

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

Campinas, SP, 1991.

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO
PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR ERWINIA AROIDEAE

BCH 104522

M. I. M.

LUIS ANTONIO MINIM
ENGENHEIRO DE ALIMENTOS

02/91

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE
ORIENTADOR

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Luis Antonio Minim
e aprovada pela Comissão Julgadora em 19.02.91.

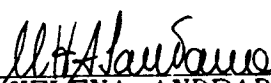
Campinas, 19 de Fevereiro de 1991.

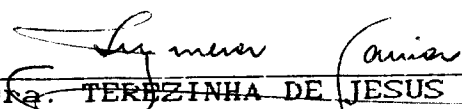
Ranulfo Monte Alegre

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BANCA EXAMINADORA


Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
(ORIENTADOR)


Dra. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA
(MEMBRO)


Dra. TEREZINHA DE JESUS GARCIA SALVA
(MEMBRO)


Dra. LUCIA REGINA DURRANT
(MEMBRO)

Campinas, 19 de fevereiro de 1991.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela valiosa orientação e constante apoio durante este trabalho, que muito contribuiu no desenvolvimento científico e crítico do mesmo.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Lucia Regina Durront, Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana e Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa, que tornou possível a realização deste projeto. Ao Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa - FAEP, pela complementação financeira concedida.

Ao CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

Aos amigos, pelo constante apoio. Em especial, ao Edinho, pela contribuição para o funcionamento do fermentador.

A ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pela cópias do trabalho.

Aos meus pais e minha irmã.

A Valéria, minha esposa, com
todo o meu amor.

ÍNDICE GERAL

PÁGINA

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A L-ASPARAGINASE COMO AGENTE TERAPEÚTICO	3
2.1.1. HISTÓRICO	3
2.1.2. QUÍMICA E MODO DE AÇÃO	4
2.1.3. TERAPIA EM HOMENS	5
2.1.4. TOXICIDADE EM HOMENS	8
2.2. FONTES DE L-ASPARAGINASE	9
2.3. PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE	11
2.4. EXTRAÇÃO DE L-ASPARAGINASE	19
2.5. IMOBILIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE	21
2.6. MEIOS DE CULTIVOS	22
2.6.1. SORO DE QUEIJO	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. EQUIPAMENTOS	25

3.2. REAGENTES	25
3.3. MICRORGANISMO	26
3.4. MEIO DE MANUTENÇÃO	26
3.5. PREPARO DO INÓCULO	27
3.5.1. INÓCULO 1	28
3.5.2. INÓCULO 2	28
3.6. FERMENTAÇÃO	29
3.6.1. FERMENTAÇÃO EM FRASCOS ERLLENMEYERS	29
3.6.1.1. FERMENTAÇÃO COM EXTRATO DE LEVEDURA .	29
3.6.1.2. FERMENTAÇÃO COM SORO DE QUEIJO	35
3.6.2. FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO	39
3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE	41
3.7.1. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS	41
3.7.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE	41
3.7.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	42
3.8. DETERMINAÇÃO DO pH	42
3.9. DETERMINAÇÃO DO PESO SECO CELULAR	42
3.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA L-ASPARAGINASE	43
3.10.1. OBTENÇÃO DO PESO SECO CELULAR	43
3.10.2. EXTRAÇÃO DA L-ASPARAGINASE	43
3.10.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE L-ASPARAGINASE POR "NESSLERIZAÇÃO"	44

3.11. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	45
3.12. MÉTODO PARA O CÁLCULO DA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO, DE PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE E DE CONSUMO DE LACTOSE	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE EM MEIO CONTENDO EXTRATO DE LEVEDURA	47
4.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE L-ASPARAGINA EM MEIO CONTENDO EXTRATO DE LEVEDURA.....	49
4.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA	51
4.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SORO DE QUEIJO NO MEIO FERMENTATIVO	54
4.5. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO SORO DE QUEIJO DILUÍDO ...	56
4.6. EFEITO DA TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO SOBRE A TAXA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EM ESCALA PILOTO	58
4.7. FERMENTAÇÃO COM pH CONTROLADO E O EFEITO SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EM ESCALA PILOTO	69
4.8. RELAÇÃO CINÉTICA ENTRE CRESCIMENTO E FORMAÇÃO DE PRODUTO	78
4.9. EFEITO DA TAXA DE AERAÇÃO E AGITAÇÃO SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE	83

5. CONCLUSÕES	91
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO A	101
ANEXO B	105
ANEXO C	107

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

2.1 - Taxas de Remissão em leucemia linfoblástica aguda usando diferentes doses de asparaginase	7
2.2 - Produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> em fermentador de 20 litros com várias taxas de aeração a 28°C	17
3.1 - Composição do meio de manutenção em agar inclinado da <u>Erwinia aroideae</u>	27
3.2 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração de lactose	31
3.3 - Composição do meio de fermentação. Variação da composição de L-asparagina	33
3.4 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração do extrato de levedura	34
3.5 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração do extrato de levedura na presença de asparagina	34

3.6 - Composição percentual do soro de queijo	35
3.7 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração do soro de queijo em pó, em termos de concentração de lactose	36
3.8 - Composição do meio de fermentação. Adição de triptona, asparagina e extrato de levedura em solução de soro de queijo	38
4.1 - Parâmetros cinéticos, peso seco celular, lactose residual, atividade máxima e pH máximo das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função da temperatura em fermentador de 16 litros	63
4.2 - Parâmetros cinéticos, peso seco celular, lactose residual e atividade máxima das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função dos três pHs monitorados e um teste sem controle a 24,5°C	73

4.3 - Parâmetros cinéticos, peso seco celular, lactose residual, atividade máxima, pH e valor do K_v das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função das taxas de agitação e aeração a 24,5°C	88
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

4.1 - Efeito da concentração de lactose sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u>	48
4.2 - Efeito da concentração de asparagina sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u>	50
4.3 - Efeito da concentração de extrato de levedura sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> na ausência de asparagina	52
4.4 - Efeito da concentração de extrato de levedura sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> na presença de asparagina	53
4.5 - Efeito da concentração do soro de queijo sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u>	55

4.6 - Efeito da suplementação do soro de queijo sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u>	57
4.7 - Fermentação de soro de queijo diluído por <u>Erwinia aroideae</u> a 22°C em fermentador de 16 litros	59
4.8 - Fermentação de soro de queijo diluído por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C em fermentador de 16 litros	60
4.9 - Fermentação de soro de queijo diluído por <u>Erwinia aroideae</u> a 26,5°C em fermentador de 16 litros	61
4.10 - Fermentação de soro de queijo diluído por <u>Erwinia aroideae</u> a 28°C em fermentador de 16 litros	62
4.11 - Efeito da temperatura sobre a produção de células e enzima em soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u>	64
4.12 - Curva de Arrhenius de crescimento celular de <u>Erwinia aroideae</u> em soro de queijo	66
4.13 - Efeito da temperatura sobre a taxa específica de produção de L-asparaginase por <u>E. aroideae</u>	68

4.14 - Fermentação de soro de queijo a 28°C por <u>Erwinia aroideae</u>	70
4.15 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C e pH 8 constante	71
4.16 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C, 300 rpm e 7,5 litros de ar/min	72
4.17 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C e pH constante igual a 6,5	74
4.18 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C e pH constante igual a 7,5	75
4.19 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C e pH constante igual 8,0	76
4.20 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> a 22°C	79
4.21 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C	80

4.22 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> a 26,5°C	81
4.23 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por <u>Erwinia aroideae</u> a 28°C	82
4.24 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C, aeração de 7,5 litros/min e agitação de 300 rpm	84
4.25 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C, aeração de 10 litros/min e agitação de 300 rpm	85
4.26 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C, aeração de 4 litros/min e agitação de 700 rpm	86
4.27 - Fermentação de soro de queijo por <u>Erwinia aroideae</u> a 24,5°C, aeração de 7,5 litros/min e agitação de 500 rpm	87

- 4.28 - Crescimento celular e síntese de L-asparaginase, por Erwinia aroideae a 24,5°C, em função do coeficiente K_v 90

RESUMO

Com o propósito de produzir L-asparaginase por Erwinia aroideae, foi estudado o crescimento e a formação de enzima em fermentação descontínua.

Inicialmente foi estudado a influência de vários nutrientes sobre a produção de L-asparaginase e crescimento celular, fermentando em frascos erlenmeyers e em meio contendo extrato de levedura. A concentração ótima de lactose foi de 1% quando foi obtida uma atividade máxima de L-asparaginase de 0,102 UI/ml e uma massa celular de 1,95 g/l. Acima de 1% de lactose, houve inibição na produção da enzima e a massa celular permaneceu praticamente constante. A adição de asparagina ao meio aumentou a produção de L-asparaginase, sendo que numa concentração de 0,4% a atividade de asparaginase foi de 0,17 UI/ml e a massa celular foi de 1,64 g/l. Acima de 0,4%, o aumento tanto da massa celular como da atividade enzimática foi pequeno; não houve inibição até uma concentração de 1,6% de asparagina.

Usando soro de queijo diluído, como fonte de nutrientes, a produção tanto de massa celular como de enzima foi irrisória numa concentração de soro de 1% em termos de lactose. A concentração ótima do soro, onde se conseguiu uma atividade máxima de enzima de 0,11 UI/ml, foi de 3% em termos de lactose. Suplementando-se o soro de queijo, diluído (2,73% ou 2% em termos de lactose), com triptona (0,3%) e asparagina (0,5%) a produção de

massa celular e de L-asparaginase aumentou bastante chegando-se a uma atividade de 0,542 UI/ml e uma massa celular de 4,52 g/l, maiorportanto do que quando se usou extrato de levedura.

Para a fermentação em escala piloto, em fermentador com capacidade útil de 16 litros, foi usado soro de queijo diluído (2,73% ou 2% em termos de lactose) suplementado com 0,3% de triptona e 0,5% de asparagina. A temperatura ótima para a produção da enzima L-asparaginase foi de 24,5°C, muito embora o crescimento celular tenha sido maior a 28°C. A produção de L-asparaginase alcançou o máximo de 2,02 UI/ml durante a fase de desaceleração de crescimento e a massa celular, no final da fermentação, foi de 5,88 g/l. O aumento da temperatura de 24,5°C para 28°C resultou em 39% de redução na produção da enzima. A energia de ativação para o crescimento celular foi de 8034 cal/mol. O controle do pH, quando comparado com uma fermentação sem o controle, não deu resultados satisfatórios. O aumento da incorporação de oxigênio ao meio fermentativo, refletido pelo aumento do valor do Kv, favoreceu a produção da enzima bem como da massa celular.

SUMMARY

Cell growth and enzyme formation were studied in batch fermentation for the purpose of obtaining L-asparaginase from Erwinia aroideae.

Initially, the influence of some nutrients on the L-asparaginase production and cell growth, on synthetic medium in Erlenmeyers flasks were investigated. The optimum lactose concentration was 1% when the enzyme and cell mass reached 0.102 UI/ml and 1.45 g/l, respectively. Above this limit the production of enzyme was inhibited and the cell mass remained constant. The addition of asparagine into the medium enhanced L-asparaginase production. Cell mass and L-asparaginase activity reached 1.64 g/l and 0.17 UI/ml, respectively, with a 0.4% asparagine concentration. Above this limit, the increase in the cell mass and L-asparaginase activity was reduced. There was no inhibition up to 1.6% of asparagine concentration.

Using diluted powdered cheese whey, as a nutrient supply, the production of cell mass and enzyme was insignificant when the whey lactose concentration was 1%. The optimum whey lactose concentration was 3%, obtaining a maximum L-asparaginase activity of 0.11 UI/ml. Supplementing the diluted powdered cheese whey (2.73%) with 0.3% of triptone and 0.5% of asparagine, the production of cell mass and L-asparaginase had a great enhancement, achieving 0.542 UI/ml of L-asparaginase activity and 4.52 g/l of cell mass, greater than the production when yeast

extract was used.

Pilot plant fermentation experiments were made in a 16 liters fermenter; powdered cheese whey was used diluted (2.73%), complemented with 0.3% of triptone and 0.5% of asparagine, as a fermentative medium. Optimum temperatures for L-asparaginase and cell mass production were 24.5°C and 28°C, respectively. Maximum L-asparaginase activity (2.02 UI/ml) was obtained at 24.5°C, 500 rpm of agitation and 7.5 l/min of aeration; the cell mass concentration was 5.88 g/l. When the temperature was increased from 24.5°C to 28°C the enzymatic activity decreased 39%. Activation energy of cell growth was 8034 cal/mol. The pH controlled process, compared with the process without control, did not give satisfactory results. Increase of oxygen incorporation into the medium enhanced the production of L-asparaginase and cell mass.

1. INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase, que hidrolisa o aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia, causa regressões em certos tumores. Esta propriedade terapêutica permite seu uso para o tratamento de doenças malignas em humanos, principalmente a leucemia linfoblástica aguda (Crowter, 1971).

São várias as fontes de L-asparaginase. A enzima proveniente de uma fonte difere da mesma enzima proveniente de outra fonte, em sua especificidade imunológica, oferecendo importante alternativa terapêutica para pacientes que se tornam hipersensíveis a uma enzima de determinada fonte (Crowter, 1971).

Muitos trabalhos foram desenvolvidos no sentido de estudar a produção de L-asparaginase usando fontes complexas de nutrientes, dentre as quais se encontram o extrato de levedura, triptona e hidrolizados de caseína. O uso destas fontes complexas de nutrientes tem sido importante uma vez que, não estando presentes, a produção celular bem como de enzima é muito baixa. Entretanto estes nutrientes são de custo elevado.

Nos últimos anos, atenção especial tem sido dada ao aproveitamento de resíduos industriais para uso em processos fermentativos. Sua altíssima carga poluidora e seu grande volume de produção os tornam agentes de alto risco poluidor de rios e lagos.

Dentre estes resíduos destaca-se o soro de queijo, o qual tem sido usado amplamente para estudos em vários processos fermentativos, incluindo a produção de β -galactosidase, ácido láctico, etanol e proteína microbiana, no sentido de diminuir esse potencial poluidor e aproveitar seus nutrientes.

No presente trabalho estudou-se a produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae NRRL B-138, utilizando soro de queijo como fonte de nutrientes. Inicialmente, verificou-se a influência de vários compostos (lactose, L-asparagina e extrato de levedura) sobre o crescimento celular e produção de L-asparaginase no sentido de se otimizar o processo fermentativo. Posteriormente, estudou-se o efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento do microrganismo e produção da enzima. Além disso, a influência do monitoramento do pH com diferentes valores e o efeito da taxa de aeração e agitação sobre o processo fermentativo também foram estudados. Finalmente, foi determinado o coeficiente de transferência de oxigênio (K_v), pelo método de oxidação do sulfito.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A L-asparaginase como agente terapêutico

2.1.1. Histórico

A descoberta de que a L-asparaginase pode ser utilizada no tratamento de algumas formas de doenças malignas em homens foi primeiramente apresentada por Kidd (1953a,1953b), o qual observou surpreendente regressão em células de linfoma, transplantadas para ratos e camundongos, após a injeção nestes animais de soro de sangue de porcos das guianas. Soro de sangue de outras espécies, tais como cavalos, coelhos e humanos, não foram efetivos. Esta informação surgiu de experimentos nos quais o soro do sangue de tais porcos foram usados como fonte de complementação alimentar dos animais testes. Embora este soro tenha aumentado a atividade de anticorpos, houve forte inibição de tumor quando ele foi usado sozinho. O efeito citotóxico do soro de sangue de porcos das guianas, *in vitro*, contra células de tumor, deve ter sido observado em várias ocasiões por imunologistas durante experimentos com anticorpos citotóxicos, mas a significância da descoberta não foi apreciada.

Broome (1961, 1963a, 1963b) deu boas evidências de que a L-asparaginase era a responsável pelos efeitos antilinfoma do

soro de sangue de porcos das guianas após ter revisado trabalhos de Clementi (1922), que investigou a distribuição de enzimas degradando aminoácidos em tecidos de diferentes espécies animais. Clementi observou que a L-asparaginase estava presente nos fígados e rins de muitas espécies, mas no sangue de somente um animal que estudou - o porco das guianas. O soro de sangue no qual não foi observado a presença de L-asparaginase também não tinha propriedades antilinfoma. O agente inibidor de tumores e a L-asparaginase pareciam ter as mesmas propriedades físicas e químicas examinadas. Foi verificado que a estabilidade da enzima à mudanças de temperatura e pH era análogo a do agente antilinfoma. Quando as proteínas do soro foram separadas por eletroforese e cromatografia em DEAE celulose, a atividade antilinfoma foi encontrada somente em frações que continham a L-asparaginase. Células de tumor podem ser selecionadas por sua resistência à L-asparaginase *in vitro*, e estas células também são insensíveis à enzima *in vivo* quando transplantadas para camundongos susceptíveis. A purificação de L-asparaginase de outras fontes mostraram sua potenciabilidade como inibidora de tumores. Isto finalmente estabeleceu a função da L-asparaginase como um agente inibidor de tumores.

2.1.2. Química e modo de ação

O peso molecular da L-asparaginase é de aproximadamente

140.000 e somente pequenas quantidades alcançam os compartimentos extravasculares. Quantidades muito pequenas são encontradas na urina, fluido cerebroespinal, tecidos ou células vermelhas do sangue (Schwartz *et al.*, 1970).

A enzima é estável e em solução, retém sua atividade por várias semanas. A ação quimioterápica da enzima é baseada num defeito metabólico de certas células cancerígenas. Diferente de células normais, estas células malignas podem sintetizar L-asparagina somente a uma taxa muito baixa e, conseqüentemente, são dependentes de uma fonte exógena deste aminoácido. A ação da L-asparaginase é eliminar a L-asparagina, resultando na morte das células asparagina-dependentes (Crowter, 1971).

A L-asparagina está presente na maioria, senão em todas as proteínas animais. Células que são incapazes de sintetizar a L-asparagina em quantidades suficientes através de outras fontes, não podem sintetizar proteínas na falta de um suprimento exógeno de L-asparagina (Broome, 1963; Sobin *et al.*, 1965). A síntese de proteínas é um dos primeiros eventos inibidos após a aplicação de L-asparaginase à células sensíveis.

2.1.3. Terapia em homens

A L-asparaginase é de grande valor no tratamento de três doenças: leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfossarcoma leucêmico e linfossarcoma. Regressões e remissões apreciáveis foram

obtidas nestas doenças usando a enzima como agente único. Pacientes com LLA respondem melhor do que aqueles com doenças nas quais há massas de tecidos de tumor como nos linfossarcomas, mas apreciáveis regressões de massas linfossarcomáticas ocorreram (Crowter, 1971).

Dolowy *et al.* (1966) foi o primeiro a tratar um paciente sofrendo de LLA com L-asparaginase. Embora o número de células blásticas no sangue periférico tenha diminuído, o paciente morreu após 10 dias.

Conforme citação em Crowter (1971), Hill *et al.* (1967) foi o primeiro a obter remissão completa em LLA, e desde então o uso de L-asparaginase no tratamento de LLA se difundiu.

Mais da metade dos pacientes com LLA tratados nos estágios iniciais da doença conseguiram remissão completa. Cerca de 30% conseguiram remissões quando a enzima foi usada tardiamente. O maior número de pacientes foram tratados no "Memorial Hospital, New York" (Shwartz *et al.*, 1970). De 73 pacientes com LLA tratados com L-asparaginase por mais de 14 dias, 62% conseguiram remissão completa com uma duração média de 60 dias. Nos pacientes que tiveram características meningeanas, houve uma redução no conteúdo celular e proteico do fluido cerebrospinal. Isto foi surpreendente em vista da pobre entrada da enzima nos tecidos extravasculares, uma vez que, dado o alto peso molecular da enzima, somente pequenas quantidades chegam à urina e ao fluido cerebrospinal (FCE). Por outro lado, há pouca L-asparagina no FCE durante o tratamento e esta pode bem ser a

explicação para o sucesso parcial.

Leucemia meningeana foi tratada por introdução direta (gota a gota) de L-asparaginase no FCE, mas com expectativas perigosas de efeitos colaterais. A remissão obtida nesta doença não foi maior do que aquela obtida pelo tratamento convencional (Crowter, 1971).

Uma das características mais interessantes da ação da L-asparaginase é o seu índice terapêutico tremendamente alto quando usada no tratamento de LLA (Crowter, 1971). Taxas de remissão com diferentes doses de enzima são mostradas na Tabela 2.1. O índice terapêutico nesta situação é maior do que 500, o

TABELA 2.1 - Taxas de remissão em leucemia linfoblástica aguda usando diferentes doses de asparaginase.

Dose de L-asparaginase (UI/Kg/dia) ^a	Nº de pacientes	Número de remissões parciais e completas
10	12	6
200	10	6
1000	22	14
5000	11	7

Fonte: Tallal (1970).

a - UI¹ de enzima por quilo de peso corporal por dia.

¹ 1 UI (UNIDADE INTERNACIONAL) DE L-ASPARAGINASE CORRESPONDE A UMA QUANTIDADE DE ENZIMA QUE LIBERA 1 µMOL DE AMONIA EM 1 MINUTO EM TEMPERATURA DE 37°C.

qual é consideravelmente melhor do que o índice de muitas outras drogas antitumores. Usando o "Melfalan", no tratamento de um tumor animal PC6 (um tumor da célula do plasma), foi conseguido um índice terapêutico de 280 neste sistema.

2.1.4. Toxicidade em homens

O tratamento com L-asparaginase é quase sempre acompanhado por efeitos colaterais. Felizmente, toxicidades sérias são incomuns (Haskell *et al.*, 1969; Beard *et al.*, 1970; Oettgen, 1970), conforme citação em Crowter (1971).

A terapia é frequentemente acompanhada por náuseas, vômitos, e anorexia com perda de peso. Febre foi comum nas primeiras preparações, mas preparações recentes são não-pirogênicas ou causam febre muito baixa. A enzima é uma proteína estranha e reações alérgicas ocorrem em um quinto das pessoas tratadas. Estas reações podem ocorrer após a primeira dose, mas mais usualmente durante a segunda semana de terapia. Se reações alérgicas ocorrerem durante o tratamento com L-asparaginase de uma fonte como Escherichia coli, o tratamento pode ser mudado usando uma enzima de outra fonte, por exemplo Erwinia carotovora. A desensibilização é possível, mas potencialmente perigosa. Testes na pele antes da administração é provavelmente uma sábia precaução (Crowter, 1971).

qual é consideravelmente melhor do que o índice de muitas outras drogas antitumores. Usando o "Melfalan", no tratamento de um tumor animal PC6 (um tumor da célula do plasma), foi conseguido um índice terapêutico de 280 neste sistema.

2.1.4. Toxicidade em homens

O tratamento com L-asparaginase é quase sempre acompanhado por efeitos colaterais. Felizmente, toxicidades sérias são incomuns (Haskell *et al.*, 1969; Beard *et al.*, 1970; Oettgen, 1970), conforme citação em Crowter (1971).

A terapia é frequentemente acompanhada por náuseas, vômitos, e anorexia com perda de peso. Febre foi comum nas primeiras preparações, mas preparações recentes são não-pirogênicas ou causam febre muito baixa. A enzima é uma proteína estranha e reações alérgicas ocorrem em um quinto das pessoas tratadas. Estas reações podem ocorrer após a primeira dose, mas mais usualmente durante a segunda semana de terapia. Se reações alérgicas ocorrerem durante o tratamento com L-asparaginase de uma fonte como Escherichia coli, o tratamento pode ser mudado usando uma enzima de outra fonte, por exemplo Erwinia carotovora. A desensibilização é possível, mas potencialmente perigosa. Testes na pele antes da administração é provavelmente uma sábia precaução (Crowter, 1971).

Em contraste com a maioria de outras drogas antitumorais, a L-asparaginase exerce efeitos mínimos sobre a medula óssea e não danifica a mucosa oral ou intestinal ou os folículos pilosos. Por outro lado, observou-se grave toxicidade que afeta o fígado, rins, pâncreas, sistema nervoso central e os mecanismos de coagulação. Evidência bioquímica de disfunção hepática está presente em mais de 50% dos tratados e a maioria dos pacientes apresentam elevação substancial de amônia no sangue (de até 700 a 900 $\mu\text{g/dl}$). Frequentemente, são vistos distúrbios do funcionamento hepático, inclusive menor produção de insulina, e aproximadamente 5% dos adultos tratados desenvolvem pancreatite manifesta; a morte resulta de pancreatite hemorrágica. Disfunção do sistema nervoso central, que varia de depressão a prejuízo sensorial e coma, ocorreu em adultos. Sugeriu-se que todos ou a maioria desses efeitos tóxicos resultam da inibição da síntese de proteína em vários tecidos do corpo. A L-asparaginase tem atividade imunossupressora, o que é comprovado por inibição da síntese de antibióticos, transformação de linfócitos, rejeição de enxertos e hipersensibilidade retardada. Portanto, são afetadas as funções dos linfócitos T e B (Gilman *et al.*, 1987).

2.2. Fontes de L-asparaginase

A L-asparaginase tem sido encontrada em soro de sangue de porcos das guianas, de certos roedores sul americanos

(Holmquist,1962; Old et al.,1963) e de macacos do novo mundo, em fígado de frangos (Ohnuma et al., 1967) e em alguns microrganismos tais como Escherichia coli, Serratia marcescens, Erwinia carotovora, Erwinia aroideae. As enzimas preparadas de diferentes fontes não tem as mesmas propriedades e algumas não tem efeito sobre o crescimento de tumores.

Mashburn e Wriston (1964) obtiveram uma potente preparação de L-asparaginase de Escherichia coli. Tal preparação mostrou ser constituída de duas enzimas, das quais somente uma é ativa contra leucemias. Uma enzima é de baixa atividade e não tem ação inibitória de tumor; a outra é de alta atividade e é um potente agente antitumor.

A taxa de desaparecimento da enzima do sangue pode ser um outro fator que determina seu efeito antitumor. A enzima inativa tem uma taxa de desaparecimento extremamente rápida no soro de sangue; isto pode explicar a inatividade de L-asparaginase de leveduras (Broome, 1961). Uma considerável quantidade de L-asparaginase de soro de sangue de porco das guianas permanece no sangue por três ou mais dias após uma única injeção intravenosa, enquanto que a asparaginase de levedura é quase que completamente eliminada em menos de uma hora. Nenhuma inibição do crescimento de tumor foi verificada após a administração de asparaginase de levedura.

A meia vida da asparaginase de Escherichia coli no plasma varia de 8 a 24 horas dependendo da preparação. Das duas preparações comerciais em uso comum derivadas de E.coli, a

preparação da Merck tem a meia vida duas vezes maior do que a preparação da Bayer (Schwartz *et al.*, 1970).

2.3. Produção de L-asparaginase

A desamidação de L-asparagina por extrato de Escherichia coli foi inicialmente observada por Tsuji (1957). Verificou-se posteriormente que a E. coli produzia duas asparaginases distintas (L-asparagina amida-hidrolase, EC 3.5.1.1) as quais diferem em muitas propriedades, talvez mais significativamente em suas grandes diferenças em afinidade pela L-asparagina (Campbell, 1967; Roberts *et al.*, 1966; Stephenson e Gale, 1937).

A enzima com maior afinidade, a L-asparaginase II, parece estar localizada no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e a parede celular da bactéria (Cedar e Schwarz, 1967).

Enquanto a produção de L-asparaginase I não é afetada pelas condições de crescimento, a quantidade de L-asparaginase II varia significativamente (Cedar e Schwartz, 1968).

