GIVIAGAG	AVT	[2].FNYAIEDA	INR	[2].IPIIQSMRT	[2].GEVPL	[10].IAS	360
1HFJ_A	243	[1].GIVYAGMG	AGVVS	[2].GIAGMR	KALEK	[1].VVMRSTR	[2].GIVPP	[6].LVSD	308
1DJP_A	240	[1].ALIHAGT	GNVVS	[2].VVPALQ	LRKN	[1].TQIIRSSHV	[3].GFVLR	[11].VVA	311
ACJ75594	230	[1].GIILEG	FGRGVVP	[2].VAEAVE	EVKE	[2].IPVITSR	[2].GRVYP	[16].IMS	306
EEX68565	241	[1].GIVYAGMG	NGSIP	[2].AEAALARA	AAE	[1].VAVVRSTRS	[2].GRVTR	[10].IAS	310
EEG08105	272	[1].GIVQAGV	GDGMA	[2].MLPAF	FREARQK	[1].VIVVRSR	[2].GIVAR	[11].VVS	342
EEU48991	284	[1].GIVVAGV	GVAGVWP	[2].AKEALEE	EVVK	[2].VPVVRSTR	[2].GFVSG	[4].IN	348
ACZ12201	258	[1].GIVHAGAG	TAMSS	[2].VLPS	VEKATKK	[1].VAIVRTR	[2].GMINH	[11].IAG	328
EAY64500	275	[1].GLVWAGT	GNGLIH	[2].LQTLAD	AVNA	[1].VAVVRAS	[2].GHWMR	[11].VS	345
ACB74433	270	[1].GIVIAGV	GDGLN	[2].ALRAA	ADAQR	[1].VVIVRSR	[2].GVVER	[11].VAA	320
Feature 1		#							
query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373					
1HFJ_A	309	LALTRTSD	PKVIQ	321	Pectobacterium chrysanthemi				
1DJP_A	312	VAMTKTQD	SKELQ	324	Pseudomonas sp.				
ACJ75594	307	VVLGKTSN	LEEIR	319	Thermosipho africanus TCF52B				
EEX68565	311	LTLTQIDQ	TAAIR	323	Mitsuokella multacida DSM 20544				
EEG08105	343	LAMTKTND	TKKIQ	355	Chromobacterium sp. 2002				
EEU48991	349	LALAKLKP	AKEIK	361	Nectria haematococca mpVI 77-13-4				
ACZ12201	329	LGLTKSN	PKYLQ	341	Sulfurospirillum deleyianum DSM 6946				
EAY64500	346	LALANGMH	[1].RDALQ	359	Burkholderia cenocepacia PC184				
ACB74433	321	LALTKTPD	PRAVQ	333	Opiritutus terrae PB90-1				

B

Feature 2	query	52	PNITIFATGGTIAGSD	[13].VGVRALIDAVPSML	[3].NVAGVQIANVGS	#####	#	#####	#	5	MAG	136
1HFJ_A	5	PNIVILATGGTIAGSA	[13].LGVDTLINAVPEVK	[3].NVKGEQFSNMQAS	ENHFD	DDVLLKLSQRVNE	[4].VDG	88				Pectobacterium chrysant...
1DJP_A	3	ANVVILATGGTIAGAG	[13].VGVDKLIAGVPELA	[3].NVRGEQVMQIAS	ESIT	NDOLLKLGKRVAE	[4].VDG	86				Pseudomonas sp.
ACJ75594	2	KKVVILTTGGTIAMVK	[8].DKGSALISEIPSLK	[4].KIEVREFSNIPS	PHMT	PQKMWELSRIDEIQ	[4].VIG	81				Thermosiphon africanus T...
EEK68565	3	KHIYILATGGTIAGKA	[13].IGIADLLAAVPELR	[3].DVEGEQIASIDS	KDMT	SAIWLRLAARCKEL	[4].VDG	86				Mitsuokella multacida D...
EEG08105	34	PNVVILATGGTIAGTG	[13].VGVDKMLIESVPELK	[3].NVRGEQVQIAS	ESMT	NDVWLKLAQRVNE	[4].VDG	117				Chromobacterium sp. 2002
EEU48991	44	PNITIFATGGTIAGSA	[13].LGIKVLIDAVPELC	[3].NVRGVQIANVGS	SDIT	STIINLTHQIQAL	[4].TQG	127				Nectria haematococca mp...
ACZ12201	20	PNVVILATGGTIAGSG	[13].TGVDKLIQAVPELK	[3].NLSGEQVAQVAS	QDIS	TDIWLKLAQRVNE	[4].VDG	103				Sulfurospirillum deleyi...
EAY64500	41	PRIAVLATGGTIAGAA	[13].LGVNFLVAVPALA	[3].RIDAEQVASIDS	KDLAL	PLWNTLAARIDALM	[4].IDG	124				Burkholderia cenocepaci...
ACB74433	13	PRIRLLATGGTIAGAQ	[12].FSIDALVAVPQLA	[3].RLDVEQVAAGS	QDMLE	GVWLQAARTEAAL	[4].IAG	95				Opiritutus terrae PB90-1

Feature 2	query	137	AVVTHGDTLLEE	YAFFLDATINC	KPVI	IVGAMRP	STAISADG	PNLLES	VTVAAS	[5].RGAMIV	MNDRIAS	AYTT	#	216
1HFJ_A	89	VWITHGDTLLEE	YAFFLHLTVKSDK <td>PVVPV <td>AAMRP <td>ATAISADG <td>PMNLE <td>AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	PVVPV <td>AAMRP <td>ATAISADG <td>PMNLE <td>AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td></td></td></td></td>	AAMRP <td>ATAISADG <td>PMNLE <td>AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td></td></td></td>	ATAISADG <td>PMNLE <td>AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td></td></td>	PMNLE <td>AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td></td>	AVRV <td>VAGD</td> <td>[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td></td>	VAGD	[5].RGMV <td>VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td></td>	VINDRIG <td>SARYIT <td></td> <td>168</td> </td>	SARYIT <td></td> <td>168</td>		168
1DJP_A	87	ZVITHGDTLLEE	YAYFNLVQK <td>TDK <td>PVW <td>VGSMR <td>PGTAMS <td>ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	TDK <td>PVW <td>VGSMR <td>PGTAMS <td>ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	PVW <td>VGSMR <td>PGTAMS <td>ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td></td></td></td>	VGSMR <td>PGTAMS <td>ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td></td></td>	PGTAMS <td>ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td></td>	ADG <td>MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td></td>	MNLY <td>NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td></td>	NAV <td>VASN</td> <td>[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td></td>	VASN	[5].KGLV <td>TMDEIQ <td>SGRDV </td></td>	TMDEIQ <td>SGRDV </td>	SGRDV
ACJ75594	82	VWITHGDTLLEE	SYLDDLTKSEK <td>PVWCT <td>AAMRN <td>IGELG <td>TDGPR <td>PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	PVWCT <td>AAMRN <td>IGELG <td>TDGPR <td>PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	AAMRN <td>IGELG <td>TDGPR <td>PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td>	IGELG <td>TDGPR <td>PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td>	TDGPR <td>PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td></td>	PNV <td>YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td></td>	YSSV <td>LVLS</td> <td>[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td></td>	LVLS	[5].MGMV <td>CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td></td>	CLNDEI <td>HAARE <td>VTK</td> </td>	HAARE <td>VTK</td>	VTK
EEK68565	87	VWITHGDTLLEE	YAYFNLVHSAK <td>PVLT <td>GAMR <td>PATALS <td>ADG <td>PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	PVLT <td>GAMR <td>PATALS <td>ADG <td>PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	GAMR <td>PATALS <td>ADG <td>PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td></td></td></td>	PATALS <td>ADG <td>PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td></td></td>	ADG <td>PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td></td>	PMNL <td>QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td></td>	QAVR <td>VAAAT</td> <td>[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td></td>	VAAAT	[5].QGV <td>IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td></td>	IVLDG <td>TIES <td>SARDV </td></td>	TIES <td>SARDV </td>	SARDV
EEG08105	118	VWITHGDTLLEE	YAYFLDLTVKSK <td>KPVV <td>VGSMR <td>PSTAISADG <td>PNL <td>INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	KPVV <td>VGSMR <td>PSTAISADG <td>PNL <td>INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	VGSMR <td>PSTAISADG <td>PNL <td>INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td></td>	PSTAISADG <td>PNL <td>INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td></td></td>	PNL <td>INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td></td>	INLY <td>NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td></td>	NAV <td>VLAGS</td> <td>[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td></td>	VLAGS	[5].KGLV <td>LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td></td>	LTLDQ <td>INAGR <td>VTK</td> </td>	INAGR <td>VTK</td>	VTK
EEU48991	128	VWITHGDTLLEE	SFFLDLTVQSD <td>KPVW <td>VGSMR <td>PATAISADG <td>PN <td>L</td> <td>SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	KPVW <td>VGSMR <td>PATAISADG <td>PN <td>L</td> <td>SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td></td></td></td></td>	VGSMR <td>PATAISADG <td>PN <td>L</td> <td>SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td></td></td></td>	PATAISADG <td>PN <td>L</td> <td>SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td></td></td>	PN <td>L</td> <td>SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td></td>	L	SAVK <td>LAAS</td> <td>[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td></td>	LAAS	[5].RGAL <td>ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td></td>	ITLND <td>RIAS <td>ARYT</td> </td>	RIAS <td>ARYT</td>	ARYT
ACZ12201	104	VWITHGDTLLEE	YAYFNLVVKSK <td>KPVW <td>VGSMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	KPVW <td>VGSMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	VGSMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td></td></td></td>	PATAISADG <td>PMNL <td>V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td></td></td>	PMNL <td>V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td></td>	V <td>DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td></td>	DAVL <td>TAGS</td> <td>[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td></td>	TAGS	[5].KGMV <td>IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td></td>	IVLND <td>RI <td>AARDV</td> </td>	RI <td>AARDV</td>	AARDV
EAY64500	125	ZVITHGDTLLEE	YAYLHLVVRG <td>KPVV <td>L <td>AAMRP <td>TALS <td>SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	KPVV <td>L <td>AAMRP <td>TALS <td>SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td></td></td></td></td>	L <td>AAMRP <td>TALS <td>SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td></td></td></td>	AAMRP <td>TALS <td>SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td></td></td>	TALS <td>SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td></td>	SDG <td>PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td></td>	PNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td></td>	NAV <td>VAAH</td> <td>[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td></td>	VAAH	[5].QGV <td>L <td>VAFN</td> </td>	L <td>VAFN</td>	VAFN
ACB74433	96	ZVITHGDTLLEE	YAFFLNLVVRSA <td>KPVV <td>L <td>VGAMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td></td></td></td></td></td>	KPVV <td>L <td>VGAMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td></td></td></td></td>	L <td>VGAMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td></td></td></td>	VGAMR <td>PATAISADG <td>PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td></td></td>	PATAISADG <td>PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td></td>	PMNL <td>NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td></td>	NAV <td>VAAH</td> <td>[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td></td>	VAAH	[5].RGLV <td>L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td></td>	L <td>VANDEI <td>HFARE </td></td>	VANDEI <td>HFARE </td>	HFARE

Feature 2	query	217	TNANTMDTFKA	[3].GYLGE	MI	[3].PFFFY	PPVQ	PTGK	KKD	[8].IPR	VD	LS	[2].MND	LY	NA	IE	SGA	289
1HFJ_A	169	TNASTLDTFRA	[3].GYLGV <th>[3].IYYQ</th> <th>NRID</th> <th>KLHT</th> <th>TRS</th> <th>[9].LPK</th> <th>VD</th> <th>LV</th> <th>[2].DPE</th> <th>Y</th> <th>LD</th> <th>AA</th> <th>IQ</th> <th>GV</th> <th>242</th>	[3].IYYQ	NRID	KLHT	TRS	[9].LPK	VD	LV	[2].DPE	Y	LD	AA	IQ	GV	242	
1DJP_A	167	SINIKTEAFKS	[2].GPLGM	VV	[3].SYW	FR	LP	A	RHT	VNS	[9].LPO	VD	IA	SY	[2].VTD	Y	K	AA
ACJ75594	162	TYTSMWTFDS	[3].GPLG	IVD	[3].VIF	FR	KL	RE	KIL	V	[3].EER	VA	IA	IT	[2].DDG	LL	Y	AA
EEK68565	167	MHTALDTFQS	[3].GALGS	VH	[3].PVF	YR	GP	LR	RHT	AQS	[9].LPR	VA	IA	IA	[2].DDG	F	L	VE
EEG08105	198	TNISTADTFKT	[3].GFLGY	MQ	[3].PHF	YR	LP	VR	KHT	AET	[9].LPO	VD	LV	GV	[2].MNR	V	AL	D
EEU48991	208	TNANALDTFKA	[3].GYLGA	FE	[3].PVF	W	PP	VR	PL	GHY	[11].LPK	VD	LV	GV	[2].VDP	EL	F	E
ACZ12201	184	TDSITDITDKA	[3].GYLGV	IV	[3].VVF	FN	PN	LN	KHT	YES	[9].LPR	VD	IA	SY	[2].DSG	V	I	D
EAY64500	205	TSTYAVDAFQS	[3].GALGW	Q	[3].VEF	ARR	TR	TR	D	QL	[5].WPP	VE	V	AS	[2].VTR	A	V	D
ACB74433	176	TNITQLGTFRA	[3].GLAG	VVN	[3].LHL	Y	AP	VR	RHT	CTS	[9].LPR	VD	LV	AY	[2].MGR	E	L	D