Cedar e Schwartz (1968) estudaram as condições que controlam a produção de L-asparaginase II, usando várias cepas de Escherichia coli, a 37 °C. E. coli K-12 foi considerada cultura padrão. Foi utilizado como meio mínimo, o meio A de minerais e sais (Davis e Mingioli, 1950). Para crescimento aeróbico, este

meio mínimo foi usado sem citrato. Para crescimento anaeróbico, o mesmo meio mínimo foi suplementado com 2,4 mg/l de L-cisteína (Gorini, 1961). Pouca enzima foi produzida pelas células da cultura padrão, durante o crescimento aeróbico. Tão logo a aeração tenha sido interrompida, a atividade específica aumentou exponencialmente alcançando um máximo em 40 minutos. A cinética do aumento da atividade sugeriu que um fator, talvez o oxigênio, inibitório da produção da L-asparaginase foi desaparecendo durante o período seguinte à interrupção da aeração. A produção de L-asparaginase com a cultura padrão foi dependente da síntese proteica. Inicialmente, as células foram cultivadas em condições aeróbicas. A adição de cloranfenicol quando a aeração foi interrompida evitou o aparecimento da enzima. A dependência do aparecimento da enzima com a síntese proteica indicou que sua formação é mais propriamente o resultado de uma nova síntese do que a conversão de uma proteína precursora preexistente, mas inativa. O crescimento com culturas padrões sugeriram que a asparaginase II poderia ser produzida continuamente e a altas taxas pela bactéria, adaptada em condições anaeróbicas de crescimento. A bactéria produziu a asparaginase II a uma taxa constante por muitas gerações durante o crescimento em jarros anaeróbicos. Sob estas condições, a produção da enzima foi muito estimulada pelo enriquecimento do meio de sais minerais e glicose com tripton, extrato de levedura ou hidrolisado de caseína. Resultados similares foram obtidos com todas as cepas testadas. A suplementação do meio mínimo com uma mistura de 17 aminoácidos

comparado com a suplementação do meio mínimo somente com caseína resultou numa produção de enzima praticamente idêntica. Quando a suplementação foi feita somente com um aminoácido ou grupos de aminoácidos, o aumento da produção da enzima não foi significativo. Nem seu substrato, a L-asparagina, e nem seus produtos, o ácido L-aspártico e amônia, parecem agir especificamente para induzir a formação da L-asparaginase II. Por outro lado, estes resultados podem refletir um sistema de controle envolvendo tanto um indutor específico, o qual é derivado de alguma forma do catabolismo de aminoácidos durante o crescimento anaeróbico, ou múltiplos indutores, nenhum dos quais estando disponível em concentração suficiente para resultar na formação da L-asparaginase quando somente alguns aminoácidos são adicionados. Alternativamente, pode ser mais razoável considerar que um metabólito comum age como um repressor da síntese de L-asparaginase e que a utilização de aminoácidos durante a anaerobiose resulta na diminuição da concentração desse repressor. A suplementação com vitaminas ou bases purínicas e pirimidínicas não aumentaram a taxa de síntese da enzima. Como acontece com muitas enzimas catabólicas, a formação da L-asparaginase II foi inibida pela adição de açúcares, particularmente glicose. Quando os açúcares xilose, maltose e galactose foram usados em lugar de glicose, a produção da enzima foi inibida numa menor extensão. Galactose permitiu a maior taxa de síntese da enzima de todos os açúcares testados. Desconsiderando qual fonte de carbono tenha sido usada, a síntese da enzima aumentou com o aumento da concentração de aminoácidos.

Sob todas as condições, a glicose inibiu a formação da enzima. Esta inibição é presumivelmente um exemplo de repressão catabólica. Durante o crescimento aeróbico e anaeróbico, a E. coli foi capaz de usar a L-asparagina como sua única fonte de nitrogênio. Entretanto, pouca asparaginase II foi formada, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. Nos estudos de Gale (1943), conforme citação de Cedar e Schwartz (1968), verificou-se que a formação de algumas desaminases era estimulada em valores de pH acima de 8 enquanto que as descarboxilases eram produzidas em condições ácidas. A L-asparaginase II foi sintetizada a uma taxa ótima pela bactéria em valores de pH entre 7 e 8.

Heinemann e Howard (1969) estudaram a produção de L-asparaginase com Serratia marcescens ATCC 60. Altos rendimentos de L-asparaginase foram obtidos quando a cultura foi cultivada em meio contendo 4% de extrato de levedura (EL). O EL supriu todos os nutrientes necessários para o microrganismo. O rendimento de L-asparaginase aumentou quando o microrganismo foi cultivado em meio EL a 4% com um pH inicial de 5. Um pico de rendimento de 4,0 UI/ml foi alcançado em 46 horas quando o pH atingiu 8,5. A atividade diminuiu para 3,1 UI/ml com o posterior aumento do pH para 8,9 após 64 horas de fermentação. Produção ótima de enzima foi obtida quando a temperatura de fermentação foi mantida a 26 °C (pH inicial igual a 5). Quando 0,4% de glicose, frutose, lactose, maltose, amido solúvel ou destrina foram adicionados, a síntese de L-asparaginase foi comparável ao meio basal (4% de EL, 0,5% de NaCl e 0,25% de K_2HPO_4 - pH 7,0). O pH final do meio se tornou

alcalino variando entre 7,5 a 8,0. Quando 1% de glicose e 0,4% de sacarose, D-manitol, D-sorbitol ou glicerol foram adicionados ao meio basal, a síntese de L-asparaginase foi inibida e o pH final se tornou ácido entre 5,2 e 6,9. Isto sugere que no caso da biossíntese de L-asparaginase o efeito negativo dos carboidratos pode ser uma função de sua habilidade de abaixar o pH do meio fermentativo. A formação de L-asparaginase iniciou após 8 horas de cultivo; sua velocidade foi maior entre 8 e 24 horas de cultivo com um acúmulo máximo da enzima após 39 horas. Durante a fermentação, o pH subiu de 5 para 8,4 onde se obteve a concentração máxima da enzima. Posteriormente, com o aumento do pH, houve uma queda abrupta na concentração da enzima. A biossíntese de L-asparaginase ocorreu durante um período de concentração limitada de oxigênio. Após o aumento da concentração do oxigênio, tanto a concentração de enzima como o número de células viáveis diminuíram. Rendimento máximos de L-asparaginase foi obtido sem agitação no fermentador, mas com uma aeração constante de 2,7 pés³ de ar/min. Fermentação com agitação, ou com altas taxas de aeração, ou ambos, promoveu um aumento na produção de células com uma pigmentação vermelha, mas houve uma diminuição na produção de L-asparaginase.

Bilimoria (1969) estudou diferentes culturas de Escherichia coli com respeito à sua habilidade de produzir L-asparaginase I e II, sob diferentes condições de crescimento. Das 28 cepas estudadas, 5 foram particularmente ativas na produção de L-asparaginase II. Baixa aeração promoveu condições mais

apropriadas para crescimento assim como para produção da enzima. Cultivo estacionário resultou em baixo crescimento, enquanto que aeração vigorosa deu bom crescimento mas resultou numa marcada diminuição do conteúdo de enzima.

Peterson e Ciegler (1969) estudaram a produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae NRRL B-138, a qual produz quantidades de enzima superiores à E. coli. O crescimento foi conduzido em meio TGY (0,1% de glicose, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de triptona - pH 7,0), a 28°C. O crescimento celular bem como a concentração de enzima nas células foi máximo após 7 a 8 horas de fermentação, onde se conseguiu uma produção de 1250 UI/g (peso seco) de células. De 11 a 24 horas de fermentação o conteúdo celular permaneceu constante. O pH do meio caiu até 6,8 após 3 horas de fermentação e então aumentou até um máximo de 8,5. A produção da enzima iniciou somente quando o pH começou a subir. Altas taxas de aeração promoveram maior rendimento celular; entretanto a produção de L-asparaginase caiu 70% (Tabela 2.2).

Liu e Zajic (1971) estudaram a síntese de L-asparaginase por Erwinia aroideae NRRL B-138 com o propósito de determinar alguns fatores envolvidos na formação da enzima. O crescimento foi conduzido em meio TGY, exceto a glicose, sob agitação, a 24 °C. Quando triptona e extrato de levedura foram usados como únicas fontes de nitrogênio, o carboidrato que promoveu o maior rendimento em L-asparaginase foi a lactose. A concentração ótima de lactose foi de 1%, onde se conseguiu uma produção de L-asparaginase de 2,84 UI/ml de cultura. Com 0,5% de

lactose como fonte de carbono, a atividade de L-asparaginase variou muito, dependendo da fonte de nitrogênio usada. Nenhum crescimento foi observado nos frascos contendo fontes de nitrogênio inorgânico, em três dias de fermentação. A concentração ótima de extrato de levedura foi de 1,5%, com 1% de lactose, produzindo 3,41 UI/ml de atividade enzimática. A inibição da síntese da enzima pela glicose aumentou conforme foi aumentada sua concentração. O fenômeno de "diauxia" foi observado quando o microrganismo cresceu em meio contendo glicose e lactose como fontes de carbono. A glicose inibiu a síntese de L-asparaginase bem como da enzima indutível β -galactosidase. A utilização de lactose em estágios posteriores da fermentação não estimulou a síntese de L-asparaginase.

TABELA 2.2 - Produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae em fermentador de 20 litros com varias taxas de aeração a 28°C.

Aeração (vol/min)	Aletas	Agitação (rev/min)	Peso seco celular (g/l)	Atividade (UI/g)
0,5	Não	300	1,4	960
1,0	Sim	300	1,6	580
1,5	Sim	300	1,8	340
2,0	Sim	350	1,8	230

Fonte: Peterson e Ciegler (1969).

Peterson e Ciegler (1972) estudaram os efeitos de vários substratos e da aeração sobre a produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae NRRL B-138, em meio TGY, a 28 °C. Os frascos com níveis mais altos de extrato de levedura produziram significativamente mais L-asparaginase. Mudanças nas concentrações de K_2HPO_4 e triptona em níveis de 0.05% a 0.2% e 0.25% a 1.0%, respectivamente, tiveram pouco efeito. Uma vez que concentrações mais elevadas de extrato de levedura aumenta a viscosidade do meio e conseqüentemente pode reduzir o consumo de oxigênio, a taxa de aeração foi aumentada pelo uso de frascos aletados e agitação mais intensa, promovendo um aumento substancial na produção da enzima.

Liu e Zajic (1973) estudaram a cinética de fermentação e produção contínua de L-asparaginase por Erwinia aroideae NRRL B138, em meio TGY modificado. Nenhum crescimento foi observado quando a fermentação foi conduzida em meio contendo somente 0,05% de extrato de levedura. Um nível de 3% de extrato de levedura foi inibitório ao crescimento celular e à síntese de L-asparaginase quando comparado com 1,5%. Usando extrato de levedura como substrato limitante, a equação da taxa de crescimento (Monod) foi a seguinte : $\mu = (0,526 \times S) / (1,18 + S)$, onde S é a concentração de extrato de levedura. Conseqüentemente, $\mu_{max} = 0,526 \text{ h}^{-1}$ e $K_s = 1,18 \text{ g/l}$ (constante de saturação). A temperatura ótima para crescimento e produção de L-asparaginase foi de 28°C e 24°C, respectivamente, tanto em processo contínuo como descontínuo. A energia de ativação para o crescimento celular foi de 8.500 cal/mol considerando a equação de Arrhenius. A equação da taxa de

crescimento, derivada por Kono e Asay (1969), conforme citação em Liu e Zajic (1973) foi usada para analisar a produção de L-asparaginase. Os valores calculados da produção da enzima não se ajustaram bem com os valores observados na fase de crescimento constante e de declínio. Os valores observados dos dados de rendimento celular e de enzima, do processo de fermentação contínua, não concordaram com os valores preditos obtidos através dos dados da fermentação descontínua. A concentração celular na fermentação contínua foi mais alta do que o esperado. Por outro lado, o rendimento de L-asparaginase foi mais baixo do que o esperado, exceto quando a taxa de diluição foi de $0,1 \text{ h}^{-1}$. "Washout" foi observado numa taxa de diluição de $0,5 \text{ h}^{-1}$. A comparação do processo contínuo e descontínuo mostrou que eles diferem em características cinéticas. Esta diferença sugere um significativo acúmulo de intermediários metabólicos entre a transformação do substrato e a formação do produto em fermentação descontínua. Isto é provavelmente devido à diferença no estado fisiológico entre o organismo em fermentação contínua e em fermentação descontínua.

Foi verificado o registro de uma patente (Lee *et al.*, 1988) para produção de L-asparaginase através da fermentação de mosto por culturas de Erwinia carysanthemí.

2.4. Extração de L-asparaginase

Cedar e Schwartz (1968) em seu trabalho de produção de

L-asparaginase por Escherichia coli utilizaram um tratamento com solução de ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) e lisozima. Uma suspensão celular (0,8 ml) em EDTA 1 mM foi mantida a 0°C por 8 minutos. Após a adição de sulfato de magnésio até uma concentração de 1 mM, 1 mg de lisozima de clara de ovo foi adicionada, dando um volume final de 1 ml. A amostra foi incubada por 15 minutos a 37°C e posteriormente ensaiada.

Peterson e Ciegler (1969) também utilizaram EDTA e lisozima para extração da L-asparaginase, com uma pequena modificação no procedimento descrito acima.

Le et al.(1984) em seu trabalho de recuperação de L-asparaginase por processos com membranas usaram um processo alcalino de rompimento celular. O rompimento celular foi conduzido em solução básica, pH 11,5, contendo as células, para liberação da enzima, a qual é estável em álcali por um curto período. Após a neutralização da solução com ácido acético, a enzima foi separada dos fragmentos celulares com membrana Azipor de 0,45 μ m.

Lee et al. (1986) em seu trabalho de recuperação e purificação de L-asparaginase de Erwinia carotovora usaram um processo de recuperação com tampão borato de sódio. Um pó acetonado foi preparado ressuspensando uma pasta celular obtida por centrifugação em acetona anidra a 10 °C e agitada por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada e o processo foi novamente repetido. Em seguida a enzima foi extraída com tampão borato de sódio 10 mM, pH 9,5, por 40 minutos, e o extrato foi clarificado em centrífuga a 1100xg.

O rendimento de L-asparaginase no processo de extração varia de método para método. Enquanto o rendimento na extração por borato de sódio foi de 80% (Lee *et al.*, 1986), o processo com tolueno-uréia é de 85% (Grossowicz *et al.*, 1972) e com álcalis é de 60-100% (Quirk e Woodrow, 1984).

2.5. Imobilização de L-asparaginase

Há um grande número de problemas que limitam o uso de proteínas terapêuticas, tais como as enzimas. Repetidas injeções destas enzimas, tal como a L-asparaginase, induzem a formação de anticorpos e, como resultado, choque anafilático e/ou inativação da enzima podem ocorrer. Além disso, a enzima injetada pode ser destruída por enzimas proteolíticas (Mori *et al.*, 1972; Bunting e Laidler, 1974).

Na tentativa de solucionar estes problemas, Mori *et al.* (1972) estudaram as condições de preparação de microcápsulas contendo L-asparaginase imobilizada através de polimerização interfacial. A atividade das microcápsulas preparadas sob condições ótimas foi cerca de 37% da atividade da L-asparaginase nativa. O tamanho das partículas das microcápsulas poderia ser controlado através da taxa de agitação e concentração de Span 85. As membranas das microcápsulas foram resistentes a choque mecânico ou ataque de quimotripsina, e nenhuma liberação de L-asparaginase das microcápsulas foi observado.

Bunting e Laidler (1974) estudaram a cinética de hidrólise, escoando o substrato (L-asparagina) por um tubo de nylon com L-asparaginase imobilizada. A L-asparaginase foi ligada quimicamente à superfície interna do tubo e soluções de asparagina, em várias concentrações, foram passadas pelo tubo a várias taxas de escoamento. A constante aparente de Michaelis, $K_m(\text{app})$, foi aproximadamente três vezes maior do que o K_m para a enzima em solução livre ($\approx 13 \times 10^{-6}$ M). Foi verificado que em condições de baixas taxas de escoamento de substrato e concentrações baixas do mesmo, a reação de hidrólise é fortemente dependente do processo difusional. Altas taxas de escoamento e concentrações mais elevadas de substrato minimizam os efeitos difusionais e, conseqüentemente, o valor do $K_m(\text{app})$ se aproxima do verdadeiro valor do K_m para a enzima imobilizada.

2.6. Meios de cultivo

A maioria dos meios de cultivo utilizando um ou outro microrganismo contém fontes complexas de nitrogênio, suplementadas ou não com alguns aminoácidos, vitaminas, bases purínicas ou pirimidínicas e fosfatos (Wade *et al.*, 1968; Cedar e Schwartz, 1968; Peterson e Ciegler, 1969; Heinemann e Horward, 1969; Bilimoria, 1969; Peterson e Ciegler, 1972; Liu e Zajic, 1971; Liu e Zajic, 1973; Buck *et al.*, 1971).

Estas fontes complexas de nitrogênio constituem-se principalmente de triptona, peptona, extrato de levedura e hidrolisados de caseína, tendo sido o extrato de levedura considerado como substrato limitante do crescimento (Liu e Zajic, 1973).

A lactose tem sido a principal fonte de carbono e energia usada nos testes já realizados pelos pesquisadores citados anteriormente.

Em vista destas características nutricionais dos meios de cultura utilizados, o soro de queijo é considerado uma excelente fonte de nutrientes para o cultivo de microrganismo e produção de L-asparaginase (Griswold, 1972).

2.6.1. Soro de queijo

O soro de queijo, sendo considerado como um subproduto da indústria queijeira, vem demonstrando crescimento anual constante como resultado da expansão do consumo de queijos que apresenta uma taxa de crescimento anual de 3% (Zall, 1984). No Brasil, o SIPA (Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal) no ano de 1986 divulgou dados em que revela a produção de 197,7 mil toneladas de queijo. A partir destes dados, pode-se estimar que a produção de soro neste mesmo ano foi de 1,78 milhões de toneladas. O descarte de todo esse soro causaria sérios problemas de poluição ambiental se jogado diretamente nos rios ou esgotos,

além de se perder totalmente um produto com alta qualidade nutricional.

O soro é um dos resíduos mais poluentes da indústria de alimentos, com uma demanda biológica de oxigênio (D.B.O.) entre 35.000 e 40.000 ppm (Hill, 1982; Mello, 1989); por outro lado, é um líquido altamente nutritivo, o que o torna um excelente meio para uso em processos fermentativos. O aproveitamento do soro de queijo está muito aquém do desejável, uma vez que, de todo o volume produzido no Brasil no ano de 1986, somente 285,2 mil toneladas, ou seja 15,6% do total produzido, foi utilizado para fins alimentícios.

Em países mais desenvolvidos, como Canadá e USA, na década de 70, o consumo chegou a 60% do total disponível; sabe-se ainda que na Comunidade Comum Européia somente 17% do soro produzido não é aproveitado (Allum, 1980). Dentre as propostas para o uso do soro de queijo, muitos processos fermentativos tem sido estudados, uma vez que o mesmo é rico em nutrientes para os microrganismos e não há necessidade de altas tecnologias para sua utilização. Dentre estas propostas, a produção de L-asparaginase foi de interesse neste trabalho, visando a independência nacional do setor farmacêutico com relação a este produto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

- Mesa Rotatória Psycrotherm marca NEW BRUNSWICK
- Centrífuga Refrigerada marca INCIBRAS modelo SPIN IV
- Banho Maria marca FANEN modelo 145
- Camara de Fluxo Laminar marca VECO modelo FL2093
- Balança Analítica marca SARTORIUS
- Balança semi-analítica marca MARTE modelo AM 5500
- Estufa a Vácuo marca FANEN modelo 099/A-1
- pHmetro marca METROHN HERISAU modelo E 516
- Autoclave marca FABBE-PRIMAR modelo 103
- Espectrofotômetro U.V./Vis. marca MICRONAL mod. B382
- Fermentador marca CHEMAP modelo FS0020
- Cronômetro digital marca CASIO

3.2. Reagentes

- Lactose P.A. marca MERCK
- Glicose P.A. marca MERCK
- Extrato de Levedura marca DIFCO
- Triptona marca DIFCO
- Asparagina marca MERCK
- K_2HPO_4 P.A. marca ECIBRA

- Reagente Glicose Enz-Color marca BIO-DIAGNÓSTICA
INDÚSTRIA QUÍMICA CLÍNICA Ltda.
- Agar-Agar marca BIOBRAS
- Enzima Lactase marca MILES
- Iodeto de Potássio marca BIOBRAS
- Cloreto de Mercúrio marca MERCK
- Hidróxido de Sódio marca BIOBRAS
- Ácido Bórico marca ECIBRA
- Borato de Sódio marca ECIBRA
- Ácido Tricloro Acético marca MERCK
- Soro de queijo em pó marca ITAMBÉ

3.3. Microrganismo

Erwinia aroideae NRRL B-138, a qual produz em grandes quantidades a enzima L-asparaginase com atividade antitumor (Wade *et al.*, 1968; Peterson e Ciegler, 1969), foi utilizada neste trabalho. Esta cultura foi obtida através do instituto NORTHERN REGIONAL RESERCH CENTER, U.S. Department of Agriculture - U.S.A. e mantida em estoque no laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

3.4. Meio de manutenção

A Erwinia aroideae foi mantida em agar inclinado

contendo a composição apresentada na Tabela 3.1.

Uma alçada foi retirada da cultura em estoque, repicada para um novo tubo contendo o meio de manutenção abaixo, incubada por 24 horas a 28°C e mantido a seguir em câmara fria (4 - 7°C) até ser utilizado.

Foram efetuadas repicagens a cada 30-40 dias ou quando fosse necessário.

TABELA 3.1 - Composição do meio de manutenção em agar inclinado da Erwinia aroideae.

COMPOSIÇÃO	(g/l)
Glicose	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Extrato de levedura	5,0
Triptona	5,0
Agar	20,0
pH	7,0

3.5. Preparo do inóculo

O meio de cultura utilizado para gerar o inóculo, denominado "meio de pré-fermentação" teve sua composição diferenciada para cada uma das etapas de fermentação, as quais

serão descritas a seguir.

3.5.1. Inóculo 1

Na fase preliminar da etapa de fermentação, cujos testes foram feitos em Erlenmeyers, a composição do meio de pré-fermentação foi idêntica ao meio de manutenção (Tabela 3.1), exceto o agar.

Colocaram-se 100 ml do meio de pré-fermentação em frasco Erlenmeyer de 500 ml de capacidade e em seguida foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, o frasco foi inoculado com uma alçada da Erwinia aroideae mantida nos tubos inclinados em estoque.

O frasco inoculado foi incubado em mesa rotatória por 10-12 horas, sob temperatura constante de $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ e agitação de 200 rpm, sendo então usado como inóculo para os testes realizados.

3.5.2. Inóculo 2

Na fase final da etapa de fermentação, onde trabalhamos com um fermentador marca "Chemap" de 16 litros, o meio de pré-fermentação teve sua composição idêntica ao meio da fermentação principal (soro de queijo diluído e suplementado).

O inóculo inicial foi preparado de forma idêntica ao inóculo 1 (item 3.5.1.), considerando-se a diferença na composição do meio de pré-fermentação. Dois volumes de 30 ml cada, retirados deste meio pré-fermentado, foram utilizados para inoculação do inóculo 2, de volume de 1 litro, separado em volumes iguais de 500 ml contidos em Erlenmeyers de 3 litros. Após incubação por 10-12 horas nas mesmas condições anteriores, todo este meio pré-fermentado (inóculo 2) foi utilizado para inoculação do meio contido no fermentador para a fermentação principal.

3.6. Fermentação

A etapa de fermentação teve duas fases. Inicialmente foram feitos testes preliminares em Erlenmeyers e incubados em mesa rotatória e os testes finais foram feitos em maior escala onde usamos um fermentador de 20 litros, com volume útil de 16 litros, marca Chemap.

3.6.1. Fermentação em frascos Erlenmeyers

3.6.1.1. Fermentação com extrato de levedura

Os ensaios para determinação da composição do meio de fermentação e influência de determinados nutrientes sobre o

crescimento do microrganismo e produção da enzima foram feitos em Erlenmeyers de 250 ml com um volume de meio de 50 ml. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A fermentação se deu transferindo um volume de 3 ml do inóculo 1 (item 3.5.1.), volume este correspondente a 6% do volume total do meio a ser fermentado, e incubado por 10 horas em mesa rotatória com temperatura controlada de 28°C e agitação de 200 rpm. O tempo e as condições de fermentação foram definidos baseados nos dados obtidos por Peterson e Ciegler (1969).

A - Estudo do efeito da concentração de lactose sobre o crescimento e produção de L-asparaginase.

Foram preparadas as seguintes soluções :

- Meio Mínimo (MM1) :

K_2HPO_4 0,25 g
Tryptona1,25 g
Extrato de Levedura1,25 g
Água suficiente para 100 ml

- Lactose (LCT) :

Lactose10 g
Água suficiente para 100 ml

As concentrações dos diversos meios de fermentação são

apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração de lactose.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE (g/100 ml)				
	0	0.5	1.0	2.0	4.0
MM1(ml)	20	20	20	20	20
LCT (ml)	0	2,5	5,0	10,0	20,0
AGUA (ml)	30,0	27,5	25,0	20,0	10,0

Os meios da Tabela 3.2 foram incubados em duplicatas, conforme descrito anteriormente. Após a fermentação retiraram-se amostras para determinações de pH, peso celular seco e atividade enzimática.

B - Estudo do efeito da concentração de L-asparagina sobre o crescimento e produção de L-asparaginase.

Foram preparadas as seguintes soluções :

- Meio Mínimo (MM2) :

K_2HPO_4 0,25 g

Triptona 1.25 g

Extrato de Levedura 1.25 g

Água suficiente para 100 ml

- Lactose (LCT) :

Lactose 12,5 g

Água suficiente para 100 ml

- Asparagina (ASN):

L-asparagina5,0 g

Água suficiente para 100 ml

As composições dos meios de fermentação são apresentadas a seguir na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração de L-asparagina.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE L-ASPARAGINA (g/100 ml)				
	0	0,2	0,4	0,8	1,6
MM2(ml)	20	20	20	20	20
LCT (ml)	4	4	4	4	4
ASN (ml)	0	2,0	4,0	8,0	16,0
ÁGUA (ml)	26	24	22	18	10

Os meios da Tabela 3.3 foram incubados em duplicatas, conforme descrito anteriormente. Após a fermentação retiraram-se amostras para determinações de pH, peso celular seco e atividade

enzimática.

C - Estudo do efeito da concentração de extrato de levedura sobre o crescimento e produção de L-asparaginase.

Foram preparadas as seguintes soluções :

- Meio Mínimo (MM3) :

K_2HPO_4 0,25 g

Triptona 1.25 g

Água suficiente para 100 ml

- Extrato de Levedura (ELV) :

Extrato de Levedura 20 g

Água suficiente para 100 ml

- Lactose (LCT):

Lactose12,5 g

Água suficiente para 100 ml

- Asparagina (ASN):

L-Asparagina 8,0 g

Água suficiente para 100 ml

As composições dos meios de fermentação são apresentadas a seguir nas Tabelas 3.4 e 3.5.

TABELA 3.4 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração de extrato de levedura.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA (g/100 ml)					
	0	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
MM3 (ml)	20	20	20	20	20	20
ELV (ml)	0	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
LCT (ml)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
AGUA (ml)	26,0	25,5	25,0	23,5	21,0	16,0

TABELA 3.5 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração de extrato de levedura na presença de asparagina.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA (g/100 ml)					
	0	0,2	0,4	1,0	2,0	4,0
MM3 (ml)	20	20	20	20	20	20
ELV (ml)	0	0,5	1,0	2,5	5,0	10,0
LCT (ml)	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
ASN (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
AGUA (ml)	21,0	20,5	20,0	18,5	16,0	11,0

Os meios das Tabelas 3.4 e 3.5 foram incubados em duplicatas, conforme descrito anteriormente. Após a fermentação retiraram-se amostras para determinações de pH, peso celular seco e atividade enzimática.

3.6.1.2. Fermentação com soro de queijo

Foi utilizado soro de queijo em pó, que foi dissolvido e diluído em várias proporções com água destilada, suplementado ou não com triptona e asparagina. Os ensaios foram feitos em Erlenmeyers de 250 ml com volume de meio de 50 ml. A fermentação se deu da mesma forma citada no item 3.6.1.1. A Tabela 3.6 mostra a composição percentual do soro de queijo utilizado.

TABELA 3.6- Composição percentual do soro de queijo.

CONSTITUÍNTES	COMPOSIÇÃO PERCENTUAL
Lactose	74
Proteínas	12
Gorduras	3
Minerais	7
Umidade	4

A - Estudo do crescimento e produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae com o uso de soro de queijo

Foi preparada a seguinte solução :

Soro de queijo em pó (SQ) 6,8 g

Água suficiente para 100 ml

Nota : Esta solução continha 5,0 % de lactose.

Em seguida foram preparados vários meios contendo diferentes concentrações de lactose, como mostra a Tabela 3.7.

TABELA 3.7 - Composição do meio de fermentação. Variação da concentração do soro de queijo em pó, em termos de concentração de lactose.

COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NO SORO DE QUEIJO ^a				
	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
SQ(ml)	10	20	30	40	50
ÁGUA (ml)	40	30	20	10	0

a- CONCENTRACAO - g de Lactose/100 ml

Os meios da Tabela 3.7 foram incubados em duplicatas, conforme descrito anteriormente. Após a fermentação retiraram-se amostras para determinações de pH, peso celular seco e atividade enzimática.

B- Estudo do crescimento e produção de L-asparaginase por Erwinia aroideae utilizando soro de queijo, suplementado ou não.

Foram preparadas as seguintes soluções para o estudo :

- Soro de queijo (SQ) :

Soro de queijo em Pó 3,4 g

Água suficiente para 100 ml

- Asparagina (ASN) :

Asparagina8,0 g

Água suficiente para 100 ml

- Triptona (TRN) :

Triptona1,75 g

Água suficiente para 100 ml

- Extrato de Levedura (ELV) :

Extrato de Levedura5,0 g

Água suficiente para 100 ml

Nota : - A soma da proteína do soro (0,33%) mais a proteína da triptona (0,175%) é aproximadamente igual à quantidade usada nos meios anteriores (0,5%); a concentração de lactose é 2,5%.

Em seguida foram preparados vários meios com diferentes composições, como mostra a Tabela 3.8.

TABELA 3.8 - Composição dos meios de fermentação. Adição de triptona, asparagina e extrato de levedura em solução de soro de queijo.

COMPOSIÇÃO	EXPERIMENTOS					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
SQ (ml)	40	40	40	40	40	40
TRN (ml)	0	5	0	5	0	0
ASN (ml)	0	0	5	5	0	5
ELV (ML)	0	0	0	0	5	5
AGUA (ml)	10	5	5	0	5	0

Os meios da Tabela 3.8 foram incubados em duplicatas, conforme descrito anteriormente. Após a fermentação retiraram-se amostras para determinações de pH, peso celular seco e atividade enzimática.

3.6.2. Fermentação em escala piloto

Após a etapa preliminar, onde selecionamos um meio com características ótimas para crescimento celular e produção de L-asparaginase, partimos para fermentação em escala piloto utilizando um fermentador com volume útil de 16 litros, marca Chemap.

Foi usado como meio fermentativo soro de queijo em pó dissolvido até uma concentração de 2,73% (aproximadamente 2,0% em lactose), suplementado com 0,5% de asparagina e 0,3% de triptona.

O meio foi preparado dentro do próprio fermentador onde o pH foi corrigido para 7. Uma parte deste meio, ou seja 1 litro, foi retirado para preparar o inóculo 2 (item 3.5.2.).

O meio de cultura foi esterilizado por 15 minutos a 121°C sob agitação de 400 rpm e posteriormente resfriado até a temperatura de fermentação. Em seguida o inóculo 2 (item 3.5.2.) foi adicionado iniciando-se a fermentação. Amostras foram retiradas no início e a cada hora de fermentação para determinações de pH, peso celular seco, concentração residual de lactose e atividade enzimática.

A - Efeito da temperatura sobre o crescimento e produção de L-asparaginase.

Foram realizados testes com diferentes temperaturas de fermentação (22 °C; 24,5 °C; 26,5 °C e 28 °C) no sentido de se

determinar a temperatura ótima para crescimento e produção de enzima. A taxa de aeração foi de 7,5 litros de ar/minuto e a agitação foi de 500 rpm. Não houve controle de pH durante a fermentação.

B - Fermentação com pH controlado e seu efeito sobre o crescimento e produção de asparaginase.

Foram realizados testes com pH constante (6,5; 7,5 e 8,0) através de adição automática de ácido clorídrico (5 N) ou hidróxido de potássio (5 N) durante a fermentação, com o objetivo de verificar se a produção de enzima ou de células era favorecida ou não. A taxa de aeração foi de 7,5 litros de ar/minuto, a agitação foi de 500 rpm e a temperatura foi de 24,5 °C.

C - Efeitos da aeração e agitação sobre o crescimento e produção de L-asparaginase.

Foram realizados testes sem controle de pH e com temperatura constante de 24,5°C sob diferentes velocidades de agitação e aeração no sentido de verificar sua influência sobre o crescimento e produção de asparaginase e determinar a agitação e aeração ótimas. A velocidade de agitação variou entre 300 e 700 rpm e a taxa de aeração variou entre 4 litros de ar/minuto e 10 litros de ar/minuto.

3.7. Determinação da concentração de lactose

3.7.1. Separação das células

Todas as amostras foram centrifugadas em centrífuga Incibrás - modelo SPIN IV - a 6000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi separado para determinação de lactose e a massa celular decantada foi usada para determinação do peso seco e atividade enzimática.

3.7.2. Hidrólise enzimática da lactose

Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra (item 3.7.1.), contendo lactose foi submetida à hidrólise por ação da enzima β -galactosidase para liberação de glicose. Esta glicose foi posteriormente determinada segundo Dahlqvist (1964) e convertida em termos de concentração de lactose. Ao sobrenadante do item 3.7.1. (0,5 ml) foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 6,5 e 0,5 ml de solução de β -galactosidase diluída 1:10. A mistura foi levada em banho de água a 37°C por 30 minutos (conforme sugere o manual técnico do produto) para completar a reação de hidrólise. A reação foi interrompida pela adição de 1 ml de solução 0,5 M de carbonato de sódio.

3.7.3. Determinação da concentração de glicose

A determinação da concentração de glicose (Dahlqvist, 1964) foi feita conforme procedimento do manual técnico do produto. A 2,5 ml de uma solução de glicose enz-color, foi adicionado 0,01 ml da solução do item 3.7.2 e levada para um banho de água a 37°C por 20 minutos. Após a formação de uma coloração rosa, a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 510 nm. A leitura foi comparada com a de uma solução padrão de glicose (0,1%) e os cálculos de concentrações foram feitos da seguinte forma:

$$\text{Concentração de lactose (g/l)} = \frac{\text{Abs(amostra)}}{\text{Abs (padrão)}} \times \frac{342}{180}$$

3.8. Determinação do pH

Todas as amostras tiveram seus pHs determinados pelo uso direto de pHmetro.

3.9. Determinação do peso seco celular

O precipitado obtido no item 3.7.1. foi ressuspenso em 10 ml de água destilada e novamente centrifugado em centrífuga Fanen modelo 209 a 6000 rpm por 15 minutos. Após o descarte do

líquido sobrenadante, as células foram novamente lavadas, nas mesmas condições acima, e posteriormente secas em estufa à vácuo a 62°C por 16 horas, sob vácuo de 700 mm Hg.

A peso celular seco foi determinado pela diferença de peso entre o tubo com as células secas e o tubo vazio, previamente pesado.

3.10. Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase

3.10.1. Obtenção da massa celular

O precipitado obtido no item 3.7.1. foi ressuspenso em 10 ml de água destilada e novamente centrifugado em centrífuga Fanen modelo 209 a 6000 rpm por 15 minutos. Após o descarte do líquido sobrenadante, as células foram novamente lavadas nas mesmas condições acima por duas vezes e então separadas para uso posterior na etapa de extração da enzima.

3.10.2. Extração da L-asparaginase

O rompimento celular foi conduzido em meio alcalino (Le, 1984) adicionando uma solução de NaOH (pH - 11,5), à massa celular obtida no item 3.10.1., numa relação de 1/1 (1 ml de NaOH/

massa provinda de 1 ml de meio fermentado). A solução foi agitada até mistura completa e deixada em repouso durante 20 minutos para a solubilização da parede celular e liberação da enzima para o meio circundante. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 6500 rpm para separar os resíduos celulares do extrato sobrenadante que contém a enzima.

3.10.3. Determinação da Atividade de L-Asparaginase por "Nesslerização"

A atividade de L-Asparaginase foi determinada segundo Lee et al. (1986), descrito a seguir. Misturaram-se 1,3 ml de solução 0,1 M de tampão borato de sódio (pH 8,5), 0,2 ml do sobrenadante (item 3.10.2.), 0,5 ml de solução 0,04 M de asparagina e deixou-se em repouso por 10 minutos em banho de água a 37°C para se completar a reação de hidrólise da asparagina. A reação foi interrompida através da adição de 0,5 ml de ácido tricloro acético a 15% (p/p). Em seguida, adicionou-se 1,0 ml do reagente de "Nessler" (Morita, 1980) e o volume foi completado a 10 ml com água destilada. A solução permaneceu em repouso por 20 minutos em temperatura ambiente para estabilização da cor amarela formada pela reação entre a amônia e o reagente de "Nessler". A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm. A concentração da amônia liberada na reação foi determinada contra uma curva padrão de sulfato de

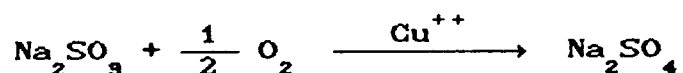
amônia. A reação de hidrólise da asparagina é esquematizada a seguir:



A atividade específica foi obtida através do quociente entre a atividade da amostra em UI/l e o peso celular seco em g/l.

3.11. Determinação do coeficiente de transferência de oxigênio

O método para determinação do coeficiente de transferência de oxigênio (K_v) é baseado na oxidação de sulfito de sódio a sulfato de sódio na presença de Cu^{++} como catalisador (Cooper, 1944) conforme a seguinte reação:



O cálculo do valor do K_v é determinado de acordo com a expressão a seguir:

$$K_v = \frac{N_v}{(\bar{P} - P^*)}$$

onde N_v é a taxa de absorção de oxigênio pela solução de sulfito de sódio em mM/hr, $\bar{P}$ é a pressão parcial do oxigênio em atm e P^* é a pressão hipotética do oxigênio, em atm, que estaria em

equilíbrio com o oxigênio dissolvido na fase líquida. A metodologia para o do cálculo do K_v é mais detalhada no Anexo A.

3.12. Método para o cálculo da taxa específica máxima de crescimento, de produção de L-asparaginase e de consumo de lactose

A taxa máxima de crescimento foi obtida tomando-se o valor máximo da derivada, calculada numericamente, da curva de crescimento (concentração celular versus tempo). Dividindo-se este valor pelo valor da concentração celular existente no mesmo ponto, determinou-se então a taxa específica máxima de crescimento (μ_{MAX}).

O mesmo procedimento foi feito para o cálculo da taxa específica máxima de produção de L-asparaginase ($q_{P_{MAX}}$) e para a taxa específica máxima de consumo de lactose ($q_{S_{MAX}}$), utilizando-se da curva de produção de enzima e de consumo de lactose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Efeito da concentração de lactose em meio contendo extrato de levedura

A figura 4.1 mostra a concentração celular, a atividade enzimática de L-asparaginase e o pH final, para fermentação em erlenmeyer e em meio contendo extrato de levedura (MM1), em função de diferentes níveis de lactose, conforme procedimento descrito no item 3.6.1.1-A. A concentração ótima de lactose foi de 1% quando se obteve uma produção máxima de L-asparaginase de 0,102 UI¹/ml, concordando com os resultados obtidos por Liu e Zajic (1971). Acima desse valor houve inibição na produção da enzima e a massa celular permaneceu praticamente constante; conseqüentemente, houve diminuição da atividade específica. Nota-se que o pH do meio fermentativo no final do processo caiu para valores mais ácidos quando a concentração de lactose aumentou (figura 4.1). Conforme citação em Cedar e Schwartz (1968), Gale (1943) verificou que a síntese das deaminases era estimulada em pHs acima de 8. Cedar e Schwartz (1968) e Peterson e Ciegler (1969) conseguiram melhores resultados para produção de L-asparaginase quando o pH se encontrava em níveis entre 7,5 e 8. Com base nestes dados nota-se que a diminuição na atividade da L-asparaginase foi devido a uma maior queda no pH provocada por níveis mais elevados de lactose.

¹ 1 UI (UNIDADE INTERNACIONAL) DE L-ASPARAGINASE CORRESPONDE A UMA QUANTIDADE DE ENZIMA QUE LIBERA 1 μ MOL DE AMONIA EM 1 MINUTO EM TEMPERATURA DE 37°C.

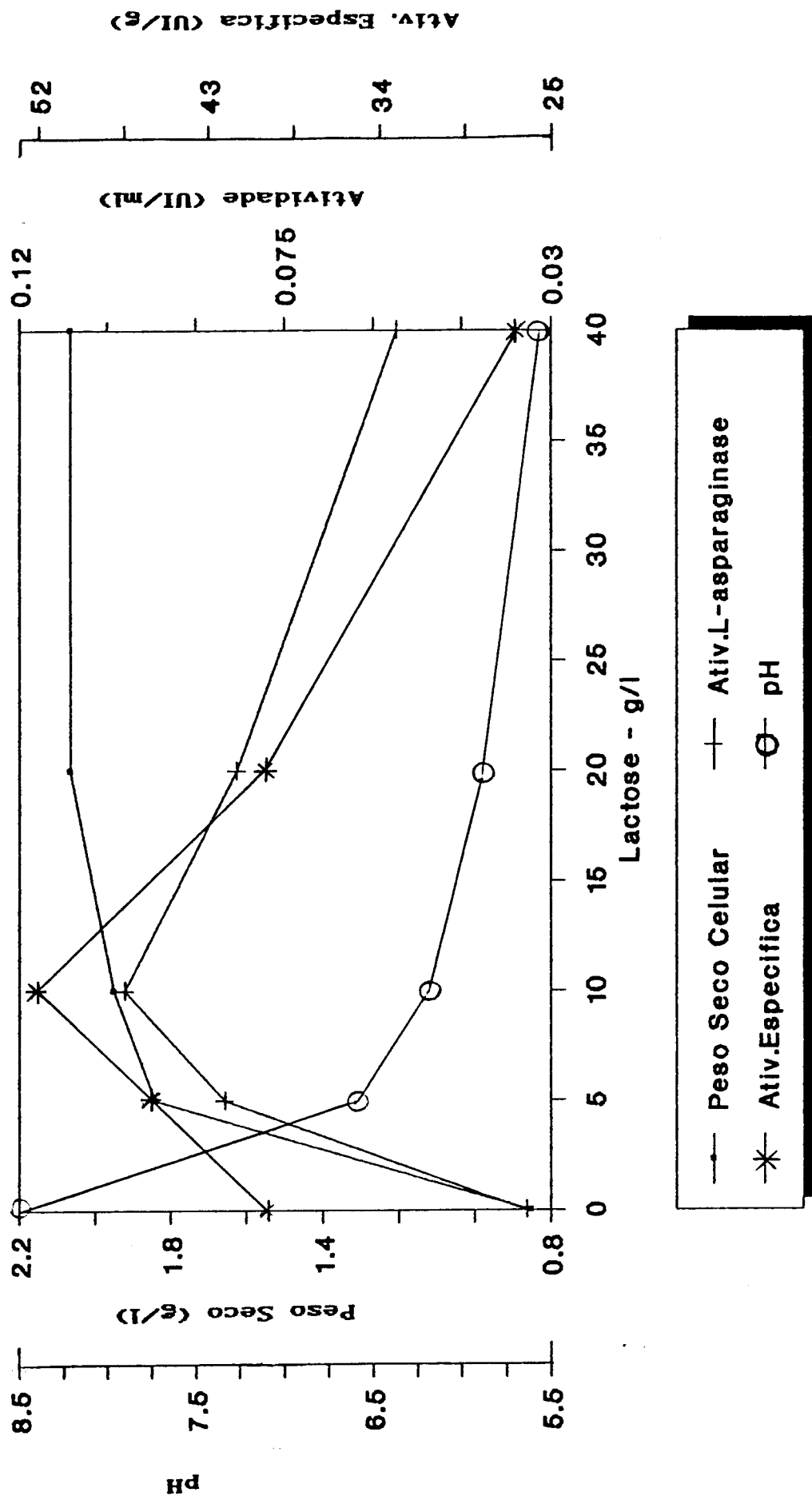


Fig.4.1-Efeito da concentração de lactose sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por *Erwinia aroldae*.

4.2. Efeito da concentração de L-asparagina em meio contendo extrato de levedura

A figura 4.2 mostra a concentração celular, a atividade de L-asparaginase e o pH, para fermentação em erlenmeyer e em meio contendo extrato de levedura (MM2), em diferentes níveis de L-asparagina, conforme procedimento descrito no item 3.6.1.1-B. Uma baixa produção de massa celular e de L-asparaginase foram encontradas quando não houve adição de L-asparagina, comparado aos resultados dos experimentos contendo esse aminoácido; há de se notar que o pH do meio no final da fermentação, neste caso, foi de 5. Com uma adição de L-asparagina ao meio de fermentação (0,2%), a massa celular praticamente duplicou e a produção de L-asparaginase aumentou cerca de 150% ; nota-se também que houve um sensível aumento do pH subindo para 7. Observa-se, portanto, que a adição de L-asparagina ao meio provoca um aumento do pH e há um efeito estimulante para a produção da L-asparaginase. Em níveis acima de 0,4% de L-asparagina, o aumento do pH foi menor subindo para 8,5 e permanecendo constante; o aumento da massa celular e de L-asparaginase foi menor tendendo para valores constantes. Não houve inibição tanto na produção da enzima como no crescimento celular em níveis de até 1,6% desse aminoácido.

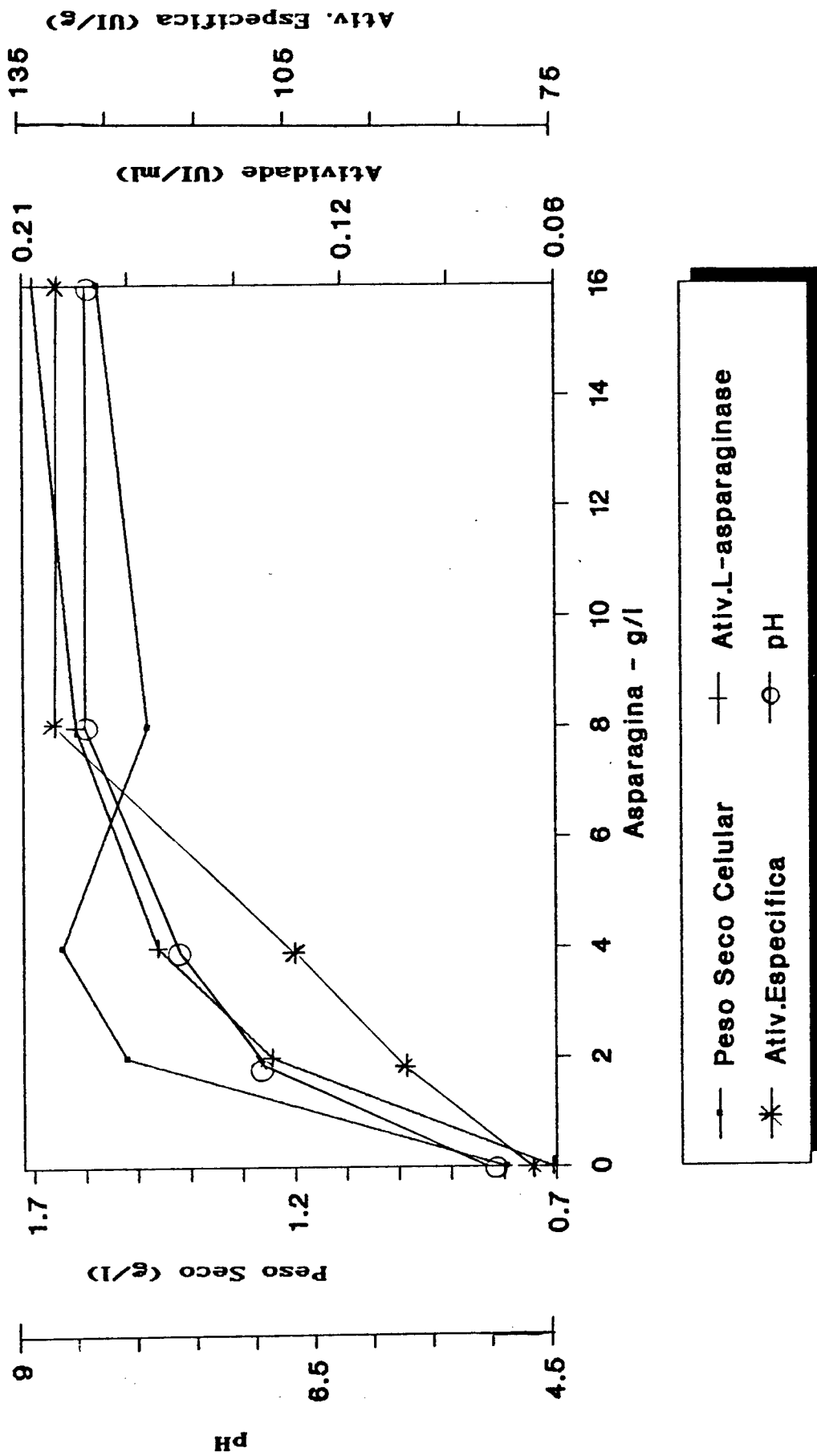


Fig.4.2-Efeito da concentração de asparagina sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por *Erwinia aroldae*.

4.3. Efeito da Concentração de Extrato de Levedura

As figuras 4.3 e 4.4 mostram a concentração celular e a produção de L-asparaginase em diferentes níveis de extrato de levedura no meio de fermentação, conforme procedimento descrito no item 3.6.1.1-C. Uma baixa produção de L-asparaginase e de massa celular foram observados quando as células cresceram em meio isento de extrato de levedura. A figura 4.3 mostra que em níveis acima de 2% de extrato de levedura ocorreu inibição do crescimento celular; já para a atividade enzimática, não houve aumento de atividade na faixa de concentração de extrato de levedura de 0,2 a 2%, sendo que se observa uma pequena queda de atividade para concentrações acima de 2% de extrato de levedura. Este efeito de inibição é ainda mais pronunciado quando a L-asparagina esteve presente (figura 4.4). Por outro lado, com a adição de L-asparagina houve um aumento substancial tanto da massa celular quanto da atividade enzimática indicando que há um efeito estimulante desse aminoácido sobre ambos, massa celular e atividade enzimática, ou seja, com adição de L-asparagina a massa celular foi de 3,5 g/l contra 1,4 g/l em sua ausência e a atividade de L-asparaginase foi de 0,16 UI/ml contra 0,11 UI/ml (ponto máximo de ambas as curvas). Pela curva de atividade específica nota-se também que o extrato de levedura tem um efeito estimulante muito maior sobre o crescimento celular do que sobre a produção de enzima, fato este comprovado pela constante queda na

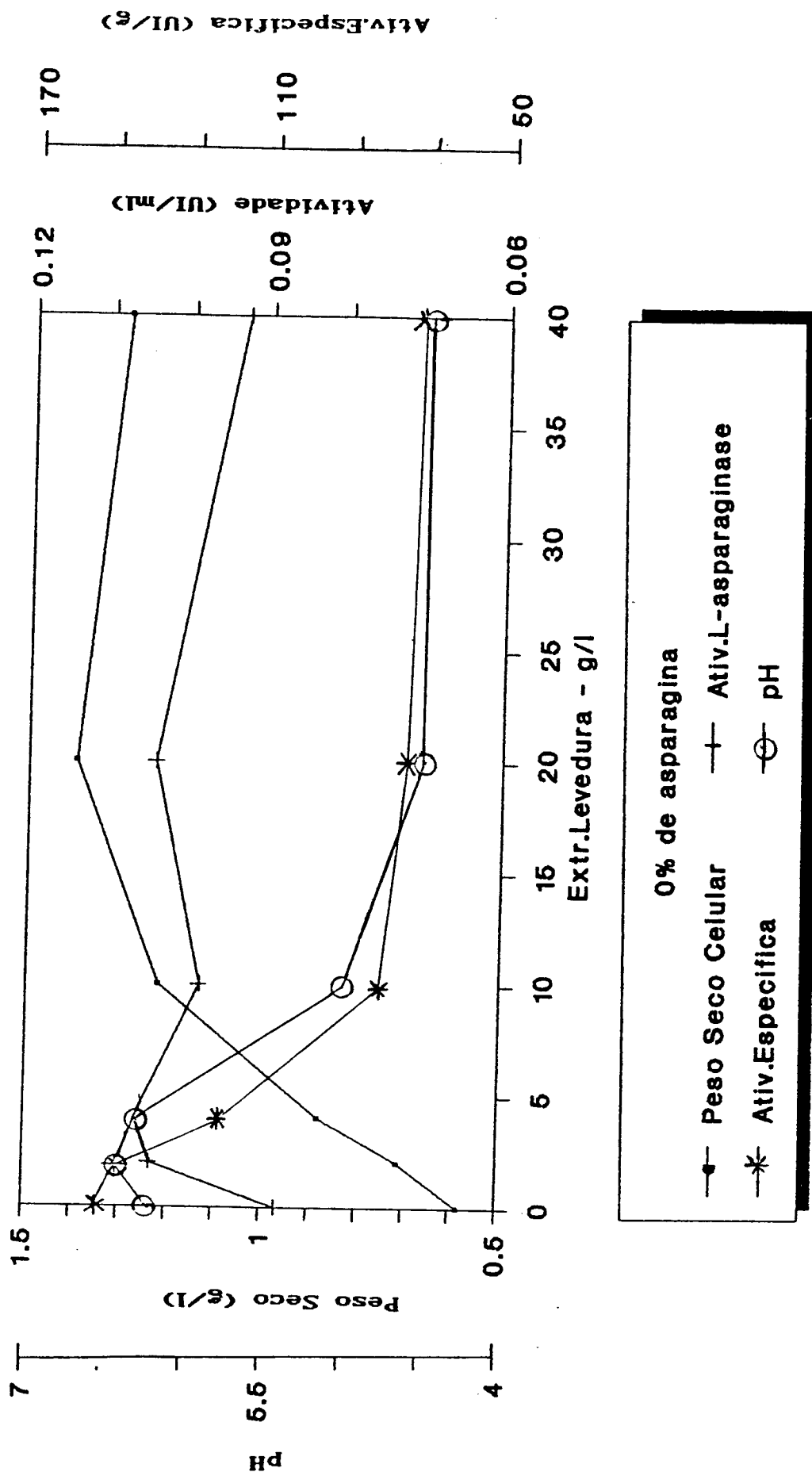


Fig.4.3 - Efeito da concentração de Extrato de Levedura sobre o crescimento e produção de asparaginase por *E. arvalis*.