Feature 2	query	290	[1].GIV	IAG	AG	GV	[2].FN	Y	A	I	E	D	A	I	N	[2].I	P	I	Q
1HFJ_A	243	[1].GIVYAG <th>MG</th> <th>AG</th> <th>SV</th> <th>[2].GI</th> <th>AG</th> <th>MR</th> <th>K</th> <th>A</th> <th>L</th> <th>E</th> <th>K</th> <th>[1].V</th> <th>V</th> <th>M</th> <th>R</th> <th>S</th> <th>R</th>	MG	AG	SV	[2].GI	AG	MR	K	A	L	E	K	[1].V	V	M	R	S	R
1DJP_A	240	[1].AL <th>I</th> <th>H</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>T</th> <th>G</th> <th>S</th> <th>V</th> <th>[2].V</th> <th>P</th> <th>A</th> <th>L</th> <th>Q</th> <th>L</th> <th>R</th> <th>K</th> <th>N</th>	I	H	A	G	T	G	S	V	[2].V	P	A	L	Q	L	R	K	N
ACJ75594	230	[1].G <th>I</th> <th>L</th> <th>E</th> <th>G</th> <th>F</th> <th>O</th> <th>R</th> <th>G</th> <th>N</th> <th>V</th> <th>[2].V</th> <th>A</th> <th>E</th> <th>A</th> <th>E</th> <th>V</th> <th>I</th>	I	L	E	G	F	O	R	G	N	V	[2].V	A	E	A	E	V	I
EEK68565	241	[1].G <th>I</th> <th>V</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>M</th> <th>I</th> <th>N</th> <th>G</th> <th>[2].A</th> <th>E</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>[1].V</th> <th>A</th> <th>V</th>	I	V	A	G	M	I	N	G	[2].A	E	A	A	A	A	[1].V	A	V
EEG08105	272	[1].G <th>I</th> <th>V</th> <th>Q</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>V</th> <th>D</th> <th>G</th> <th>[2].M</th> <th>L</th> <th>P</th> <th>A</th> <th>F</th> <th>R</th> <th>A</th> <th>R</th> <th>Q</th>	I	V	Q	A	G	V	D	G	[2].M	L	P	A	F	R	A	R	Q
EEU48991	284	[1].G <th>I</th> <th>V</th> <th>V</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>V</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>[2].A</th> <th>K</th> <th>E</th> <th>A</th> <th>E</th> <th>E</th> <th>V</th> <th>V</th> <th>K</th>	I	V	V	A	G	V	A	G	[2].A	K	E	A	E	E	V	V	K
ACZ12201	258	[1].G <th>I</th> <th>V</th> <th>H</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>A</th> <th>T</th> <th>S</th> <th>[2].V</th> <th>L</th> <th>P</th> <th>S</th> <th>V</th> <th>E</th> <th>K</th> <th>A</th> <th>T</th>	I	V	H	A	G	A	T	S	[2].V	L	P	S	V	E	K	A	T
EAY64500	275	[1].G <th>L</th> <th>V</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>T</th> <th>G</th> <th>S</th> <th>[2].L</th> <th>Q</th> <th>T</th> <th>A</th> <th>L</th> <th>A</th> <th>D</th> <th>A</th> <th>V</th> <th>N</th>	L	V	A	G	T	G	S	[2].L	Q	T	A	L	A	D	A	V	N
ACB74433	250	[1].G <th>I</th> <th>V</th> <th>I</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>V</th> <th>D</th> <th>G</th> <th>[2].A</th> <th>L</th> <th>R</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>A</th> <th>Q</th>	I	V	I	A	G	V	D	G	[2].A	L	R	A	A	A	A	A	Q

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL	AK	KL	P
ACZ12201	329	LGL	T	K	SNN
EAY64500	346	LAL	ANG	MH	[1].RDALQ
ACB74433	321	LAL	T	K	TPD

Feature 2	query	361	LLLAKSSN	ITEIA	373
1HFJ_A	309	LAL	TR	TS	DK
1DJP_A	312	VAM	TK	TQ	SKELQ
ACJ75594	307	VVL	G	K	TSN
EEK68565	311	LTL	L	Q	TD
EEG08105	343	LAM	T	K	TND
EEU48991	349	LAL			

4. CONCLUSÃO

A sequência do gene da L-asparaginase do fungo filamentoso *P. sizovae* isolado do solo do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro foi identificada por homologia às sequências prováveis de L-asparaginase depositadas em bancos de dados das espécies *P. citrinum* e *P. steckii* pertencentes à mesma classe Citrina que *P. sizovae*. O gene nativo e parcial (com depleção dos primeiros 20 aminoácidos) da L-asparaginase foi clonado na levedura *K. phaffii* com vetor pPICZ α A a fim de obter uma expressão heteróloga extracelular incrementada de enzima. A atividade biológica da L-asparaginase parcial foi preservada intracelularmente, em menor valor para o clone Mut^s testado (1,59 U/g_{célula}) e em maior nível para o clone Mut^t testado (3,05 U/g_{célula}) em meio de cultivo BMM. A L-asparaginase não foi detectada no meio extracelular apesar da remoção dos primeiros 20 aminoácidos que direcionam a enzima ao espaço periplasmático e adição do fator α de *S. cerevisiae*, embora sua presença ter sido confirmada por SDS-PAGE. É possível que a enzima tenha sofrido alguma modificação para uma forma inativa devido à ausência de chaperonas conservadas dentro do espaço periplasmático responsáveis pela proteção das proteínas contra o estresse de dobramento, desnaturação e agregação. O *pI* teórico da L-asparaginase de *P. sizovae* é de 4,93 e sua massa molecular teórica, calculada a partir da hipótese de se ser uma proteína tetramérica, é de 160.292 kDa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de diferentes amostras do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro frente à produção de L-asparaginase de interesse industrial e farmacêutico.

Vinte e duas espécies fúngicas isoladas do solo e dezoito espécies fúngicas isoladas de folhas de plantas do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro foram selecionadas para as triagens qualitativa em meio sólido e quantitativa em fermentação submersa da produção de L-asparaginase. Das cinco espécies nas quais foram obtidos os maiores níveis de atividade da L-asparaginase, três espécies que obtiveram os menores valores de atividade da glutaminase foram selecionadas. Destas, duas foram identificadas por técnicas de biologia molecular como *P. sizovae* e *Fusarium proliferatum*. O planejamento estatístico por Plackett-Burman visou a triagem de fatores essenciais ao crescimento fúngico (fontes de carbono, fontes de nitrogênio, temperatura e tamanho do inóculo) para incrementar a produtividade da enzima. Os maiores níveis de atividade de L-asparaginase obtidos por *F. proliferatum* e *P. sizovae* no planejamento experimental Plackett-Burman Design foram $1,86 \pm 0,12$ U/mL e $3,68 \pm 0,14$ U/mL, respectivamente. Concluiu-se que *F. proliferatum* produz mais L-sparaginase em meio rico de fonte de carbono (glicose e extrato de malte) com a maior quantidade de inóculo, enquanto *P. sizovae* produz mais L-asparaginase em meio de cultivo pobre em fonte de carbono (ausência de glicose, sacarose e extrato de malte) com a menor quantidade de inóculo, concluindo que estas fontes de carbono atuam como repressoras da síntese enzimática. A comparação dos parâmetros cinéticos calculados antes e após o planejamento experimental revelou que a seleção dos fatores que influenciam na produção de L-asparaginase por Plackett-Burman Design aumentou a produtividade da enzima 3 vezes por *F. proliferatum* e 4 vezes por *P. sizovae*, aumentou o rendimento da enzima específica 6 vezes por *F. proliferatum* e 5 vezes por *P. sizovae* e o fator de conversão de biomassa na enzima aumentou 6 vezes em *F. proliferatum*, enquanto *P. sizovae* aumentou 10 vezes, portanto, esta espécie foi selecionada como a melhor produtora de L-asparaginase.

A avaliação do método mais eficiente para o rompimento celular visou promover maior liberação da L-asparaginase do espaço periplasmático para o meio extracelular.

O método mecânico por maceração do micélio com gral e pistilo liberou mais enzima do que o método físico por sonicação, o que foi comprovado por visualização de uma maior destruição dos conidósporos de *P. sizovae* em imagens de microscopia eletrônica de varredura.

O extrato bruto de *P. sizovae* foi submetido à métodos não cromatográficos de precipitação de proteínas por adição de solvente orgânico (acetona e metanol) e sulfato de amônio a fim de purificar a L-asparaginase nativa. A enzima foi semi-purificada, apresentando aproximadamente 40,7 kDa por emprego dos métodos cromatográficos de gel filtração seguida de troca iônica.