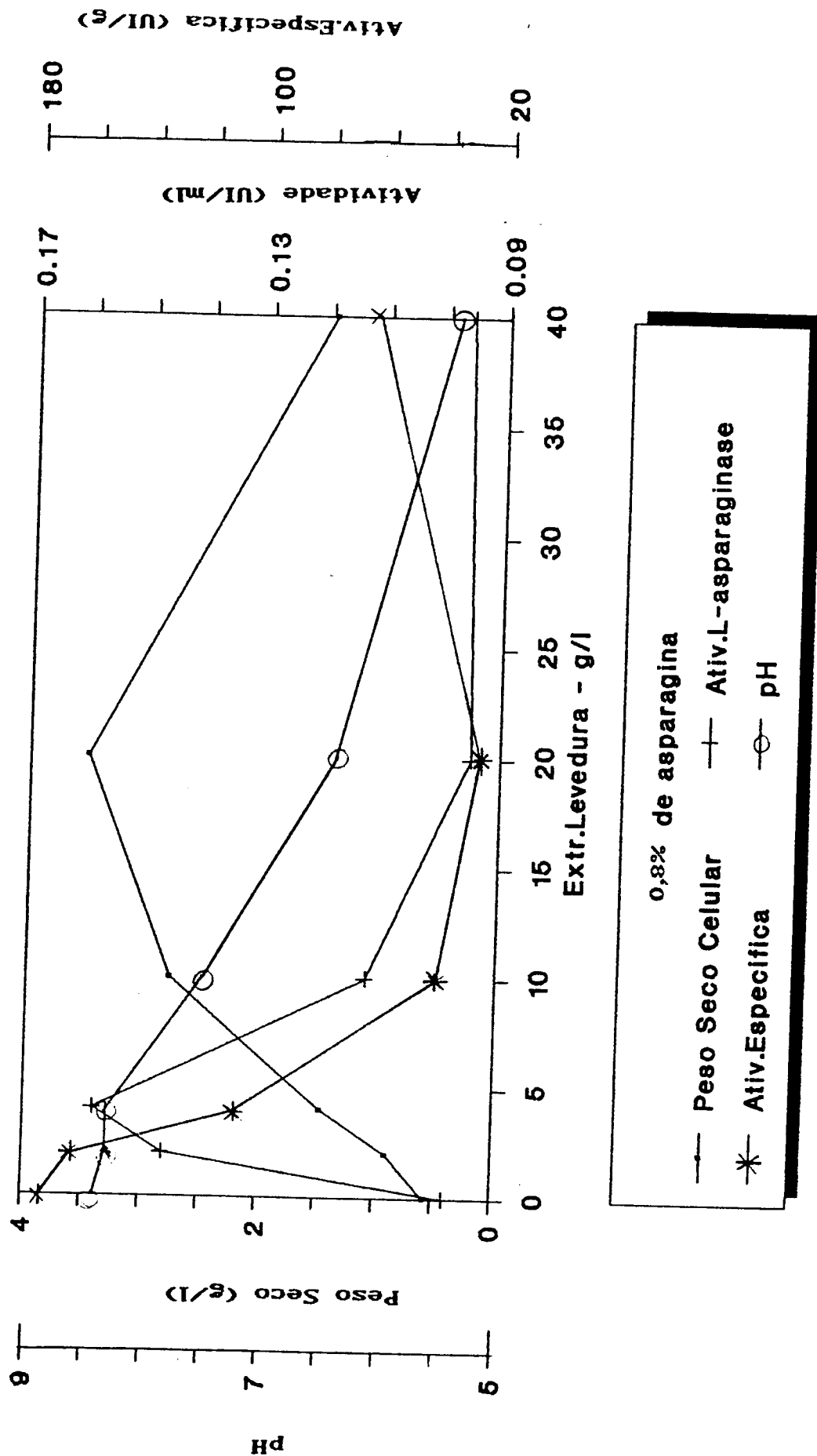


Fig.4.4 - Efeito da concentração de Extrato de Levedura sobre o crescimento e produção de asparaginase por *E. arvalis*.

curva de atividade específica. Como a glicose exerce um efeito inibidor sobre a produção de L-asparaginase (Liu e Zajic, 1971), e tendo sido determinado uma concentração de 14% de glicose no extrato de levedura utilizado, a diminuição da atividade específica com o aumento da concentração do extrato de levedura é devido justamente ao aumento da concentração de glicose no meio. Nota-se que com o aumento da concentração do extrato de levedura, para ambos os experimentos com adição de 0,8% de L-asparagina ou sem adição de L-asparagina, o pH do final da fermentação se torna mais ácido devido ao fato de se estar aumentando a concentração de glicose. Nota-se ainda que no experimento com L-asparagina o pH se situa numa faixa mais básica e sem L-asparagina, numa faixa mais ácida. Isto mais uma vez nos mostra que há uma maior produção, tanto de células como de enzima, em níveis de pH mais altos e que a L-asparagina contribui para isso.

4.4. Efeito da concentração do soro de queijo no meio fermentativo

A figura 4.5 mostra o efeito da concentração do soro de queijo no meio fermentativo sobre o crescimento celular e produção de L-asparaginase conforme procedimento descrito no item 3.6.1.2-A. A menor produção de massa celular e de atividade de L-asparaginase foi encontrada quando a concentração de lactose no

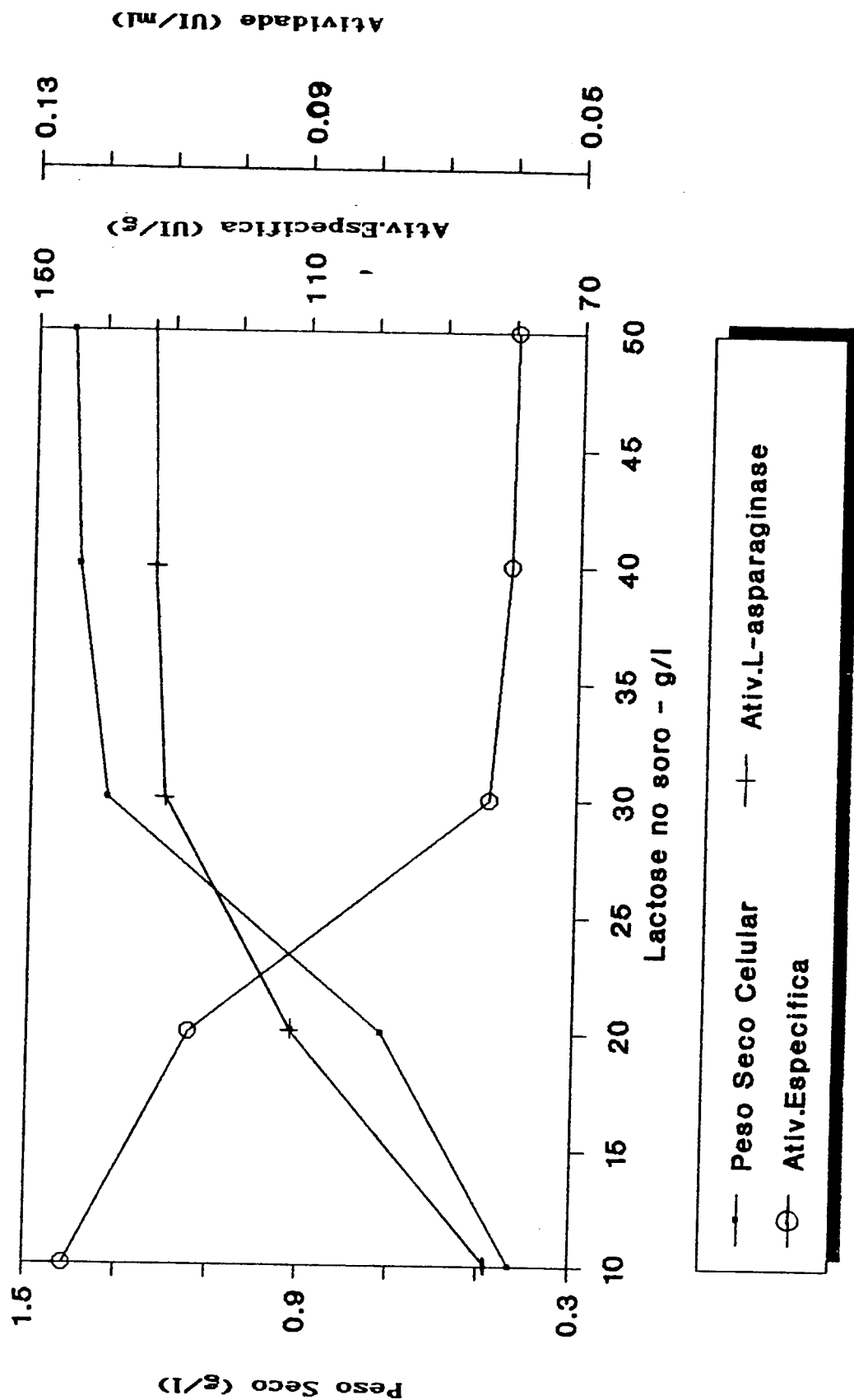


Fig.4.5 - Efeito da concentração do Soro de queijo sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae*.

soro de queijo diluído foi de 1%. Numa concentração acima de 3% o aumento na produção de massa celular e de atividade enzimática foi muito pequeno tendendo para um valor constante. Observa-se também que a atividade específica cai com o aumento da concentração do soro de queijo e, assim sendo, consideramos que 2% de concentração foi um nível ótimo, além do que, acima desse limite, há grande formação de grumos (observação visual de proteína coagulada durante a esterilização), o que dificulta a fermentação e as análises posteriores.

4.5. Efeito da suplementação do soro de queijo diluído

A figura 4.6 mostra a produção celular e a produção de L-asparaginase tendo como meio fermentativo base o soro de queijo numa concentração de 2% em termos de lactose, e suplementado com diversos constituintes conforme procedimento descrito no item 3.6.1.2-B. Uma baixa produção de massa celular e enzima foram obtidos quando se usou soro não suplementado ou suplementado somente com extrato de levedura (experimentos E1 e E5, respectivamente), mostrando que o extrato de levedura não é essencial quando usado como suplemento de soro de queijo a 2% em lactose. A adição de triptona ao meio base (experimento E2) favoreceu mais especificamente a produção de massa celular e, por sua vez, a adição de L-asparagina (experimento E3) teve uma

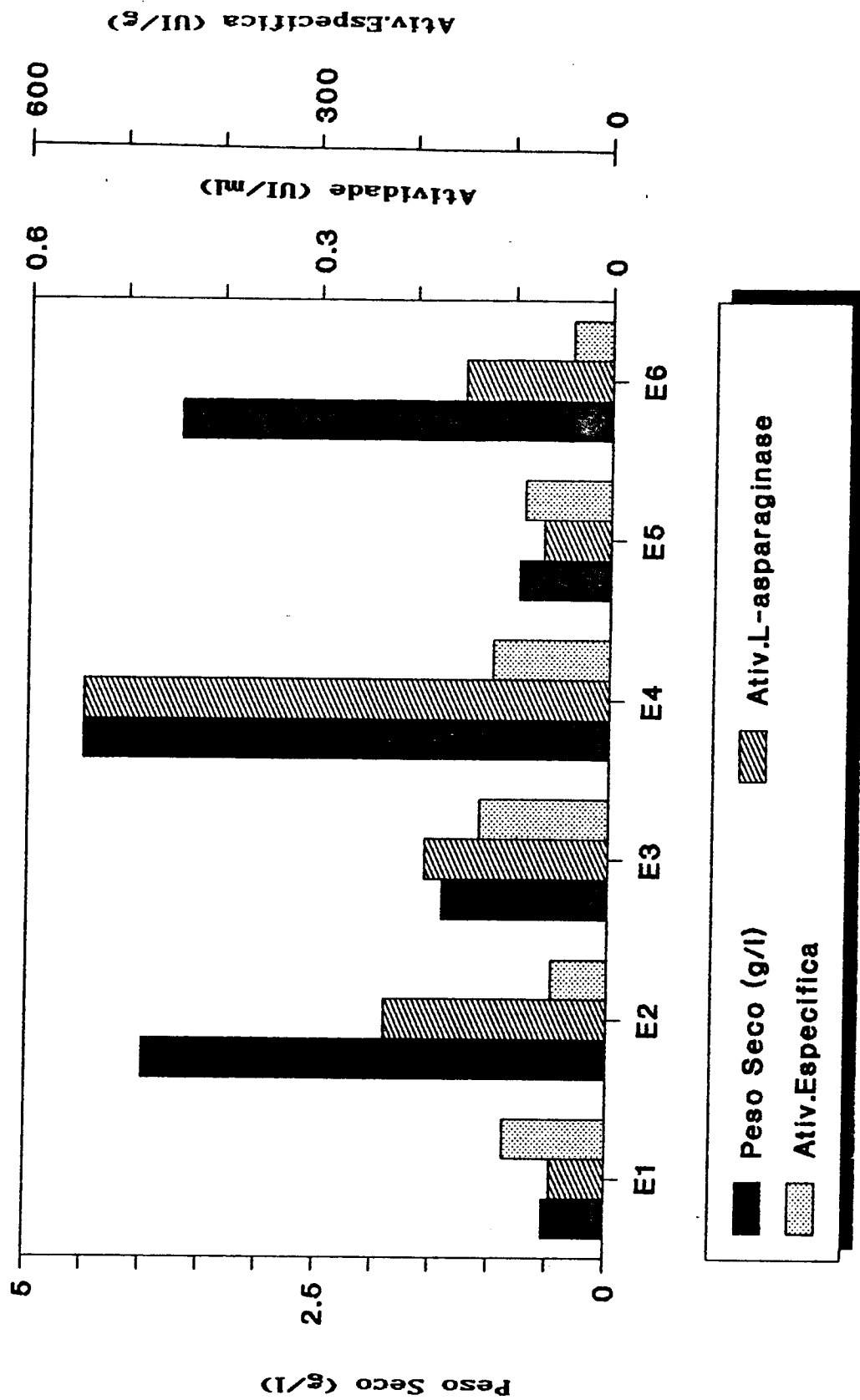


Fig.4.6-Efeito da suplementação do soro de queijo sobre o crescimento e produção de L-asparaginase por *Erwinia aroldae*.

influência mais pronunciada sobre a produção de L-asparaginase, onde se conseguiu a maior atividade específica. No experimento onde se usou ambos, extrato de levedura e L-asparagina (experimento E6), notou-se um comportamento semelhante àquele onde somente a triptona esteve presente (experimento E2). O uso simultâneo de triptona e L-asparagina (experimento E4) forneceu o melhor resultado, onde as produções de massa celular e de L-asparaginase foram máximas e a atividade específica foi comparável à atividade máxima conseguida (experimento E3). Cabe ressaltar também o pronunciado efeito estimulante sobre a produção de L-asparaginase pela L-asparagina.

4.6. Efeito da temperatura de fermentação sobre a taxa de crescimento e produção de L-asparaginase em escala piloto

O efeito da temperatura de fermentação sobre a taxa de crescimento e produção de L-asparaginase foi estudado. As figuras 4.7 a 4.10 mostram o comportamento do pH, massa celular, produção de enzima e consumo de lactose, em soro de queijo diluído a uma concentração de 2% em termos de lactose, durante o curso da fermentação, em diferentes temperaturas. A Tabela 4.1 mostra os valores obtidos para a taxa específica de crescimento celular durante a fase exponencial (μ_{MAX}), taxa específica máxima de produção de L-asparaginase ($q_{P_{MAX}}$), taxa específica máxima de consumo de lactose ($q_{S_{MAX}}$), massa total produzida (M_t), atividade

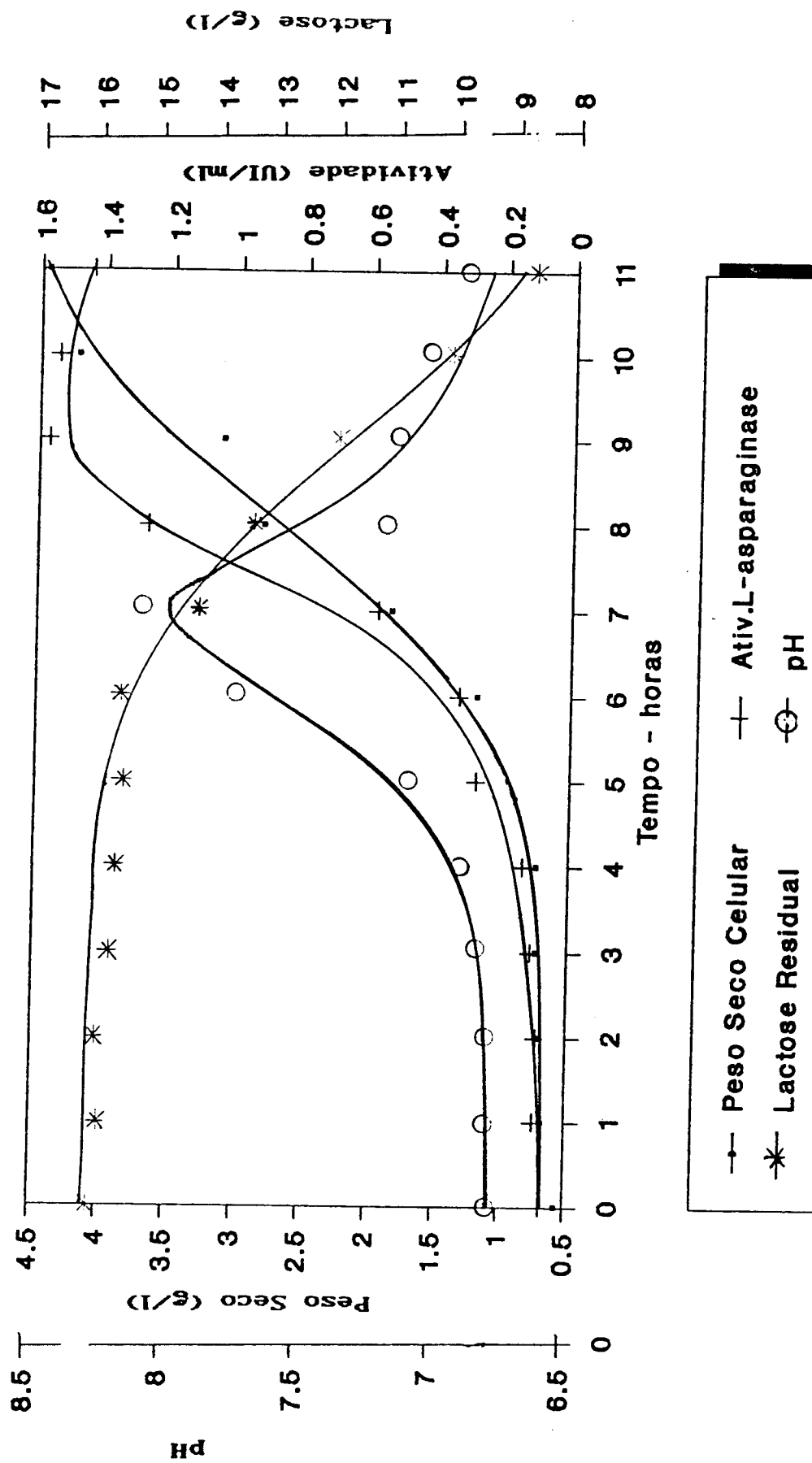


Fig.4.7- Fermentação de soro de queijo diluído por *Erwinia aroideae* a 22 C em fermentador de 16 litros.

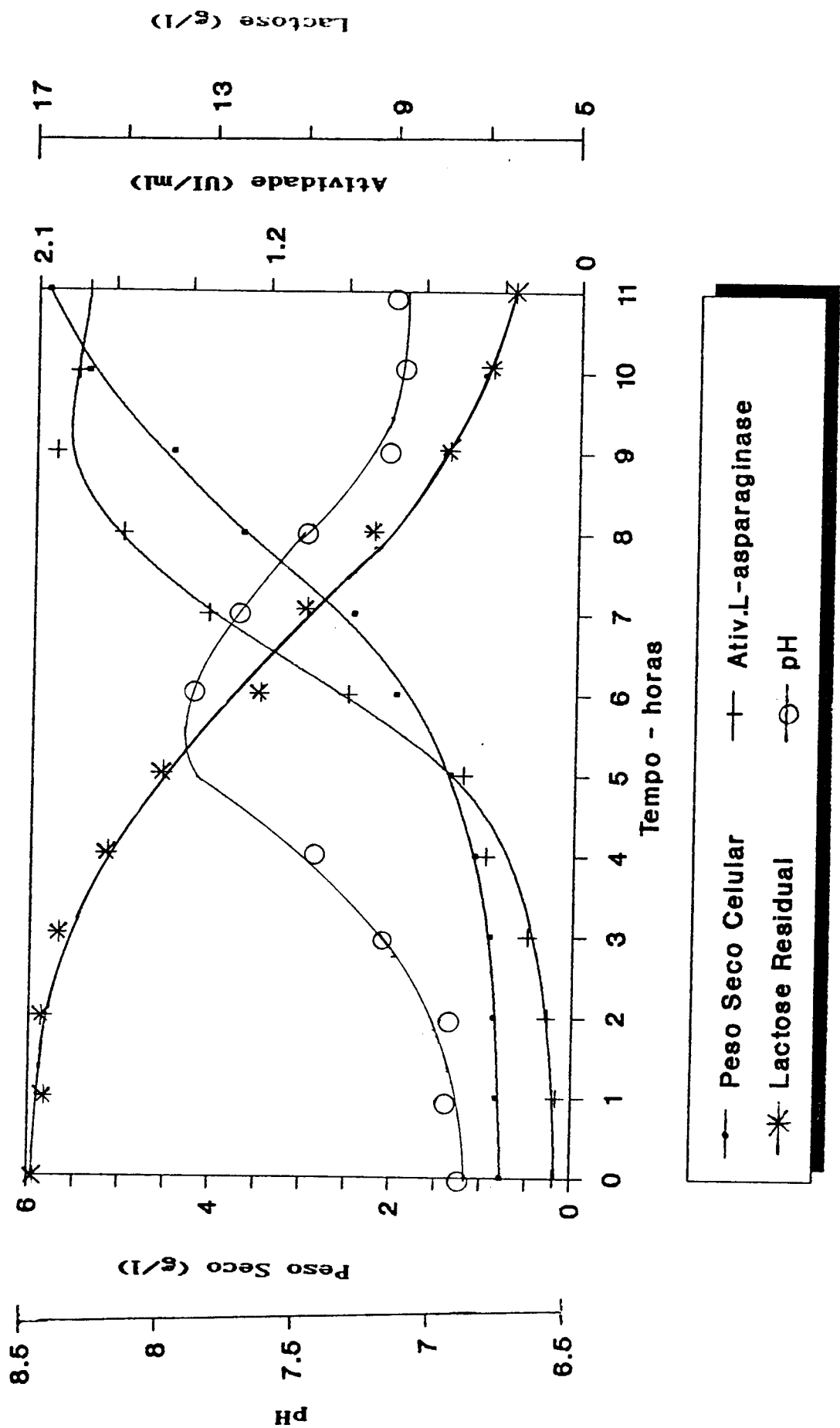


Fig.4.8- Fermentação de soro de queijo diluído por *Erwinia aroidae* a 24,6°C em fermentador de 16 litros.

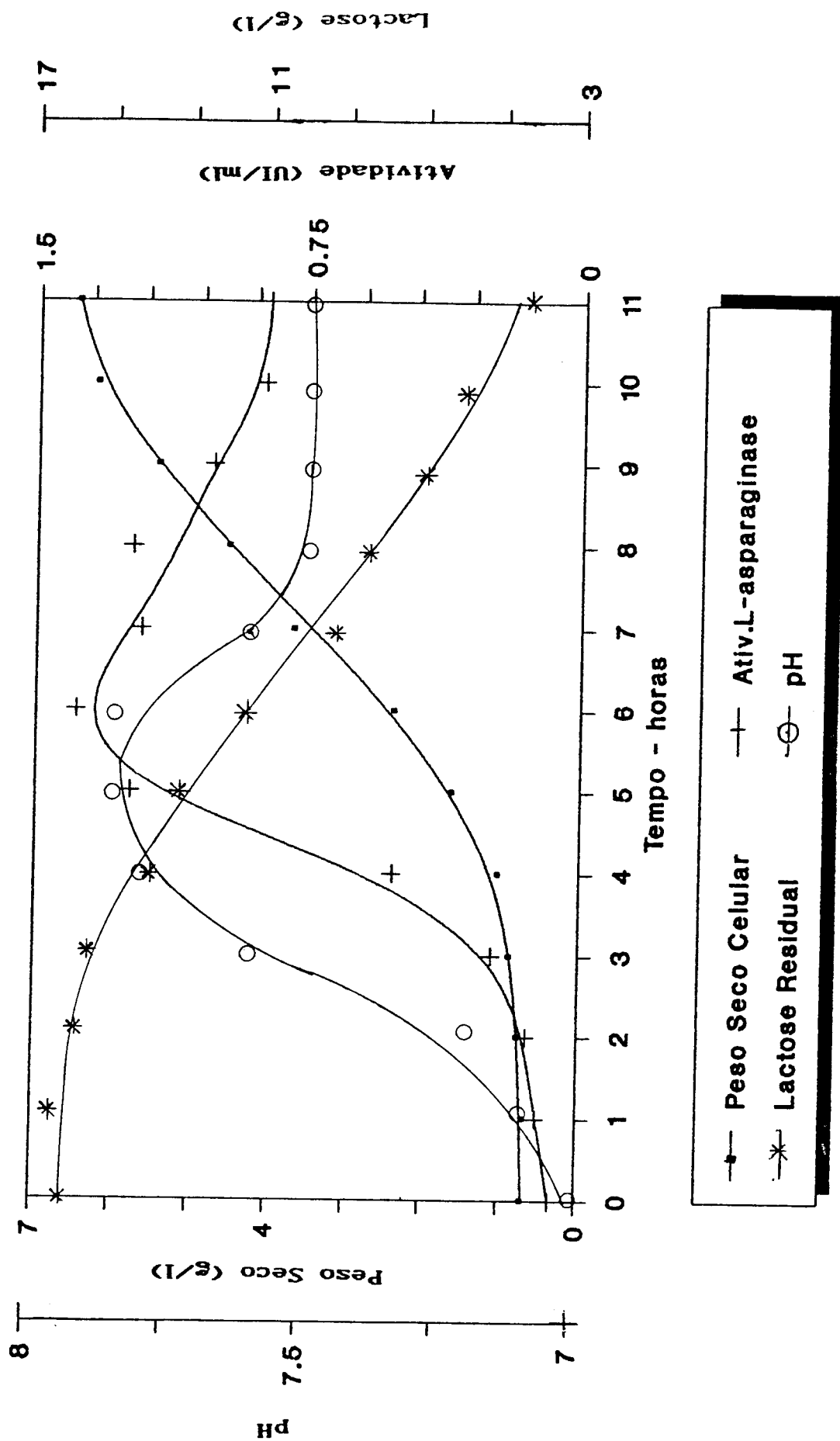


Fig. 4.9-Fermentação de soro de queijo diluído por *Erwinia aroldae* à 26,5°C em fermentador de 16 litros.

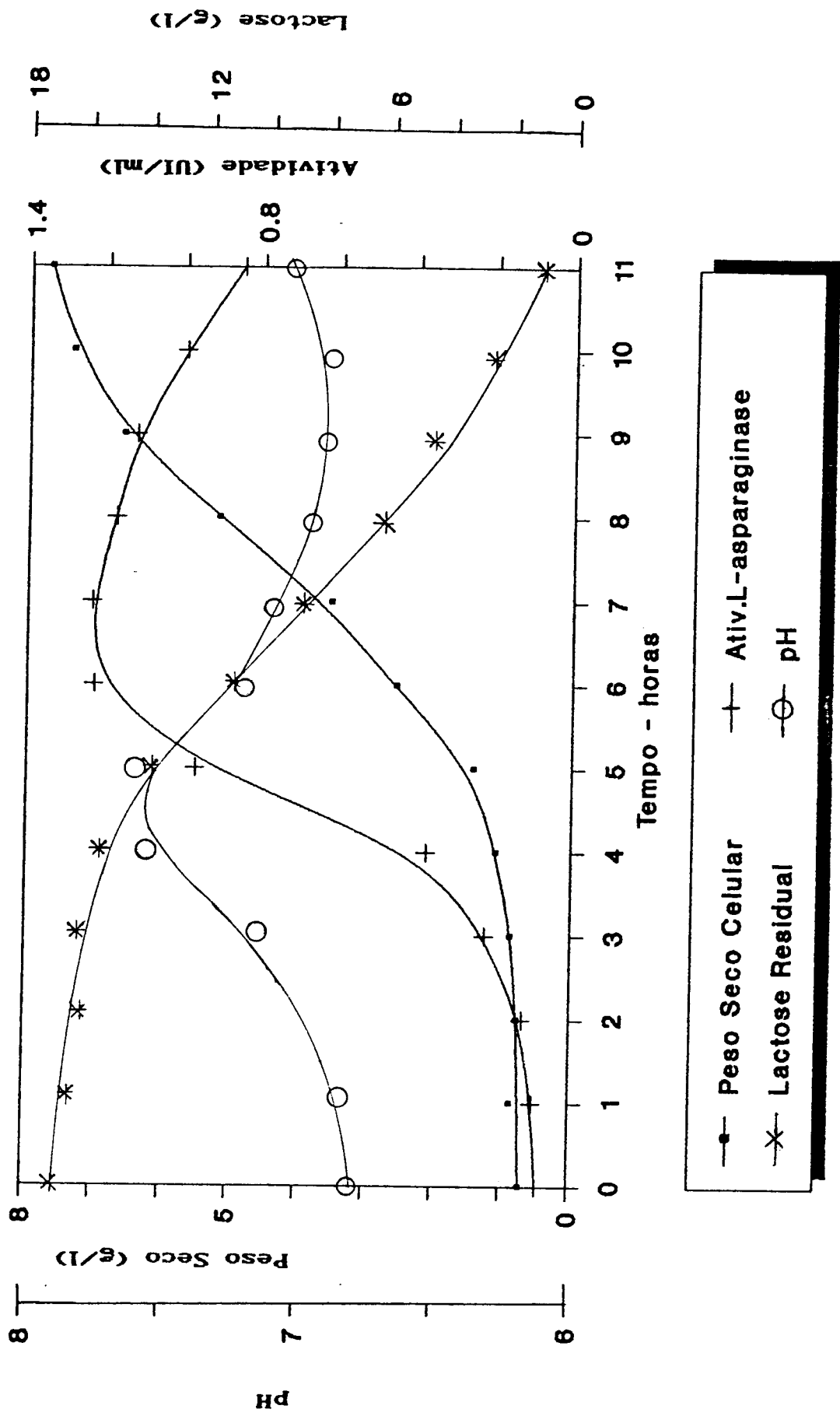


Fig.4.10-Fermentação de soro de queijo diluído por *Erwinia aroideae* a 28°C em fermentador de 16 litros.

enzimática máxima (AEM), consumo total de lactose (CTL) e pH máximo, nas diferentes temperaturas.

TABELA 4.1 - Parâmetros cinéticos, peso celular seco, lactose residual, atividade máxima e pH máximo das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função da temperatura em fermentador de 16 litros.

TEMP. (°C)	μ_{MAX}^*	q_{PMAX}^*	q_{SMAX}^*	M_t (g/l)	AEM (UI/ml)	CTL (%)	pH
22,0	0,33	0,25	0,05	4,44	1,57	46,0	8,1
24,5	0,37	0,28	0,10	5,89	2,02	61,4	8,0
26,5	0,41	0,48	0,11	6,50	1,39	72,5	7,8
28,0	0,52	0,34	0,15	7,70	1,23	93,3	7,6

* UNIDADES = h⁻¹

A menor produção de massa celular foi observada quando a temperatura foi mantida em 22°C. Aumentando-se a temperatura, nota-se um aumento na massa celular produzida bem como na taxa específica de crescimento (μ_{MAX}), obtendo-se um valor máximo a 28°C (figura 4.11), fato este também observado por Liu e Zajic (1973).

A energia de ativação para o crescimento celular em soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina foi de

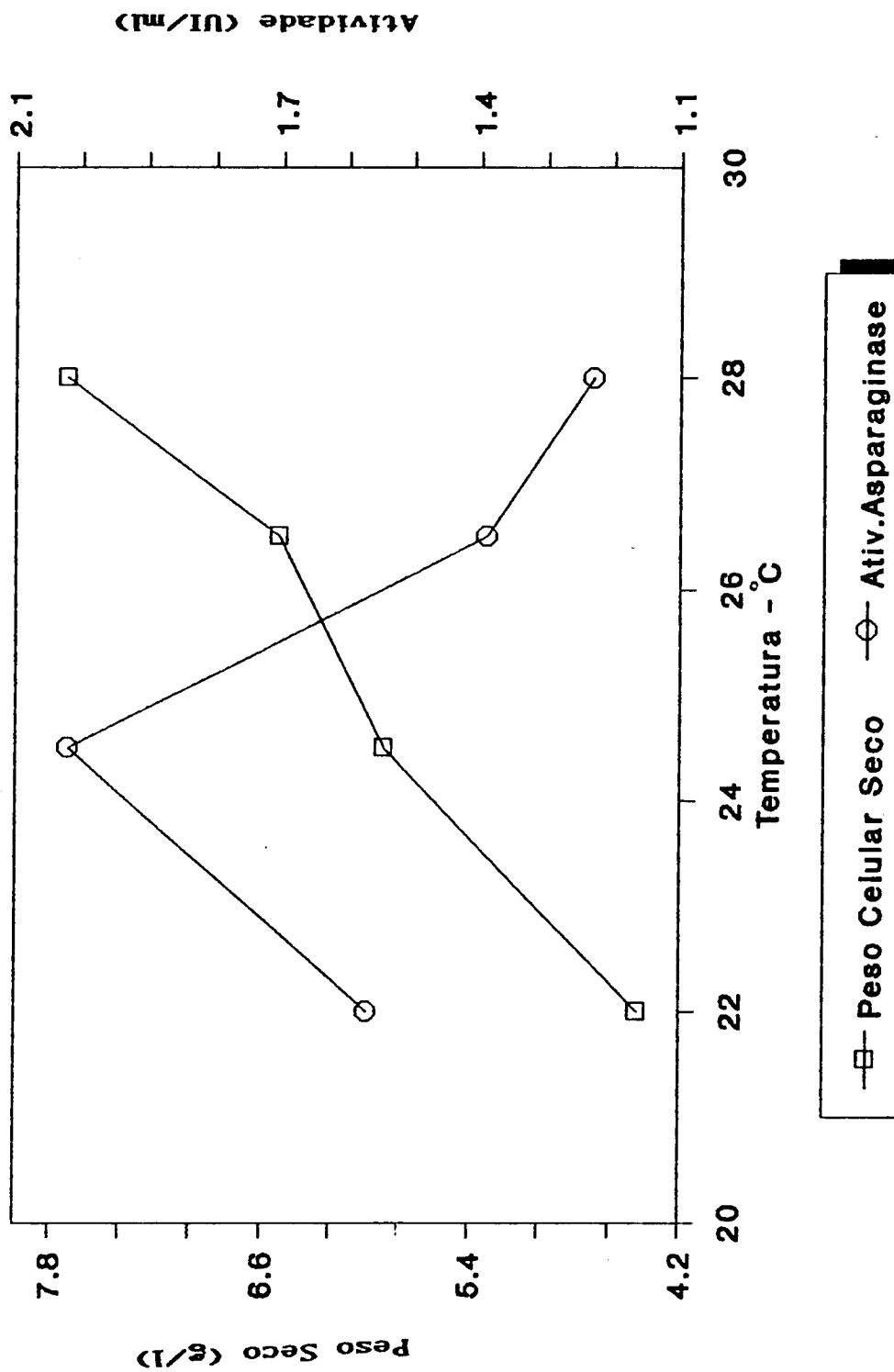


Fig.4.11 - Efeito da temperatura sobre a produção de células e enzima em soro de queijo por *Erwinia aroideae*.

8038 cal/mol para a faixa de 22°C a 26,5°C, através da equação de "Arrhenius", plotando-se a taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ_{MAX}) em função da temperatura absoluta (figura 4.12). Liu e Zajic (1973) conseguiram um valor muito próximo de 8500 cal/mol.

Na figura 4.11, pode-se verificar o comportamento da produção de enzima em função da temperatura de fermentação. Observa-se que a temperatura ótima para formação de enzima é de 24,5°C, um valor muito próximo daquele observado por Liu e Zajic (1973), os quais determinaram o ótimo a 24°C. Um aumento na temperatura de 24,5°C para 28°C reduziu a produção da enzima de 2,02 UI/ml para 1,23 UI/ml respectivamente, isto é, uma redução de 39%, enquanto que a massa seca celular aumentou de 5,89 g/l para 7,7 g/l, isto é, um aumento de 31%.

Nas temperaturas de 26,5°C e 28°C a atividade enzimática máxima foram de 1,39 UI/ml e 1,23 UI/ml, respectivamente, alcançada após 6 horas de fermentação; estes valores foram maiores que os obtidos a 22°C e 24,5°C, que foram 0,33 UI/ml e 0,88 UI/ml, respectivamente, no mesmo tempo de fermentação. Entretanto, nas temperaturas de 22°C e 24,5°C a atividade enzimática continuou a subir, alcançando valores máximos de 1,57 UI/ml e 2,02 UI/ml, respectivamente, maiores que os obtidos nas outras temperaturas, após 9 horas de fermentação.

A atividade máxima foi atingida próximo à fase exponencial de crescimento (figuras 4.7 a 4.10); nas temperaturas mais baixas (22°C e 24,5°C) ela foi atingida após a fase

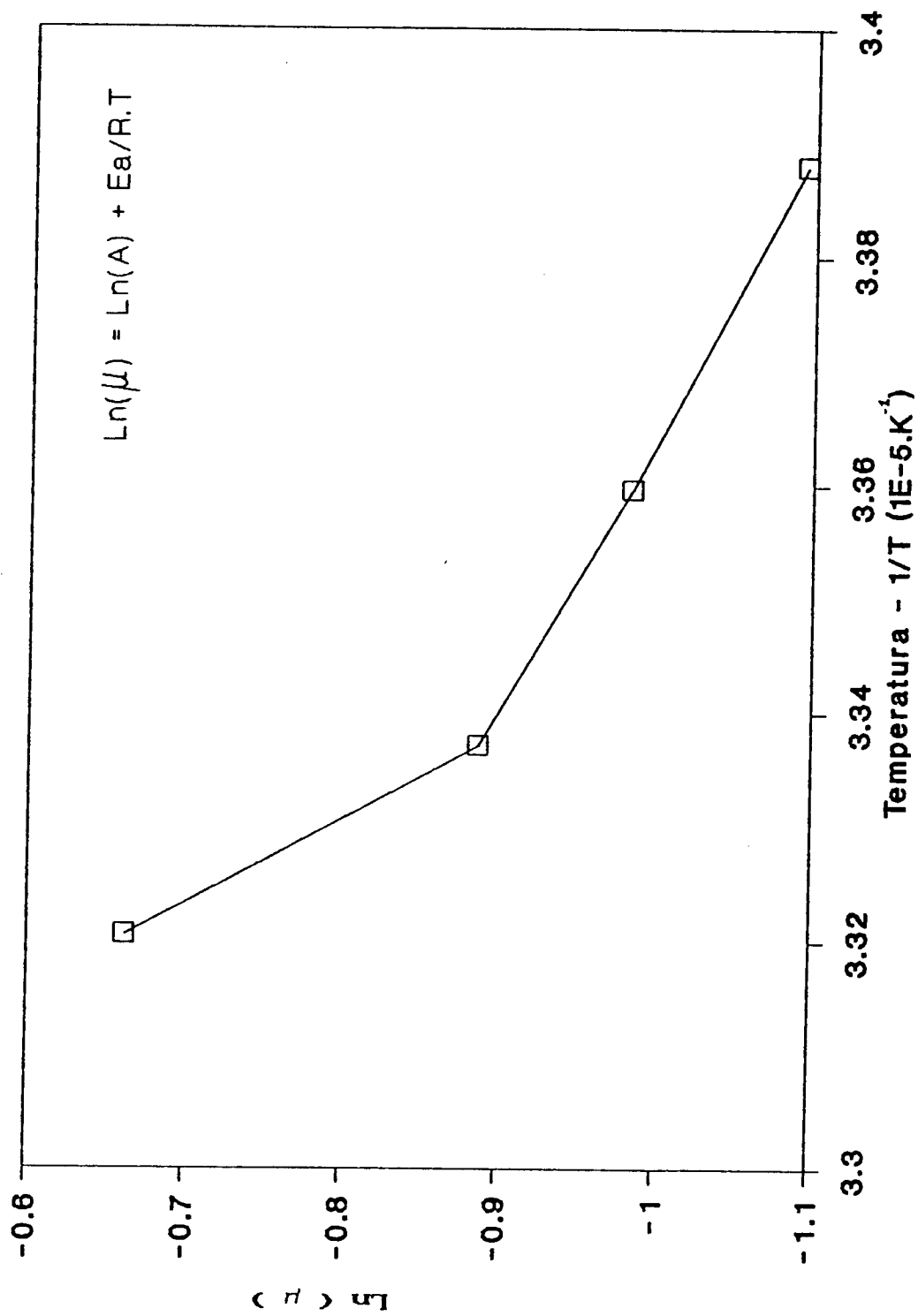


Fig.4.12 - Curva de Arrhenius de crescimento celular de *Erwinia aroideae* em soro de queijo.

exponencial de crescimento, próximo à fase estacionária, e a 26,5°C e 28°C, a atividade máxima foi atingida mais rapidamente, anterior à fase exponencial de crescimento. Notou-se, portanto, uma maior atividade do microrganismo, para produção de massa celular bem como de enzima, nas temperaturas mais altas. Entretanto, o efeito dessa maior atividade do microrganismo sobre a produção de L-asparaginase é negativo, uma vez que a atividade máxima conseguida se tornou menor.

A atividade específica máxima de produção de enzima aumentou com o aumento da temperatura até 26,5°C e posteriormente verificou-se uma redução desta atividade indicando que ocorreu uma inibição na formação da enzima pela temperatura, conforme pode ser observado pela figura 4.13, onde foi plotada a taxa específica máxima de produção de enzima (q_{p_MAX}) em função da temperatura de fermentação.

O consumo de lactose também pode ser observado nas figuras 4.7 a 4.10. Nota-se que, a partir do momento em que a atividade de L-asparaginase começa a subir, o consumo da lactose começa a aumentar. Neste momento também se observa um aumento na concentração celular (início da fase exponencial).

O consumo de lactose é maior em temperaturas mais altas, um comportamento oposto ao da produção de L-asparaginase, que diminui com o aumento da temperatura. Nota-se também que em temperaturas mais baixas (22°C e 24,5°C) a taxa de consumo de lactose é menor, aumentando com o acréscimo da temperatura. Isto

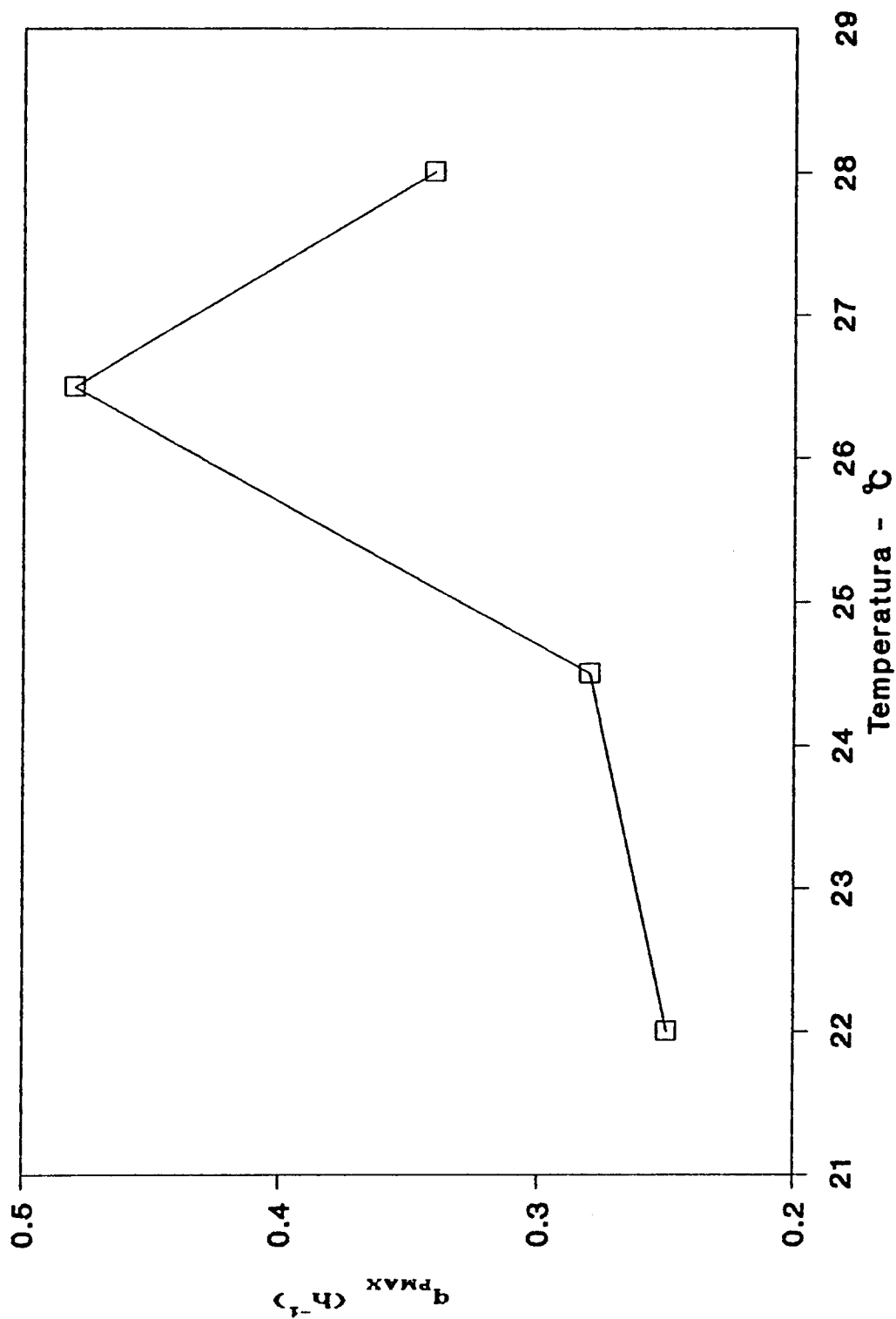


Fig.4.13- Efeito da temperatura sobre a taxa específica de produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae*.

se deve ao fato de que ocorre hidrólise da lactose e há um acúmulo de glicose no meio. Este acúmulo de glicose é maior nas temperaturas mais altas (26,5°C e 28°C) e é o responsável pela inibição da produção da L-asparaginase, conforme citam Liu e Zajic (1971) .

As figuras 4.14, 4.15 e 4.16 mostram o crescimento celular, a produção de L-asparaginase, o consumo de lactose e o aparecimento de glicose no meio fermentativo. Os pontos máximos das curvas de atividade enzimática e de glicose tem abcissas próximas, sugerindo uma relação entre a produção de L-asparaginase e o acúmulo de glicose no meio.

O pH do meio aumentou em consequência da atividade de L-asparaginase a qual libera ions NH_3^+ , produto da reação desta enzima com o aminoácido L-asparagina. Quando a taxa de consumo de lactose aumentou, observou-se a queda de pH. Com o aumento da temperatura, o pH máximo diminuiu; isso se explica, uma vez que a atividade de L-asparaginase também diminuiu e, conseqüentemente, a liberação de ions NH_3^+ foi menor.

4.7. Fermentação com pH controlado e o efeito sobre o crescimento e produção de L-asparaginase em escala piloto

O efeito do monitoramento do pH durante o curso da fermentação sobre o crescimento celular e produção da enzima

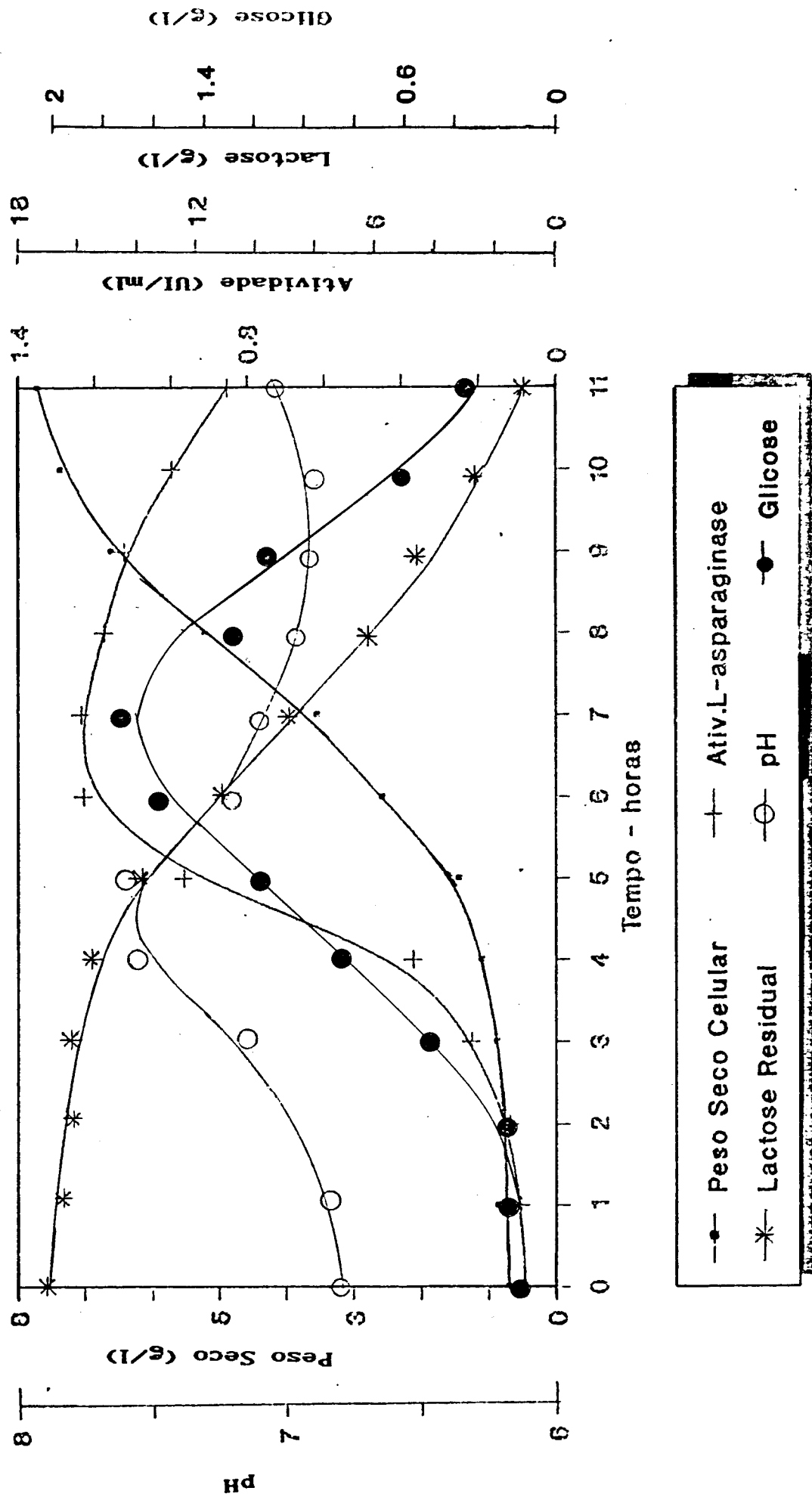


Fig.4.14-Fermentação de soro de queijo a 28°C por *Erwinia aroldae*.

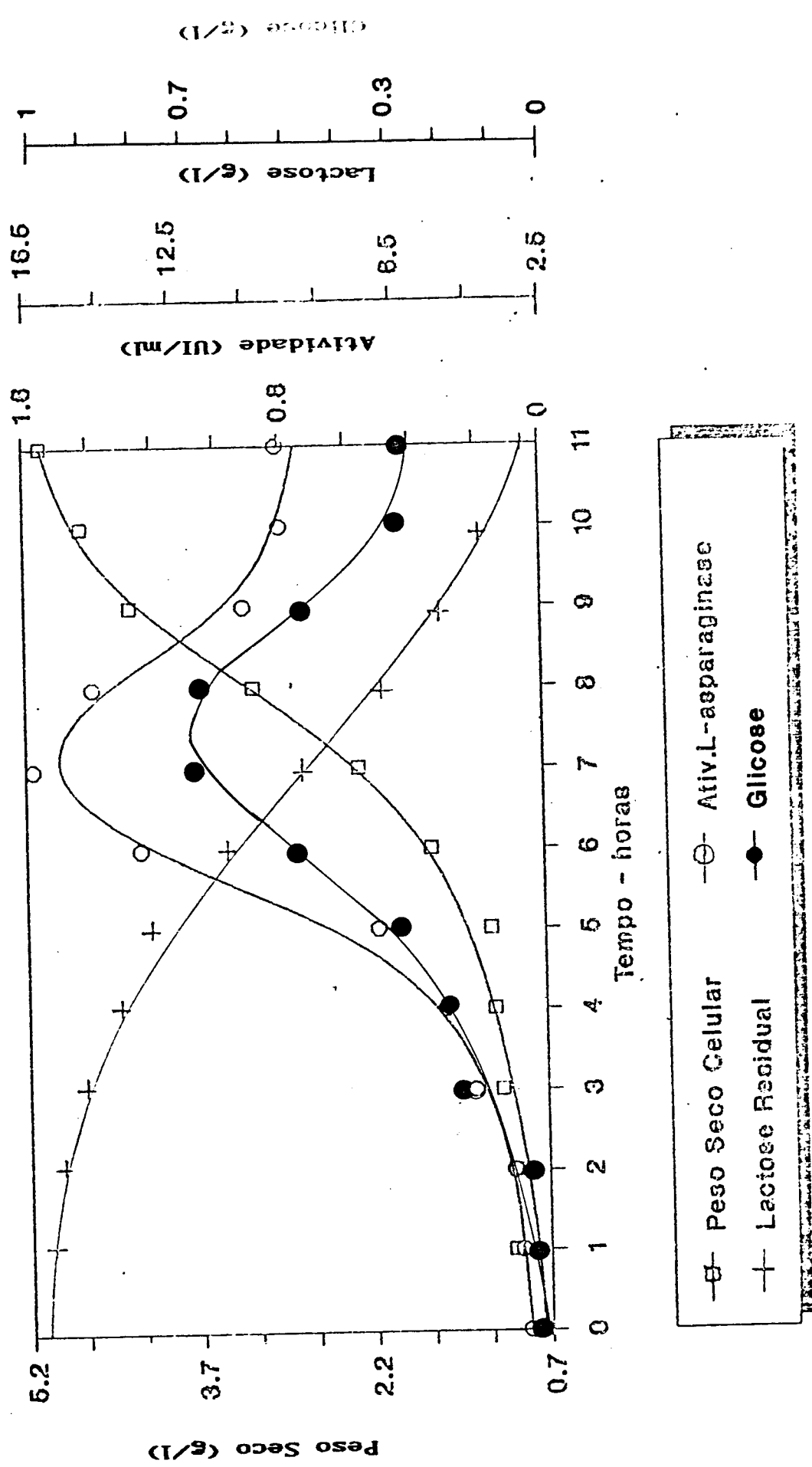


Fig.4.15- Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroldae* a 24,5°C e pH constante igual a 8.