A sequência genética da L-asparaginase de *P. sizovae* foi identificada por homologia a sequências de espécies fúngicas da mesma classe taxonômica (*P. citrinum* e *P. steckii*). O vetor pPICZαA com o fator α para expressão secretada foi selecionado para inserção do gene da enzima de interesse em sua sequência nativa e parcial, sendo esta com depleção dos 20 primeiros aminoácidos, transformado em células de *K. phaffii* X-33, sendo este o primeiro trabalho publicado sobre clonagem do gene da L-asparaginase de um fungo filamentoso em uma levedura, tornando-o inédito. O clone selecionado apresentou atividade da L-asparaginase em células (3,05 U/g_{célula}) cinco vezes superior àquela obtida pelo fungo nativo na triagem inicial (0,6 U/g_{célula}), entretanto as células de *K. phaffii* não foram submetidas a nenhum método de rompimento celular, que visa liberar a enzima do meio intracelular, ou de otimização de meio de cultivo para expressão, que objetivam incrementar a produção da enzima.

A comparação com proteínas já cristalizadas que já tenham sido depositadas em bases de dados foi realizada a fim de determinar a estrutura secundária ou terciária da L-asparaginase de *P. sizovae*, em que as mais próximas são aquelas com atividade de L-asparaginase ou glutaminase, o que denota conservação do sítio catalítico. A L-asparaginase cristalizada mais similar à sequência de *P. sizovae* é a sintetizada pelo microrganismo *Dickeya chrysanthemi* (sin. *Erwinia chrysanthemi*). Pelo grau de conservação observado de sítios ativos nessas estruturas, pode-se inferir que a L-asparaginase de *P. sizovae* tenha atividade de asparaginase tipo II (periplasmática, com maior atividade de L-asparaginase em relação à atividade de glutaminase) e que seja um dímero-dímero, ou seja um tetrâmero. A computação do pl teórico da L-asparaginase parcial de *P. sizovae* é de 4,93 e sua massa molecular teórica é de 40073,46 Da, que por se tratar de uma proteína tetramérica, estima-se que sua massa molecular seja de 160 kDa.

Este trabalho demonstrou que produtores de L-asparaginase de origem eucariótica, tais como *P. sizovae* e *F. proliferatum*, com baixa atividade de glutaminase isolado de um *hotspot* de biodiversidade global podem levar a uma potencial produção da enzima L-asparaginase com características funcionais desejadas para uma melhoria nas aplicações terapêuticas de LLA. Além de ser a primeira vez que será relatado na literatura a produção heteróloga da enzima L-asparaginase de fungo filamentosos por *K. phaffii*.

No entanto, dar continuidade na avaliação dos clones obtidos neste estudo é necessário, assim como dar sequência a purificação e caracterização da enzima clonada em *K. phaffii*, a fim de determinar pH ótimo, temperatura ótima, massa molar, estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos – ΔG , ΔH e E_a da enzima. Adicionalmente, avaliar a citotoxicidade da L-Asparaginase em células normais e leucêmicas humanas, identificando as concentrações que causam morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL BAKY, H. H.; EL BAROTY, G. S. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2016, p. 1785938, 2016.
- ACS. KEY STATISTICS FOR ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (ALL). The American Cancer Society, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2018a.
- ACS. WHAT IS ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (ALL)? The American Cancer Society, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/what-is-all.html>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2018b.
- ACS. CHEMOTHERAPY FOR CHILDHOOD LEUKEMIA. The American Cancer Society, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children/treating/chemotherapy.html#written_by>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2019.
- ACS. LEUKEMIA IN CHILDREN. The American Cancer Society, 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children.html>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2020.
- AKILANDESWARI, K.; KAVITHA, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Production of bioactive enzyme L-asparaginase from fungal isolates of water sample through submerged fermentation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4, n. SUPPL. 4, p. 363-366, 2012. Article.
- ALBERTSEN, B. K.; SCHRODER, H.; JAKOBSEN, P.; AVRAMIS, V. I. *et al.* Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase. **Med. Pediatr. Oncol.**, 38, n. 5, p. 310-316, May 2002.
- ALBRECHT, J.; NORENBURG, M. D. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. **Hepatology**, 44, n. 4, p. 788-794, Oct 2006.
- ALLEN, W. J.; PHAN, G.; WAKSMAN, G. Structural Biology of Periplasmic Chaperones. In: MCPHERSON, A. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**: Academic Press, 2009. v. 78, p. 51-97.
- ALMEIDA, R. P. C. **Avaliação da produção de L- Asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado. 2015. 88 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)—Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.**
. 2015. -.
- AMENA, S.; VISHALAKSHI, N.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A. *et al.* Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Braz. J. Microbiol.**, 41, n. 1, p. 173-178, Jan 2010.
- ASHOK, A.; DORIYA, K.; RAO, J. V.; QURESHI, A. *et al.* Microbes producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of antarctic soil and moss. **Sci. Rep.**, 9, n. 1, p. 1423, 2019/02/05 2019.

ASSELIN, B. L.; WHITIN, J. C.; COPPOLA, D. J.; RUPP, I. P. *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**, 11, n. 9, p. 1780-1786, 1993.

ASTHANA, N.; AZMI, W. Microbial L-Asparaginase: A Potent Antitumour Enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, 2, p. 184-194, 2003.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer Res.**, 32, n. 7, p. 2423-2437, Jul 2012.

AVRAMIS, V. I.; SENCER, S.; PERICLOU, A. P.; SATHER, H. *et al.* A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, 99, n. 6, p. 1986-1994, Mar 15 2002.

AW, R. Factors Affecting the Specific Productivity of *Pichia pastoris*. Imperial College London. Department of Cell and Molecular Biology. . 2012.

BACON, C. W. Procedure for isolating the endophyte from tall fescue and screening isolates for ergot alkaloids. **Appl Environ Microbiol**, 54, n. 11, p. 2615-2618, Nov 1988.

BAHREINI, E.; AGHAIYPOUR, K.; ABBASALIPOURKABIR, R.; GOODARZI, M. T. *et al.* An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, 44, n. 5, p. 510-528, 2014.

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

BARNES, W. R.; DORN, G. L.; VELA, G. R. Effect of culture conditions on synthesis of L-asparaginase by *Escherichia coli* A-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, 33, n. 2, p. 257-261, Feb 1977.

BARROS, T.; BRUMANO, L.; FREITAS, M.; PESSOA JR, A. *et al.* Development of processes for recombinant L-asparaginase II production by *Escherichia coli* BL21 (DE3): from shaker to bioreactors. **Pharmaceutics**, 12, 2020.

BASCOMB, S.; BANKS, G. T.; SKARSTEDT, M. T.; FLEMING, A. *et al.* The properties and large-scale production of L-asparaginase from *Citrobacter*. **J. Gen. Microbiol.**, 91, n. 1, p. 1-16, Nov 1975.

BASHA, N. S.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from Marine Actinomycetes by Solid-state and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 8, n. 4, p. 353-360, Aug 2009.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Application of latin square design for the evaluation and screening of supplementary nitrogen source for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Indian Journal of Science and Technology**, 2, n. 12, p. 50-54, 2009a. Article.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Statistical screening of process variables for the production of L-asparaginase from cornflour by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 in submerged fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, 2, n. 5, p. 45-48, 2009b. Article.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of Media Components and Operating Conditions for Exogenous Production of Fungal L-asparaginase. **Chiang Mai Journal of Science**, 38, n. 2, p. 270-279, Apr 2011a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Statistical and evolutionary optimisation of operating conditions for enhanced production of fungal L-asparaginase. **Chemical Papers**, 65, n. 6, p. 798-804, Dec 2011b.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L -asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pac. J. Chem. Eng.**, 7, n. 2, p. 212-220, 2012. Article.