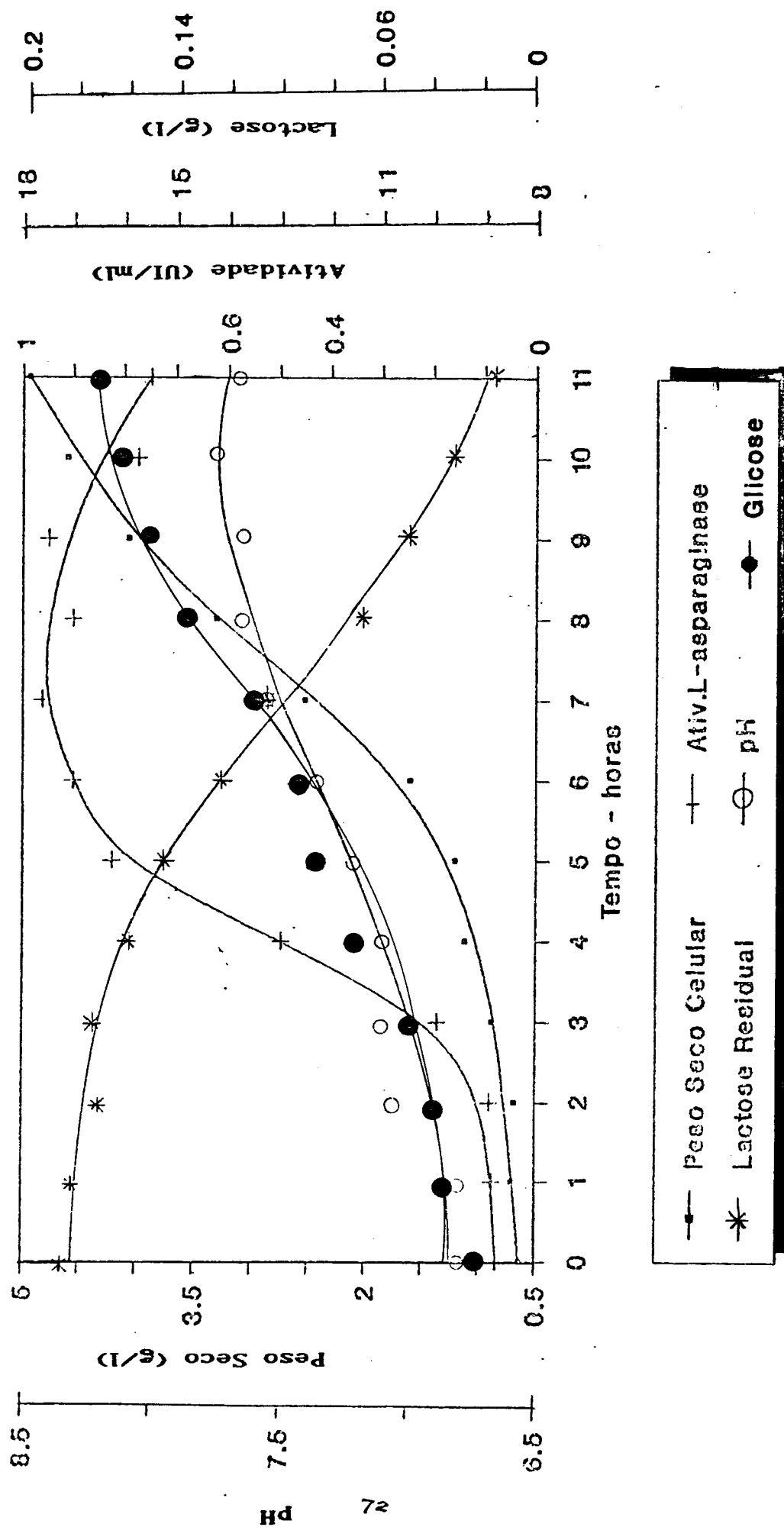


Fig.4.16- Fermentação de soro de queijo por *E. arloides*, a 24,5°C, 300 rpm e 7,5 L de ar/min.

L-asparaginase foi estudado. As figuras 4.17 a 4.19 mostram o comportamento do crescimento celular, produção de enzima e consumo de lactose nos três pHs testados, a 24,5°C. A Tabela 4.2 mostra os valores obtidos da taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{MAX}), taxa específica máxima de produção de L-asparaginase ($q_{P_{MAX}}$), taxa específica máxima de consumo de lactose ($q_{S_{MAX}}$), massa total produzida (M_t), atividade enzimática máxima (AEM) e consumo total de lactose (CTL), nas fermentações onde houve monitoramento do pH e, para efeito comparativo, num teste onde não houve controle do pH (SC), mas permanecendo constantes as demais condições.

TABELA 4.2 - Parâmetros cinéticos, peso celular seco, lactose residual e atividade máxima das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função dos três pHs monitorados e um teste sem controle, a 24,5°C.

pH	μ_{MAX}^*	$q_{P_{MAX}}^*$	$q_{S_{MAX}}^*$	M_t (g/l)	AEM (UI/ml)	CTL (%)
6,5	0,36	0,05	0,17	5,17	0,46	75,8
7,5	0,37	0,12	0,16	5,08	0,70	79,2
8,0	0,33	0,34	0,20	5,04	1,58	82,5
SC	0,37	0,28	0,18	5,89	2,02	61,4

* - UNIDADE = h⁻¹

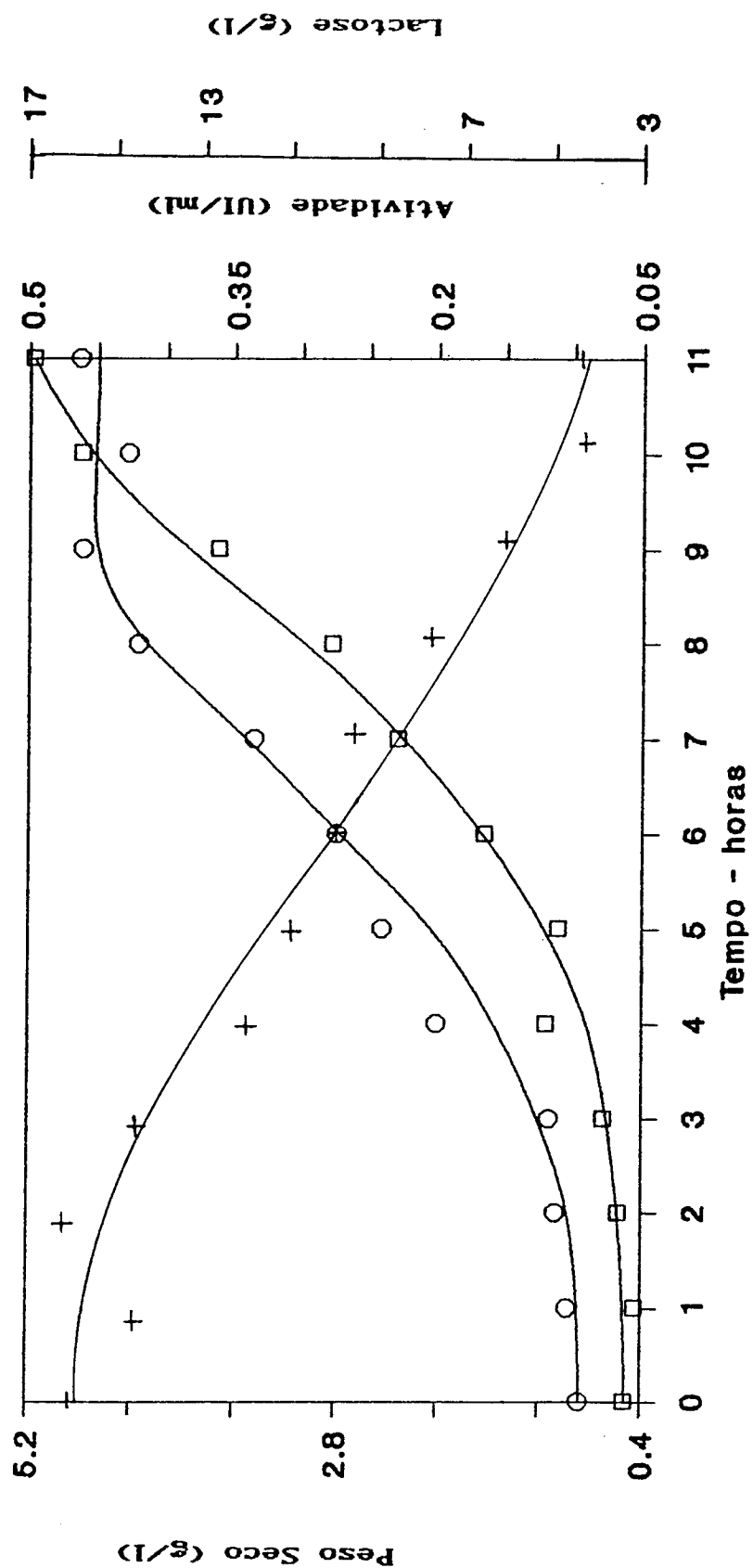


Fig.4.17- Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroldae* a 24,5°C e pH constante igual a 6,5.

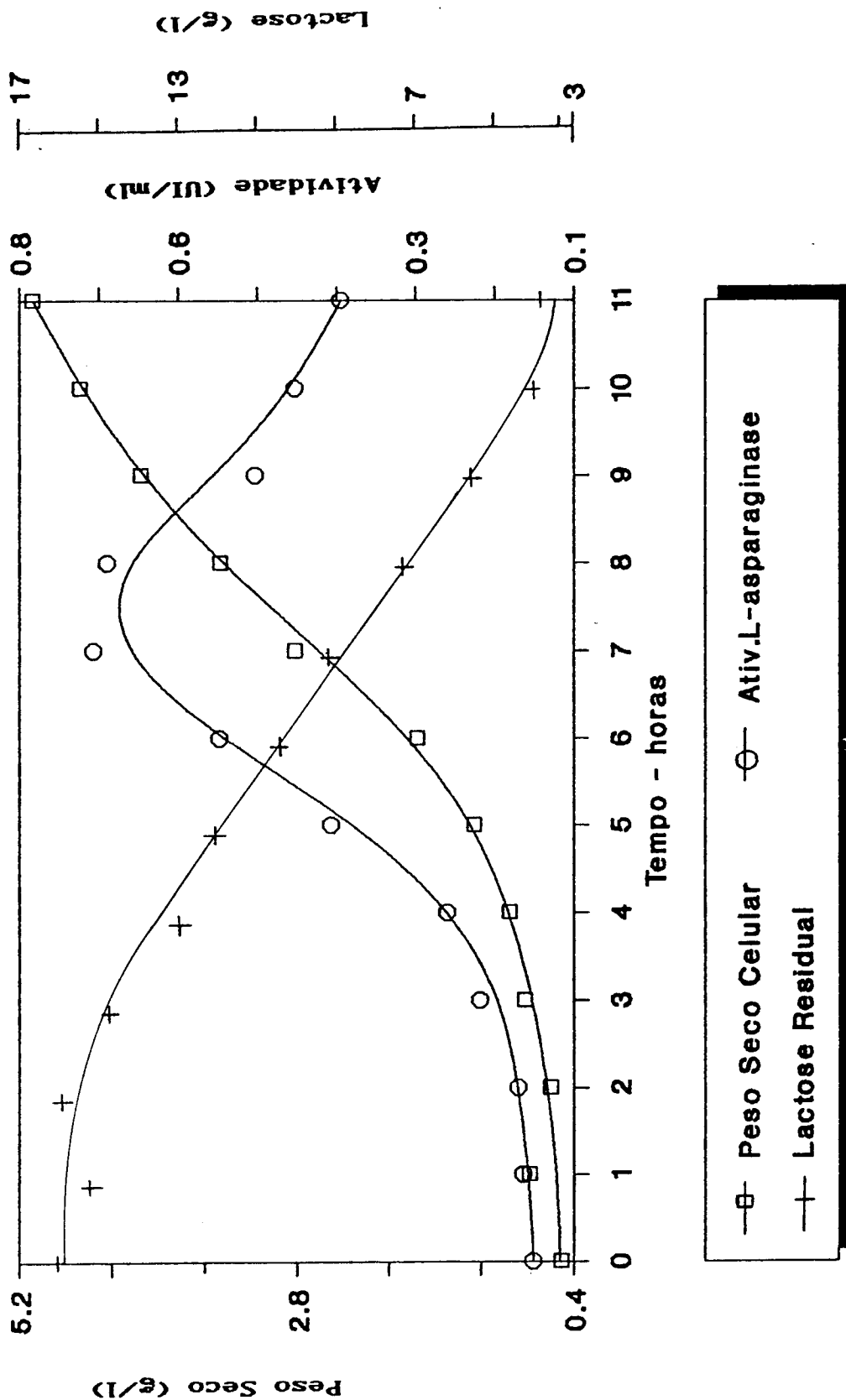


Fig.4.18 - Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroldae* a 24,5°C e pH constante igual a 7,5.

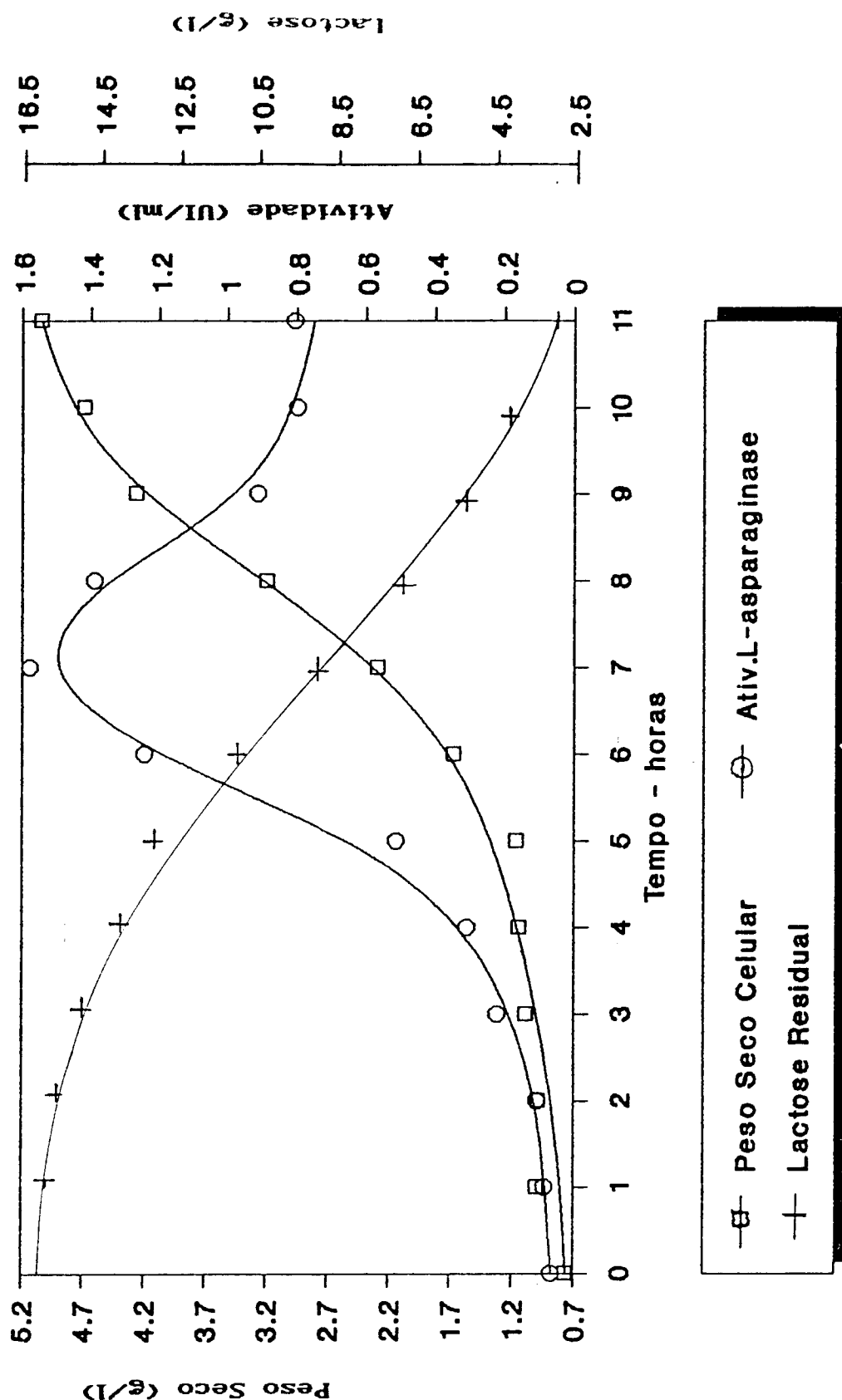


Fig.4.19 - Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 24,5°C e pH constante igual a 8.

Nota-se que a variação da massa celular máxima produzida, entre os testes com pH monitorado, foi muito pequena. Já para o teste sem o monitoramento do pH, a massa celular foi 0,62 g/l maior que aquela produzida na fermentação com pH monitorado em 6,5, a qual por sua vez apresentou a maior massa celular (5,17 g/l).

Nota-se também que os valores de μ_{MAX} são praticamente iguais nas fermentações onde o pH se manteve constante em 6,5 e 7,5 e naquela onde não houve controle, indicando que é inexistente ou insignificante a influência do monitoramento do pH sobre a produção da massa celular.

Com relação à formação de produto, nota-se que houve um grande aumento na atividade enzimática máxima, a medida em que o pH subiu. O teste a pH 8,0 produziu o melhor resultado, rendendo uma atividade máxima de 1,58 UI/ml; este valor foi 125% maior que o valor da atividade máxima conseguida em pH 7,5 e 243% maior que em pH 6,5, porém 22% menor que a atividade máxima do teste sem o controle do pH.

A taxa específica máxima de produção de enzima ($q_{P_{MAX}}$) também foi maior em pH 8,0, inclusive maior que o valor do teste sem o controle do pH. Entretanto, ao se comparar a atividade máxima de L-asparaginase produzida, o resultado do teste sem o controle do pH foi sensivelmente maior que o resultado do teste a pH 8 controlado (Tabela 4.2).

Pela figura 4.19, nota-se que a taxa de produção de enzima é bastante alta, de maneira similar à observada nas figuras

4.9 e 4.10. Observa-se que, quando a taxa de produção de enzima é alta, um valor máximo da atividade enzimática é obtido rapidamente, em etapa anterior à fase exponencial de crescimento celular, e posteriormente há uma queda nesta atividade. Sendo a massa celular ainda pequena nesta fase da fermentação, comparada com a massa no final da fermentação, resulta como consequência deste fato uma menor produção da enzima.

O consumo de lactose, nos testes com pH controlado, foi maior a pH 8,0, atingindo 82,5% do teor inicial, sendo também maior que no teste sem o controle do pH, onde o consumo foi de 62,4%. Entretanto, apesar de o consumo ter sido maior, observa-se que no teste sem monitoramento do pH houve maior eficiência de utilização do substrato para produção de massa celular bem como de enzima.

4.8. Relação cinética entre crescimento e formação de produto

A relação cinética entre crescimento e formação de produto depende da função do produto no metabolismo celular. Produtos sintetizados de uma forma associada ao crescimento são geralmente produtos diretos de uma via catabólica ou são produzidos como um metabólito intermediário; ex.: vitaminas, aminoácidos (Wang et al., 1979). Nas figuras 4.20 a 4.23 observa-se que para a Erwinia aroideae crescendo em soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina, a produção de

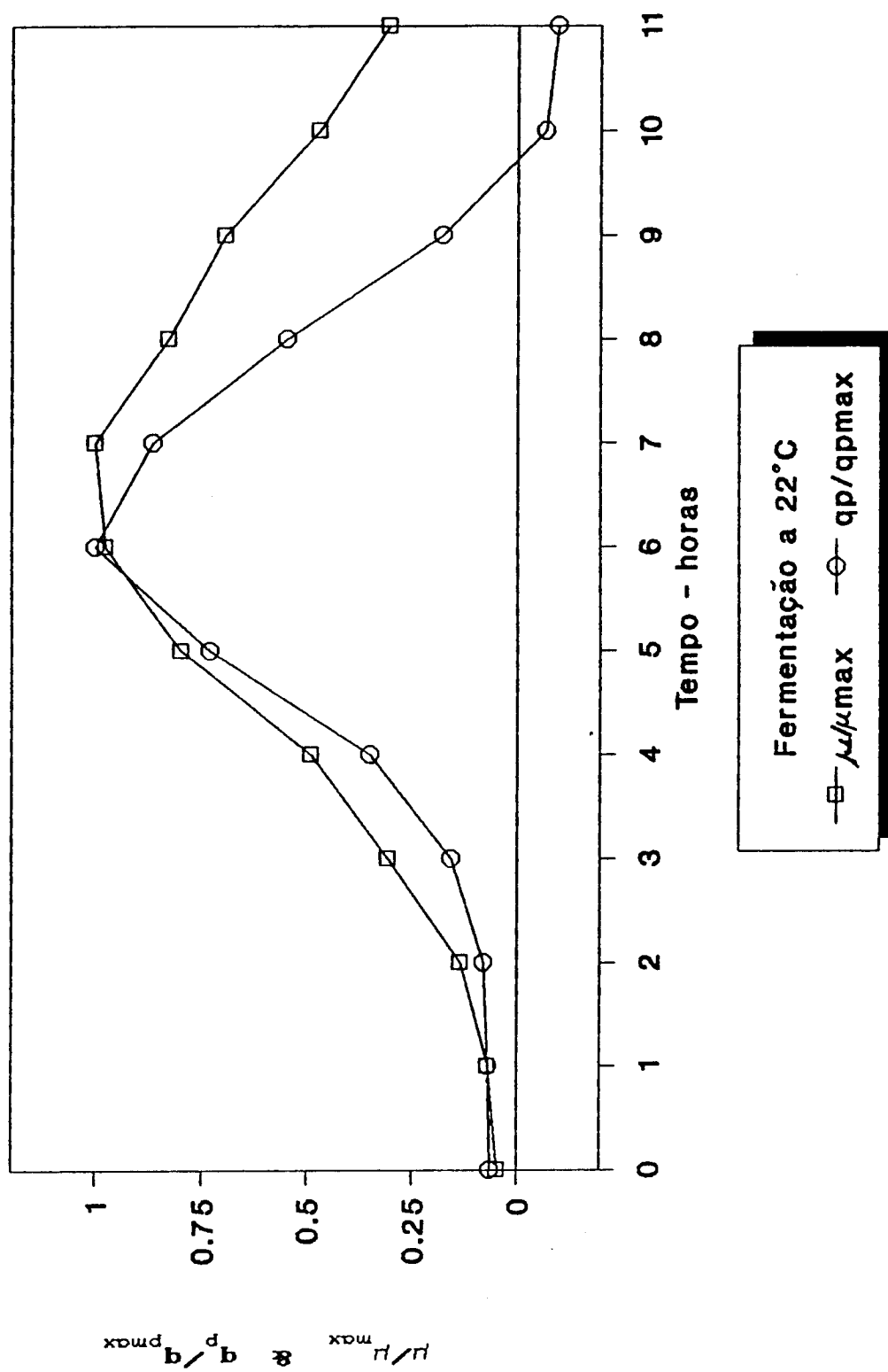


Fig.4.20 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por *E. aroidae*.

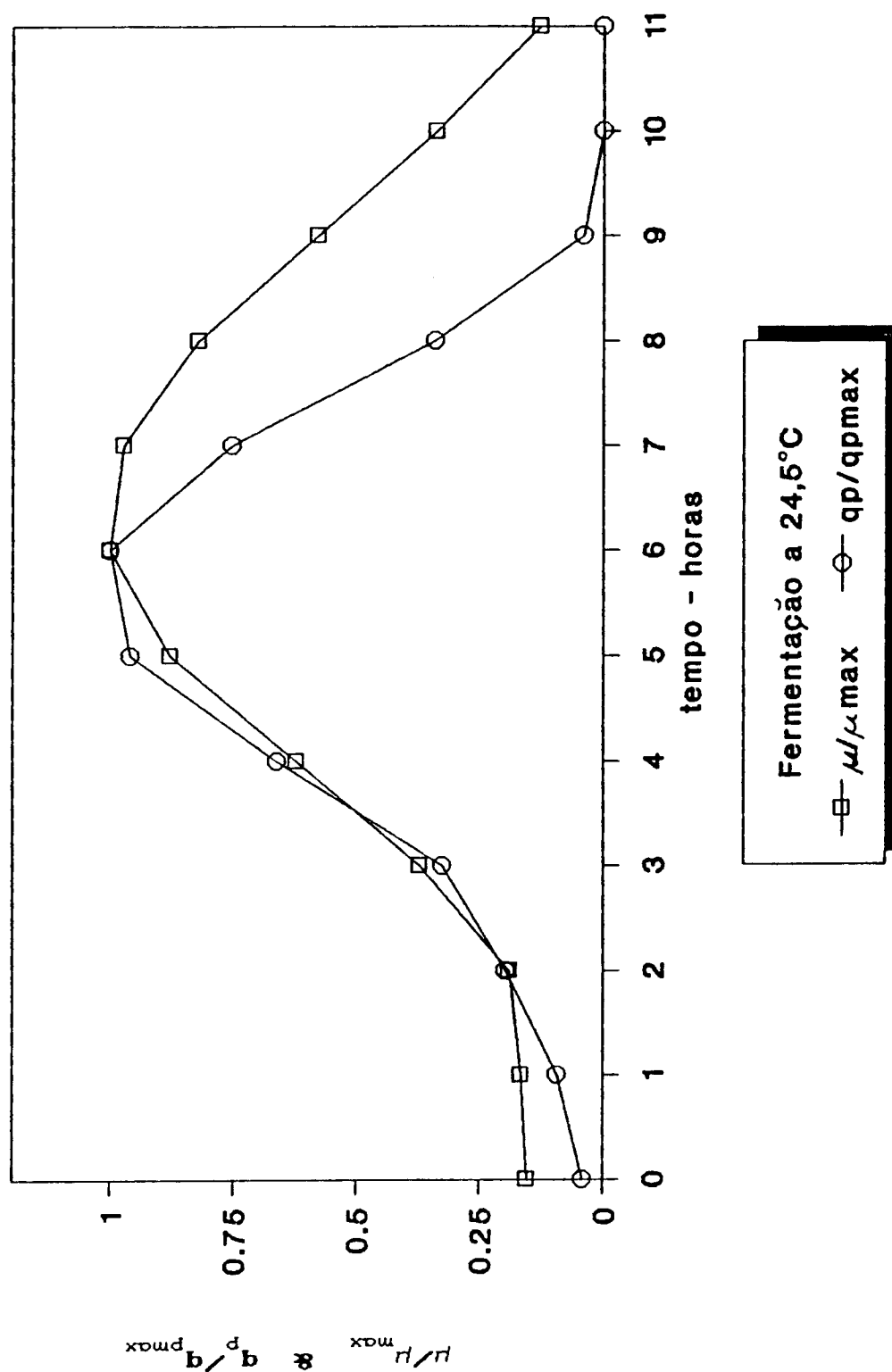


Fig.4.21 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por *E. aroldiae*.