BASKAR, G.; SRIHARINI, C.; SRIPRIYA, R.; RENGANATHAN, S. Statistical Screening of Supplementary Nitrogen Source for Enhanced Production of L-Asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, 24, n. 4, p. 467-472, Dec 2010.

BILIMORIA, M. H. Conditions for the production of L-asparaginase 2 by coliform bacteria. **Applied microbiology**, 18, n. 6, p. 1025-1030, 1969.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BON, E. P. S.; CARVAJAL, E.; STANBROUGH, M.; ROWEN, D. *et al.* Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae* - GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 63-5, p. 203-212, Spr 1997.

BOYSE, E. A.; OLD, L. J.; CAMPBELL, H. A.; MASHBURN, L. T. SUPPRESSION OF MURINE LEUKEMIAS BY L-ASPARAGINASE : INCIDENCE OF SENSITIVITY AMONG LEUKEMIAS OF VARIOUS TYPES: COMPARATIVE INHIBITORY ACTIVITIES OF GUINEA PIG SERUML-ASPARAGINASE AND ESCHERICHIA COLI L-ASPARAGINASE. **J Exp Med**, 125, n. 1, p. 17-31, Jan 1 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde garante medicamento contra leucemia infantil, 2013. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/4480-saude-garante-medicamento-contra-leucemia-infantil>>. Acesso em: 13 de agosto de 2017. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério fez consulta mundial para compra de asparaginase, 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27975-ministerio-fez-consulta-mundial-para-compra-de-asparaginase>>. Acesso em: 13 de agosto de 2017. 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa Conjunta n01/2017 - DAF/SCTIE/MS e DAET/SAS/MS. 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério passará a pagar hospitais por fases da quimioterapia de Leucemia (LLA), 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-passara-a-pagar-hospitais-por-fases-da-quimioterapia-de-leucemia-lla>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota – Autorização para importação da L-Asparaginase, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/nota--autorizacao-para-importacao-da-l-asparaginase>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2018b.

BRASIL. Ministério da Economia. Painel de Preços - Materiais. Disponível em: <<https://paineldeprecos.planejamento.gov.br/analise-materiais>> Acesso em: 3 de dezembro de 2020. 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – Brasília 2020b.** Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/assistencia-farmaceutica/medicamentos-rename>.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, 191, n. 4793, p. 1114-1115, 1961.

BROWN, L.; WOLF, J. M.; PRADOS-ROSALES, R.; CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nat Rev Microbiol**, 13, n. 10, p. 620-630, Oct 2015.

BRUMANO, L. P.; DA SILVA, F. V. S.; COSTA-SILVA, T. A.; APOLINÁRIO, A. C. *et al.* Development of L-Asparaginase Biobetters: Current Research Status and Review of the Desirable Quality Profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 6, n. 212, 2019-January-10 2019. Review.

CACHUMBA, J. J. M.; ANTUNES, F. A. F.; PERES, G. F. D.; BRUMANO, L. P. *et al.* Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Braz. J. Microbiol.**, 47, n. Suppl 1, p. 77-85, 10/27 08/22/received 09/06/accepted 2016.

CANTOR, J. R.; STONE, E. M.; CHANTRANUPONG, L.; GEORGIU, G. The human asparaginase-like protein 1 hASRGL1 is an Ntn hydrolase with beta-aspartyl peptidase activity. **Biochemistry**, 48, n. 46, p. 11026-11031, Nov 24 2009.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, 91, n. 3, p. 553-556, 1999/05/01 1999.

CARUSO, V.; IACOVIELLO, L.; DI CASTELNUOVO, A.; STORTI, S. *et al.* Venous thrombotic complications in adults undergoing induction treatment for acute lymphoblastic leukemia: results from a meta-analysis. **J. Thromb. Haemost.**, 5, n. 3, p. 621-623, Mar 2007.

CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; WILLIAMSON, P.; RODRIGUES, M. L. Vesicular transport across the fungal cell wall. **Trends in Microbiology**, 17, n. 4, p. 158-162, 2009/04/01/ 2009.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Localization of the two-L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, 242, n. 16, p. 3753-3755, Aug 25 1967.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, 24, n. 1, p. 45-66, Jan 2000.

CHAN, W. K.; LORENZI, P. L.; ANISHKIN, A.; PURWAHA, P. *et al.* The glutaminase activity of L-asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. **Blood**, 123, n. 23, p. 3596-3606, 10/28/received 03/17/accepted 2014.

CHANAKYA, P.; NAGARJUN, V.; SRIKANTH, M. Production of a tumour inhibitory enzyme, L-asparaginase through solid state fermentation using *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 7, n. 2, p. 189-192, 2011.

CHITYALA, S.; VENKATA DASU, V.; AHMAD, J.; PRAKASHAM, R. S. High yield expression of novel glutaminase free L-asparaginase II of *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 in *Bacillus subtilis* WB800N. **Bioprocess Biosyst Eng**, 38, n. 11, p. 2271-2284, Nov 2015.

CHOW, Y. Y.; TING, A. S. Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of Advanced Research**, 6, n. 6, p. 869-876, Nov 2015.

COSTA-SILVA, T. A.; FLORES-SANTOS, J. C.; FREIRE, R. K. B.; VITOLO, M. *et al.* Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Prep. Biochem. Biotechnol.**, p. 1-11, Jul 11 2018.

COSTA, I. M.; SCHULTZ, L.; DE ARAUJO BIANCHI PEDRA, B.; LEITE, M. S. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Sci Rep**, 6, p. 36239, Nov 8 2016.

CREDALI, A.; GARCIA-CALDERON, M.; DAM, S.; PERRY, J. *et al.* The K⁺-dependent asparaginase, NSE1, is crucial for plant growth and seed production in *Lotus japonicus*. **Plant Cell Physiol**, 54, n. 1, p. 107-118, Jan 2013.

DA ROCHA, W. R. V.; COSTA-SILVA, T. A.; AGAMEZ-MONTALVO, G. S.; FEITOSA, V. A. *et al.* Screening and optimizing fermentation production of l-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **J Appl Microbiol**, 126, n. 5, p. 1426-1437, May 2019.

DAS MURTEY, M.; RAMASAMY, P. Sample preparations for scanning electron microscopy – Life Sciences, Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences, Milos Janecek and Robert Kral, IntechOpen <https://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/sample-preparations-for-scanning-electron-microscopy-life-sciences>. 2016.

DE FREITAS, M. M.; SOUZA, P. M.; CRUVINEL, K.; BARROS, T. *et al.* Interferences that impact measuring optimal L-asparaginase activity and consequent errors interpreting these data. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 103, n. 13, p. 5161-5166, Jul 2019.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, 27, n. 3, p. 297-306, May-Jun 2009.

DEVI, S.; AZMI, W. One step purification of glutaminase free L-asparaginase from *Erwinia carotovora* with anticancerous activity. **International Journal of Life Science & Pharma Research**, 2, n. 3, p. 36-45, 2012.

DIAS, F. F. G.; DE CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G. *et al.* Simplex centroid mixture design to improve l-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4, n. 4, p. 528-534, 10// 2015.

DIAS, F. F. G.; RUIZ, A. L. T. G.; TORRE, A. D.; SATO, H. H. Purification, characterization and antiproliferative activity of l-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6, n. 9, p. 785-794, 2016/09/01/ 2016.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 6, p. 33-39, Apr 2016.

DIETERICH, D. C.; LANDWEHR, M.; REISSNER, C.; SMALLA, K. H. *et al.* Gliap--a novel untypical L-asparaginase localized to rat brain astrocytes. **J Neurochem**, 85, n. 5, p. 1117-1125, Jun 2003.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of l-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, 6, n. 2, Dec 2016.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol.**, 98, n. 2, p. 493-501, 1977.

DRAINAS, C.; PATEMAN, J. A. L-Asparaginase activity in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Society Transactions**, 5, n. 1, p. 259-261, 1977. Article.

DUNLOP, P. C.; MEYER, G. M.; ROON, R. J. Reactions of asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. A mechanistic analysis of hydrolysis and hydroxylaminolysis. **Journal of Biological Chemistry**, 255, n. 4, p. 1542-1546, 1980. Article.

DUTTA, S.; GHOSH, S.; PRAMANIK, S. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 51, n. 4, p. 425-431, Jul 2015.

EISELE, N.; LINKE, D.; BITZER, K.; NA'AMNIEH, S. *et al.* The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource Technology**, 102, n. 3, p. 3316-3321, 2// 2011.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Bot. Rev.**, 38, n. 2, p. 201-341, 1972/04/01 1972.

EL-REFAI, H. A.; EL-SHAFAI, M. S.; MOSTAFA, H.; EL-REFAI, A. M. H. *et al.* Statistical optimization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase production by *Penicillium cyclopium*. **Curr. Trends Biotechnol. Pharm.**, 8, n. 2, p. 130-142, 2014. Article.

EL-SHARKAWY, A. S.; FARAG, A. M.; EMBABY, A. M.; SAEED, H. *et al.* Cloning, expression and characterization of aeruginosa EGYII L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain EGYII DSM 101801 in *E.coli* BL21(DE3) pLysS. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 132, p. 16-23, Oct 2016.

ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; ABOUZEID, M. A.-E.; MAHMOUD, D. A. *et al.* Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, 2, n. 3, p. 158-174, 2012.

ERENLER, S. O.; GECKIL, H. Effect of vitreoscilla hemoglobin and culture conditions on production of bacterial L-asparaginase, an oncolytic enzyme. **Appl Biochem Biotechnol**, 173, n. 8, p. 2140-2151, Aug 2014.

EVANS, W. E.; TSIATIS, A.; RIVERA, G.; MURPHY, S. B. *et al.* Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma. **Cancer**, 49, n. 7, p. 1378-1383, 1982.

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*. **Egypt. J. Aquat. Res.**, 41, n. 4, p. 295-302, 2015. Article.

FENG, Y.; LIU, S.; JIAO, Y.; GAO, H. *et al.* Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. **Appl Microbiol Biotechnol**, 101, n. 4, p. 1509-1520, Feb 2017.

FERRARA, M. A.; SEVERINO, N. M. B.; MANSURE, J. J.; MARTINS, A. S. *et al.* Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, 39, n. 7, p. 1457-1463, Nov 2006.

FERRARA, M. A.; SEVERINO, N. M. B.; VALENTE, R. H.; PERALES, J. *et al.* High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, 47, n. 3, p. 71-76, Aug 2010.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol. Ecol.**, 2, n. 2, p. 113-118, Apr 1993.

GERVAIS, D.; FOOTE, N. Recombinant deamidated mutants of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase have similar or increased activity compared to wild-type enzyme. **Mol Biotechnol**, 56, n. 10, p. 865-877, Oct 2014.

GHOSHON, M. B.; BERENJIAN, A.; HEMMATI, S.; DABBAGH, F. *et al.* Extracellular Production of Recombinant L-Asparaginase II in *Escherichia coli*: Medium Optimization Using Response Surface Methodology. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 21, n. 4, p. 487-495, Dec 2015.

GILBERT, H. J.; BLAZEK, R.; BULLMAN, H. M.; MINTON, N. P. Cloning and expression of the *Erwinia chrysanthemi* asparaginase gene in *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. **J Gen Microbiol**, 132, n. 1, p. 151-160, Jan 1986.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GONÇALVES, A. B.; MAIA, A. C. F.; RUEDA, J. A.; VANZELA, A. P. d. F. C. Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. **Acta Scientiarum**, 38, n. 4, p. 387-394, 2016.

GOODSELL, D. S. The molecular perspective: L-asparaginase. **Oncologist**, 10, n. 3, p. 238-239, Mar 2005.

GREENBERG, D. M.; BLUMENTHAL, G.; RAMADAN, M. E. Effect of administration of the enzyme glutaminase on the growth of cancer cells. **Cancer Res.**, 24, p. 957-963, Jul 1964.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Segunda ed. Wiley-Liss, 1994.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. **Lett. Appl. Microbiol.**, 24, n. 1, p. 23-26, 1997. Article.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Jornal de Pediatria**, 84, p. S52-S57, 2008.

HATANAKA, T.; USUKI, H.; ARIMA, J.; UESUGI, Y. *et al.* Extracellular production and characterization of two *Streptomyces* L-asparaginases. **Appl Biochem Biotechnol**, 163, n. 7, p. 836-844, Apr 2011.

HEITINK-POLLE, K. M.; PRINSEN, B. H.; DE KONING, T. J.; VAN HASSELT, P. M. *et al.* High incidence of symptomatic hyperammonemia in children with acute lymphoblastic leukemia receiving pegylated asparaginase. **JIMD Rep.**, 7, p. 103-108, 2013.

HENDRIKSEN, H. V.; KORNBURST, B. A.; OSTERGAARD, P. R.; STRINGER, M. A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **J Agric Food Chem**, 57, n. 10, p. 4168-4176, May 27 2009.

HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. **Mycologia**, 97, n. 6, p. 1316-1329, Nov-Dec 2005.

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

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Stud. Mycol.**, 70, n. 1, p. 53-138, Nov 15 2011.

HOUBRAKEN, J.; KOCSUBÉ, S.; VISAGIE, C. M.; YILMAZ, N. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Stud. Mycol.**, 2020/06/27/ 2020.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Stud Mycol**, 70, n. 1, p. 1-51, Nov 15 2011.

HUANG, L.; LIU, Y.; SUN, Y.; YAN, Q. *et al.* Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, 80, n. 5, p. 1561-1569, 2014. Article.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro organisms. **Journal of General Microbiology**, 76, n. 1, p. 85-99, 1973. Article.

INCA. **Câncer da criança e adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade.** 2008. 220 p.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Instituto Ronald McDonald. – 2. ed. rev. ampl., 3. reimp. – Rio de Janeiro: Inca, 2014. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diagnostico-precoce-na-crianca-e-no-adolescente.pdf>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2020. 2014.

INCA. Leucemia, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2020. 2020.

JALGAONWALA, R. E.; MAHAJAN, R. T. Production of anticancer enzyme asparaginase from endophytic *Eurotium* Sp. isolated from rhizomes of *Curcuma longa*. **European Journal of Experimental Biology**, 4, n. 3, p. 36-43, 2014.

JEONG, R. D.; SHIN, E. J.; CHU, E. H.; PARK, H. J. Effects of ionizing radiation on postharvest fungal pathogens. **Plant. Pathol. J.**, 31, n. 2, p. 176-180, Jun 2015.

KARAMITROS, C. S.; KONRAD, M. Bacterial co-expression of the alpha and beta protomers of human L-asparaginase-3: Achieving essential N-terminal exposure of a catalytically critical threonine located in the beta-subunit. **Protein Expr Purif**, 93, p. 1-10, Jan 2014.

KEATING, M. J.; HOLMES, R.; LERNER, S.; HO, D. H. L-asparaginase and PEG asparaginase—past, present, and future. **Leuk. Lymphoma**, 10, n. sup1, p. 153-157, 1993.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum: I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **J Exp Med**, 98, n. 6, p. 565-582, Nov 30 1953a.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum: II. Studies on the nature of the active serum constituent: Histological mechanism of the regression: Tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells *in vitro*: Discussion. **J Exp Med**, 98, n. 6, p. 583-606, Nov 30 1953b.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial**. Segunda edição ed. 2020.