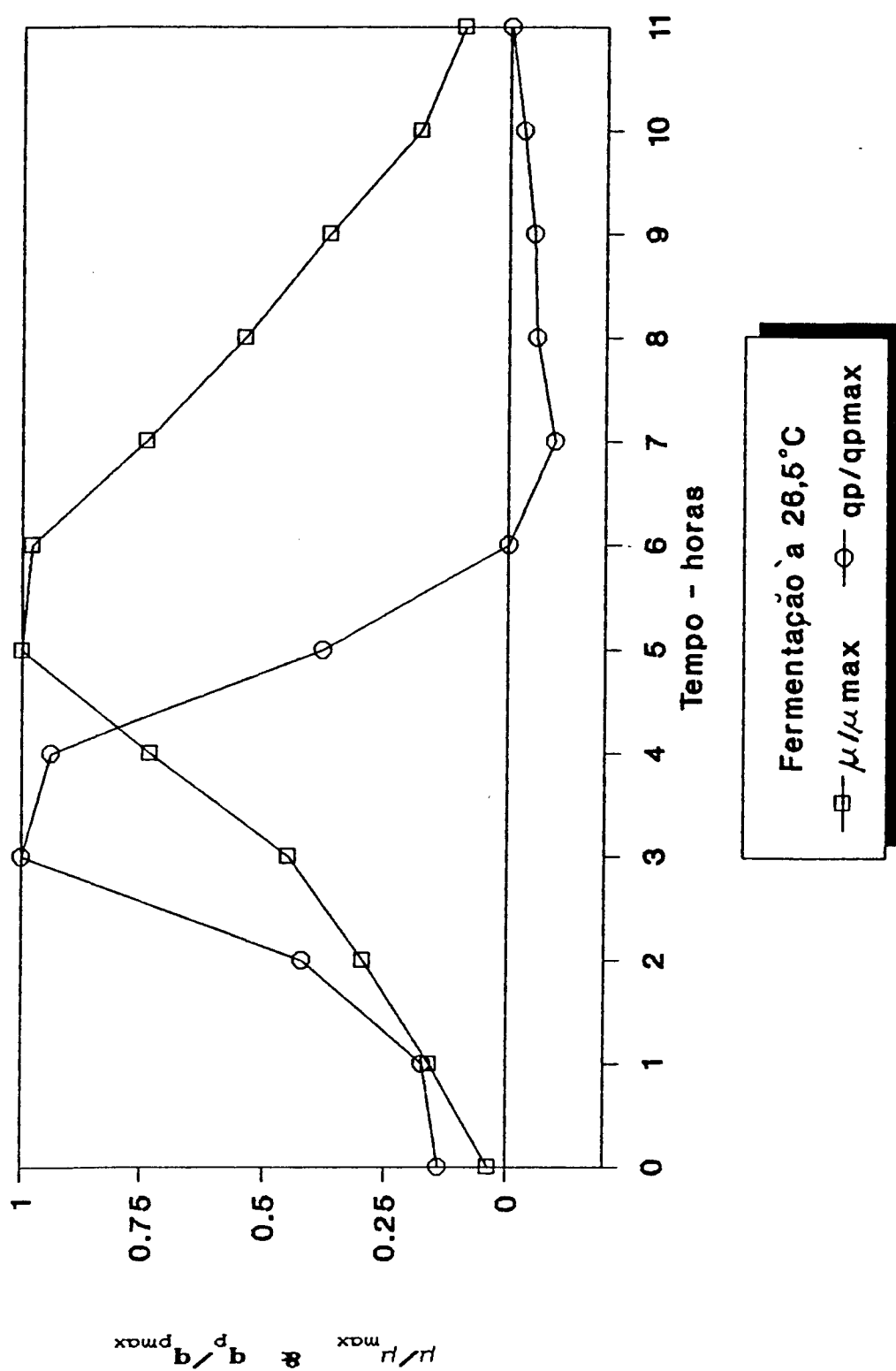
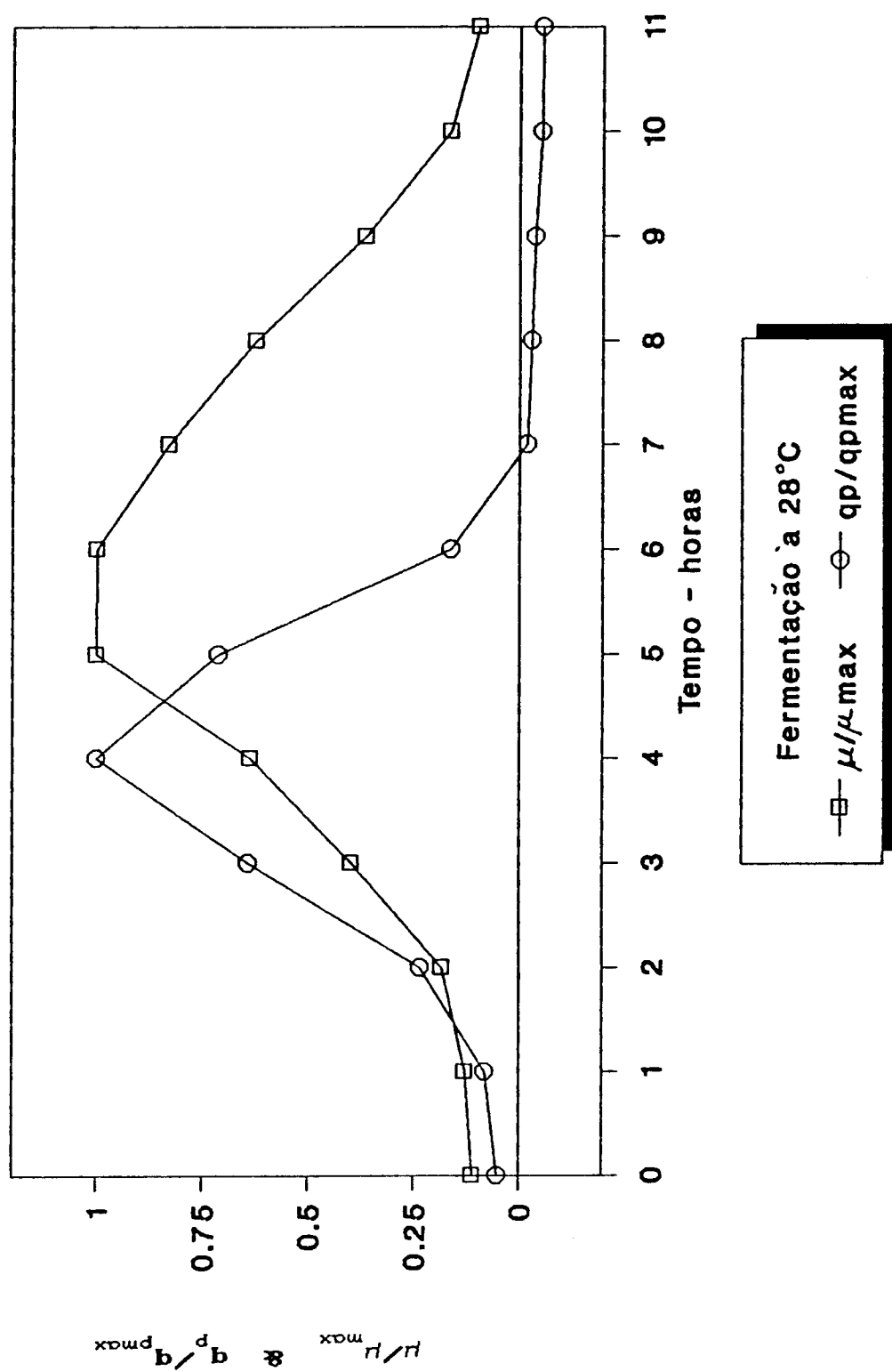


Fig. 4.22 - Relação da taxa específica de crescimento e taxa específica de síntese de L-asparaginase por *E. aroldiae*.



L-asparaginase é associada ao crescimento. Observa-se ainda que a produção da enzima é inibida antes que o microrganismo atinja a fase estacionária de crescimento; para temperaturas mais altas como 26,5°C e 28°C, observa-se esse fato antes mesmo que se atinja a fase exponencial de crescimento.

4.9. Efeito da Taxa de Aeração e Agitação sobre o Crescimento e Produção de L-asparaginase

O efeito da taxa de aeração e agitação sobre o crescimento e produção de L-asparaginase foi estudado. As figuras 4.24 a 4.27 mostram o comportamento do pH, massa celular, produção de L-asparaginase e consumo de lactose, em fermentação com soro de leite diluído até uma concentração de 2,73% (2% em termos de lactose), durante o curso da fermentação, sob diferentes taxas de aeração e agitação. A tabela 4.3 mostra os valores obtidos da taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{MAX}), taxa específica máxima de produção de L-asparaginase ($q_{p_{max}}$), taxa específica máxima de consumo de lactose ($q_{s_{max}}$), massa total produzida (M_t), atividade enzimática máxima (AEM), consumo total de lactose (CTL), pH final e valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_v), determinado pelo método de oxidação do sulfito, para as fermentações conduzidas em diferentes taxas de aeração e agitação. Testes com taxas de agitação e/ou aeração mais elevados não foram possíveis devido à grande formação de espuma, tornando impraticável o processo.

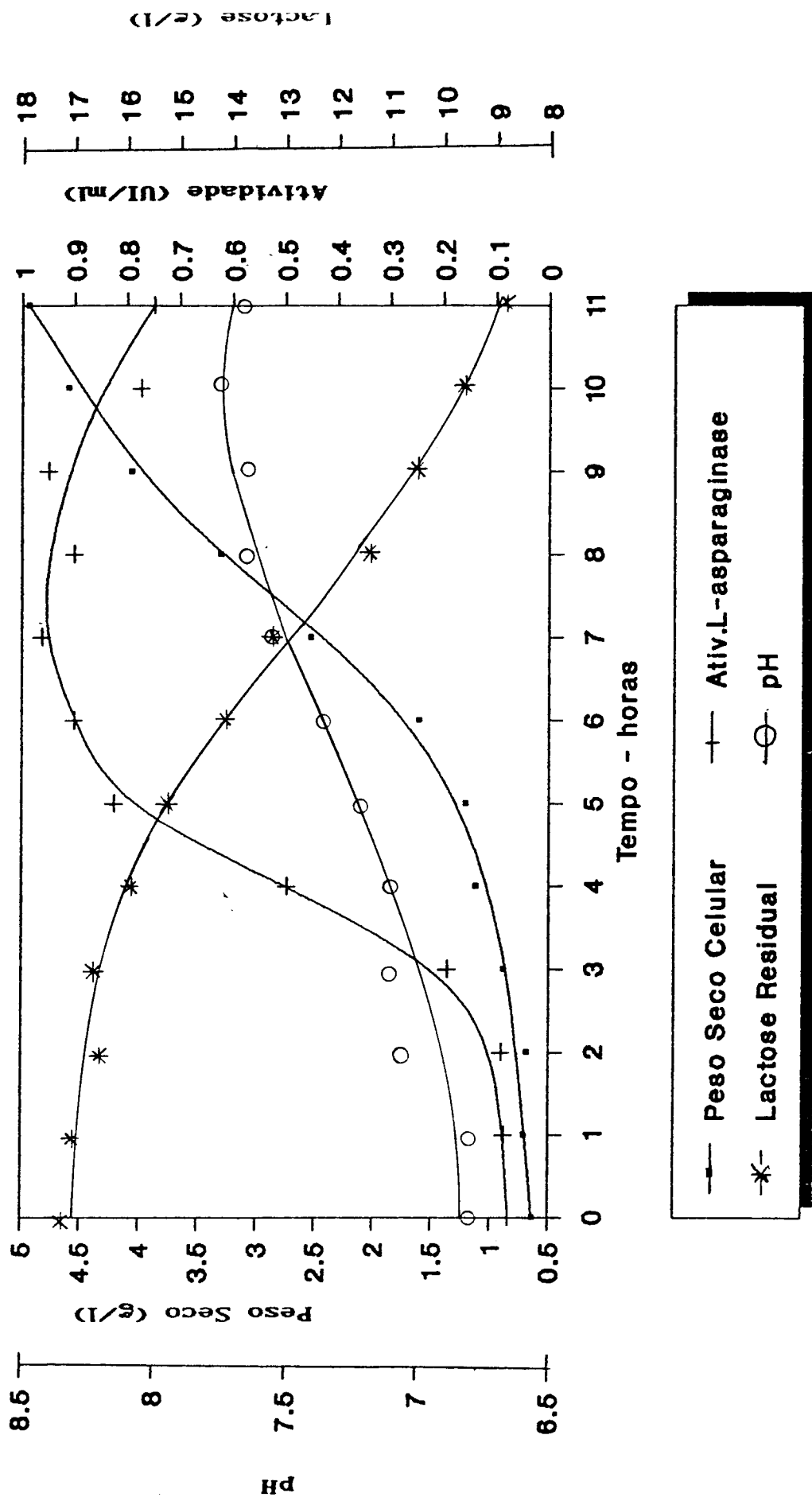


Fig.4.24 - Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroides* a 24,5°C, aeração de 7,5 l/min e agitação de 300 rpm.

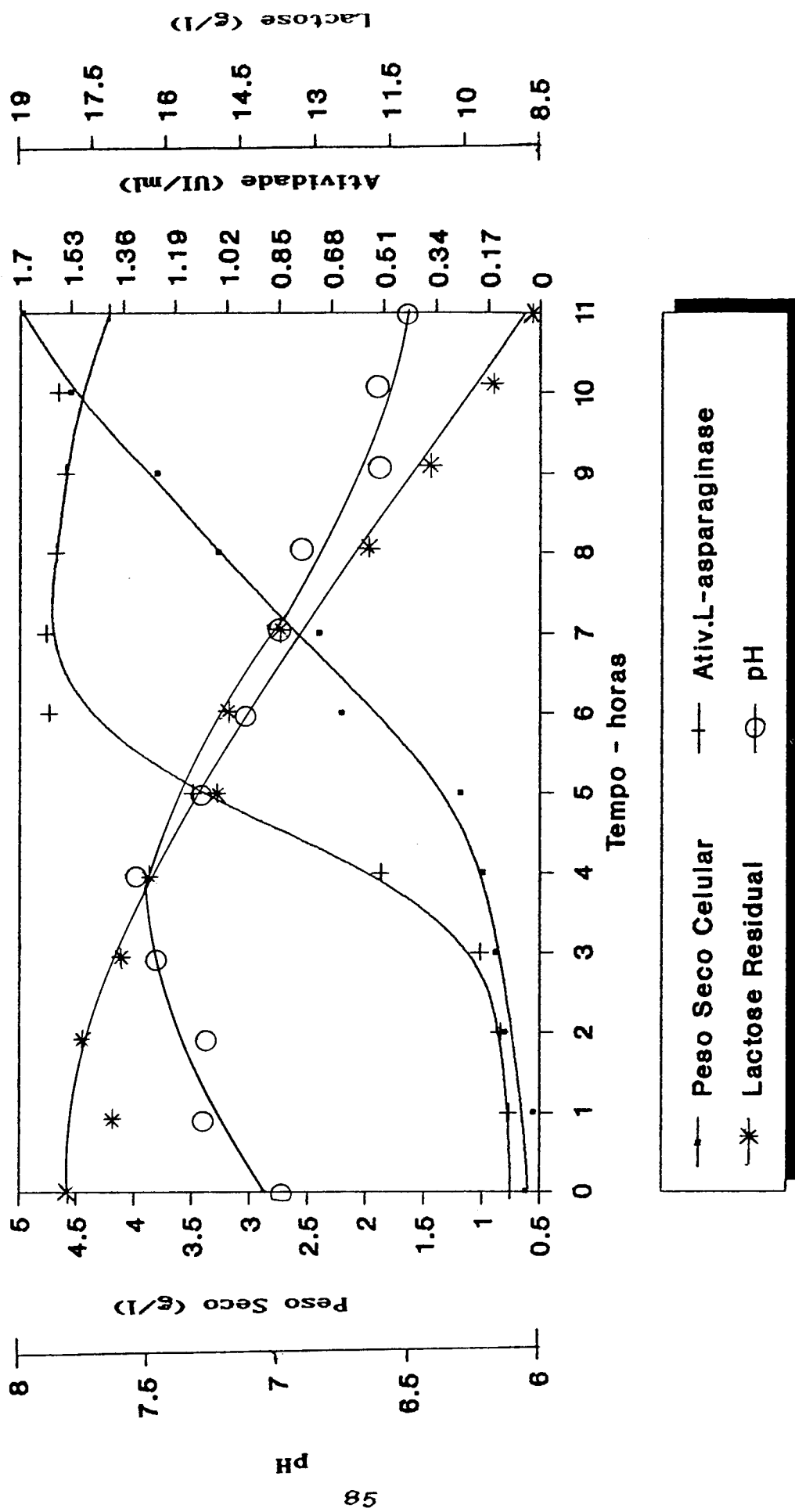


Fig.4.25 - Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroldeae* a 24,5°C, aeração de 10l/min. e agitação de 300 rpm.

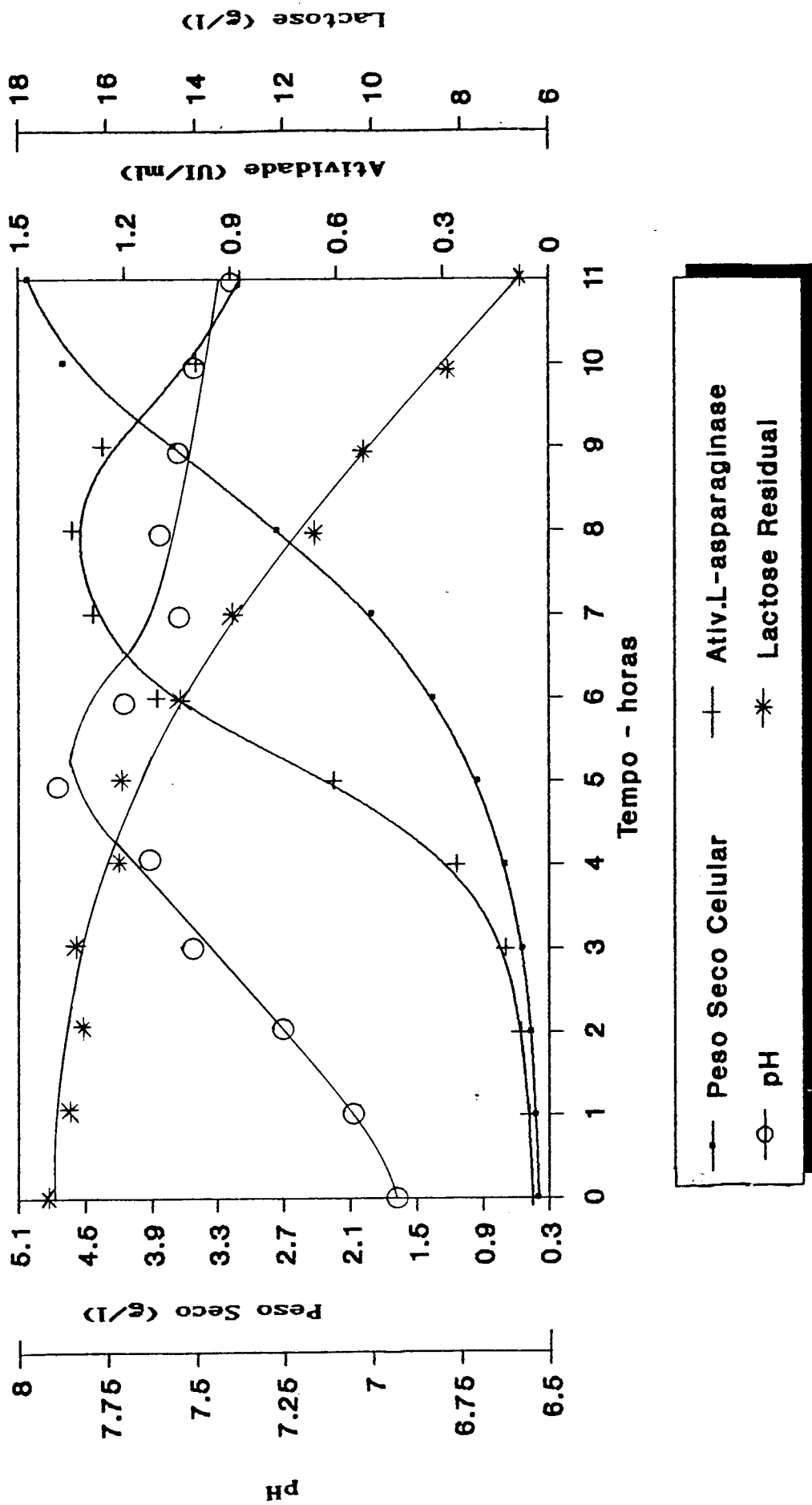


Fig.4.26 - Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroldae* a 24,5°C, aeração de 4 l/min e agitação de 700 rpm.

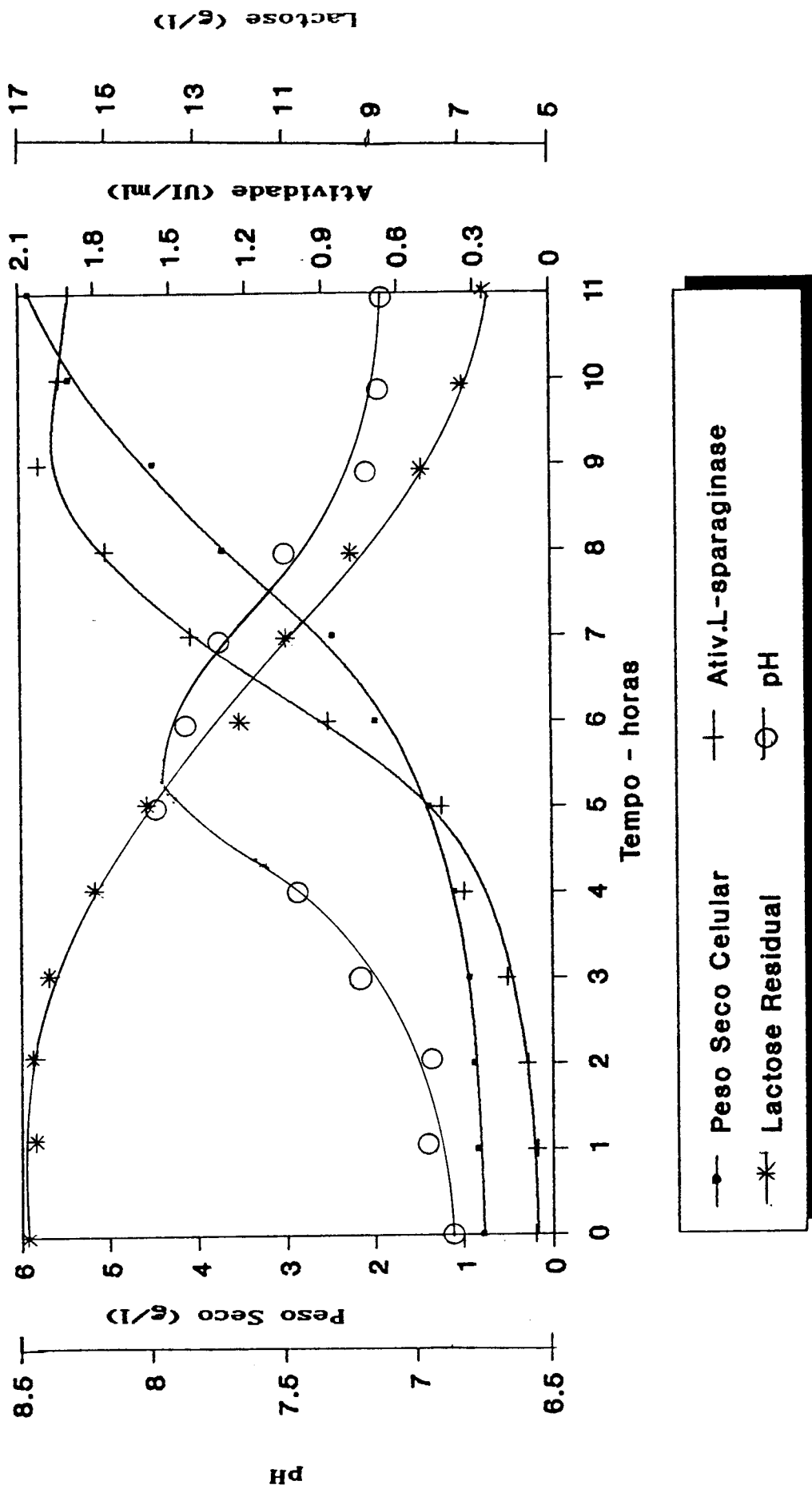


Fig.4.27- Fermentação de soro de queijo por *Erwinia aroideae* a 24,5°C, aeração de 7,5 l/min e agitação de 500 rpm.

TABELA 4.3 - Parâmetros cinéticos, peso celular seco, lactose residual, atividade máxima, pH e valor do K_v das fermentações de soro de queijo suplementado com triptona e L-asparagina em função das taxas de agitação e aeração, a 24,5°C.

AGITAÇÃO/ AERAÇÃO	μ_{MAX}^*	$q_{P_{MAX}}^*$	$q_{S_{MAX}}^*$	AEM (UI/ml)	M_l (g/l)	CTL (%)	pH	K_v^{**}
500/7,5	0,371	0,28	0,10	2,02	5,88	61,4	8,0	0,314
700/4,0	0,368	0,45	0,09	1,35	5,01	60,3	7,9	0,246
300/10	0,346	0,47	0,08	1,61	4,97	52,2	7,8	0,080
300/7,5	0,335	0,31	0,07	0,96	4,94	48,3	7,6	0,058

*- UNIDADE = h^{-1}

** - UNIDADE = (moles/litro.hora.atm)

Nota: taxa de aeração em litros de ar/minuto e taxa de agitação em rpm.