KOLTHOFF, I. M.; LEUSSING, D. L.; LEE, T. S. Reaction of ferrous and ferric iron with 1,10-phenanthroline. III. The ferrous monophenanthroline complex and the colorimetric determination of phenanthroline. **Journal of the American Chemical Society**, 72, n. 5, p. 2173-2177, 1950/05/01 1950.

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**, 46, n. 3, p. 281-287, 2016. Article.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 124, p. 83-91, 2016/02/01/ 2016.

KUMAR, R.; SEDOLKAR, V. K.; TRIVENI, A. G.; KUMAR, M. S. *et al.* Isolation, screening and characterization of L-asparaginase producing fungi from medicinal plants. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 8, n. 1, p. 281-283, 2016. Article.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.**, 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KURTZBERG, J.; ASSELIN, B.; BERNSTEIN, M.; BUCHANAN, G. R. *et al.* Polyethylene Glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (POG 8866). **J Pediatr Hematol Oncol**, 33, n. 8, p. 610-616, Dec 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 15 1970.

LI, R. J.; JIN, R.; LIU, C.; CAO, X. *et al.* FDA Approval Summary: Calaspargase Pegol-mknl For Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Young Adults. **Clin Cancer Res**, 26, n. 2, p. 328-331, Jan 15 2020.

LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* Pers: SF Grey. **J. Microbiol. Biotech. Food. Sci.**, 4, n. 4, p. 310-316, 2015.

LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. **Mol. Biol. Evol.**, 16, p. 1799-1808, 01/01 2000.

LOPES, A. M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; RIBEIRO, A.; TAIRUM, C. A., Jr. *et al.* Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Crit. Rev. Biotechnol.**, p. 1-18, Dec 23 2015.

LOUREIRO, C. B.; BORGES, K. S.; ANDRADE, A. F.; TONE, L. G. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. **Advances in Microbiology**, 2, n. 2, p. 138-145, 2012.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C., Jr. TUMOR INHIBITORY EFFECT OF L-ASPARAGINASE FROM *ESCHERICHIA COLI*. **Arch Biochem Biophys**, 105, p. 450-452, May 1964.

MATTANOVICH, D. Genome Database of the *Pichia pastoris*. Disponível em: <<http://pichiagenome-ext.boku.ac.at:8080/apex/f?p=100:1>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2021. 2021.

MEDAWAR, C. V.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. d. M.; COSTA, T. M. A. d. PEG-asparaginase and native *Escherichia coli* L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: a systematic review. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 42, p. 54-61, 2020.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Purification and Characterization of Therapeutic Enzyme L-Asparaginase from a Tropical Soil Fungal Isolate *Fusarium Culmorum* ASP-87. **MOJ Proteomics & Bioinformatics**, 2, n. 6, 2015.

MESQUITA, P. G. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* : busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.** 2011. x, 102 f., il. **Dissertação(Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília.** 2011. -.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T., 2010, New Orleans, LA. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". 1–8.

MILLER, S. I.; SALAMA, N. R. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. **PLOS Biology**, 16, n. 1, p. e2004935, 2018.

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

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

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, 43, p. 150-158, 5// 2013.

MOHAPATRA, B. R.; BAPUJI, M.; BANERJEE, U. C. Production and properties of L-asparaginase from *Mucor* species associated with a marine sponge (*Spirastrella* sp.). **Cytobios**, 92, n. 370-371, p. 165-173, 1997.

MS. **Ministério fez consulta mundial para compra de asparaginase.** 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27975-ministerio-fez-consulta-mundial-para-compra-de-asparaginase>. Acesso em: 13 de agosto de 2017.

MUKHERJEE, J.; MAJUMDAR, S.; SCHEPER, T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 53, n. 2, p. 180-184, Feb 2000.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403, n. 6772, p. 853-858, 2000/02/01 2000.

NCI. **Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®)–Health Professional Version.** Disponível em: <://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#_7_toc>. Acesso em: 30 de novembro de 2020. 25 de novembro de 2020 2020a. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq#_7_toc.

NCI. **Childhood Cancers.** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/childhood-cancers#types>>. Acesso em: 30 de novembro de 2020. 28 de agosto de 2020 2020b.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; LAVIE, A. Design and characterization of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. **J Biol Chem**, 291, n. 34, p. 17664-17676, Aug 19 2016.

NGUYEN, H. A.; SU, Y.; ZHANG, J. Y.; ANTANASIJEVIC, A. *et al.* A Novel L-Asparaginase with low L-Glutaminase Coactivity Is Highly Efficacious against Both T- and B-cell Acute Lymphoblastic Leukemias In Vivo. **Cancer research**, 78, n. 6, p. 1549-1560, 2018/03// 2018.

OLLENSCHLÄGER, G.; ROTH, E.; LINKESCH, W.; JANSEN, S. *et al.* Asparaginase-induced derangements of glutamine metabolism: the pathogenetic basis for some drug-related side-effects. **European journal of clinical investigation**, 18, n. 5, p. 512-516, 1988.

OMS. **WORLD HEALTH ORGANIZATION MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES FOR CHILDREN, 7th List, 2019.** Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHOMVPPEMPIAU201907>>. Acesso em: 22 de novembro de 2020. 2019a.

OMS. **WORLD HEALTH ORGANIZATION MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES, 21st List, 2019.** Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/WHOMVPPEMPIAU2019.06>> Acesso em: 22 de novembro de 2020., 2019b. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/>.

OZA, V. P.; PARMAR, P. P.; PATEL, D. H.; SUBRAMANIAN, R. B. Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. **3 Biotech**, 1, n. 1, p. 21-26, Jul 2011.

PATRO, K. R.; BASAK, U. C.; MOHAPATRA, A. K.; GUPTA, N. Development of new medium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of Environmental Biology**, 35, n. 1, p. 295-300, Jan 2014.

PEREIRA, C. B. **Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do cerrado, costa marinha brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato.** 2016. 117 f. il., Dissertation (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2016. -.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, 117, n. 2, p. 238-249, Jan 15 2011.

PLACE, A. E.; STEVENSON, K. E.; VROOMAN, L. M.; HARRIS, M. H. *et al.* Intravenous pegylated asparaginase versus intramuscular native *Escherichia coli* L-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukaemia (DFCI 05-001): a randomised, open-label phase 3 trial. **Lancet Oncol**, 16, n. 16, p. 1677-1690, Dec 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Syst. Biol.**, 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

POURHOSSEIN, M.; KORBKANDI, H. Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*. **Adv Biomed Res**, 3, p. 82, 2014.

PRIEST, J. R.; RAMSAY, N. K.; STEINHERZ, P. G.; TUBERGEN, D. G. *et al.* A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Pediatr**, 100, n. 6, p. 984-989, Jun 1982.

PUI, C.-H. **Childhood Leukemias**. 3 ed. 2012.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, 339, n. 9, p. 605-615, Aug 27 1998.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 371, n. 9617, p. 1030-1043, Mar 22 2008.

RAHA, S. K.; DEY, S. K.; ROY, S. K.; CHAUDHURI, S. *et al.* Antitumor activity of L-asparaginase from *Cylindrocarpum obtusisporum* MB-10 and its effect on the immune system. **Biochem Int**, 21, n. 6, p. 1001-1011, Sep 1990.

RAMAKRISHNAN, M. S.; JOSEPH, R. Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. **Canadian Journal of Microbiology**, 42, n. 4, p. 316-325, 1996. Article.

RAMBAUT, A. **FigTree**. 2018. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. **J. Mol. Evol.**, 43, n. 3, p. 304-311, 1996/09/01 1996.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, 80, n. 3, p. 223-230, 1997/09/01/ 1997.

RIBES, J. A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, 13, n. 2, p. 236-301, 2000.

RIGOUIN, C.; NGUYEN, H. A.; SCHALK, A. M.; LAVIE, A. Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 10224, 2017/08/31 2017.

RIZZARI, C.; CONTER, V.; STARY, J.; COLOMBINI, A. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr Opin Oncol**, 25 Suppl 1, p. S1-9, Mar 2013.

ROBERTS, J.; PRAGER, M. D.; BACHYNSKY, N. The antitumor activity of Escherichia coli L-asparaginase. **Cancer Res**, 26, n. 10, p. 2213-2217, Oct 1966.

RODRIGUES, D.; PILLACA-PULLO, O.; TORRES-OBREQUE, K.; FLORES-SANTOS, J. *et al.* Fed-Batch Production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by Recombinant *Pichia pastoris* MUT (s) Strain. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, 7, p. 16, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Terceira Edição.** 2014.

ROLDÁN, B.; LIMA, G.; CABARCA, S.; PESSOA, A. *et al.* L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch[®] : effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 49, p. 1-7, 04/16 2019.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2.5: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19, p. 1572-1574, 2014.

ROTH, G.; NUNES, J. E. S.; ROSADO, L. A.; BIZARRO, C. V. *et al.* RECOMBINANT *Erwinia carotovora* L-ASPARAGINASE II PRODUCTION IN *Escherichia coli* FED-BATCH CULTURES. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 30, n. 2, p. 245-256, Apr-Jun 2013.

SAEED, H.; ALI, H.; SOUDAN, H.; EMBABY, A. *et al.* Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* asparaginase in *Escherichia coli*. **Int J Biol Macromol**, 106, p. 1041-1051, Jan 2018.

SANNIKOVA, E. P.; BULUSHOVA, N. V.; CHEPEREGIN, S. E.; GUBAYDULLIN, II *et al.* The Modified Heparin-Binding L-Asparaginase of *Wolinella succinogenes*. **Mol Biotechnol**, 58, n. 8-9, p. 528-539, Sep 2016.

SANTOS, J. H.; FLORES-SANTOS, J. C.; MENEGUETTI, G. P.; RANGEL-YAGUI, C. O. *et al.* In situ purification of periplasmatic L-asparaginase by aqueous two phase systems with ionic liquids (ILs) as adjuvants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 93, n. 7, p. 1871-1880, 2018.

SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99, n. 5, p. 489-492, Aug 2004.

SHEETZ, R. W.; WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. **Arch Biochem Biophys**, 142, n. 1, p. 184-189, Jan 1971.

SCHWARTZ, J. H.; REEVES, J. Y.; BROOME, J. D. Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 56, n. 5, p. 1516-1519, Nov 1966.

SERVIER. Oncaspar. [Bula]. Indianapolis, EUA: Exelead, Inc.. Importado e Registrado por: Laboratórios Servier do Brasil Ltda. 2020.

SHAFEI, M. S.; EL-REFAI, H. A.; MOSTAFA, H.; EL-REFAI, A.-M. H. *et al.* Purification, Characterization and Kinetic Properties of *Penicillium cyclopium* L-Asparaginase: Impact of L-asparaginase on Acrylamide Content in Potato Products and its Cytotoxic Activity. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, 9, n. 2, p. 132-140, 2015.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; SHRIVASTAV, A.; JAIN, S. K. *et al.* Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 42, n. 6, p. 574-581, 2012. Article.

SIDDALINGESHWARA, K. G.; LINGAPPA, K. Production and characterization of Lasparaginase - a tumour inhibitor. **International Journal of PharmTech Research**, 3, n. 1, p. 314-319, 2011. Article.

SIQUEIRA, F. G. d. Siqueira, Félix Gonçalves de. Resíduos agroindustriais com potencial para a produção de holocelulases de origem fúngica e aplicações biotecnológicas de hidrolases. 2010. 277 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010. 2010.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

SOUZA, P. M.; DE FREITAS, M. M.; CARDOSO, S. L.; PESSOA, A. *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, 120, p. 194-202, 2017.

STRASSBURG, B. B. N.; BROOKS, T.; FELTRAN-BARBIERI, R.; IRIBARREM, A. *et al.* Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nat. Ecol. Evol.**, 1, p. 1-3, 2017.

STURMBERGER, L.; CHAPPELL, T.; GEIER, M.; KRAINER, F. *et al.* Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. **J Biotechnol**, 235, p. 121-131, Oct 10 2016.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, 2, n. 2, 2014.

THERMOSCIENTIFIC. **Pierce BCA Protein Assay Kit Instructions**. Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf.

THERMOSCIENTIFIC. **Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios**. Disponível em: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>> Acesso em: 5 de dezembro de 2020., 2012.

THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; RAVISHANKAR, J. P. *et al.* L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. **Mycosphere**, 2, n. 2, p. 147-155, 2011.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, 11, n. 15, p. 3692-3696, 2012. Article.

TONG, W. H.; PIETERS, R.; DE GROOT-KRUSEMAN, H. A.; HOP, W. C. *et al.* The toxicity of very prolonged courses of PEGasparaginase or Erwinia asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. **Haematologica**, 99, n. 11, p. 1716-1721, Nov 2014.

UNKLES, S. E.; WANG, R.; WANG, Y.; GLASS, A. D. *et al.* Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. **J. Biol. Chem.**, 279, n. 27, p. 28182-28186, Jul 2 2004.

UPPULURI, K. B.; DASARI, R. K. V. R.; SAJJA, V.; JACOB, A. S. *et al.* Optimization of L-asparaginase production by isolated aspergillus niger C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box-Behnken

design in column bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, 11, n. 1, 2013. Article.

UZMA, F.; MURTHY K., N.; SRINIVAS, C. Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. **European Journal of Experimental Biology**, 6, n. 3, p. 37-45, 2016.

WANG, M.; LIU, S.; LI, Y.; XU, R. *et al.* Protoplast mutation and genome shuffling induce the endophytic fungus *Tubercularia* sp. TF5 to produce new compounds. **Curr Microbiol**, 61, n. 4, p. 254-260, Oct 2010.

WARANGKAR, S. C.; KHOBRAGADE, C. N. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. **J. Cell Tissue Res.**, 9, n. 3, p. 1963-1968, 2009.

WARRELL, R. P., Jr.; CHOU, T. C.; GORDON, C.; TAN, C. *et al.* Phase I evaluation of succinylated *Acinetobacter* glutaminase-asparaginase in adults. **Cancer Res.**, 40, n. 12, p. 4546-4551, Dec 1980.

WATANABE, M.; YONEZAWA, T.; LEE, K.; KUMAGAI, S. *et al.* Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evol. Biol.**, 11, p. 322, Nov 3 2011.

WERNECK, G. C. **Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado. 2016. 88 f., il. Dissertation (Mestrado em Ciências da Saúde)—Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília. 2016. -.**

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press. 1990.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chem**, 210, p. 163-171, Nov 1 2016.

YADAV, N. C.; SARKAR, S. Production of L-Asparaginase by *Fusarium oxysporum* using submerged fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, 3, n. 6, p. 32-40, 2014.

YU, X.; HALLETT, S. G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A. K. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 47, p. 301-305, 1997.