Verifica-se que para as taxas de agitação e aeração que proporcionaram valores de K_v mais altos, houve maior produção de massa celular bem como de L-asparaginase. Para o teste com o menor valor de K_v (0.058 moles/litro.hora.atm), quando a taxa de aeração foi de 7,5 litros de ar/minuto e agitação de 300 rpm, a produção de L-asparaginase foi somente 0,96 UI/ml e a massa celular foi de 4,94 g/l. A curva de crescimento celular (figura 4.24) para este

teste sugere que o oxigênio foi o fator limitante do crescimento. Quando a taxa de agitação subiu para 500 rpm, mantendo a mesma aeração, houve um grande aumento no valor do K_v (valor máximo de 0,314 moles/litro.hora.atm); neste caso obtivemos um valor máximo tanto para o crescimento celular (5,88 g/l) como para a produção de L-asparaginase (2,02 UI/ml), isto é, houve um acréscimo de 19% e 110%, respectivamente. Pela figura 4.28, que mostra o comportamento da produção de L-asparaginase e de massa celular em função do aumento do K_v , observa-se que com o aumento deste parâmetro, a massa celular bem como a produção de L-asparaginase aumentam. Resultados semelhantes foram obtidos por Peterson e Ciegler (1972), trabalhando com extrato de levedura numa faixa de concentração de 2 a 10%, onde conseguiram aumento substancial tanto na produção de massa celular como na produção de L-asparaginase quando a taxa de aeração e agitação foi aumentada.

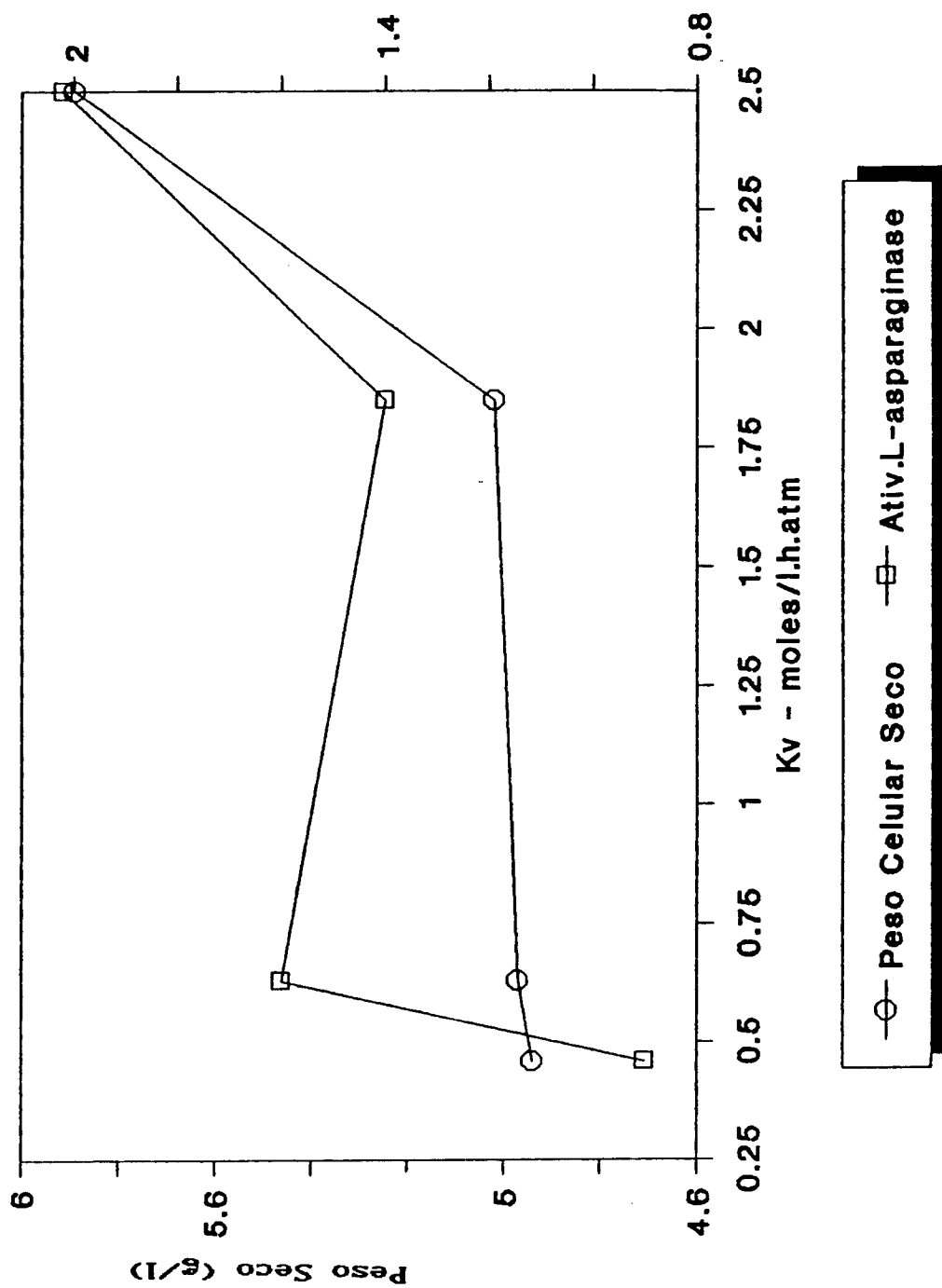


Fig.4.28 - Crescimento celular e síntese de L-asparaginase por *Erwinia aroldiae* a 24,5 C, em função do coeficiente Kv.

5. CONCLUSÕES

-A concentração ótima de lactose, em meio fermentativo contendo extrato de levedura, contendo extrato de levedura e triptona, foi de 1%, sendo que acima deste limite a produção de massa celular permanece constante e ocorre uma diminuição na produção de L-asparaginase.

-O efeito do extrato de levedura sobre o aumento da massa celular é positivo até em torno de 2,0%, sendo que a partir deste limite torna-se prejudicial . Com relação à produção de L-asparaginase, a atividade máxima é conseguida bem abaixo deste nível, isto é, em torno de 0,4%. Acima de 0,4%, o pH do meio se torna muito ácido, desfavorecendo a produção da L-asparaginase.

-Foi constatado que a presença da L-asparagina no meio formulado em laboratório assim como no soro de queijo foi importante, visto que tanto a massa celular como a atividade enzimática aumentaram muito quando comparados com os mesmos meios não suplementados com o aminoácido.

-O uso de soro de queijo com uma concentração de 2,73% (2% em termos de concentração de lactose), quando suplementado com triptona e L-asparagina, permitiu uma produção tanto de massa celular como de L-asparaginase, melhor do que o uso de extrato de

levedura e triptona, mostrando que este meio de cultivo pode ser usado para a produção da L-asparaginase, possibilitando a redução do custo de sua produção. Concentrações abaixo desse valor diminuem a produção da enzima bem como da massa celular pelo fato do meio se tornar pobre em nutrientes; por outro lado, concentrações maiores dificultam o processo pela formação de coágulos de proteína durante a esterilização, além de diminuir a atividade específica.

-A melhor temperatura para crescimento celular, na faixa estudada, foi de 28 °C mas nessa temperatura a atividade enzimática máxima foi somente 61 % do valor encontrado quando a temperatura foi de 24,5 °C. Desta forma, concluímos que a temperatura ótima para produção de L-asparaginase por Erwinia aroidae é 24,5 °C.

-Quanto ao controle de pH do processo fermentativo, verificamos que ocorre uma diminuição tanto na massa celular como na atividade enzimática. Assim sendo, concluímos que não é uma boa prática fazer o controle do pH durante a fermentação.

-Os resultados dos testes variando a taxa de aeração e agitação mostraram que, para a produção de L-asparaginase com soro de queijo a 2,73%, o aumento na incorporação de oxigênio ao meio favorece a produção da enzima, bem como da massa celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLUM, D., 1980. Whey - The international scene. J. of the Society of Dairy Technology., 33: 59.
- BEARD, M. E. J.; D. CROWTHER; D. A. G. GALTON; R. J. GUYER; G. HAMILTON FAIRLEY, H. E. M. KAY; P. J. KNAPTON; J. S. MALPAS & R. BODLEY SCOTT, 1970. Brit. Med. J., 1:191. Citado em CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. Nature, 229: 168.
- BILIMORIA, M. H., 1969. Conditions for the Production of L-asparaginase 2 by Coliform Bacteria. Applied Microbiology 18: 1025.
- BROOME, J. D., 1961. Nature, 191: 1114. Citado em em CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. Nature, 229: 168.
- BROOME, J. D., 1963a. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. J. Exp. Med., 118: 99.
- BROOME, J. D., 1963b. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. J. Exp. Med., 118: 121.

- BUCK, P. W.; R. ELSWORTH; G. A. MILLER; K. STANLEY & H. E. WADE, 1971. The batch production of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. J. General Microbiology, 65: 252.
- BUNTING, P. S. & K. J. LAIDLER, 1974. Flow Kinetics of L-asparaginase attached to nylon tubing. Biotechnology and Bioengineering, 15: 119.
- CAMPBELL, H. A.; L. T. MASHBURN, E. A. BOYSE & L. J. OLD, 1967. Two L-asparaginase from *Escherichia coli* B. Their separation, purification and antitumor activity. Biochemistry. 6: 721.
- CEDAR, H. & J. H. SCHWARTZ, 1967. Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 242: 3753.
- CEDAR, H. & J. H. SCHWARTZ, 1968. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 96: 2043.
- CLEMENTI, A., 1922. Arch. Intern. Physiol., 19: 360. Citado em BROOME, J. D., 1963a. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. J. Exp. Med., 118: 99.
- COOPER, C. M., G.A. FERNSTROM & S.A.MILLER, 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. Ind. Eng. Chem., 36: 504.

- CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. *Nature*, 229: 168.
- DAHLQVIST, A., 1964. Method for assay of intestinal dissacharidases. *Analytical Biochemistry*, 7: 18.
- DAVIS, B. D. & S. MINNGIOLE, 1950. *J. Bacteriol.*, 60: 17. Citado em CEDAR, H. & J. H. SCHWARTZ, 1968. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 96: 2043.
- DOLOWY, W. C.; D. HEENSON; J. CORNET & H. SELLIN, 1966. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. *Cancer*, 19: 1813.
- GALE, E. F., 1943. *Bacteriol. Rev.* 7:139. Citado em CEDAR, H. & J. H. SCHWARTZ, 1968. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 96: 2043.
- GILMAN, G. A.; L. S. GOODMAN; T. W. RALL & F. MIRAD, 1987. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 7^a ed., editora Guanabara, Brasil.
- GORINI, L., 1961. *J. Bacteriol.*, 82: 305. Citado em CEDAR, H. & J. H. SCHWARTZ, 1968. Production of L-asparaginase II by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 96: 2043.
- GRISWOLD, R.M., 1972. *Estudo experimental dos alimentos*, 342. Tradução de A.C. Santos, ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, SP.

- GROSSOWICZ, N. & G. ROOSOLY. in Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today, 333. Citado em LEE, S.M.; J. T. ROSS; M. H. GUSTAFSON; M. H. WROBLE & G. M. MUSCHIK, 1986. Large-scale Recovery and Purification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 12: 229.
- HASKELL, C. M.; C. P. CANELLOS; B. G. LEVENTHAL; P. P. CARBONE; A. A. SERPICK & H. H. HANSEN, 1969. Cancer Res., 29: 974. Citado em CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. Nature, 229: 168.
- HEINEMANN B. & A. J. HORWARD, 1969. Production of tumor-inhibitory L-asparaginase by submerged growth of *Serratia marcescens*. Applied Microbiology, 19: 550.
- HILL, J. M.; J. ROBERTS; E. LOEB; A. KHAN; A. MACLELLAN & R. W. HILL, 1967. J. Amer. Med. Assoc., 202: 882. Citado em CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. Nature, 229: 168.
- HILL, A., 1982. Concentration and fractionation of whey. Modern Dairy., 4: 12.
- HOLMQUIST, N. D., 1962. Effect of normal agouti serum on 6C3HED Lymphoma in vivo. Fed. Proc., 21: 116.

- KIDD, J. G., 1953a. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. J. Exp. Med., 98: 565.
- KIDD, J. G., 1953b. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. J. Exp. Med., 98: 583.
- LE, M. S.; L. B. SPARK; P. S. WARD & N. LADWA, 1984. Microbial asparaginase recovery by membran process. J. Membr. Sci., 21: 307.
- LEE, S.M.; J. T. ROSS; M. H. GUSTAFSON; M. H. WROBLE & G. M. MUSCHIK, 1986. Large-scale Recovery and Purification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 12: 229.
- LEE, S.M.; J. T. ROSS; M. H. GUSTAFSON & M. H. WROBLE, Process for manufacture of L-asparaginase from *Erwinia crysanthemii*. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC (USA), Mar. 8, 1988, US Patent 4, 729, 957. US Cl 435/229; Int. Cl. 12N 9/82, C12 R 1/18.
- LIU, F. S. & J. E. ZAJIC, 1971. L-Asparaginase synthesis by *Erwinia aroideae*. American Society for Microbiology, 23: 667.

- LIU, F. S. & J. E. ZAJIC. 1973. Fermentation kinetics and continuous process of L-Asparaginase production. *Applied Microbiology*, 25:92.
- MASHBURN, L. T. & J. C. WRISTON, 1964. Tumor inhibitory effect of L-Asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 105:450.
- MELLO, E. M., 1989. Obtenção e caracterização de concentrado proteico de soro de queijo por Ultrafiltração. Tese de mestrado - FEA - UNICAMP Campinas,p.118.
- MORI, T.; T. SATO; Y. MATUO, T. TOSA & I. CHIBATA, 1972. Preparation and characteristics of microcapsules containing asparaginase. *Biotechnology and Bioengineering* 14: 663.
- MORITA, T. & R.M.V. ASSUMPÇÃO, 1976. Manual de soluções, reagentes e solventes. 2^a ed., 300. Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, SP.
- OETTGEN, H. F.; P. A. STEVSON;M. K. SCHWARTZ; R. D. LEEPER; L. TALLAL; C. T. C. TAN; B. D. CLARKSON; R. B. GOLBEY; L. H. KRAKOFF; D. A. KARNOFSKY; M. L. MURPHY & J. H. BURCHENAL, 1970. *Cancer*, 25: 253. Citado em CROWTER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. *Nature*, 229: 168.

- OHNUMA, T.; F. BERGEL & R. C. BRAY, 1967. Enzymes in cancer - Asparaginase from liver chickem liver. Biochem. J., 103: 238.
- OLD, L. J.; E. A. BOYSE; H. A. CAMPBELL & G. M. DARIA, 1963. Nature, 198: 801. Citado em CROWTHER, D., 1971. L-asparaginase and human malignant disease. Nature, 229: 168.
- PETERSON, R. E. & A. CIEGLER, 1969. L-Asparaginase prodution by *Erwinia aroideae*. American Society for Microbiology,18:64.
- PETERSON, R. E. & A. CIEGLER, 1972. Factors influencing L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. Applied Microbiology, 23: 671.
- QUIRK, A. V. & J. R. WOODROW, 1984. Enzyma Microb. Technol. 6:201. Citado em LEE, S.M.; J. T. ROSS; M. H. GUSTAFSON; M. H. WROBLE & G. M. MUSCHIK, 1986. Large-scale Recovery and Purification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 12: 229.
- ROBERTS, J.; M. D. PRAGER & N. BACHINSKY, 1966. The antitumor activity of *Escherichia coli* L-asparaginase. Cancer Res, 26: 2213.
- SCHWARTZ, M. K.; E. D. LASH; H. F. OETTGEN & F. A. TOMAO, 1970. L-asparaginase activity in plasma and other biological fluids. Cancer, 25: 244.

- SOBIN, L. H. & J. G. KIDD, 1965. A metabolic difference between two lines of lymphoma 6C3HED cells in relation to asparagine. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 119: 325.
- STEPHENSON, M. & E. F. GALE, 1937. Factors influencing bacterial deamination. I. The deamination of glycine, DL-alanine and L-glutamic acid by *Bacterium coli*. Biochem. J, 31: 1316-1322.
- TALLAL, L.; C. TAN; H. OETTGEN; N. WOLLNER; M. MCCARTHY; L. HELSON; J. BURCHENAL; D. KARNOFSKY & M. L. MURPHY, 1970. *E. coli* L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. Cancer, 25: 306.
- TSUJI, Y., 1957. Studies on the amidase. IV. Supplemental studies on the amidase action of the bacteria. Arch. International Med. 4: 222.
- WADE, H. E.; R. ELSWORTH; D. HERBERT; J. KEPPIE & K. SARGEANT, 1968. A new L-asparaginase with antitumour activity. The Lancet, 5: 776.
- WANG, D. I. C.; C. L. COONEY; A. L. DEMAIN; P. DUNNILL; A. E. HUMPHREY & M. D. LILLY, 1979. Fermentation and Enzyme Technology.
- ZALL, R. R., 1984. Trends in whey fractionation and utilization. A global perspective. J. Dairy Sci., 11: 2621.

Método para determinação do coeficiente de transferência de oxigênio pelo método do sulfito.

No processo de transferência do oxigênio de uma bolha de ar no seio do líquido fermentativo para o microrganismo, algumas resistências interferem nesse transporte, sendo as principais à serem consideradas a resistência através do filme gasoso internamente à bolha e a resistência através do filme líquido. A figura A1 mostra uma ampliação esquemática da interface gás-líquido de uma bolha de ar em um líquido.

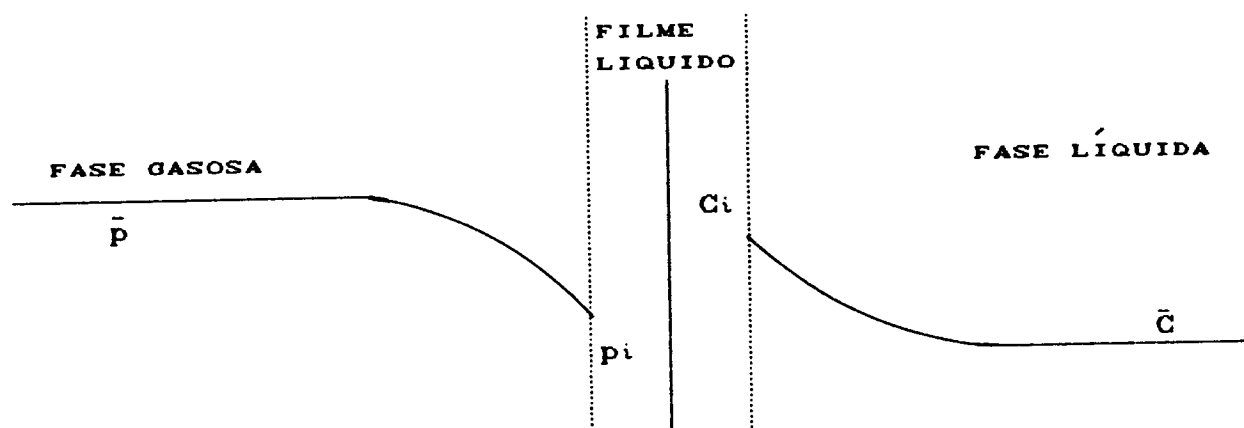


Fig. A1 - PERFIL DE CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO

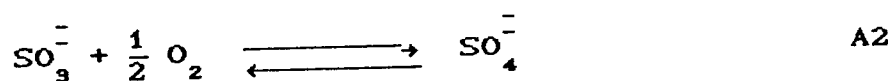
O fluxo de oxigênio através da interface pode ser dado

por:

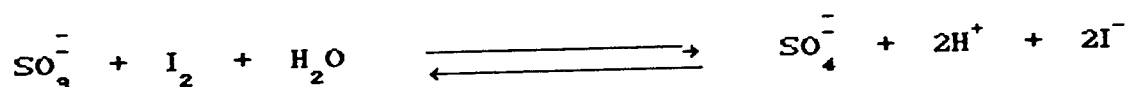
$$N_v = K_L a \times (C^* - \bar{C}) \quad A1$$

onde N_v é o fluxo de oxigênio através da interface (massa /tempo),
"a" é a área superficial das bolhas por unidade de volume e C é
concentração do oxigênio.

O método do sulfito se baseia na oxidação do sulfito de
sódio à sulfato de sódio pelo oxigênio, uma reação de ordem zero:



Para se determinar o oxigênio transferido, tira-se do
fermentador uma alíquota de 5 ml de solução de sulfito de sódio e
reage com iodo em excesso:



O excesso de iodo é determinado com solução de
tiosulfato de sódio. Assim o fluxo de oxigênio pode ser dado por:

$$N_v = \frac{N \cdot V_1}{4 \cdot t \cdot V_2} \quad A3$$

onde : N - normalidade da solução de tiosulfato;

V_1 - volume gasto de tiosulfato;

V_2 - volume de amostra em litros;

t - intervalo de tempo entre uma amostra e outra;

N_v - fluxo de oxigênio (moles/tempo)

O fluxo de oxigênio também é dado por :

$$N_v = K_v \cdot (\bar{p} - p^*) \quad A4$$

onde $\bar{p}$ é a pressão parcial do oxigênio e p^* é a pressão hipotética que estaria em equilíbrio com o oxigênio dissolvido no líquido.

Como a reação do sulfito é uma reação de ordem zero, a concentração do oxigênio no líquido é zero. Assim sendo, p^* também é zero e consequentemente a equação A2 fica:

$$N_v = K_v \cdot \bar{p} \quad A5$$

O valor de $\bar{p}$ pode ser calculado pela média aritmética das pressões de entrada e saída do gás no fermentador :

$$\bar{p} = \frac{p_e + p_s}{2} \quad A6$$

$$p_e = \left(p_i + \frac{h}{f} \right) \cdot 0,21 \quad A7$$

$$p_s = (p_i \cdot 0,21) - (p_i \cdot 0,21 \cdot \eta) \quad A8$$

$$\eta = \frac{\text{oxigênio consumido (transferido)}}{\text{oxigênio fornecido}} \quad A9$$

$$\eta = \frac{N_v \cdot V \cdot 22,4}{F \cdot 0,21} \quad A10$$

onde: V - volume de líquido dentro do fermentador;

F - vazão de ar;

h - altura do líquido no fermentador;

f - fator de conversão da coluna de líquido em atmosferas,

para a água = 10,3 (MCA/atmosfera);

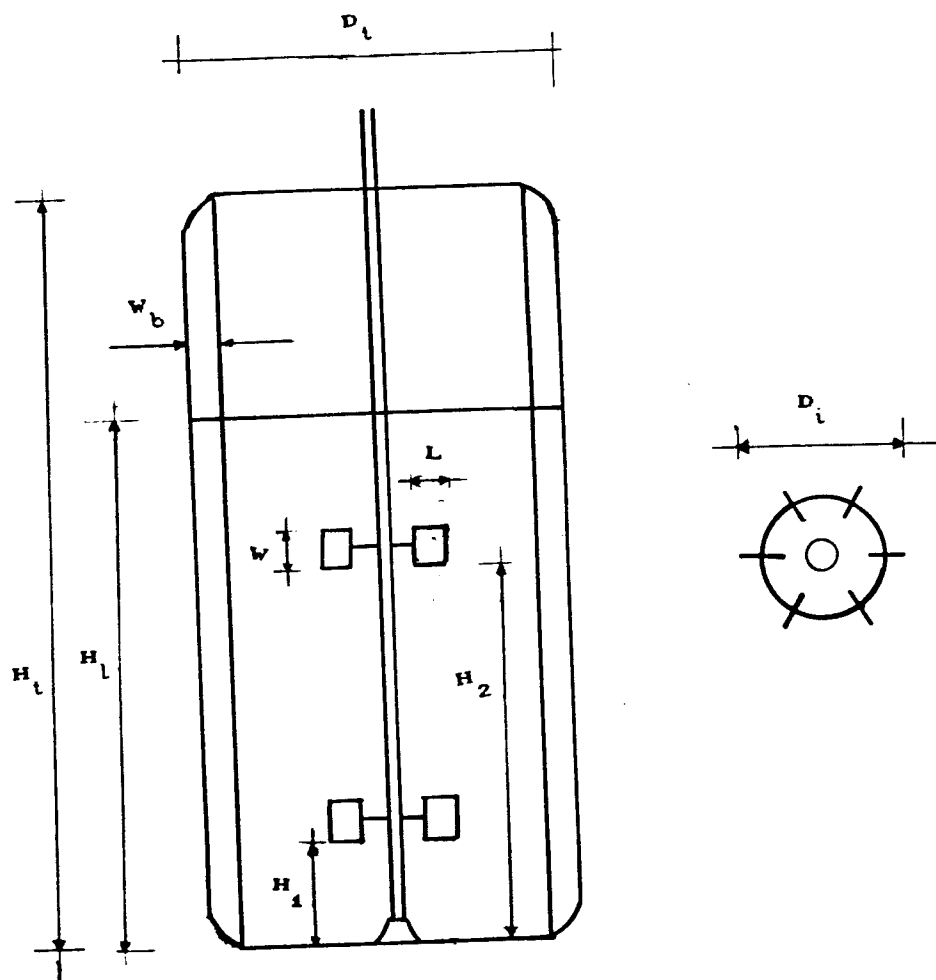
P_t - pressão total no fermentador (igual à pressão atmosférica para sistemas não pressurizados);

η - eficiência de transferência de oxigênio.

Diagrama e características do fermentador usado

Foi utilizado um fermentador marca CHEMAP, modelo FS-0020, dotado de painel de controle de agitação, aeração, pH e temperatura, com as seguintes características:

- Tanque de fermentação : Tanque cilíndrico de aço inoxidável de 20 litros de capacidade, operado com um volume útil de 16 litros, possuindo 4 aletas. Os detalhes geométricos e suas dimensões são mostradas abaixo.



$$D_T = 0,240 \text{ m}$$

$$D_i/D_T = 0,322 \quad ; \quad H_T/D_T = 2,030 \quad ; \quad H_L/D_T = 1,474$$

$$H_1/D_T = 0,288 \quad ; \quad H_2/D_T = 0,625 \quad ; \quad W_B/D_T = 0,0825$$

$$L/D_i = 0,242 \quad ; \quad W/D_i = 0,309$$

- Sistema de aeração constituído de anel dispersor com 15 orifícios de 1,4 mm de diâmetro e filtros de porcelana porosa para esterilização do ar na entrada e na saída do equipamento. A vazão do ar foi medida por rotâmetro BROOKS tipo 1355-10A-1bab.
- Sistema de agitação constituído por duas turbonas de disco, de seis pás, acionado por um motor de corrente contínua com controle eletrônico de velocidade na faixa de 100 a 1500 rpm.
- Sistema de controle de temperatura com sensor de resistência de platina, controlador HARTMANN-BRAUN, atuando, sobre a admissão alternada de água de refrigeração e água, aquecida por reostatos, na camisa do tanque.
- Sistema de controle de pH, tendo como elemento sensor um eletrodo de pH INGOLD esterilizável, controlador METRHOM HERISAU, o qual opera duas bombas peristálticas, de vazão ajustável.

Anexo C

Reagente de NESSLER

A - Solução de iodeto de potássio

KI 7 g

Água 30 ml

B - Solução de cloreto de mercúrio

HgCl₂ 3,4 g

Água 60 ml

C - Solução de hidróxido de sódio

NaOH 24 g

Água 60 ml

Adicionar a solução B à solução A agitando contínua e vigorosamente até que o precipitado formado não se dissolva mais, isto é, fique permanente.

Adicionar vagarosamente a solução C e diluir com água até 200 ml.

Adicionar, pouco a pouco, o restante da solução B até formação de pequena precipitação permanente.

Deixar decantar até a solução ficar transparente e eliminar a parte insolúvel por filtração com amianto ou algodão.

Reação:

