



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE L-ASPARAGINASE E
L-GLUTAMINASE DE ACTINOBACTÉRIA DA RIZOSFERA DE *Poincianella
pyramidalis***

WELMA DE OLIVEIRA SILVA

**Recife – PE
2017**

WELLMA DE OLIVEIRA SILVA

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE L-ASPARAGINASE E
L-GLUTAMINASE DE ACTINOBACTÉRIA DA RIZOSFERA DE *Poincianella
pyramidalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva.

**Recife - PE
2017**

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso, CRB-4/ 1728

Silva Wellma de Oliveira

Otimização e caracterização parcial de L-asparaginase e L-glutaminase de actinobactéria da rizosfera de *Poincianela pyramidalis*. – 2017.

109 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, Recife, 2017.

Inclui referências

1. Enzimas 2. Actinobactéria 3. Antibiótico I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orient.) II. Silva, Leonor Alves de Oliveira da (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-024

WELLMMA DE OLIVEIRA SILVA

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE L-ASPARAGINASE e L-
GLUTAMINASE DE ACTINOBACTÉRIA DA RIZOSFERA DE *Poincianella*
*pyramidalis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre.

APROVADA EM: 14/ 02/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho - UFPE
(Orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves de Oliveira da Silva – UFPE
(Coorientadora)

Prof^ª Dr^ª Norma Buarque de Gusmão - UFPE
(1º Examinador)

DEDICATÓRIA

“A Deus, aos meus pais, minhas mães acadêmicas, minha família e aos meus amigos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar diariamente, com saúde, segurança, graça, paz, alegria e conforto. Sem Ti senhor, eu nada seria.

A minha Mãe, minha melhor amiga, meu maior exemplo. Um mulher de garra e determinação a qual eu devo tudo que um dia eu já conquistei. O melhor é que desde que eu ingressei no meio científico, ela tornou-se também minha companheira de viagem! Nos congressos mais distantes, estava sempre comigo, me apoiando, me ajudando e me levando para frente. Obrigada por tudo!

A Universidade de Pernambuco, que me conferiu o título de Bacharela em Ciências Biológicas e também a Universidade Federal de Pernambuco, mais especificamente a Pós-graduação em Ciências Biológicas, onde tive a oportunidade de dar continuidade ao meu aperfeiçoamento acadêmico.

Ao Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI) que me acolheram e me permitiram expandir meus conhecimentos e dessa forma amadurecer como profissional, pesquisadora e pessoa.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, que me aceitou como aluna, inicialmente sem bolsa, com o tempo limitado por causa do trabalho, mas mesmo assim não desistiu de mim, acreditou no meu potencial e desta forma possibilitou a existência desta dissertação. Fica firmada nossa parceria acadêmica, para vida, não deixarei de contar com toda sua experiência na produção científica. Muito obrigada, professora! Muitos beijos e bênçãos para a senhora!

À minha coorientadora, Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves de Oliveira da Silva que de uma forma ou de outra, longe ou perto, sempre arranhou uma forma de poder colaborar comigo nos meus experimentos. A senhora sabe o quanto me ajudou e o quanto me fez crescer não só na bancada, mas na vida mesmo. O melhor de tudo é que terei a felicidade de contar com a senhora na continuação das minhas pesquisas, eu simplesmente não sei como agradecer tanta boa vontade da sua parte para comigo.

À Prof^ª. Dr^ª Norma Gusmão, que além de me aceitar no LAMAI, me aceitou como sua futura orientanda no Doutorado em Biologia dos fungos, seleção a qual, eu não teria sido aprovada sem sua orientação, apoio e atenção, então professora, muito obrigada!!

Não poderia deixar de agradecer também, ao grupo de professores que conheci ao trabalhar na Faculdade Metropolitana: professoras Cybele, Juliana, Milena, Ihana, Dafne, Tânia, Luciana e professor Flávio. O dia a dia na faculdade era corrido, talvez vocês nem façam ideia do quanto influenciaram positivamente minha caminhada acadêmica, mas saibam que influenciaram e muito! Obrigada de coração, por tudo!!

Ao meu irmãozinho, Wellington Pedro e à minha prima Bianca Santos, não poderia deixar de falar que muitos dos resumos, trabalhos e estudos relacionados ao mestrado eu fiz no computador dele ou no dela, inclusive parte desta dissertação... né gente? Demorei para conseguir comprar o meu, mas sempre pude contar com a ajuda de vocês! Eu e tu Bi, a parceria é grande... Já eu e meu irmão até temos nossos momentos de “estranhezas”, mas quando o assunto é ajudar um ao outro, não falta carinho, não falta amor e dedicação! Estamos juntos! Amo vocês, obrigada por tudo!!

A Vinícius e Laís que estagiaram por um tempo comigo, aprendi mais do que ensinei a vocês, foi gratificante! Obrigada por toda ajuda, vocês são sensacionais!!!

Às minhas amigas, Iasmim Lucas e Wellen Laís, ter vocês comigo é simplesmente um presentão de Deus para mim! Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelo apoio emocional, os conselhos que vocês me deram, foram tão importantes, que eu nem consigo descrever aqui. Vocês são pessoas lindas de viver, quero vocês na minha vida sempre!!

A minha amigona Kah Michaelis, que me ajudou com a formatação dos esquemas presentes nesta dissertação. Obrigada, Kah!!

Agradeço muito também, a todos que fazem parte da família LAMAI: Emanuella, Iasmim, Hugo, Camila, Vinícius, Robson, Pércio, Erik, Nelânia, Diana, Manu, Cássio, Thales, Patrícia, Jacilene, Ana, Glêzia, Raphael, Jéssica e Profa. Magali.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o segundo ano de Mestrado.

E por fim a todos aqueles que estiveram comigo me auxiliando de forma direta ou indireta neste trabalho, mas que por descuido não citei, obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

RESUMO

Metabólitos secundários de origem microbiana são alvo de diversas pesquisas na área biotecnológica e desempenham importantes funções, principalmente na indústria farmacêutica. Actinobactérias, são micro-organismos ubíquos, que integram o grupo de bactérias gram positivas. Entre as enzimas extracelulares produzidas por actinobactérias, destacam-se a L-asparaginase e L-glutaminase, ambas com grande potencial antitumoral. A L-asparaginase, enzima produzida por micro-organismos, há décadas, é usada como princípio ativo de medicamentos para o tratamento médico de alguns tipos de linfomas, como a leucemia linfóide aguda. A L-glutaminase, tem sido aplicada como potencial antitumoral, intensificador de sabor, útil como biossensores e também na fabricação de produtos químicos especiais por transformações enzimáticas. O objetivo geral deste trabalho foi otimizar a produção das enzimas L-asparaginase e L-glutaminase excretadas por actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis* bem como identificar morfologicamente a actinobactéria. No melhoramento de condições da produção da L-asparaginase, o melhor resultado obtido na dosagem enzimática foi no ensaio com concentração de 1,5%, pH 4,2 a 44 °C. Em relação à dosagem proteica foi detectado 0,432 µg/mL, nas condições com concentração de 1,5%, pH 7,8 a 33 °C. No que diz respeito a otimização da produção e caracterização parcialmente a enzima L-glutaminase, a melhor atividade foi constatada no ensaio com concentração de 1,5%, pH 7,0 a 44 °C. A análise da variância resultou na determinação de R² de 99,84%. O estudo dos principais efeitos e suas interações mostrou que todos os fatores testados foram significantes. Na caracterização enzimática foram obtidos o pH ótimo 8,0 e a temperatura ótima 37°C. L-glutamina e o ácido glutâmico foram tidos como excelentes substratos. A atividade enzimática foi aumentada pela adição de íons, tais como MnCl₂ e MgCl₂, mas foi diminuída quando outros, como ZnSO₄ foram usados, demonstrando que a atividade da enzima é suscetível a alterações diante da adição de íons metálicos. A análise estatística das variáveis e a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos foram avaliadas através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA). Os resultados obtidos neste trabalho, foram relevantes para a área biotecnológica, trazendo dados sobre os modelos de produção e caracterização, além de reforçar a importância de pesquisar novas fontes microbianas,

tais quais actinobactérias, para a exploração de novos metabólitos secundários.

Palavras-chaves: Actinobactérias. L-asparaginase. L-glutaminase.

ABSTRACT

Secondary metabolites of microbial origin are the subject of several researches in the biotechnology area and play important roles, mainly in the pharmaceutical industry. Actinobacteria, are ubiquitous microorganisms, which are part of the group of gram positive bacteria. Extracellular enzymes produced by actinobacteria include L-asparaginase and L-glutaminase, both of which have a high antitumor potential. L-asparaginase, the enzyme produced by microorganisms for decades, is used as an active drug for the medical treatment of some types of lymphomas, such as acute lymphoid leukemia. L-glutaminase has been applied as an antitumor potential, flavor enhancer, useful as biosensors and also in the manufacture of special chemicals by enzymatic transformations. The general objective of this work was to optimize the production of the L-asparaginase and L-glutaminase enzymes excreted by actinobacteria isolated from the rhinoceros of *Poincianella pyramidalis* as well as morphologically identify the actinobacteria. In the improvement of L-sparaginase production conditions, the best result obtained in the enzymatic dosage was in the 1.5% concentration test, pH 4.2 at 44 ° C. Regarding protein dosage, 0.432 µg / mL was detected, under conditions of 1.5% concentration, pH 7.8 at 33 ° C. As regards the optimization of production and partial characterization of the enzyme L-glutaminase, the best activity was observed in the assay with a concentration of 1.5%, pH 7.0 at 44 ° C. The analysis of the variance resulted in the determination of R² of 99.84%. The study of the main effects and their interactions showed that all factors tested were significant. In the enzymatic characterization, the optimum pH 8.0 and the optimum temperature were obtained 37 ° C. L-glutamine and glutamic acid were considered as excellent substrates. The enzymatic activity was increased by the addition of ions, such as MnCl₂ and MgCl₂, but was decreased when others, such as ZnSO₄, were used, demonstrating that the activity of the enzyme is susceptible to changes due to the addition of metallic ions. the analysis of variance (ANOVA) of the obtained results was evaluated through the program Statistica, version 7.0 (StatSoft Co., USA). The results obtained in this work were relevant to the biotechnology area, bringing data about the production and characterization models, besides reinforcing the importance of researching new microbial sources, such as actinobacteria, for the exploration of new secondary

metabolites.

Key-words: Actinobacteria. L-asparaginase. L-glutaminase.

LISTA DE FIGURAS

1 ARTIGO 1 (REVISÃO DE LITERATURA)

Figura 1. Esquema da técnica do microcultivo para identificação de actinobactérias	27
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação da L – asparaginase	32
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo de ação da L- glutaminase	34

2 ARTIGO 2

Figura 1. Gráfico de Pareto para significância dos fatores	55
--	----

3 ARTIGO 3

Figura 1. Gráfico de Pareto com efeitos e interações das variáveis	77
Figura 2. Gráfico de Pareto com efeitos e interações das variáveis	80
Figura 3. Gráficos de contorno 2D e 3D	82
Figura 4. Caracterização enzimática: pH	83
Figura 5. Caracterização enzimática: Temperatura ótima.	83
Figura 6. Caracterização enzimática: diferentes substratos	84
Figura 7. Caracterização enzimática: diferentes íons	85
Figura 8. Microscopia microcultivo	86

LISTA DE TABELAS

1 ARTIGO 1 (REVISÃO DE LITERATURA)

Tab 1. Algumas importantes enzimas terapêuticas oriundas de actinobactérias	31
---	----

2 ARTIGO 2

Tab 1. Condições e níveis dos ensaios para o planejamento fatorial 2 ³	51
Tab 2. Resultados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial 2 ³	53
Tab 3. Estimativa dos efeitos, planejamento fatorial 2 ³	55
Tab 4. Condições utilizadas para ponto central para o planejamento fatorial 2 ³	56
Tab 5. Valor produzido por U/ml com as condições de ponto central	57

3 ARTIGO 3

Tab 1. Condições e níveis dos ensaios para o planejamento fatorial 2 ³	69
Tab. 2 Condições e níveis dos ensaios para o 2 ^o planejamento fatorial 2 ³	76
Tab 3. Rendimento obtido no 1 ^o planejamento experimental 2 ³	77
Tab 4. Estimativa dos efeitos no 2 ^o planejamento experimental 2 ³	78
Tab 5. Rendimento do 2 ^o planejamento experimental 2 ³	78
Tab 6. Designer do planejamento 2 ³	80

LISTA DE ABREVIATURAS

µg/mL	Micrograma por mililitros
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
g/L	Gramas por litros
ISP-2	Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar
M	Molar
MH	Muller Hington Ágar
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minutos
SDS	Sulfato sódico de dodecila
TCA	Ácido tricloroacético
U/mg	Unidades por miligramas de proteínas
U/mL	Unidade de enzima por mililitros
µmol	Micromol
µL	Microlitros
$\square\square$	Constante de Michaelis
\square máx	Valor máximo da velocidade inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 ARTIGO 1.....	22
4 ARTIGO 2.....	47
5 ARTIGO 3.....	62
6 CONCLUSÕES GERAIS	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

No Brasil 12% de seu território é constituído por uma região semiárida, em que predomina o bioma Caatinga. A Caatinga (ou "mata branca", no idioma Tupi) é o único bioma exclusivo brasileiro, com uma área de aproximadamente 800 mil km² (Mamede e Araújo, 2008). Lima e Rodal (2010) afirmam que as condições semiáridas influenciam fortemente o aparecimento de estratégias ecológicas, possibilitando maior eficiência fisiológica de tolerar a sazonalidade da disponibilidade de água. Entre as plantas que compõe a flora da caatinga, a *Poincianella pyramidalis* Tul. é uma espécie endêmica da região Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como "catingueira" partes dessa planta, especialmente sua casca interna ou folhas, são usadas tradicionalmente por seus efeitos anti-inflamatório, diurético, dispepsia, digestivo, antipirética, e efeitos expectorantes. (Queiroz, 2009; Santos et al, 2012).

O solo dentre todos os habitats terrestres, abriga a maior diversidade de espécies microbianas (Moreira; Siqueira, 2006). A rizosfera do solo da Caatinga é caracterizada por uma comunidade microbiana selecionada (Deangelis et al, 2008). Actinobactérias fazem parte dessa comunidade e colaboram no desenvolvimento de plantas; com isso, a presença desses micro-organismos na rizosfera é de extrema importância. Contudo, existem poucos estudos relacionados à rizosfera da *P. pyramidalis*.

Grande parte das actinobactérias, em relação a fisiologia e ecologia, são organismos aeróbicos livres, amplamente distribuídos em ecossistemas terrestres e aquáticos (incluindo marinhos). Além disso, elas podem ser heterotróficos ou quimioautotróficos, mas predominam os quimioheterotróficos. Estes micro-organismos são capazes de usar uma ampla variedade de fontes nutricionais, incluindo vários polissacarídeos complexos (Barka et al., 2016).

As actinobactérias são eficientes produtoras de metabólitos secundários; desde a descoberta do antibiótico actinomicina, foram obtidas diversas outras moléculas. Não obstante a produção de antibióticos, são também provenientes outras moléculas, enzimas extracelulares industrialmente importantes, antioxidantes, herbicidas, antifúngicos, antivirais e fármacos com potencial antitumoral (Trujillo, 2008). Em relação a obtenção de enzimas industriais, a produção da enzima L-asparaginase, tem ganhado destaque entre as demais.

A enzima L-asparaginase (L-asparaginase amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é tida como um excelente antitumoral. Essa enzima hidrolisa L-asparagina em L-aspartato, com a liberação de uma molécula de amônia. Além disso, essa enzima tem sido utilizada tanto no tratamento do câncer quanto na indústria alimentar (Gesto et al., 2013). A ação clínica dessa enzima é atribuída à redução de L-asparagina, uma vez que as células tumorais são incapazes de sintetizar esse aminoácido, seletivamente mortas pela privação da L-asparagina (Siddalingeshwara K.G. & Lingappa K. 2011).

A L-glutaminase é uma enzima (L-glutamina amidohidrolases EC 3.5.1.2) que catalisa a hidrólise de L-glutamina em ácido glutâmico. Esta enzima pode ser obtida de fontes microbianas, vegetais e animais. As L-Glutaminases provenientes de fontes microbianas tem sido aplicadas como um potencial antitumoral na indústria farmacêutica, intensificador de sabor na indústria alimentícia, útil como biossensores e também na fabricação de produtos químicos especiais por transformações enzimáticas (Unissa et al., 2014).

REFERÊNCIAS

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H.-P. VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, 80(1), 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15

DEANGELIS K.M., BRODIE E.L., DESANTIS T.Z., ANDERSEN G.L., LINDOW S.E., FIRESTONE M.K. (2008). "Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots." **The ISME Journal** 3(2): 168-178. DOI: 10.1038/ismej.2008.103

GESTO D. S. , CERQUEIRA N. M. F. S. A. , FERNANDES P.A., RAMOS M. J.(2013). Unraveling the Enigmatic Mechanism of L-Asparaginase II with QM/QM Calculations. **Journal Of The American Chemical Society**. Porto, p. 7146-7158. abr. 2013.

LAZZARINI A., CAVALETTI L., TOPPO G., MARINELLI F. (2001). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 399–405

LIMA, A. L. A.; RODAL, M. J. N. (2010). Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, n. 11, p. 1363- 1373.

MAMEDE, M.A.; ARAÚJO F.S. (2008). Effects of slash and burn practices on a soil seed bank of Caatinga vegetation in Northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 72, p. 458–470.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.(2006). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Ufla, 729 p.

QUEIROZ, L. P. (2009). Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Ba: UEFS, 467 p.

SANTOS J. S., MENDES S. S., CONDE D. C., DELMONDEZ R. C., MANN R. S., THOMAZZI S. M. (2012). Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. **Scientia plena**. Sergipe, p. 1-8.

SIDDALINGESHWARA K.G.; LINGAPPA K. (2011) Production and Characterization of LAsparaginase - A Tumour inhibitor. **International Journal of PharmTech Research** CODEN (USA): 3 (1), pp 314-319.

TRUJILLO, M. (2008). Actinobacteria. **Encyclopedia Of Life Sciences**, [s.l.], p.1-16, 15 jul. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020366.

UNISSA R., SUDHAKAR M., REDDY A. S. K., SRAVANTHI K. N. (2014). A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.4617-4634. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.5(11).4617-34.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Otimizar a produção das enzimas L-asparaginase e L-glutaminase excretadas por actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis* bem como identificar morfológicamente a actinobactéria.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a produção de L-asparaginase extracelular e L- Glutaminase de actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis*;
- Caracterizar o complexo enzimático de L-glutaminase;
- Produzir a L-glutaminase nas condições otimizadas em biorreator;
- Identificar morfológicamente a actinobactéria.

3 ARTIGO 1

Revisão de literatura

Actinobactérias como produtoras de enzimas terapêuticas

Artigo a ser submetido a revista Ciência e Natura

Actinobactérias como produtoras de Enzimas terapêuticas

Wellma de Oliveira Silva^{1*}, Wellen Laís de Souza Gomes¹, Vinícius Eduardo Souza de Oliveira¹, Erick Jonne Vieira de Melo¹, Leonor Alves de Oliveira Silva¹ Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho²

¹ Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, PE, Brazil.

*Corresponding Author: Wellma de Oliveira (wellmaoliveira@gmail.com)

Resumo

Actinobactérias, são micro-organismos ubíquos, que integram o grupo de bactérias gram positivas. Organismos com a morfologia bastante variada, as actinobactérias são encontradas em formas cocoídes, fragmentadas ou com micélio ramificado. Elas são consideradas uma das principais fontes para produção de antibióticos, mas a importância destas bactérias, não se resume a área farmacêutica. As actinobactérias são capazes de produzir inúmeros metabólitos secundários, tais como antibióticos, enzimas extracelulares, herbicidas, antifúngicos e antivirais. Entre as enzimas extracelulares produzidas por actinobactérias, destacam-se a L-asparaginase e L-glutaminase, ambas com grande potencial antitumoral. Muitas pesquisas estão sendo voltadas para o rastreamento de actinobactérias e o estudo de condições fermentativas para produção de novos compostos bioativos, que podem resultar na descoberta de importantes enzimas terapêuticas.

Palavras chaves: Metabólitos secundários, l-asparaginase, l-glutaminase.

Abstract

Actinobacteria, are ubiquitous microorganisms, which are part of the group of gram positive bacteria. Organisms with a very varied morphology, actinobacteria are found in coccoid, fragmented or branched mycelium forms. They are considered one of the main sources for antibiotic production, but the importance of these bacteria, is not restricted to the pharmaceutical area. Actinobacteria are capable of producing numerous secondary metabolites, such as antibiotics, extracellular enzymes, herbicides, antifungals and antivirals. Extracellular enzymes produced by actinobacteria include L-asparaginase and L-glutaminase, both of which have a high antitumor potential. Much research is being done to screen for actinobacteria and study fermentative conditions for the production of new bioactive compounds, which may result in the discovery of important therapeutic enzymes.

Key words: Secondary metabolites, l-asparaginase, l-glutaminase.

1 Introdução

As actinobactérias compõem o grupo de bactérias gram-positivas que possuem uma elevada quantidade de guanina (G) e citosina (C) em seu genoma (>55 mol%; Ensign, 1992; Shivlata; Satyanarayana, 2015). O teor de GC é uma medida rudimentar da relação dos micro-organismos, mas ainda é útil para diferenciar grandes divisões filogenéticas. Eles exibem uma ampla gama de ciclos de vida, que são únicos entre os procariontes (Chavan; Mulaje; Mohalkar, 2013). São organismos que variam em forma de organismos unicelulares para filamentos que se ramificam formando o micélio. As actinobactérias são encontradas em uma vasta gama de ambientes ecológicos, normalmente de vida livre e apresentam diferentes morfologias, variando de cocóides (*Micrococcus*), rod-coccoide (*Arthrobacter*), fragmentadas em formas de hifas (*Nocardia*) e também aqueles com micélio ramificado (*Streptomyces*) (Trujillo, 2008).

O filo Actinobacteria, representa uma das linhagens mais primitivas entre os procariontes (Koch, 2003) e atualmente configura entre as principais linhagens reconhecidas no domínio das bactérias, abrangendo 5 subclasses, 6 ordens e 14 subordens. Os gêneros deste filo exibem enorme diversidade em termos de sua morfologia, fisiologia e capacidades metabólicas (Ludwig et al., 2012).

As actinobactérias, eram antes tradicionalmente consideradas formas de transição entre fungos e bactérias. Na verdade, eram confundidas especificamente falando, com os fungos filamentosos por muitas delas produzirem micélio e até mesmo reproduzirem-se por esporulação. O próprio nome actinobactéria, remete aos fungos, pois a forma de crescimento com combinação de extensão da ponta e ramificação das hifas lhes deu o nome que deriva das palavras gregas para raio (aktis ou aktin) e Fungos (mukes) (Barka et al., 2015).

Há muito anos, actinobactérias vem sendo usadas comercialmente para produção de compostos bioativos, de alto valor industrial, tais como fármacos, enzimas, agentes antitumorais, inibidores enzimáticos e entre outros (Remya; Vijayakumar, 2008). Por este motivo, actinobactérias tornaram-se alvo dos pesquisadores interessados na

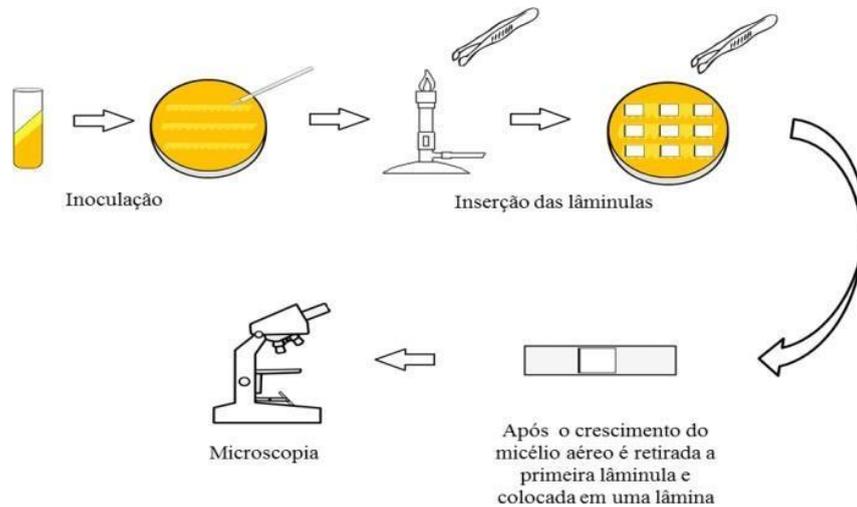
produção de novos compostos bioativos. Grande parte dos gêneros de actinobactérias possuem capacidade de produção de enzimas e produtos que são aplicados em indústrias biotecnológicas e campos biomédicos. O advento do genoma e dos dados de sequenciação de proteínas, com informações vitais disponíveis, possibilitou que os actinomicetos sejam continuamente utilizados na produção de proteases, celulases, quitinases, amilases, xilanases, asparaginases entre outras enzimas (Prakash et al., 2013).

2 Identificação Morfológica de Actinobactérias

Actinobactérias podem ser caracterizadas de forma morfológica, fisiológica, bioquímica e também por métodos moleculares. A maioria das actinobactérias são inicialmente caracterizadas com base na sua morfologia para fornecer informações com profundidade sobre sua taxonomia. São parâmetros importantes na classificação morfológica, segundo Jiang et al. (2016) : a cor do micélio, o modo de crescimento e da quebra do micélio e substrato, a posição do esporo, o número de esporos, as estruturas superficiais formadas pelo micélio, a forma dos esporângios ou se apresentam esporangiosporos flagelados.

Os métodos morfológicos podem ser classificados em macroscópicos ou microscópicos (Mangamuri et al., 2012). O método morfológico microscópico, possui diferentes metodologias, que variam de autor para autor, mas todas elas tem como escopo principal a visualização dos micélios, estrutura, fragmentação e cadeia de esporos das colônias. Mangamuri et al. (2012), utilizaram o método de cultura de lâminas (Williams e Cross, 1971), onde a estrutura do micélio, cor e disposição dos esporos no micélio foram observados através de microscópio invertido. Taddei et al. (2006), realizaram segundo técnica de Shirling e Gottlieb (1966), que consiste em inocular o micro-organismo em estrias nos meios de cultura sólido e, em seguida, inserir lamínulas com inclinação de 45° sobre a estria, de forma a induzir o crescimento do micélio aéreo sobre a lamínula para observação microscópica em objetiva com o aumento de 40 vezes, técnica esta, esquematizada na figura 1.

Figura 1 — Esquema da técnica do microcultivo para identificação de actinobactérias segundo Shirling e Gottlieb, 1966.



Fonte: Autor (2017)

No método macroscópico são predominantemente usados diferentes meios de ISP- ISP - ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5 e ISP 6, para analisar a capacidade do crescimento em diferentes meios, a cor dos micélios aéreos e dos substrato, além da produção de pigmentos.

3 Enzimas

As enzimas são os biocatalisadores que desempenham um papel indispensável em todos os estágios do metabolismo e reações bioquímicas dos seres vivos. A utilização de enzimas foi constatada desde os egípcios antigos na preservação de alimentos e bebidas, porém apenas em 1877 que surgiu a terminologia científica desta biomolécula, pelo professor fisiologista Wilhelm Friedrich Kühne, a palavra vem (do grego en = dentro zyme = levedura) para designar as substâncias contidas nos extratos de levedura usados em fermentação (Gurung et al., 2013). As enzimas estão sendo utilizadas direta ou indiretamente pela humanidade há milhares de anos, mas sua importância só foi reconhecida em meados do século XIX, quando cientistas descobriram como elas atuam. Os principais marcos foram o desenvolvimento de métodos para o isolamento e purificação enzimática, a constatação de que as enzimas são proteínas com atividade bioquímica e sua caracterização por técnicas de difração de

raios X (Martínez Cuesta et al., 2015).

Algumas enzimas são de interesse específicos e desta forma são direcionadas para uso em numerosos processos de escala industrial, como catalisadores (Nigam, 2013). Para estes processos industriais comerciais, muitas enzimas de fontes microbianas já estão sendo usadas. De acordo com Anbu et al. (2013) as enzimas microbianas são mais ativas e estáveis do que as enzimas vegetais e animais. Além disso, os microorganismos representam uma fonte alternativa de enzimas porque podem ser cultivados em grandes quantidades em curto espaço de tempo por fermentação por causa de sua diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação de genes.

O mercado de enzimas industriais é um dos setores geradores de recursos financeiros no mundo. O mercado global de enzimas industriais evoluiu continuamente devido a numerosas fusões e aquisições. No ano de 2011, gigantes da indústria enzimática como Novozymes e DuPont ocuparam quotas de mercado de 47% e 21%, respectivamente (Prakash et al., 2013). Pesquisadores estão à procura de microorganismos selecionados, que podem ser bactérias, fungos e leveduras, para que eles possam ser estudados em relação a bio-síntese de metabólitos secundários, assim como também a viabilidade das preparações para aplicações comerciais (Pandey et al., 1999; Nigam, 2013).

As actinobactérias, micro-organismos ubíquos, estão relacionados com a produção de uma vasta gama de enzimas com aplicabilidade em indústrias tecnológicas. Na verdade, desde a descoberta da actinobactéria em 1940, mais de 20.000 metabólitos secundários foram obtidos a partir dessas bactérias (Lazzarini et al., 2001; Barka et al., 2015). Além de antibióticos, as actinobactérias produzem enzimas extracelulares industrialmente importantes, herbicidas, antifúngicos, antivirais e drogas anticancerígenas. Actinobactérias são um reservatório de importantes enzimas e metabólitos devido ao seu versátil repertório genético. Contudo, existem gêneros pouco explorados e não manipulados para fins de potencial biotecnológicos e potencial (Prakash et al., 2013).

4 Enzimas Terapêuticas

As enzimas voltadas para uso clínico apresentam características que as diferenciam de outros tipos de fármacos tais como especificidade, maior afinidade, alta eficiência catalítica. Além disso, podem ser empregadas em muitas conversões químicas e na aceleração de processos metabólicos importantes (Mane; Tale, 2015). De acordo com Vellard (2003) o conceito de enzimas terapêuticas tem sido usado há mais de 40 anos, citando como exemplo, uma enzima como parte da terapia de substituição para deficiências genéticas utilizadas na década de 1960 por de Duve. Entretanto, Sabu et al (2005) relata que John Beard, um cientista inglês, descreve o primeiro uso de enzimas para tratar o câncer em 1902, onde propôs que as enzimas proteolíticas pancreáticas desempenhavam além de sua função digestiva bem conhecida, a principal defesa contra o câncer.

As enzimas terapêuticas possuem uma ampla variedade de usos específicos, como oncolíticos (pepsina), trombolíticos (trobominase), enzimas com capacidade de reduzir aminoácidos (l-asparaginase, l-glutaminase), enzimas redutoras de macromoléculas (ribonucleases, proteases), entre muitos outros crescentes grupos de enzimas, com diversificadas funções (Jayaram; Ahluwalia; Cooney, 2000).

As enzimas com fins terapêuticos, encontram-se disponível em forma de pílulas, cápsulas e também em pó, onde muitas vezes pode consistir em combinações de várias enzimas diferentes. Gurung et al 2013, em seu trabalho afirmou que enzimas terapêuticas possuem mecanismos diferentes das demais enzimas, pois são necessárias em quantidades relativamente menores, mas com alto grau de pureza e de especificidade além de necessitarem de baixos K_m e alta V_{max} de modo que seja maximamente eficaz, mesmo em baixas concentrações de enzimas e substratos, fazendo com que desta forma as enzimas terapêuticas tenham diferentes utilizações específicas. O desenvolvimento de aplicações enzimáticas industriais na medicina estão trazendo bons retornos clínicos. Salienta-se que apesar dos micro-organismos serem uma fonte muito boa de enzimas terapêuticas, a utilização de enzimas microbianas para fins terapêuticos é limitada devido à sua incompatibilidade com o corpo humano. Mas há um foco maior

na utilização de enzimas microbianas por causa de sua viabilidade econômica (Sabu et al., 2005).

5 Actinobactérias como fonte de enzimas terapêuticas

Actinobactérias tem se destacado no que diz respeito a produção de novas enzimas terapêuticas, tal fato compreende uma das importantes razões existentes para a crescente busca de actinobactérias, procura esta, que se estende até mesmo em lugares mais remotos como no deserto, ambientes marinhos e zonas úmidas (Kurapova et al., 2012; Manivasagan et al., 2013; Yu et al., 2015). O uso de enzimas terapêuticas tornou-se uma excelente alternativa clínica, visto que apesar da disponibilidade de um número enorme de medicamentos, as cepas patogênicas resistentes a múltiplos fármacos estão emergindo constantemente, provocando surtos de doenças graves, em muitos países (Shivlata; Satyanarayana, 2015).

Enzimas terapêuticas têm uma ampla variedade de usos específicos, tais como oncolíticos, anticoagulantes, agentes anti-inflamatórios e substituições para deficiências metabólicas. Existem várias enzimas terapêuticas importantes de origem microbiana tais como L-asparaginase, L-glutaminase, trombinase, superóxido Dismutase (SOD), penicilina acilase, lipase, estreptoquinase, entre outras (Balagurunathan et.al 2013). A L-asparaginase e L-glutaminase são enzimas com potencial antitumoral, altamente exploradas e produzidas por várias espécies de actinobactérias. Na tabela 1 são relatadas algumas das enzimas produzidas por actinobactérias, com potencial terapêutico, com sua devida aplicação clínica.

Tabela - 1 Algumas importantes enzimas terapêuticas oriundas de actinobactérias.

Enzimas	Aplicação	Fonte Microbiana	Referências
L-asparaginase	Antitumoral	<i>Streptomyces aureofaciclus</i> , <i>Streptomyce Chattanoogaogenesis</i> , <i>Streptomyces hawaiiensis</i> , <i>Streptomyces orientalis</i> , <i>Streptomyces canus</i> , <i>Streptomyces olivoviridis</i> , <i>Streptomyces longsporusflavus</i>	(Sahu et al., 2007)
		<i>Nocardia sp.</i>	(Chauhan;Dhaliwa, 2014)
		<i>Nocardiosis alba</i>	(Meena et al., 2014)
L-glutaminase	Antitumoral	<i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces sp.-SBU1</i>	(Krishnakumar et l., 2011)
		<i>Streptomyces avermitilis</i>	(Abdallah;Amer;Habeeb, 2013)
		<i>Streptomyces canarius</i>	(Reda, 2015)
Trombinase	Tratamento de infarto do miocárdio	<i>Streptomyces Venezuelae</i>	(Naveena et al., 2012)

Fonte: Autor (2017)

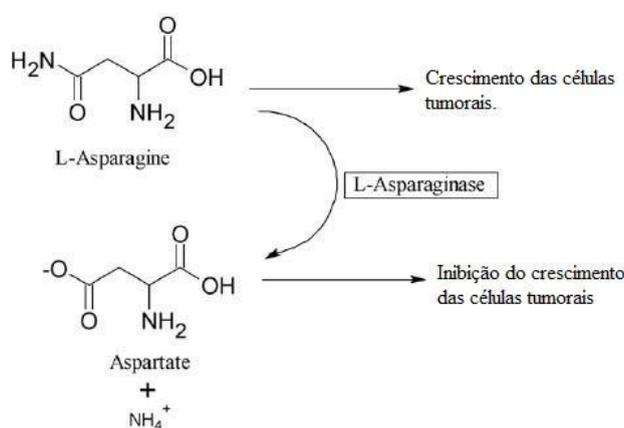
6 L-asparaginase

A L-asparaginase (E.C 3.5.1.1) é uma proteína tetramétrica que catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amoníaco (Arif HM e Hussain Z., 214; Badoei-Dalfard,A., 2016). A enzima L-asparaginase vem tendo duas grandes aplicações, uma delas está na área alimentícia, onde L-asparaginase é usada na produção de batatas fritas, com o intuito de diminuir a formação de acrilamida que as altas temperaturas durante a fritura ou tempo de cozimento provocam, como resultado da reação de Millard entre açúcares redutores e L-asparagina. Já a propriedade anticancerígena desta enzima é aplicada no tratamento da leucemia linfoblástica (Tareke E .et al 2002; Anese M, Quarta B, Frias J., 2011; Badoei-dalfard, 2016). Diante da aplicação da enzima tanto no processo de alimentos, quanto na área clínica, a demanda por L-asparaginase tem aumentado bastante nos últimos anos (Baskar;Renganathan, 2011; More, 2013).

A ação clínica desta enzima é atribuída a redução da asparagina (L-Asn) e uma vez que as células tumorais não possuem a capacidade de sintetizar este aminoácido, acabam mortas pela privação da asparagina (Sanghamitra; Ghosh; Saptarshi, 2014). De

uma forma mais específica, para o crescimento de células tumorais linfáticas, a L-asparagina serve como um aminoácido essencial, uma vez que necessitam de asparagina para o seu desenvolvimento, utilizam toda a asparagina da dieta e da circulação sanguínea ou fluido corporal (figura 2). No entanto, as células normais são capazes de sintetizar a l-asparagina suficiente para suas necessidades metabólicas usando da asparagina sintetase, o que não acontece com as células tumorais linfáticas (More, 2013).

Figura 2 — Representação esquemática do mecanismo de ação da l-asparaginase.



Fonte: Adaptado de Narta, Kanwar e Azmi (2007).

L-Asparaginase pode ser obtida através de espécies vegetais e animais, mas devido ao procedimento de extração difícil dessa enzima, fontes como micro-organismos estão sendo pesquisadas e mais requisitadas. Micro-organismos mostram-se bastante eficientes e baratos, ademais podem ser cultivados com facilidade, propiciando a produção em larga escala. É vasta a lista de micro-organismos que são produtores eficientes da L-asparaginase abrange bactérias, fungos, leveduras, actinobactérias, variando as propriedades enzimáticas, de organismos para organismos e também do modo como foi isolado e cultivo (Narta; Kanwar; Azmi, 2007). Os micro-organismos podem produzir vários tipos de asparaginases de acordo com propriedades da localização celular, nomeadas pela literatura de periplasmática Asparaginase, asparaginase extracelular, intracelular Asparaginase e glutaminase-asparaginase, que desempenham um papel básico no metabolismo (Zuo et al, 2014).

Apenas duas espécies bacterianas, tem sido usadas para produzir a enzima em grandes quantidades, já que liberam a enzima com uma menor toxicidade e melhor atividade antitumoral, *E. coli* e *Erwinia caratovora*. Através destas cepas, a L-asparaginase é preparada de 3 formas: duas formas não modificadas ou nativas, purificadas de origem bacteriana, e uma forma modificada de uma das preparações nativas. As preparações nativas são derivadas de *E. coli* (comercializado comercialmente por Merck & Co. como Elasper), *Erwinia caratovora* (disponível como Erwinia L-asparaginase Ogden Bioservices Pharmaceutical Repository no Estados Unidos). O produto Erwinia está comercialmente disponível no Canadá e Europa como Erwinase, comercializado por Porton (Duval et al 2002; Narta; Kanwar; Azmi, 2007).

Importante ressaltar que as actinobactérias são uma excelente fonte para produção da enzima L-asparaginase, mostram as recentes pesquisas. Em actinomycetaceae, por exemplo, espécies de *Streptomyces* tais como *S. Karnatakensis*, *S. venezualae*, *S. longisporusflavus* e uma *Streptomyces sp.* PDK2 de vida marinha, foram explorados para a produção de L-asparaginase (Meena et al. 2014). More (2013), com *Mucor hiemalis* produtor de L-asparaginase usando o Czapek como meio; Sanghamitra; ghosh; saptarshi (2014), realizou fermentações com diferentes resíduos agrícolas (casca de arroz, farelo de trigo, farelo de milho, casca de lentilha amarela) como substratos para produção da L-asparaginase, por meio de *Aspergillus fumigatus*. Basha et al. 2009, realizou a produção de extracelular L-asparaginase de actinobactérias marinhas realizada em condições de fermentação submersa e em estado sólido.

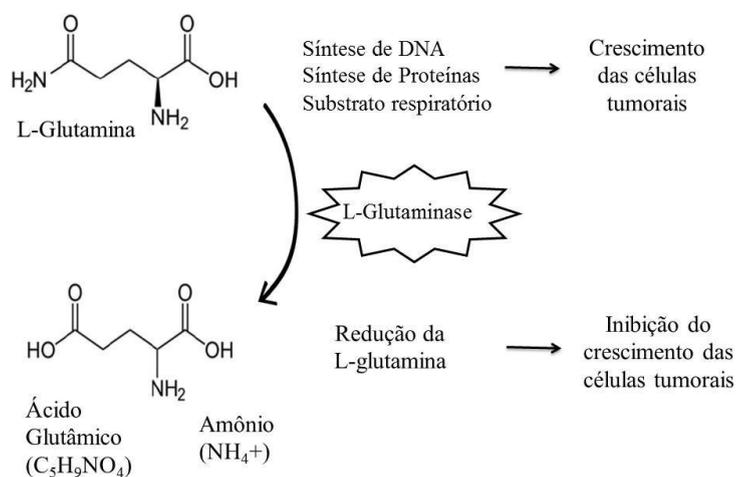
7 L-Glutaminase

L-Glutaminase é uma enzima (L-glutamina amidohidrolases EC 3.5.1.2) que catalisa a hidrólise de L-glutamina em ácido glutâmico. A enzima está amplamente distribuída em tecidos animais, plantas e em micro-organismos incluindo bactérias, fungos e leveduras. Nos últimos anos, desde a descoberta da potencial ação antitumoral da enzima, a L-glutaminase tem sido combinada com a L-asparaginase ou até mesmo usada como alternativa na terapia enzimática para o câncer, particularmente em alguns

tipos leucemias (Unissa et al., 2014). Dessa forma, a enzima passou a atrair a atenção dos pesquisadores não só em aplicações farmacêuticas, como também em aplicações na indústria de alimentos (Sinha; Nigam, 2016).

No que diz respeito à aplicação cancerígena, a enzima provoca a morte de células leucêmicas privando-as do fornecimento de L-glutamina. As células tumorais precisam necessariamente da glutamina como substrato de crescimento, pois ao contrário das células normais, células leucêmicas não demonstram a existência da L-glutamina sintetase, fornecedor principal de L-glutamina, aminoácido essencial para o seu crescimento e sobrevivência. A glutamina é importante como um precursor tanto para a síntese de DNA como para a síntese de proteínas e também pode ser utilizada como substrato respiratório das células, como demonstrado na figura 3 (Unissa et al., 2014).

Figura 3 — Representação esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase.



Fonte: Autor (2017).

Na indústria alimentar, a L-glutaminase é utilizada como potenciador de sabor aumentando o teor de ácido glutâmico nos alimentos através da hidrólise de L-glutamina em ácido L-glutâmico e amoníaco (Desai; Chopra; Hungund, 2016). L-glutaminase é geralmente considerada como uma enzima-chave que confere aos alimentos fermentados um delicioso sabor, como por exemplo o molho de soja, conhecido como “molho shoyu” (Unissa et al., 2014). Sua importância comercial exige a busca de novas e melhores cepas microbianas e bioprocessos economicamente viáveis

para sua produção em larga escala (Iyer;Singhal, 2009; Sinha; Nigam, 2016).

Tanto em organismos procariotos, quanto em eucariotos, a L-Glutaminase desempenha um papel importante no metabolismo do nitrogênio. A síntese desta enzima tem sido relatada de muitos gêneros bacterianos, particularmente de fontes terrestres como *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter* e *Bacillus sp*. Embora a glutaminase tenha sido detectada em várias estirpes bacterianas, as mais bem caracterizadas foram de membros da família *Enterobacteriaceae* (Roberts J., Holcenberg J.S., Dolowy W.C., 1972; Prusiner S., Stadtman E.R., 1976; Cook et al. 1981; Katikal et al. 2009; Unissa et al., 2014). As L-glutaminases microbianas são usada com maior frequência para usos alimentares e farmacêuticos porque a sua produção é rápida, barata e compatível com os passos a caminho de sua purificação (Sing;Banik, 2013).

8 Otimização enzimática – Análise Estatística

Os experimentos projetados estatisticamente passaram a ser usados como uma poderosa ferramenta para melhorar a eficiência da experimentação. Através de um processo dinâmico, eles nos permitem adquirir conhecimento sobre o sistema em estudo com um número mínimo de experimentos. A inclusão de condições de teste replicadas permite a estimativa da variação aleatória experimental. A análise estatística dos dados gerados a partir do experimento estabelece claramente a relação entre o parâmetro de interesse medido (resposta) e os parâmetros do processo (fatores ou fatores de entrada) estudados. Os fatores podem ter efeitos individuais e simples sobre a resposta ou podem ter efeitos interdependentes (Altekar et al., 2006).

São muitos os tipos de planejamento experimentais, tais como o desing fatorial simples, desing fatorial completo, desing fatorial fracionado, delineamento composto central rotacional. Importante ressaltar, que utilização de cada um destes tipos depende da finalidade do estudo (Granato; Araújo ,2014). Quando é necessário obter melhor atividade enzimática, o uso do planejamento fatorial e análise de superfície de resposta são bastante úteis para determinar as condições ideais. Além disso, o desing fatorial de um grupo limitado de variáveis é vantajoso em relação ao método convencional de

manipulação de um único parâmetro por ensaio, uma vez que tal abordagem não consegue localizar condições ótimas devido à sua falha em não considerar o efeito das possíveis interações que podem ocorrer entre fatores (Kalil et al , 2000; Burkert, J. F. M. et al . 2006).

9 Planejamento Fatorial 2^k

A execução de um Planejamento de Experimento 2^K , tem por finalidade suprir informações sobre a interação de diferentes fatores (variáveis em estudo), ou seja, explicitar quais são os impactos de cada fator na resposta analisada e como eles se relacionam em diferentes níveis (condição de operação dos fatores) de interação entre fatores (Camargo; Moreira; Vaccaro, 2010). A execução de um planejamento experimental, exige como primeiro passo, a escolha de cada fator e a especificação dos níveis em que cada fator será estudado. Normalmente os níveis são identificados por nível baixo (-) e nível alto (+), onde a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados (Cunico et al., 2008).

Este tipo de planejamento também é representado por b^k , sendo que k representa o número de fatores e “ b ” o número de níveis escolhidos (Neves et al., 2002, Cunico et al., 2008)). Para planejamentos fatoriais de dois níveis (2^k), o modelo matemático usado para descrever a relação entre os fatores e a variável de resposta linear, é:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon$$

Onde Y é a variável dependente, β_i , $i=0,1, \dots, k$, são chamados coeficientes de regressão do modelo, e X_i $i=1,2, \dots, k$ são as variáveis independentes no modelo (Pap, N., et al 2013).

10 Conclusão

As actinobactérias mostram-se de grande importância, por apresentarem ótima capacidade para produção de enzimas e compostos secundários, como consequência aos seus versáteis repertórios genéticos. Entre as enzimas extracelulares industrialmente importantes, produzidas por actinobactérias, estão a L-asparaginase e a L-glutaminase, que possuem propriedades antitumorais. No mundo, poucas enzimas têm sido potencialmente utilizadas a nível industrial e ainda existem muito gêneros raros de actinobactérias a serem exploradas biotecnologicamente. Portanto, continuar a explorar o potencial biotecnológico de novas fontes bacterianas, é uma tendência positiva que poderá render moléculas de baixo custo, com alta importância tecnológica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (LCBCC), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Referências

ABDALLAH N. A., AMER S. K, HABEEB. M. K.(2013). Production, purification and characterization of L-glutaminase enzyme from *Streptomyces avermitilis*, Afr J Microbiol Res, Vol. 7, 1184-1190.

ALTEKAR M. , HOMON C. A., KASHEM M.A, MASON S. W. , NELSON R. M., PATNAUDE L.A., YINGLING J., TAYLOR P.B. (2006). Assay Optimization: A Statistical Design of Experiments Approach. **Journal Of The Association For Laboratory Automation**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.33-41. DOI: 10.1016/j.jala.2005.11.001.

ANBU P., GOPINATH S.C., CHAULAGAIN B.P., TANG T.H., CITARTAN M. (2013). Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-2. DOI: 10.1155/2013/204014.

ANESE M, QUARTA B, FRIAS J.(2011). Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chem.* 126:435-40.

ARIF HM, HUSSAIN Z.(2014). Important sources and medicinal applications of L-asparaginase. *Int J Pharm Sci Rev*;3:35-45.

AYARAM, Hiremagalur N.; AHLUWALIA, Gurpreet S.; COONEY, David A. (2000). Enzyme Applications, Therapeutic. **Kirk-othmer Encyclopedia Of Chemical Technology**, [s.l.], p.1-22, 4 dez. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/0471238961.2008051810012501.a01.

BADOEI-DALFARD, ARASTOO. (2016). L-asparaginase production in the pseudomonas pseudoalcaligenes strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. **Molecular Biology Research Communications**, Kerma, v. 5, n. 1, p.1-10.

BALAGURUNATHAN R., SHANMUGASUNDARAM T., PRIYADHARSHINI D., M. SANJIVKUMAR. (2013) Magnesite Ore Soil Actinobacteria – A Source for Novel Enzymes and Antibiotics. *Indo American Journal of Pharm Research*.:3(4)

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H.-P.VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: MMBR, 80(1), 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15

BASKAR, GURUNATHAN; RENGANATHAN, SAHADEVAN. (2011). Statistical and evolutionary optimisation of operating conditions for enhanced production of fungal l-asparaginase. **Chemical Papers**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.1-12, 1. Springer Nature. DOI: 10.2478/s11696-011-0072-8

BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F., RODRIGUES, M. I. (2006). Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. *Braz. J. Chem. Eng.* [online].vol.23, n.2], pp.163-170. DOI:10.1590/S0104-66322006000200002

CAMARGO, L. F.; MOREIRA, V; VACCARO, G.(2010). Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no desenvolvimento de novos produtos em uma empresa de saneantes. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.404-420, 22 jan. 2010. UNISINOS - Universidade do Vale do Rio Dos Sinos. DOI: 10.4013/ete.2009.53.11.

CHAUHAN B, DHALIWAL M.K. (2014). Study of L-asparaginase production in *Nocardia* spp. isolated from Mangroves. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*; 4:3476-3484.

CHAVAN DILIP V. MULAJE S. S.¹, MOHALKAR R.Y. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.1730-1742, 1. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.4(5).1730-42

COOK, W. R., HOFFMAN, J. H., BERNLOHR, R. W. (1981). Occurrence of an Inducible Glutaminase in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 365–367.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M. MIGUEL, O. G. ZAWADZKI, S. F. PERALTA-ZAMORA, P. VOLPATO, N. (2008). Planejamento fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica.. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.23-32, 30 jun. 2008. Universidade Federal do Parana. DOI: 10.5380/acd.v9i1.14635

DESAI, SAVITHA; CHOPRA, SONAL; HUNGUND, BASAVARAJ.(2016) Production, purification and characterization of L-Glutaminase from *Streptomyces* sp.

isolated from soil. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], p.100-105.
Journal of Applied Pharmaceutical Science. DOI: 10.7324/japs.2016.60715.

DUVAL M.,SUCIU S., FERSTER A., RIALLAND X., NELKEN B., LUTZ P., BENOIT Y., ROBERT A, MANEL A.M., VILMER E., OTTEN J., PHILIPPE N.
(2002). Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer<remove-image>Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 99:2734–9.

ENSIGN J. C. (1992). Introduction to the Actinomycetes, in *The Prokaryotes*, 2nd Edn. Vol. II, eds Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Hardeer W., Schleifer K. H., editors. (New York, NY: Springer-Verlag;), 811–815.

GRANATO D., CALADO, A. V. M. (2014) The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology, in *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (eds D. Granato and G. Ares), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. DOI: 10.1002/9781118434635.ch01

GURUNATHAN B, SAHADEVAN R (2011) Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal *L*-asparaginase. *Chiang Mai J Sci* 38: 270-279.

GURUNG N., RAY S., BOSE S., RAI V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **A Broader View: Microbial Enzymes And Their Relevance In Industries, Medicine, And Beyond**. Mohanpur, p. 1-18. 09 jul.

IYER, P. AND R.S. SINGHAL,(2009). Screening and selection of marine isolate for L-glutaminase production and media optimization using response surface methodology. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 159: 233-250.

JIANG Y., LI Q., CHEN X., JIANG C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria, Actinobacteria - **Basics and Biotechnological Applications**, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61457

KATIKALA P.K., BOBBARALA V., PRABHAKAR T.P., GUNTUKU G.S. (2009) Screening of L-glutaminase producing marine bacterial cultures for extracellular production of L-glutaminase. *Int J Chem Tech.*; 1:1232-5.

KOCH, A. L. (2003). Were Gram-positive rods the first bacteria? *Trends Microbiol.* 11, 166–170. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00063-5

KRISHNAKUMAR S, ALEXIS R, RAVIKUMAR S (2011) Extracellular production of L-Glutaminase by marine alkalophilic *Streptomyces sp*-SBU1 isolated from Cape Comorin coast. *IJMS* 40:717-721.

KURAPOVA, I., ZENOVA, G. M., SUDNITSYN, I. I., KIZILOVA, A. K., MANUCHAROVA, N. A., NOROVSUREN, Z. H., (2012). Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia Desert Steppe Zone. *Microbiology* 81, 98–108. DOI: 10.1134/s0026261712010092

LUDWIG W, EUZÉBY J, SCHUMANN P, BUSS HJ, TRUJILLO ME, KÄMPFER P, WHITEMAN WB. (2012). Road map of the phylum *Actinobacteria*, p 1–28. *In* Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, WhitmanWB(ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 5. Springer-Verlag, New York.

MANE, PRAJAKTA; TALE, VIDYA. (2015) Overview of Microbial Therapeutic Enzymes. **Int.j.curr.microbiol.app.sci**, Pune, v. 4, n. 4, p.16-27

MANGAMURI U.K, MUVVA V., PODA S., KAMMA S. (2012). Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. *Mal J Microbiol.* 8(2): 83-91.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SIVAKUMAR, K., AND KIM, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol. Res.* 168, 311–332. DOI: 10.1016/j.micres.2013.02.00

MARTÍNEZ CUESTA, SERGIO et al. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, [s.l.], v. 109, n. 6, p.1082-1086, set. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.04.020

MEENA B., ANBURAJAN L., DHEENAN P.S., BEGUM M., VINITHKUMAR N.V., DHARANI G., KIRUBAGARAN R.. (2014). Novel glutaminase free l-asparaginase from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.373-388, 2. DOI: 10.1007/s00449-014-1277-3.

MONTGOMERY, D.G.(2001). **Design and analysis of experiments**. John Wiley & Sons, New York.

MORE, S. S.(2013). Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, [s.l.], v. 02, n. 02, p.1-9.DOI:10.4172/2324-9099.1000108.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.208-221.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E.(2002) Variables search technique applied to gas separation. *Química Nova*. v.25, n 2, p.327-329, 2002.

NIGAM, P. (2013). Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.597-611, 23. DOI: 10.3390/biom3030597.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.,
SOCCOL, V. T. (1999)The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 29, no. 2, p. 119-131.

PAP, N., BESZÉDES, S., PONGRÁCZ, E. MYLLYKOSKI L., GÁBOR M.,
GYIMES E., HODÚR C., KEISK R. L. (2013). Food Bioprocess Technol 6: 2666.
DOI:10.1007/s11947-012-0964-9

PRAKASH D., NAWANI N., PRAKASH M., BODAS M., MANDAL A.,
KHETMALAS M., KAPADNIS B. (2013) Actinomycetes: A Repertory of Green
Catalysts with a Potential Revenue Resource. **Biomed Research International**, [s.l.], v.
2013, p.1-8, 2013. Hindawi Publishing Corporation. DOI:10.1155/2013/264020

PRUSINER S, STADTMAN ER.(1976). Regulation of glutaminase B in *Escherichia coli-II*. Modulation of activity by carboxylate and borate ions. *J Biol Chem*. 1976;
251:3457-62.

REDA, Fifi M. (2015). Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L- Glutaminase and
its anticancer efficiency. *Brazilian Journal Of Microbiology*, [s.l.], v. 46, n. 4, p.957-
968, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1517-838246420130847

REMYA, M. R. VIJAYAKUMAR,(2008). “Isolation and characterization of marine
antagonistic actinomycetes from west coast of India,” *Medicine and Biology*, vol. 15,
no. 1, pp. 13–19, 2008.

ROBERTS J., HOLCENBERG J.S., DOLOWY W.C.,(1972). Isolation, crystallization
and properties of *Achromobacteraceae* glutaminase– asparaginase with antitumor
activity. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 84–90.

SABU, A., K.M. NAMPOOTHIRI AND A. PONDEY, (2005). L-Glutaminase as a
therapeutic enzyme of microbial origin. In: Baredo, J.L., (Editor), *Methods in*

Biotechnology: Microbial Enzymes and Biotransformations. Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp: 75-90

SAHU M. K., SIVAKUMAR K., POORANI E., THANGARADJOU T., AND KANNAN L. (2007), Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *J. Environ. Biol.* 28, 465 – 474

SANGHAMITRA, D.; GHOSH, S.; SAPTARSHI, P.(2014). LAsparaginase and Lglutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical Properties. **Applied Biochemistry And Microbiology**, West Bengal, v. 51, n. 4, p.425-431, nov. 2014.

SHIRLING E. B., GOTTLIEB D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.10-14, 25 set. 2015. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01014

SINGH P., BANIK R.M. (2013) Biochemical characterization and antitumor study of L-glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;171:522–531.

SINHA, S., NIGAM, V. K. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF L-GLUTAMINASE BY *BACILLUS* SP. (2016) **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.120-126, 1 abr. 2016. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.7(4).1620-26.

TADDEI A., RODRÍGUEZ M.J., MÁRQUEZ-VILCHEZ E., CASTELLI C.(2006). Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.222-231, jul. 2006. DOI: 10.1016/j.micres.2005.08.004.

TAREKE E, RYDBERG P, KARLSSON P, ERIKSSON S, TÖRNQVIST M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agr Food Chem* 2002;50:4998-5006.

TRUJILLO, M.(2008). Actinobacteria. **Encyclopedia Of Life Sciences**, [s.l.], p.1-16, 15 jul. 2008. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020366.

UNISSA R., SUDHAKAR M., REDDY A. S. K., SRAVANTHI K. N. (2014). A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.4617-4634. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.5(11).4617-34.

VELLARD, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.444-450, ago. 2003. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0958-1669(03)00092-2.

WILLIAMS, S. T. AND CROSS, T. (1971). Isolation, Purification, Cultivation and Preservation of Actinomycetes. *Methods in Microbiology* 4, 295-334.

YU, J., ZHANG, L., LIU, Q., QI, X., JI, Y., KIM, B. S. (2015). ISOLATION AND characterization of actinobacteria from Yalujiang coastal wetland, North China. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5, 555–560. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.04.007

ZUO, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. (2014). Recent research progress on microbial l-asparaginases. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 99, n. 3, p.1069-1079, 11 dez. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-014-6271-9.

4 ARTIGO 2

Planejamento fatorial 2³ na produção de L-Asparaginase de actinobactéria da rizosfera de *Poincianella pyramidalis* do Bioma Caatinga

Artigo a ser submetido a revista *Biotechnology Journal International*

.

Planejamento fatorial 2³ na produção de L-Asparaginase de actinobactéria da rizosfera de *Poincianella pyramidalis* do Bioma Caatinga

Wellma de O. Silva¹, Wellen L. de S. Gomes¹, Vinícius E. S. de Oliveira¹, Iasmim L. da Silva, Erick J. V. de Melo¹, Leonor A. de O. Silva¹, Luana C. B. B. Coelho²

¹ Departamento de Antibióticos Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil ²Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, PE, Brazil. *Corresponding Author: Wellma de Oliveira (wellmaoliveira@gmail.com)

RESUMO

Com o intuito de otimizar a produção do complexo de L-asparaginase, excretado por actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis*, foi realizado um planejamento fatorial completo (2³), com duplicata, para estimativa do erro experimental. O planejamento teve como variáveis pH (4,2 e 7,8), temperatura (33 °C, 44 °C) e concentração da L-asparagina (0,5% e 1,5%). Nessa etapa, a actinobactéria foi semeada em meio líquido ISP-2 a 37 °C por 48 horas e posteriormente um alíquota, correspondendo a 10% foi inoculada no meio M-9, meio padrão para indução da produção da L-asparaginase, nas diferentes condições já citadas. Posteriormente, foram dosadas as atividades enzimáticas e proteicas dos complexos enzimáticos. O melhor resultado obtido na dosagem enzimática foi no ensaio com concentração de 1,5%, pH 4,2 a 44 °C. Em relação à dosagem proteica foi detectado 0,432 µg/mL, nas condições com concentração de 1,5%, pH 7,8 a 33 °C. A análise estatística das variáveis e a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos foram avaliadas através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA). Os resultados mostraram que todos os fatores testados no presente estudo são significantes e que existe relevante interação entre o pH e concentração de L-asparagina. A análise deste planejamento sugere a realização de novos ensaios para que haja um aperfeiçoamento da otimização enzimática.

Palavras chaves: Otimização enzimática, asparagina, micro-organismos.

1 INTRODUÇÃO

Países pertencentes ao continente sul-americano são conhecidos por sua notável biodiversidade e intrincada história evolutiva. Turchetto-zolet et al. (2013) [1]. As formações secas abertas, muitas vezes coletivamente referidos como os biomas diagonais secos, se

estendem em uma direção Noroeste-Sudeste da Caatinga semi-árida do nordeste do Brasil para o Chaco seco na Argentina, Bolívia e Paraguai, em todo o Cerrado central do Brasil (Werneck et al., 2015) [2]. Ocupando uma área de aproximadamente 800.000km², a Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro. Lima e Rodal (2010) [3] afirmam que as condições semiáridas influenciam fortemente o aparecimento de estratégias ecológicas, possibilitando maior eficiência fisiológica de tolerar a sazonalidade da disponibilidade de água.

A *Poincianella pyramidalis*, antes chamada de *Caesalpinia pyramidalis* Tul, é uma planta endêmica da região Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como "catingueira." Partes dessa planta, especialmente a casca interna ou folhas, são tradicionalmente usadas por seus efeitos anti-inflamatório, diurético, dispepsia, digestivo, antipirética, e efeitos expectorantes. (Queiroz, 2009; Santos et al. 2012). [4,5] A rizosfera do solo da Caatinga é caracterizada por uma comunidade microbiana selecionada (Deangelis et al., 2008) [6]. Actinobactérias fazem parte dessa comunidade e colaboram no desenvolvimento de plantas. Com isto, a presença desses micro-organismos na rizosfera é de extrema importância. No entanto, existem poucos estudos relacionados à rizosfera da *P. pyramidalis*.

As contribuições de actinobactérias do solo à biotecnologia são atribuídas, segundo Miao e Davies (2010) [7] envolvem a produção de antibióticos, participação em processos de ciclagem de matéria orgânica, biorremediação, síntese de enzimas de aplicação industrial e farmacêutica além da participação da conversão e produção de bicompostíveis. Através do uso da tecnologia enzimática de microbiana, pode-se obter uma gama de enzimas, com potencial biotecnológico.

A L-asparaginase (L-asparagina aminohidrolase E.C.3.5.1.1) faz parte do grupo de enzimas produzidas pelas actinobactérias que são estudadas e utilizadas amplamente na indústria farmacêutica, por conta de seu potencial efeito antitumoral e também na indústria alimentícia, devido à redução da acrilamida (Gesto et al, 2013) [8]. Sua ação clínica é atribuída à redução de L-asparagina, uma vez que as células tumorais são incapazes de sintetizar esse

aminoácido, seletivamente mortas pela privação da L-asparagina (Siddalingeshwara;Lingappa, 2011) [9].

Existem muitos relatos na literatura estudando a produção de L-asparaginase sob diferentes condições fermentativas e por diferentes micro-organismos. Com o objetivo de otimizar a produção podem ser utilizados métodos estatísticos, tais como, o planejamento experimental de Plackett-Burman, algoritmo genético e redes neurais artificiais baseados no delineamento de modelos, delineamento composto central rotacional, além da metodologia da superfície de resposta (Zuo et al., 2014) [10].

Os modelos estatísticos experimentais têm sido utilizados durante várias décadas e podem ser adotados em várias fases de uma estratégia de otimização enzimática, tanto para experiências de seleção ou para encontrar as condições ótimas para a finalidade que se deseja direcionar. Os resultados analisados por um experimento estatisticamente planejado estão sendo bem mais reconhecidos do que aqueles realizados pelo tradicional, onde cada variável é analisada separadamente em um único período de tempo (Shehata; Aty, 2014) [11]. Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir com o estudo de actinobactéria com potencial capacidade de produção de L-asparaginase, através de um planejamento experimental composto 2^3 com ponto central.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Condições do micro-organismo e cultura

O micro-organismo utilizado foi uma actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis*, durante o período de inverno do Bioma da Caatinga; cedidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). Durante as experimentações a estirpe foi mantida em Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-2) a 4 ° C .

2.2 Preparação do inóculo

Para o pré-inóculo, blocos circulares de 9 mm de diâmetro, foram retirados com auxílio de um furador metálico, da área central das colônias da actinobactéria, (crescidos em placa com meio ISP-2 a 37 °C por cerca de 5 dias) e transferido para erlenmeyer (150mL), contendo 50mL do meio ISP-2 líquido e mantidos sob agitação (120 rpm) a 37 °C por 48 horas. Posteriormente foi realizada a inoculação de 10% do pré-inóculo, nas diferentes condições fermentativas do planejamento fatorial.

2.3 Produção e otimização da L-Asparaginase extracelular através do planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi elaborado para melhorar o rendimento da produção do complexo enzimático L-asparaginase. Inicialmente, foi realizado um planejamento composto 2³, em duplicata, para estimativa do erro experimental. O método estatístico visou avaliar o efeito das variáveis fermentativas, tais como: valores de pH, temperatura e concentração de asparagina (tabela 1). Estas variáveis foram estudadas em dois níveis, sendo realizado um planejamento de 16 ensaios. Os valores que foram determinados nos níveis, para cada variável, assim como também as condições fermentativas, teve como fundamento o trabalho de Silva, Silva e Silva [12], onde o mesmo isolado de actinobactéria foi inoculado em meio líquido e submetido à agitação de 180 rpm e foi observado um perfil cinético com pico de produção em 48 h de cultivo, pH 6,0 a 37°C.

Tabela 1 - Condições e níveis dos ensaios para o planejamento fatorial 2³

Fatores	-	Níveis	+
1- Valores de Ph	4,2		7,8
2- Temperatura (°C)	33		44
3- L-asparagina (%)	0,5		1,5

A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de L-asparaginase foi avaliada através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA), enquanto que o programa *Design Expert*, versão 5.0, foi empregado tanto para realizar a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos, assim como também para realizar os procedimentos de otimização gráfica e/ou numérica. Nesse contexto, o teste *F* foi empregado segundo sugerido por Ladeira et al. [13].

2.4 Ensaio Quantitativo da L-asparaginase extracelular e ensaio protéico.

A metodologia de dosagem quantitativa do complexo enzimático, conforme descrita por Imada et al. (1973) [14], utilizou o reativo de Nessler. A atividade da L-asparaginase foi determinada pela reação de Nessler, medida pela produção direta do sulfato de amônio. A reação foi iniciada pela adição de 0,16 ml do sobrenadante (complexo enzimático) em 0,16 ml de L-asparagina a 0,04 M dissolvida em tampão fosfato de sódio pH 7,0 e incubadas a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 0,15 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1,5 M. A mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 2 a 3 minutos e uma alíquota de 0,16 mL do sobrenadante foi retirada, diluída com 0,5 mL de água destilada e adicionados 0,25 mL do reativo de Nessler. Esta solução foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorbância em 450 nm [15]. A amostra de branco, contendo apenas substrato e reativo de nessler, foi incluído nos ensaios. Também foi construída uma curva padrão de sulfato de amônio. Uma unidade internacional de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1mol de amoníaco por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração de proteína das diferentes amostras foi analisada pelo método de Bradford [16].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a actinobactéria provinda da rizosfera da caatingueira, utilizando de um planejamento experimental 2^3 , o rendimento enzimático pode ser observado na tabela 2. O

maior rendimento da enzima atingiu o valor de 1,210 U/ml, obtido no ensaio 7, com o pH de 4,2, temperatura à 44 °C e a concentração do substrato indutor 1,5%. A concentração proteica, apresentou variações que foram de 0,155 a 432 U/mg .

Tabela 2 - Resultados obtidos em cada ensaio do planejamento fatorial 2³

N° Ensaio	pH	Temperatura °C	% Asparagina	Desvio ±	U/ml	U/mg
1	4,2	33	0,5	0,048	0,086	0,155
2	7,8	33	0,5	0,010	0,022	0,288
3	4,2	44	0,5	0,005	0,118	0,194
4	7,8	44	0,5	0,010	0,170	0,361
5	4,2	33	1,5	0,070	0,465	0,148
6	7,8	33	1,5	0,049	0,129	0,161
7	4,2	44	1,5	0,045	1,210	0,432
8	7,8	44	1,5	0,002	0,01	0,140

Nos trabalhos relacionados com a produção da enzima, as condições fermentativas ótimas variam nitidamente, dependendo o resultado, não só do micro-organismo, como também do método realizado para produção. A produção de *Streptomyces albidoflavus* L-asparaginase, em fermentação submersa, foi otimizado e o nível máximo de produção da enzima foi encontrada a pH 7,5 e 35 °C em meio de cultura, suplementado com maltose e extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (Narayana et al. 2008) [17]. Amena et al [18], obteve na produção de L-asparaginase extracelular sob condições de fermentação submersa utilizando extrato de bolo de amendoim, o pH ótimo de 8,5 e temperatura de 40 °C. Já no trabalho de Agarwal et al. [19], realizado por meio de um DCCR, foi utilizado para otimizar os parâmetros químicos e físicos, a partir de um novo isolado de *S. marcescens* SK-07 em um tipo de biorreator, e a produção máxima de L-asparaginase foi obtida a um pH inicial de 6,5.

Muitos relatos na literatura examinam a produção de L-asparaginase sob diversas condições fermentativas por diferentes micro-organismos (Zuo et al., 2014) [10]. A exemplo de More (2013) [20], com *Mucor hiemalis* produtor de L-asparaginase usando o Czapek como meio; (Sanghamitra; ghosh; saptarshi 2014) [21], que realizou fermentações com diferentes resíduos agrícolas (casca de arroz, farelo de trigo, farelo de milho, casca de lentilha amarela) como substratos para produção da L-asparaginase, por meio de *Aspergillus fumigatus*. Basha et al. 2009 [22], realizou a produção de extracelular L-asparaginase de actinobactérias marinhas realizada em condições de fermentação submersa e em estado sólido.

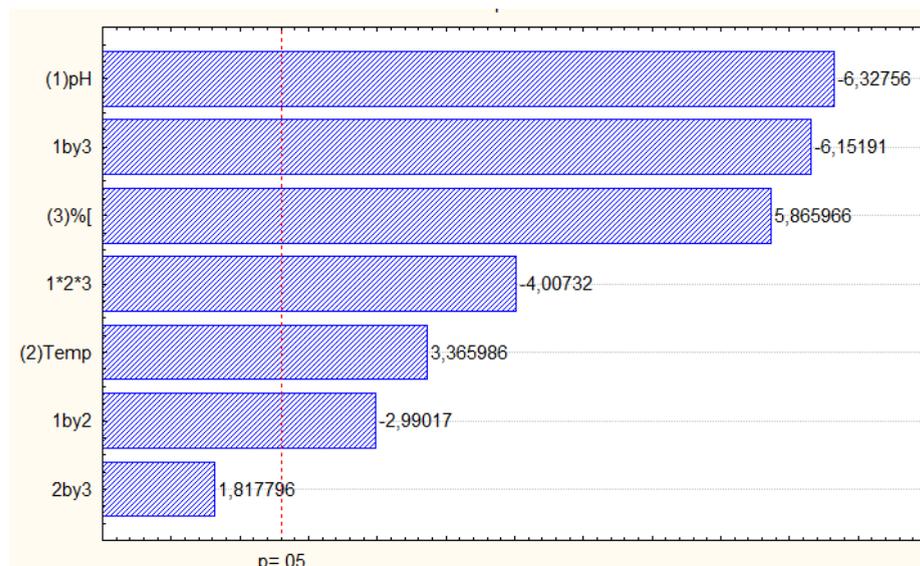
A otimização da produção enzimática é uma etapa de extrema importância na obtenção da enzima, pois, sabe-se que a L-asparaginase, dependendo da forma de produção, pode apresentar variações em suas propriedades bioquímicas. Além disso, experimentos projetados estatisticamente passaram a ser usados como uma poderosa ferramenta para melhorar a eficiência da experimentação. Através de um processo dinâmico, eles nos permitem adquirir conhecimento sobre o sistema em estudo com um número mínimo de experimentos (Altekar et al., 2006) [23].

É frequente uso de métodos estatísticos no processo de produção e otimização da enzima L-asparaginase, a exemplos temos a produção de L-asparaginase de *Cladosporium sp.* em fermentação em estado sólido (SSF) com resíduos agroindustriais, onde foram estudados modelos de rotação combinada central (CCRDs) com o aparato da metodologia de superfície de resposta [24]; Venil et al [25] combinou o design experimental de Plackett-Burman com um planejamento fatorial e o método de superfície de resposta, otimizar o meio para a produção de L-asparaginase por *Serratia marcescens SB08*.

A partir dos resultados obtidos com as dosagens enzimáticas, efeitos dos três fatores (pH, temperatura e concentração do substrato indutor) também foram analisados no programa Statistica 6.0, por meio de um planejamento experimental 2³. Podemos inferir que a maior

produção do complexo enzimático foi obtida quando o pH foi diminuído e temperatura e concentração foram aumentadas (Figura 1).

Figura 1 — Gráfico de Pareto para significância dos fatores.



Fonte: Autor. 1 – pH; 2 – Temperatura; 3 – Concentração de L-asparagina; 1 e 2 – Interação entre pH e temperatura; 1 e 3 – Interação entre pH e concentração L-asparagina; 2 e 3 – Interação entre temperatura e concentração.

Desta maneira, foi possível propor um modelo para produção enzimática, em sua forma reduzida, com os coeficientes que apresentaram significância, gerados pelo programa estatístico na tabela 3.

Tabela 3 - Estimativa dos efeitos, planejamento fatorial 2^3 .

	Efeitos	Std.Err	T(8)	P	+95%	-95%	Coeficient e	Std.Err	+95%	-95%
Principal	0,276	0,031	9,03	0,00	0,206	0,347	0,276	0,031	0,206	0,347
interação										
(1)Ph	-0,387	0,061	-6,32	0,00	-0,528	-0,246	-0,194	0,031	-0,264	-0,123
(2)Temperatura	0,206	0,061	3,36	0,01	0,065	0,347	0,103	0,031	0,032	0,174
(3) % L- asparagina	0,359	0,061	5,86	0,00	0,218	0,500	0,180	0,031	0,109	0,250
1 e 2	-0,183	0,061	-2,99	0,01	-0,324	-0,042	-0,092	0,031	-0,162	-0,021
1 e 3	-0,377	0,061	-6,15	0,00	-0,518	-0,235	-0,188	0,031	-0,259	-0,118
2 e 3	0,111	0,061	1,81	0,10	-0,030	0,252	0,056	0,031	-0,015	0,126
1, 2 e 3	-0,245	0,061	-4,00	0,00	-0,386	-0,104	-0,123	0,031	-0,193	-0,052

Levando em consideração que todos os fatores e interações foram significativos, excetuando-se a interação temperatura e concentração.

$$Y = 0,276 - 0,194X_1 + 0,103X_2 + 0,179X_3 - 0,092X_1X_2 - 0,188X_1X_3 - 1,123X_1X_2X_3$$

Equação 1

Onde, X1, X2 e X3 correspondem ao pH, temperatura e concentração da L-asparagina respectivamente; X1X2 - interação entre os fatores pH e temperatura; X1X3 - interação entre pH e concentração.

Valores de regressão (2,397), resíduo (0,360), falta de ajuste (0,240), erro puro (0,119); foram obtidos através da análise da variância (ANOVA) para todos os ensaios. O valor de F, proveniente da razão entre a média quadrática de regressão residual é de 4,98, representando 1,8 menor que o valor tabelado (F=), quando na verdade, precisa ser cerca de 10 vezes maior o valor. Além disto, a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e de erro não pode ser calculada, demonstrando que o modelo pode estar precisando tão somente de ajuste. Portanto, na tentativa de viabilizar o modelo linear, foram realizados os experimentos e potencializar a otimização, foi realizado o planejamento com 4 pontos centrais, em condições que representavam uma média dos níveis do planejamento 2³ (Tabela 4).

Tabela 4 - Condições utilizadas para ponto central para o planejamento fatorial 2³

Condições - Ponto central	
pH	6,0
Temperatura °C	38,5
(g/mL)% L-asparaginase	1,0

Notou-se, a partir dos resultados da dosagem enzimática, uma melhora de mais de 100% na produção da enzima (Tabela 5).

Tabela 5 - Valor produzido por U/ml com as condições de ponto central.

Ensaio	U/ml	Desvio \pm
1	2,292	0,03
2	2,347	0,01
3	2,336	0,04
4	2,352	0,02

Mas, por outro lado, entretanto, também foi constatado que nosso modelo experimental não atendia aos requisitos de um modelo linear. Os valores obtidos da razão da média quadrática de regressão residual e da razão entre a média quadrática da falta de ajuste e de erro, também se mostraram inadequados, quando submetidos à comparação com o valor de F padrão. O potencial para produção pode ser melhorado através de outros métodos analíticos como o MRS (Modelo de Superfície de Resposta), visto que eles são usados quando há indicação prévia de comportamento não-linear ou quando uma experiência fatorial demonstra a presença de comportamento não-linear [23].

4 CONCLUSÃO

O estudo realizado explorou o potencial biotecnológico de uma actinobactéria, isolada de do Bioma da Caatinga, quanto à produção da enzima antitumoral, L-asparaginase. Foi constatado que o isolado possui capacidade para produzir a enzima L-asparaginase e desta forma é útil para ser utilizado como possível fonte de produção de compostos farmacêuticos. O planejamento fatorial completo 2^3 , pôde melhorar o rendimento enzimático, mas a produção extracelular da enzima l-asparagina, por actinobactéria da rizosfera da *Poincianella pyramidalis* não atendeu aos requisitos de um modelo linear.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (LCBBC), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

INTERESSES COMPETITIVOS

Os autores declararam que não existem interesses conflitantes.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Este trabalho foi realizado com a colaboração de todos os autores. Os autores WOS, LSOAD WLSG, VESO, EJVM, LAOS, ILS, realizaram as análises estatísticas, escreveram os protocolos experimentais e realizaram os procedimentos experimentais. Os autores WOS, LSOAD,LCBBC, escreveram os primeiros esboços do manuscrito, projetaram, supervisionaram e gerenciaram o estudo realizado. Todos os autores leram e aprovaram o Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

REFERÊNCIAS

1. Turchetto-zolet, A.C.; Pinheiro F.; Salgueiro F.; Palma-silva, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Ecol.* 2013; **22**:1193-1213.
2. Werneck, F., Leite R., Geurgas S., Rodrigues M. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicoduridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. *Bmc Evolutionary Biology*. Brasil, p. 01-24. maio 2015.

3. Lima, A. L. A.; Rodal, M. J. N. Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, n. 11, p. 1363- 1373, 2010.
4. Queiroz, L. P. Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Ba: UEFS, 2009. 467 p.
5. Santos J. S., Mendes S. S., Conde D. C., Delmondez R. C., Mann R. S., Thomazzi S. M. Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. **Scientia plena**. Sergipe, p. 1-8. 2012.
6. Deangelis, K.M.; Brodie E.L., Desantis T.Z.; Andersen G.L.; Lindow S.E; Firestone M.K.. (2008). "Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots." **The ISME Journal** 3(2): 168-178.
7. Miao, Vivian; Davies, Julian. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 98, n. 2, p.143-150, 14 abr. 2010. Springer Nature. DOI: 10.1007/s10482-010-9440-6.
8. Gesto, D. S.; Nuno M. F. S. A.; Cerqueira, Pedro A. F.; Maria J. Ramos. Unraveling the Enigmatic Mechanism of L-Asparaginase II with QM/ QM Calculations. **Journal Of The American Chemical Society**. Porto, p. 7146-7158. abr. 2013.
9. Siddalingeshwara K.G.; Lingappa K. Production and Characterization of L-Asparaginase: A Tumour inhibitor. **International Journal of PharmTech Research** CODEN (USA): 3 (1), pp 314-319, 2011.
10. Zuo, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. Recent research progress on microbial l-asparaginases. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 99, n. 3, p.1069-1079, 11 dez. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-014-6271-9.
11. Shehata, A. N.; Aty, A. A. Optimization of Process Parameters by Statistical Experimental Designs for the Production of Naringinase Enzyme by Marine Fungi. **International Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 2014, p.1-10, 2014. Hindawi Publishing Corporation. DOI: 10.1155/2014/273523.
12. Silva, I. L. da; Silva, W. OI.; Silva, L. A. O. L-ASPARAGINASES DE BACTÉRIAS E ACTINOBACTÉRIAS, ISOLADAS DA CAESALPINIA PYRAMIDALIS TUL. **Sodebras**, Recife, v. 110, n. 1, p.41-46, fev. 2015.

13. Ladeira, S.A.; Andrade, M.V.V.; Delatorre, A. B.; Perez, V.H.; Martins, M.L.L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, 33, 324-328, 2010.
14. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M (1973) Asparaginase and Glutaminase activities of microorganisms. *J Gen Microbiol* 76:85–99
15. Tizzot M. R. P. A., Fröhner C. R. A., Gonçalves C. G. D., Hill J. A. G., Lima P. G.C., Silva C. J., Borsari A. P., Funayama S. Asparaginase [EC 3.5.1.1] de Tuiuti: Ciência e Cultura, Curitiba, n. , p.53-72, 2005
16. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
17. Narayana, K. J. P., K. G. Kumar, M. Vijayalakshmi. "L-Asparaginase Production by *Streptomyces Albidoflavus*." *Indian Journal of Microbiology* 48.3 (2008): 331–336. *PMC*. Web. 16 Feb. 2017.
18. Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., Lingappa, K. (2010) Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz J Microbiol* **41**, 173–178.
19. Agarwal, A.; Kumar, S.; Veeranki, V.d.. Effect of chemical and physical parameters on the production of l-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. **Letters In Applied Microbiology**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.307-313, 15 fev. 2011. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2011.03006.x.
20. More, S. S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, [s.l.], v. 02, n. 02, p.1-9, 2013. OMICS Publishing Group. DOI:10.4172/2324-9099.1000108.
21. Sanghamitra, D.; Ghosh, S.; Saptarshi, P. LAsparaginase and Lglutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical

- Properties1. **Applied Biochemistry and Microbiology**, West Bengal, v. 51, n. 4, p.425-431, nov. 2014.
22. Basha N. S., Rekha R., Komala M, Ruby S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, Benin City, p. 353- 360. ago. 2009
23. Altekar M. , Homon C. A., Kashem M.A, Mason S. W. , Nelson R. M., Patnaude L.A., YINGLING J., Taylor P.B.. Assay Optimization: A Statistical Design of Experiments Approach. **Journal Of The Association For Laboratory Automation**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.33-41, fev. 2006. SAGE Publications. DOI: 10.1016/j.jala.2005.11.001.
24. Kumar N.S.M., Ramasamy R, Manonmani H.K. (2013) Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind Crop Prod* 43:150–158
25. Venil C. K. , Nanthakumar K., Karthikeyan K. Lakshmanaperumalsamy P. Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: Optimization by response surface methodology. **Iranian Journal of Biotechnology**. Tamil Nadu, p. 10-30. jan. 2009.

5 ARTIGO 3

Otimização e Caracterização enzimática parcial da L-glutaminase excretada por actinobactéria isolada da *Poincianella pyramidalis* do Bioma Caatinga

Artigo a ser submetido a Revista Letters in Applied Microbiology

Otimização e Caracterização enzimática parcial da L-glutaminase liberada por
Actinobactéria sp. isolada da *Poincianella pyramidalis* do Bioma Caatinga

Wellma de Oliveira Silva^{1*}, Wellen Laís de Souza Gomes¹, Vinícius Eduardo Souza de
Oliveira¹, Erick Jonne Vieira de Melo¹, Leonor Alves de Oliveira Silva¹, Luana
Cassandra Breitenbach Barroso Coelho²

¹ Departamento de Antibióticos Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife, PE, Brazil.

*Corresponding Author: Wellma de Oliveira (wellmaoliveira@gmail.com)

Significância e o impacto do estudo: Os resultados experimentais obtidos neste trabalho, trouxeram dados sobre modelos de produção extracelular, caracterização e produção em larga escala da enzima L-Glutaminase, utilizando como fonte microbiana, uma actinobactéria isolada da rizosfera da caatingueira, planta somente encontrada na região nordeste do Brasil. Por ser tratar de uma enzima com potencial atividade antitumoral, estudos acerca de suas propriedades e de suas origens microbianas, são de grande relevância biotecnológica.

RESUMO

A propriedade antitumoral descoberta na L-glutaminase é uma das características que tem promovido a busca de novas fontes microbianas para produção da referida enzima. Neste estudo foi utilizado um isolado de actinobactéria proveniente da rizosfera de *Poincianella pyramidalis* do Bioma Caatinga, com capacidade de excretar a enzima L-glutaminase. O objetivo do estudo foi otimizar a produção e caracterizar parcialmente a enzima L-glutaminase. Na otimização a melhor atividade foi constatada no ensaio com concentração de 1,5%, pH 7,0 a 44 °C. A análise da variância resultou na determinação de R² de 99,84%. O estudo dos principais efeitos e suas interações mostrou que todos os fatores testados foram significantes. Na caracterização enzimática foram obtidos o pH ótimo 8,0 e a temperatura ótima 37°C. L-glutamina e o ácido glutâmico foram tidos como excelentes substratos. A atividade enzimática foi aumentada pela adição de íons, tais como MnCl₂ e MgCl₂, mas foi diminuída quando outros, como ZnSO₄ foram usados, demonstrando que a atividade da enzima é suscetível a alterações diante da adição de íons metálicos. O estudo relata a eficiência do planejamento experimental completo (2³) para identificar fatores que influenciam no processo de otimização da produção da enzima L-glutaminase, a qual vem sendo amplamente usada na indústria biotecnológica.

Palavras chaves: Enzimas, micro-organismos do solo, Statistic 7.0, glutamina, otimização enzimática.

ABSTRACT

The antitumor property discovered in L-glutaminase is one of the characteristics that has promoted the search of new microbial sources for the production of said enzyme. In this study, an actinobacterium isolate from the rhizosphere of *Poincianella pyramidalis* of the Caatinga Biome was used, with the ability to excrete the enzyme L-glutaminase. The objective of the study was to optimize the production and partially characterize the enzyme L-glutaminase. In optimization the best activity was observed in the assay with 1.5% concentration, pH 7.0 at 44 ° C. The analysis of the variance resulted in the determination of R² of 99.84%. The study of the main effects and their interactions showed that all factors tested were significant. In the enzymatic characterization, the optimum pH 8.0 and the optimum temperature were obtained 37 ° C. L-glutamine and glutamic acid were considered as excellent substrates. The enzymatic activity was increased by the addition of ions, such as MnCl₂ and MgCl₂, but was decreased when others, such as ZnSO₄, were used, demonstrating that the activity of the enzyme is susceptible to changes due to the addition of metal ions. The study reports the efficiency of the complete experimental design (2³) to identify factors that influence the optimization process of L-glutaminase enzyme production, which has been widely used in the biotechnology industry.

Keywords: Enzymes, soil microorganisms, Statistic 7.0, glutamine, enzymatic optimization.

1 Introdução

A L-glutaminase (EC.3.5.1.2) é classificada como uma amidohidrolase que catalisa a desaminação hidrolítica de L-glutamina, resultando na produção de ácido L-glutâmico e amônia (Nagwa; Shaima; Mario, 2013). Esta enzima atua como um excelente agente antitumoral (Singh et al., 2013). A propriedade antitumoral da enzima da l-glutaminase, deve-se ao fato que alguns tipos de células cancerígenas necessitam de uma alta quantidade da glutamina (Lazarus;Panasci, 1986; Reda, 2015). Dessa forma, a L-glutaminase pode ser usada para provocar a desnutrição de células tumorais, impedindo o avanço do câncer (Reda, 2015). A L-glutaminase é usada especialmente para o tratamento da leucemia linfocítica aguda (Robert et al, 2001; Kyoko et al., 2004; Reda, 2015).

De acordo com Unissa et al (2014), existem algumas propriedades desejáveis da enzima L-glutaminase, para uso terapêutico, entre elas estão: elevada atividade enzimática a pH fisiológico, isto é, entre pH 6,5 e 8,5; baixo K_m entre 10^{-6} e 10^{-4} M ; restrita especificidade para o substrato, irreversibilidade efetiva da reação enzimática em condições fisiológicas e terem origem em organismo não patogênicos (com pouca ou nenhuma toxina).

A descoberta da propriedade antitumoral da L-glutaminase levou os pesquisadores explorarem a enzima em diversas áreas da biotecnologia. A enzima também vem sendo usada como intensificador de sabor como o molho de soja e (Sabu et al., 2000; Iyer and Singhal, 2008; Singh et al., 2013), na mitigação da acrilamida de

alimentos com óleo e biossensores para monitorar os níveis de glutamina em células de mamíferos e hibridoma (Kattimani, L. et al. 2009).

A atividade da L-glutaminase pode ser extraída de diversas fontes. A enzima é amplamente encontrada em plantas, tecidos animais e micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Fontes microbianas são mais vantajosas no que diz respeito a capacidade na produção enzimática e a facilidade de manipular condições de crescimento, para obtenção de enzimas com as características desejadas (Sarada, 2013).

O solo é uma grande fonte de microbiana pois entre todos os habitats existentes, abriga a maior parte dos micro-organismos. Entre estes micro-organismos estão as actinobactérias, conhecidas por produzirem uma vasta gama de metabolitos secundários (Baltz, 2005; Manivasagan et al., 2014). Ademais, as actinobactérias atualmente vem sendo selecionadas para estudos em detrimento a outros micro-organismos devido à sua produção de enzimas extracelulares (Sunil Dutt et al., 2014).

O processo de produção enzimática, é regulado por uma série de fatores físicos-químicos e nutricionais. Tais fatores, aumentam não somente a quantidade produzida da enzima, como também melhora a qualidade do rendimento, para uma provável aplicação específica (Reda, 2015). Neste contexto, a forma de execução da fermentação sob condições otimizadas, pH, temperatura, período de fermentação, o tamanho do inóculo, o tempo de inoculo, velocidade de agitação são parâmetros cruciais a serem avaliados, já que cada um deles, provoca diversos efeitos e realizam diferentes interações durante o processo (Singh et al., 2013). Para o estudo desses fatores,

pesquisadores têm recorrido a métodos estatísticos, tal como o planeamento fatorial experimental.

Em um estudo com poucos fatores, o planeamento fatorial completo é o ideal para avaliar a interação e influência das variáveis. Visando melhorar o rendimento da produção do complexo enzimático L- Glutaminase, foi realizado um planeamento composto 2^3 , em duplicata, para estimativa do erro experimental; onde o 'n' representa o número de fatores. Cada fator tem um nível menor e um nível maior, expressos como +1 e -1, respectivamente (Vander Heyden, Y., Perrin, C., Massart, D. 2000; Kennedy, M.;Krouse, D. 1999; Mosbah et al., 2015). Avaliou-se neste trabalho, a influência do valor do pH, temperatura e concentração do substrato indutor, com o intuito de melhorar o rendimento enzimático. Com a enzima obtida da otimização, foi realizada sua caracterização e produção em larga escala.

2 Materiais e Métodos

2.1 Condições do micro-organismo e cultura

O micro-organismo utilizado foi uma actinobactéria isolada da rizosfera da *Poincianella pyramidalis*, durante o período de inverno do Bioma da Caatinga; cedidas pelo Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). Durante as experimentações a estirpe foi mantida em Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-2) a 4 ° C .

2.2 Avaliação para produção qualitativa da enzima L-glutaminase

A actinobactéria mostrou capacidade de produzir L-glutaminase quando semeada usando Minimal agar glutamina (MGA) médio, descrito por Balagurunathan et al (2013) composto por: 0,5(g / L) de KCl; 0,5(g / L) MgSO₄; 1.0(g / L) KH₂PO₄; 0.1 (g / L) FeSO₄; 0,1(g / L) ZnSO₄; 25 (g / L) NaCl; 10(g / L) L-Glutamina em que L-glutamina age como fonte de carbono e nitrogênio. O meio MGA foi suplementado com 0,012 (g / L) de vermelho de fenol como indicador de pH. A atividade de L-glutaminase foi identificada pela formação de uma zona avermelhada em torno da colônia devido à acumulação de amônia que resultou em mudança de cor do indicador de pH amarelo para cor de rosa devido ao aumento do valor de pH (Nagwa; Shaimaa; Mario, 2013).

2.3 Produção e otimização da L-Glutaminase extracelular através do planejamento fatorial

2.3.1 Preparação do inóculo

Para o pré-inóculo, blocos circulares com 9 mm de diâmetro semelhantes foram retirados, com auxílio de um furador metálico, obtidos da área central das colônias da actinobactéria, (crescidos em placa com meio ISP-2 a 37 °C por cerca de 5 dias) e inoculados em Erlenmeyer (150mL), contendo 50mL do meio ISP-2 líquido e mantidos sob agitação (120 rpm) a 37 °C por 48 horas.

2.3.2 Otimização das condições de cultivo para a produção de L-glutaminase

O método estatístico visou avaliar o efeito das variáveis fermentativas independentes, tais como: pH, temperatura e concentração de L-glutamina e da resposta esperada da produção enzimática pela actinobactéria como variável dependente (tabela 1 e 2). Estas variáveis foram estudadas em dois níveis, cada planejamento contou com 16 ensaios.

Tabela 1 - Condições e níveis dos ensaios para o 1º planejamento fatorial 2³ para produção da enzima L-glutaminase.

Variáveis Independentes	Variável (X)	Níveis	
		-	+
Valores de Ph	1	4,2	7,8
Temperatura (°C)	2	33	44
L-asparagina (%)	3	0,5	1,5

Tabela 2 - Condições e níveis dos ensaios para o 2º planejamento fatorial 2³ para produção da enzima L-glutaminase.

Variáveis Independentes	Variável (X)	Níveis	
		-	+
Valores de pH	1	7,0	9,0
Temperatura (°C)	2	33	44
L-asparagina (%)	3	0,5	1,5

Os resultados esperados em relação a produção enzimática (Y₁) foi modelados pelas regressões múltiplas para ajustar a equação de primeira ordem:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3.$$

Onde Y representa a resposta (variável dependente), B_0 representa a constante coeficiente de regressão, b_1 é os coeficientes de regressão linear, b_{12} e b_{123} são os coeficientes de regressão das interações de dois e três fatores, respectivamente, e X_1 , X_2 , e X_3 são os fatores (variáveis independentes). O modelo ajustado é utilizada para estudar a sensibilidade relativa da resposta às variáveis e procurar condições ideais para experimentação (Mosbah et al., 2015).

A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de L- Glutaminase foi realizada através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA), enquanto que o programa *Design Expert*, versão 5.0, foi empregado tanto para realizar a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos, assim como também para realizar os procedimentos de otimização gráfica e/ou numérica. Nesse contexto, o teste F foi empregado segundo sugerido por Dubey, Singh e Banerjee (2011).

2.4 Ensaio Quantitativo da L-glutaminase extracelular e concentração protéica

A metodologia de dosagem quantitativa do referido complexo enzimático,foi realizada conforme descrita por Imada et al. (1973), e a produção de proteína conforme descrito por Bradford (1976). A atividade da l-glutaminase é determinada pela reação de nessler, medida pela produção direta do sulfato de amônio. A reação foi iniciada pela adição de 250µl do sobrenadante (complexo enzimático) em 500µL de L- glutamina a 0,04 M dissolvida em, 250 µL tampão fosfato de sódio pH 7,0 e incubadas a 37 °C por

30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 1,5 M. A mistura foi centrifugada a 10000 rpm por 2 a 3 minutos e uma alíquota de 50 μL foi retirada, diluída com 1 mL de água destilada e adicionados 50 μL do reativo de Nessler. Esta solução foi mantida por 10 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorbância em 450 nm. A amostra de branco, contendo apenas substrato e reativo de nessler, foi incluído nos ensaios. Também foi construída uma curva padrão de sulfato de amônio. Uma unidade internacional de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de amoníaco por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5 Caracterização parcial do complexo enzimático

Após a produção do complexo enzimático de L-glutaminase otimizado nas etapas anteriores, o referido complexo foi caracterizado quanto a determinação dos seus respectivos parâmetros: pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade em diferentes valores de pH, estabilidade em diferentes temperaturas, efeito de íons na reação, afinidade por diferentes substratos. (El- bessoumy et al., 2004; Silva, L.A.O; Carmona, E.C., 2008; Dharmaraj, 2011). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As propriedades bioquímicas como: valor ótimo do pH, a estabilidade do pH, temperatura de reação, tolerância ao sal estabilidade térmica, os ions metálicos e especificidade do substrato da enzima foram determinadas como descrito por Amena et al (2010) e Sabu et al (2005).

A determinação do pH ótimo sobre a atividade da enzima foi considerada ao longo da gama de pH de 2,0 a 10,0 usando diferentes tampões de 50 mM: tampão de

citrato (pH 2,0 a 6,0), tampão Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e tampão de glicina-NaOH (pH 9,0 e 10,0). A atividade da enzima foi medida utilizando 10 µL da enzima, 10 µL dos diferentes tampões, incubada a 37°C por 30 min. Para estabilizar a reação colocou-se 5 µL de TCA (Ácido tricloroacético) e acrescentou 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizou a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm (Amena *et al.* 2010; Badoei-dalfard, 2015).

A estabilidade foi realizada por meio de pré-incubação de 10 µL de enzima, com 10 µL de cada um dos tampões sem L-asparagina, por 24h. Após o período de incubação, foram retirados 10 µL da amostra, adicionados mais 10 µL os tampões com L-asparagina e posteriormente foi realizada a incubação na temperatura por 30°C por 30 min para o tempo de reação, em seguida foram adicionados 5 µL de TCA (Ácido tricloroacético). Por fim, acrescentou-se 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e procedeu-se a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm. (Amena *et al.* 2010).

A determinação da temperatura ótima da enzima L-glutaminase foi medida ao longo do intervalo de temperatura de 4-60°C, utilizando 10 µL da enzima, 10 µL do tampão fosfato de sódio (50mM), incubando nas respectivas temperaturas por 1h. Após o período de incubação adicionou-se 5 µL de TCA, 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizou a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm (Amena *et al.* 2010).

A estabilidade de temperatura foi medido por pré-incubação de 10 µL de enzima sem o tampão nas temperaturas de 30°, 37°, 44°, 50° e 60°C por 30 minutos. Em seguida foi quantificada a atividade residual de L-glutaminase utilizando 10 µL da

enzima, 8 µL do tampão Fosfato de sódio com Glutamina, pH 7 (50mM), incubando nas respectivas temperaturas por 30 min a 37°C, após acrescentou-se 5 µL de TCA, 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizou a leitura a 450 nm (Wriston e Yellin, 1973; Amena *et al.* 2010).

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade L-glutaminase foi avaliada utilizando o cloreto de Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Pb²⁺ e Mn²⁺ a 10 mM. A influência dos inibidores e ativadores também foi considerado usando 10 mM de β-mercaptoetanol, SDS (Sulfato sódico de dodecila), PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e ureia (Warangkar;Khobragade, 2010; Monica et al., 2013).

O ensaio foi realizado na presença do composto mencionado em cada reação do ensaio para caracterização. A atividade foi determinada adicionando 10 µL do tampão Tris-HCl com L-asparagina (pH 7 a 50 mM), seguido 2 µL do íon mais 10 µL da enzima que foi incubado a 37°C por 30 min. Os procedimentos posteriores a incubação seguem a metodologia descrita nos parágrafos anteriores. A atividade da enzima em cada amostra foi medida e expressa como uma atividade relativa. A amostra não tratada foi utilizada como controle (Warangkar e Khobragade, 2010; Amena et al. 2010).

2.6 Produção L-glutaminase em Biorretor

Foi utilizado um biorreator de bancada, modelo BioFlo 110, da New Brunswick, dotado dos controles de aeração, agitação, nível de espuma, temperatura e pH, através das quais foi possível manter as condições do processo otimizadas na etapa anterior.

Foram utilizada as melhores condições obtidas no planejamento experimental em frascos. O ensaio foi realizado por 48 horas. O monitoramento da produção de L-glutaminase extracelular foi monitorado bem como os parâmetros de pH, biomassa e produção proteica também foram avaliados durante o processo. A avaliação do pH foi realizada por medições do potencial de hidrogênio do caldo nutritivo após cada etapa, utilizando o potenciômetro digital DIGIMED® modelo DM-21. O sobrenadante da produção da enzima foi quantificada de acordo com a metodologia Tizzot (2005).

2.7 Caracterização Morfológica e molecular do micro-organismo

2.7.1 Caracterização Macro-morfológica dos micro-organismos

Com a finalidade de realizar a identificação taxonômica da actinobactéria foram utilizadas algumas características micromorfológica, bioquímica, fisiológica. A realização da caracterização da linhagem em nível de crescimento em diferentes meios de culturas foi desenvolvida para observação das seguintes características: micromorfológica, cor do micélio aéreo, cor do micélio no substrato e difusão de pigmento no meio; foram estudados os seguintes meios : Extrato de Levedura - Ágar (ISP-1), Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-2), Farinha de aveia - Ágar (ISP-3), Sais inorgânicos - Amido - Ágar (ISP-4), Glicerol - Asparagina - Ágar (ISP-5), Peptona - Extrato de ferro - Ágar (ISP-6) e Tirosina - Ágar (ISP-7), sendo os meios ISP-6 e ISP-7 utilizados para avaliar a produção de pigmentos melanóides.

2.7.2 Caracterização Micro-morfológica dos micro-organismos

Para a realização da técnica, os micro-organismos foram cultivados em ISP2 ou ISP3(Farinha de aveia ágar) ou GAA (Glicerol asparagina Agar), dependendo da melhor esporulação, com a inserção parcial de lamínulas nos meios de cultura para crescimento das hifas sobre sua superfície e incubado a 37 °C por cerca de 12 dias. Após o período de incubação, foi possível a observação de características como coloração e pigmentação além de características micromorfológicas, através de microscopia óptica, como presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos ou a presença de esporângio (Soraes et al., 2012).

3 Resultados e discussão

3.1 Otimização da produção enzimática através do Planejamento experimental Fatorial

Dependendo da forma de produção a enzima pode apresentar variações em suas propriedades bioquímicas. Na otimização da L-glutaminase, neste estudo, pode-se inferir, diante do rendimento enzimático obtido, que o planejamento experimental fatorial mostrou-se eficaz frente aos estudos das variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios. O rendimento da enzima, no primeiro planejamento fatorial 2^3 , pode ser observado na tabela 3. A maior produção da enzima atingiu o valor de 1,597 U/mL, obtido no ensaio 6, com o pH de 7,8, temperatura à 33 °C e a concentração do substrato 1,5%. A resposta no rendimento, tende a variar conforme as condições fermentativas, dependendo o resultado não só do micro-organismo, como também do

método realizado para produção. A concentração proteica, apresentou variações que foram de 0,193 a 294 U/mg .

Tabela 3- Rendimento obtido no 1º planejamento experimental 2³.

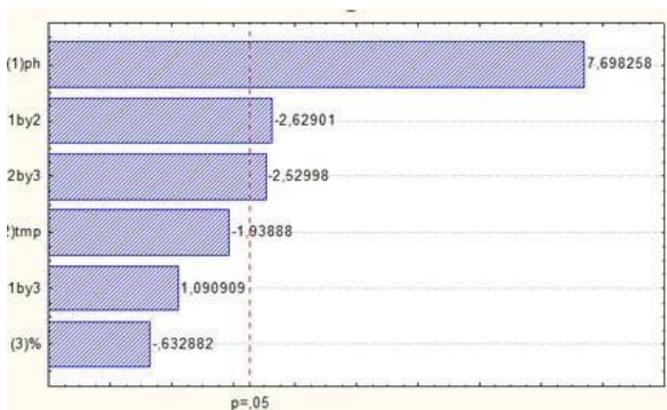
Ensaio	pH	Temperatura(°C)	(%) de L-Glutamina	Desvio ±	U/mL	U/mg
1	4,2	33	0,5	0,00	0,251	0,287
2	7,8	33	0,5	0,01	1,020	0,279
3	4,2	44	0,5	0,02	0,357	0,294
4	7,8	44	0,5	0,00	1,044	0,193
5	4,2	33	1,5	0,00	0,203	0,285
6	7,8	33	1,5	0,04	1,597	0,281
7	4,2	44	1,5	0,02	0,138	0,283
8	7,8	44	1,5	0,04	0,840	0,277

A partir dos resultados obtidos com as dosagens enzimáticas, efeitos dos três fatores (pH, temperatura e concentração do substrato indutor) também foram analisados no programa Statistica 6.0.

Na análise dos fatores, foi possível notar claramente que o pH, foi um fator determinante no aumento do rendimento enzimático. Quando escolhemos manter o fator 1 (pH), entre os ensaios 1 e 2 (I) e 5 e 6 (II), observa-se que tomando do menor nível para o maior nível de pH, houve um aumento de aproximadamente 3 vezes no rendimento em I, enquanto que em II o aumento foi de mais de 4 vezes. Já os demais fatores (temperatura e concentração) quando relacionados não demonstram efeitos que impliquem em mudança no rendimento. A interação entre a temperatura e pH, e temperatura e concentração, foram levemente significativos, entretanto, podemos inferir

que o efeito do pH foi o maior responsável na otimização da produção do complexo enzimático. O gráfico de Pareto explicita bem tais resultados (figura 1).

Figura 1 — Gráfico de Pareto com efeitos e interações das variáveis.



Desta maneira, foi possível propor um modelo para produção enzimática, em sua forma reduzida, com os coeficientes que apresentaram significância, gerados pelo programa statistic na tabela 4.

Tabela 4. Estimativa dos efeitos, planejamento fatorial 2^3 . Estimativa de erro; Variância: Desvio padrão_ 1; Coeficiente de correlação (R-sqr) =,89646; Adj:,82744 MS Pure Error=,0261025

	Efeitos	Std.Err	P	-95%	+95%	Coeficiente	Std.Err	-95%	+95%
Principal	0,563	0,040	0,000	0,472	0,654	0,563	0,040	0,472	0,654
interação									
(1)Ph	0,621	0,080	0,000	0,439	0,804	0,310	0,040	0,219	0,402
1 e 2	0,212	0,080	0,027	-0,395	-0,02	-0,106	0,040	-0,197	-0,014
2 e 3	0,204	0,080	0,032	-0,387	-0,02	-0,102	0,040	-0,193	-0,010

$$Y = 0,5635 + 0,310X_1 - 0,106X_1X_2 - 0,102X_2X_3$$

Onde, X_1 , corresponde ao pH; X_1X_2 - interação entre os fatores pH e temperatura; X_1X_3 - interação entre temperatura e concentração. Através da análise da variância

(ANOVA) para todos os ensaios, foi percebido que, o R^2 ainda não estava satisfatório,

apresentando confiabilidade de 89, % e que o modelo pode estar precisando tão somente de ajuste. Portanto, na tentativa de viabilizar o modelo linear, foram realizados novos experimentos com objetivo de potencializar a otimização. Um novo planejamento foi elaborado, alterando apenas a faixa do pH. O menor nível passou de 4,2 para 7,0, enquanto que o maior nível foi de 7,8 para 9,0.

Com o novo planejamento fatorial 2³, notou-se a partir dos resultados da dosagem enzimática e protéica, uma melhora na produção da enzima, na maioria dos ensaios. O resultado obtido, com maior rendimento U/ml, foi observado no ensaio de número 7, com concentração de 1,5%, pH 7,0 a 44 °C (tabela 5). A concentração protéica, apresentou variações que foram de 0,229 a 457 mg/mL .

Tabela 5 - Rendimento do 2º planejamento experimental 2³.

Ensaios	pH	Temperatura °C	Substrato (%)	Desvio ±	(U/mL)	mg/mL
1	7,0	33	0,5	0,04	0,998	0,415
2	9,0	33	0,5	0,01	0,434	0,229
3	7,0	44	0,5	0,01	0,547	0,310
4	9,0	44	0,5	0,01	0,581	0,325
5	7,0	33	1,5	0,01	0,370	0,225
6	9,0	33	1,5	0,00	0,363	0,312
7	7,0	44	1,5	0,01	1,226	0,410
8	9,0	44	1,5	0,02	1,202	0,457

Singh et al. (2013), para otimizar as L-glutaminase produzida a partir de *Bacillus cereus* MTCC 1305 utilizou como ferramentas estatísticas a metodologia de superfície de resposta (MSR) e a de rede neurais artificiais (RNAs) com as condições ótimas de 40 horas de fermentação, temperatura 34°C, inóculo de 2% e velocidade de agitação 175 rpm. Os valores do coeficiente de determinação foram 99.97 ANN e 97.78 RSM. O rendimento enzimático ficou em 666,97 U / L.

Meena et al. (2014), obteve um aumento na atividade enzimática com a produção e otimização de novas moléculas extracelulares de L-asparaginase livre de L-glutaminase de *Nocardioopsis alba* NIOT-VKMA08. Entre as fontes de carbono e de nitrogênio testadas, a produção de L-asparaginase foi observada com uma combinação de L-asparagina e maltose (1,5%) provocando o aumento do rendimento (18,47 UI/mL).

3.1.1 Análise estatística das variáveis e a análise da variância (ANOVA)

O ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação R^2 , que foi de 0,99846 para a resposta de produção enzimática, o que indica que 99,84% da variabilidade na resposta poderia ser explicada através do modelo.

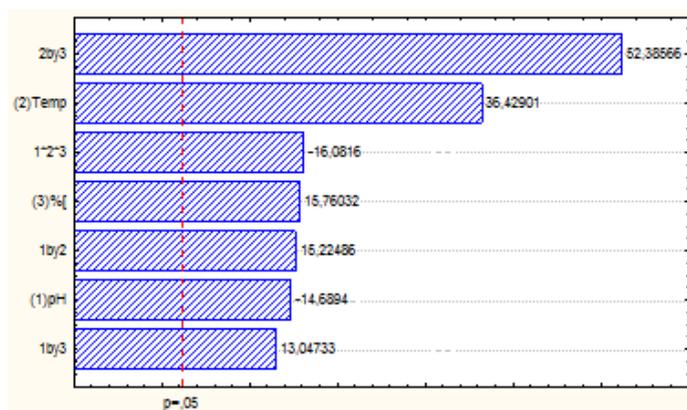
A significância estatística de modelos de equações foi avaliada pelo teste de F para a ANOVA. Os valores de F, modelo apresentado na Tabela 5, mostram que o modelo é significativo. Os valores de P foram também muito baixos ($P < 0,001$), indicando a importância do modelo.

Tabela 6 - Designer do planejamento 2^3 apresentando: Estimativa de erro; Variância: Desvio padrão_ 1; Coeficiente de correlação (R-sqr) =,99846; Adj:,99712 MS Pure Error=,0001962 DV: Resp %11

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Valor de p
(1) Ph	0,042333	1	0,042333	215,779	0,000000
(2) Temperatura	0,260355	1	0,260355	1327,073	0,000000
(3) Substrato (%)	0,048731	1	0,048731	248,388	0,000000
(1) e (2)	0,045476	1	0,045476	231,796	0,000000
(1) e (3)	0,033398	1	0,033398	170,233	0,000001
(2) e (3)	0,538389	1	0,538389	2744,258	0,000000
(1) e (2) e (3)	0,050738	1	0,050738	258,618	0,000000
Erro Puro	0,001570	8	0,000196		
Total SS	1,020988	15			

O gráfico de Pareto representa que todos os fatores avaliados, foram significativos. A temperatura (2), concentração da glutamina (3), as interações do pH com a temperatura e com a concentração da glutamina e a interação da temperatura e pH, exerceram efeitos positivos na produção extracelular da enzima L-glutaminase. Por outro lado, o pH(1) e a interação entre todos os fatores (pH, temperatura, concentração da glutamina) exerceram efeitos negativos no rendimento enzimático (figura 2).

Figura 2 — Gráfico de Pareto com efeitos e interações das variáveis.



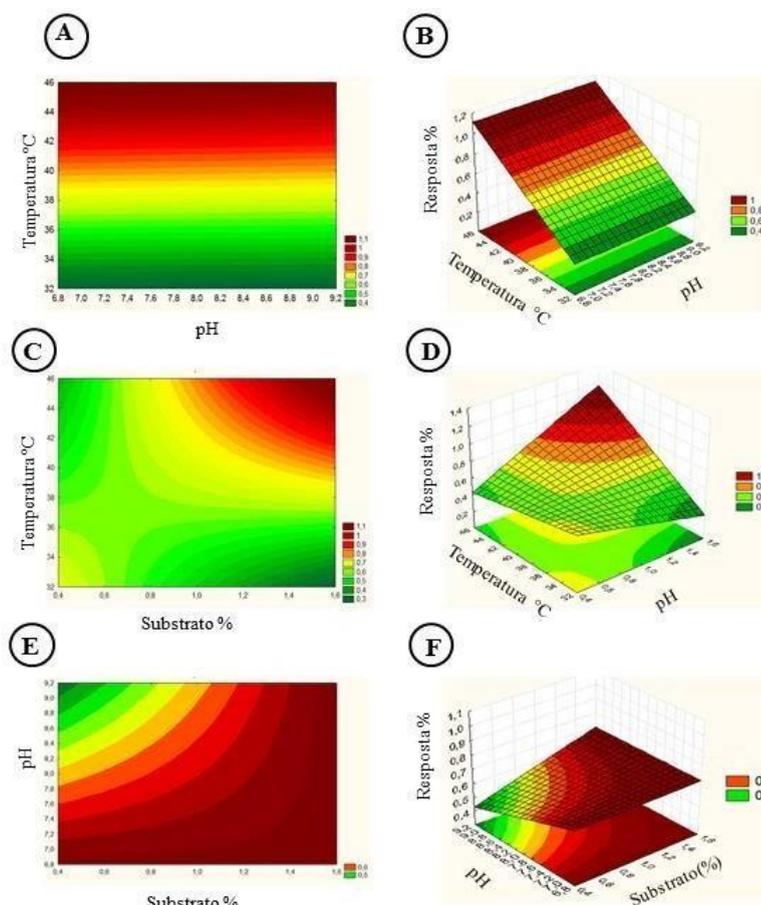
3.1.2 Interpretação gráfica do modelo de resposta

Gráficos de contorno bi-dimensionais (2D) e de contorno tridimensional (3D) de superfície de resposta são representações gráficas da equação de regressão, usados para investigar possíveis relações entre três variáveis. Estas representações gráficas são projetadas de dois fatores, enquanto que os outros fatores são mantidos constantes em seu melhor nível. Dessa forma, a região ótima pode ser encontrada através de uma inspeção visual das superfícies (Haider, M. A.; Pakshirajan, K., 2007, Mosbah et al., 2015).

As Figuras 3A e 3B mostram que, quando se utiliza o substrato indutor a 1,5 % de L-glutamina como uma variável constante a produção da enzima foi aumentada com a diminuição do valor de pH e um aumento na temperatura de fermentação. Um alto desempenho no rendimento enzimático foi observado em valor de pH superior a 7, e a temperatura maior que 40°C. O pH, neste aspecto, pouco influenciou na produção, podendo desta forma, ser usado dentro de uma larga escala (6,9 a 9,1).

As Figuras 3C e 3D mostram que com um aumento simultâneo do valor de pH e a concentração do substrato indutor é alcançado o maior rendimento na produção da enzimática. A elevada produção é conseguida no valor de pH a partir de 6,8 com a temperatura a partir de 40°C. A interação entre a concentração do substrato indutor e o pH, ilustrada nas figuras 3-E e 3-F, indicou que o aumento do pH e aumento simultâneo da L-glutamina, favorecem o rendimento máximo de produção.

Figura 3 — Gráficos de contorno 2D e 3D de superfície de resposta do modelo empírico para a produção de enzimática da L-glutaminase.



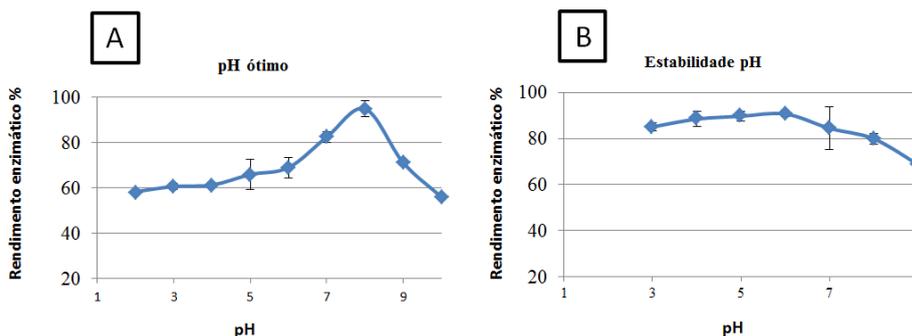
Fonte: Autor (2017)

3.2 Caracterização parcial do complexo enzimático

L-Glutaminase obtida da actinobactéria otimizada através do planejamento experimental teve como pH ótimo 8,0 (figura 4a) e mostrou atividade estável de até 80% rendimento enzimático, entre valores de pH 4,0 a 8,0 (fig. 4b) Desai, Chopra e Hungund (2016), também testaram a atividade enzimática de L-glutaminase oriunda da

produção extracelular de uma actinobactéria do solo, identificada como *Strptomyces sp.* onde demosntrou-se que a enzima estava ativa numa gama de pH 5-9 com pH óptimo 7,0. A atividade diminuiu consideravelmente a pH baixo (5,0) e pH elevado (10,0).

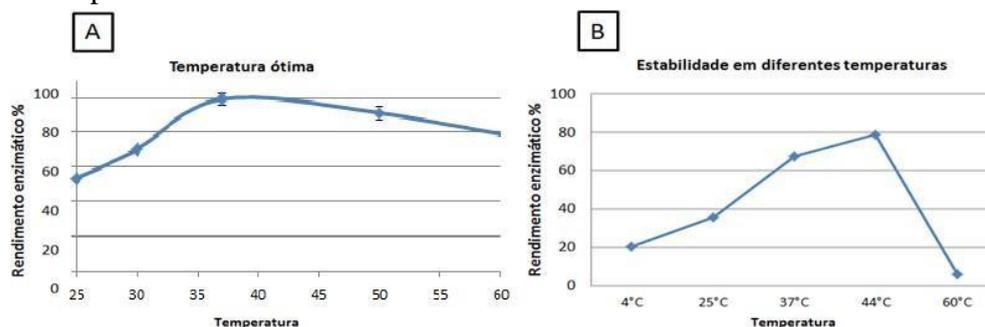
Figura 4 - Caracterização enzimática: a) pH ótimo b) Estabilidade em diferentes pHs.



Fonte: Autor (2017)

Em relação ao desempenho da atividade enzimática em diferentes temperaturas, a enzima mostrou-se estável entre as temperaturas de 25°C a 60°C, tendo como pico do teste de estabilidade, 44°C. A temperatura ótima, ficou estabelecida a 37°C (fig. 5a e 5b). Ainda no trabalho de Desai, Chopra e Hungund (2016), foi obtida como temperatura ideal 30°C e 75% da atividade foi mantida numa gama de temperaturas 20 a 60 ° C e assim como neste trabalho, a enzima também manteve-se estável a 60 ° C.

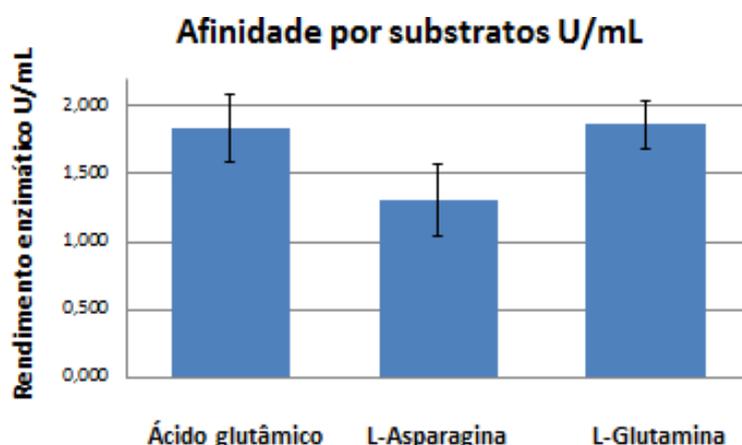
Figura 5 - Caracterização enzimática: a) Temperatura ótima b) Estabilidade em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor (2017)

Em relação a afinidade da enzima por diferentes substratos, a L-glutamina e o ácido glutâmico foram tidos como excelentes substratos indutores (figura. 6). A alta afinidade com o substrato L-glutamina foi detectada também anteriormente por Senthil-Kumar e Selvam (2011) e Kumar *et al.* (2012) para *Streptomyces radiopugnans* MS1.

Figura 6 - Caracterização enzimática: Efeito da L-glutaminase em diferentes substratos.

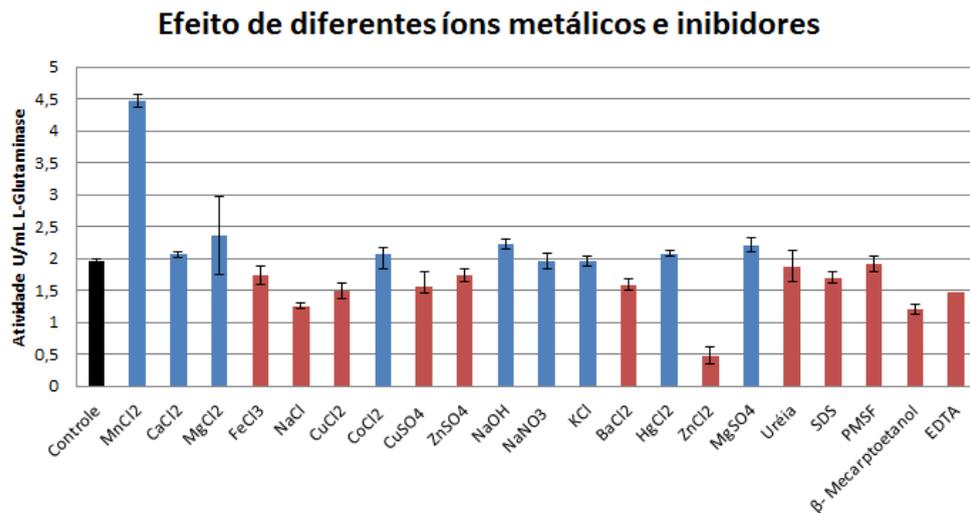


Fonte: Autor (2017)

A L-glutaminase proveniente da actinobactéria da caatingueira, teve sua atividade aumentada fortemente pela adição da solução iônica de $MnCl_2$ e não apresentou queda na atividade quando foram adicionadas soluções iônicas de $ZnSO_4$, nem mesmo quando quelantes como EDTA, foram usados. Resultados que demonstram características importantes para enzimas voltadas para aplicação terapêutica, visto que certos íons são necessários para manter a conformação da enzima ou podem agir como co-fatores. No trabalho de Chasanah, Tambunan e Yulianti (2012), com a enzima L-glutaminase excretada por uma *Pseudomonas aerginosa*, isolada de um ambiente marinho, também teve atividade enzimática aumentada quando o íon de Mn^{2+} foi

adicionado e, em contraste com este trabalho, teve a atividade diminuída pela adição de Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} .

Figura 7 - Caracterização enzimática: efeito de diferentes íons metálicos e inibidores da L-glutaminase.



Fonte: Autor (2017)

3.3 Produção em Biorreator da enzima L-glutaminase extracelular

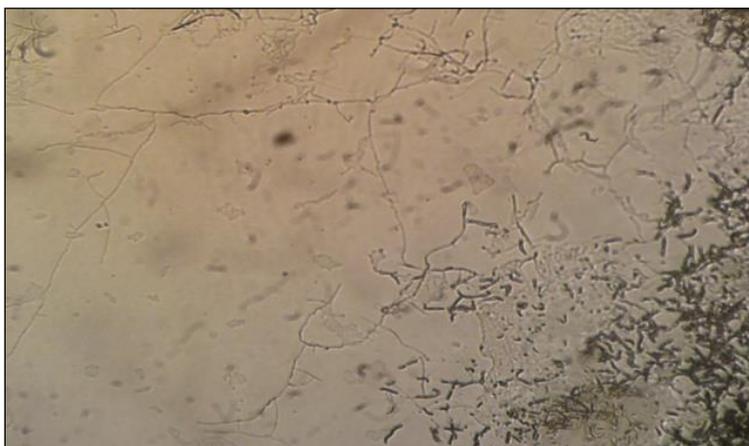
A produção da enzima L-glutaminase, foi submetida ao processo de produção em biorreator, dentro das condições otimizadas em etapas anteriores. Neste trabalho o biorreator foi mantido por 48 horas, a temperatura de $44^{\circ}C$, com a concentração do substrato indutor (L-glutamina) a 1,5% e o pH 7,0. A produção em larga escala com uso do Biorreator teve um rendimento de um pouco mais de 50% (0,645 U/mL, em relação ao um rendimento enzimático obtido com a otimização.

3.4 Identificação da actinobactéria

A actinobactéria apresentou excelente crescimento no meio com extrato de malte e levedura (ISP-2), porém apenas neste meio houve formação de micélio aéreo abundante, o meio de sais inorgânicos e amido (ISP-4) teve um bom crescimento. Já nos demais meios, o crescimento foi fraco ou quase não observável. Não houve produção de pigmentos melanóides nos meios peptona e extrato de ferro (ISP-6), Tirosina (ISP-7).

O microcultivo foi realizado e a actinobactéria apresentou características morfológicas pertinentes ao gênero *Actinomadura*, com grande número de hifas vegetativas ramificadas, além de possuir denso micélio. Desta maneira a linhagem foi parcialmente identificadas, como pertencentes ao gênero *Actinomadura* (Figura 9), porém algumas espécies de *Streptomyces* podem até ser confundidas com o gênero *Actinomadura*, devido à presença de cadeias de esporos em pequenos espirais pouco desenvolvidos e pelo lento crescimento do micélio aéreo.

Figura 8 - Micro-organismo isolado, identificado morfolologicamente como *Actinomadura sp.*



Fonte: Autor (2016)

Conclusões

O estudo demonstra a eficiência do planejamento experimental completo (2³) para identificar fatores que influenciam no processo de otimização da produção da enzima L-glutaminase, a qual vem sendo amplamente usada na indústria biotecnológica. Na caracterização foi definido que a atividade da enzima é suscetível a alterações diante da adição de íons metálicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (LCBCC), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Conflito de interesses

Os autores declararam que não existem interesses conflitantes.

Referências

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A. E Lingappa, K. (2010) Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz J Microbiol* **41**, 173–178.

Badoei-dalfard, A. (2015) Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatal Agric Biotechnol* **4**, 388–397.

Balagurunathan, R.; Radhakrishnan, M.; Somasundaram, S.t.(2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments – Selective Isolation,. **Australian Journal of Basic And Applied Sciences**, Tamilnadu, p. 698-705. 2010.

Baltz R. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall. *SIM News* 2005;55(5):186–96.

Barros, R. J. **Aplicações de Enzimas e Biocatálise: Estabilidade enzimática**. 2012. Disponível em: <http://w3.ualg.pt/~rbarros/documentos/biobio/12-13/AEB_estabilidade_enzimatica.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2016.

Bongers, F., Popma, J., Meave, J. e Carabias, J. (1988). Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Chasanah, E.; Tambunan, U. S. F.; Yulianti, T.(2012). Screening And Characterization Of L-Glutaminase Produced By Bacteria Isolated From Sangihe Talaud Sea. **Squalen**, Indonesia, v. 7, n. 3, p.115-121, dez. 2012.

Desai, S.; Chopra, S.; Hungund, B.(2016). Production, purification and characterization of L-Glutaminase from *Streptomyces* sp. isolated from soil. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], p.100-105, 2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. DOI: 10.7324/japs.2016.60715

Dubey, S.; SINGH, A.; BANERJEE, U. C.(2011). Response surface methodology of nitrilase production by recombinant *Escherichia coli*. **Brazilian Journal Of**

Microbiology, [s.l.], v. 42, n. 3, p.1085-1092, set. 2011. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1517-83822011000300029.

Gulati, R.; Saxena, R.K.; Gupta, R.(1997). A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. **Letts. Appl. Microbiology**. 24, 23–26. 1997.

Haider, M. A., and Pakshirajan, K. (2007) Screening and Optimization of Media Constituents for Enhancing Lipolytic Activity by a Soil Microorganism Using Statistically Designed Experiments. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141,377–390.

Hymavathi M, Sathish T, Subba R. CH, Prakasham R.S. (2009). Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 191-198

Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M (1973) Asparaginase and Glutaminase activities of microorganisms. *J Gen Microbiol* 76:85–99

Kattimani L., Amena S., Nandareddy V., Mujugond P.(2009). Immobilization of *Streptomyces gulbargensis* in. *Iranian Journal Of Biotechnology*, Karnataka, p. 199-204. ago. 2009.

Kennedy, M.,; Krouse, D. (1999) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 456–475.

Kyoko K., Hroaki N, An y., Kataoka J., Kitamoto K. .(2004). Glutaminase, its gene and a method of producing it. U.S. Patent. Pat. No. 6830905 B2

Lazarus, P.;Panasci, L. C. Characterisation of L-threonine and L-glutamine transport in murine P388 leukemia cells *in vitro*. Presence of an N-like amino acid transport system. *Biochimica et Biophysica Acta* **856**. 488–495, 1986.

Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.K.(2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria.**Microbiological Research**, [s.l.],

v. 169, n. 4, p.262-278, abr. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.014.

Meena B., Anburajan L., Dheenan P.S., Begum M., Vinithkumar N.V., Dharani G., Kirubakaran R.(2014). Novel glutaminase free l-asparaginase from *Nocardioopsis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.373-388, 2. DOI: 10.1007/s00449-014-1277-3.

Monica, T., Lincoln, L., Niyonzima, F.N., Sunil, S.M., (2013). Isolation, purification and characterization of fungal extracellular l-Asparaginase from *Mucor Hiemalis*. *J. Biocatal. Biotransform.* 2, 1–9.

Mosbah, H.;Aissa I.; Hassad N.; Farh D. Bakhrouf A.; Achour S. Improvement of biomass production and glucoamylase activity by *Candida famata* using factorial design. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.572-580, 24 jun. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/bab.1389.

Nagwa, A. A.; Shaimaa, K. A.; Mario, KHALIL HABEEB. Production, purification and characterization of L-glutaminase enzyme from *Streptomyces avermitilis*. **Afr. J. Microbiol. Res.**, [s.l.], v. 7, n. 14, p.1184-1190, 2 abr. 2013. Academic Journals. DOI: 10.5897/ajmr2013.5367.

Reda, F. M. (2015). Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L- Glutaminase and its anticancer efficiency. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.957-968, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1517-838246420130847.

Robert J, Allister JW, Sethuraman N., Freeman A.G. (2001) Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. U.S. Patent, No. 6312939.

Sabu, A., Pandey, A., Jaafar D., M., Szakacs, G. (2005). Tamarind seed powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid

state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, 96(11), 1223-1228. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.11.002

Sarada, K V. (2013) Production and applications of l-glutaminase using fermentation technology. **Asia Pacific Journal Of Reaserch**. Vishakapatnam, p. 1-4. ago. 2013.

Sarkar S., Pramanik A., Mitra A., Mukherjee J.(2013) Bioprocess engineering approaches for the production of marine enzymes. **Marine Enzymes For Biocatalysis**, [s.l.], p.131-164, 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1533/9781908818355.2.131

Singh P., Shera S.S., Banik J., Banik R.M.(2013). Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of l-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 137, p.261-269, jun. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.086.

Soares, E. C. L.; Costa, E. P.; Silva, L. C. N.; Araújo, J. M.(2012). Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968.” *Scientia Plena*, 8 (12): 01–07. 2012.

Sunil D. P., Siddalingeshwara K.G., Karthic J. (2014) Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submergrd fermentation. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3:819-823.

Tizzot M. R. P. A., Fröhner C. R. A., Gonçalves C. G. D., Hill J. A. G., Lima P. G.C., Silva C. J., Borsari A. P., Funayama S. (*Asparaginase* [EC 3.5.1.1] de Tuiuti: *Ciência e Cultura*, Curitiba, n. , p.53-72, 2005

Vander H., Y., Perrin, C., Massart, D. (2000) *Handb. Analyt. Sep.* 1,163–212.

Velhopereira, Sonashia; Kamat, Nandkumar M. (2013) Actinobacteriological research in India. **Indian Journal of Experimental Biology**. India, p. 573-596. ago. 2013.

Warangkar, S.C. E Khobragade C.N. (2010) Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzym Res* **2010**, 1-10, 2010.

Wriston J.C.; Yellin T., (1973). L-asparaginase:A review. *Adv Enzimol* 39: 185.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O estudo realizado explorou o potencial biotecnológico de *Actinobacteria sp.* quanto à produção de enzimas antitumorais, L-asparaginase e L-glutaminase. O isolado de actinobactéria do bioma da Caatinga, mostrou potencial capacidade para produzir enzima L-asparaginase e, desta forma útil, para produção farmacêutica, porém foi constatado que nosso modelo experimental, apesar de melhorar o rendimento enzimático, não atendia aos requisitos de um modelo linear.

A produção extracelular de L-glutaminase, através do modelo estatístico, demonstrou a eficiência do planejamento experimental completo (2³) para identificar fatores que influenciam no processo de otimização da produção (99,8% de confiabilidade do modelo estatístico) da enzima L-glutaminase. Com a enzima L-glutaminase extracelular foi realizada sua otimização, caracterização parcial e reprodução das condições ótimas em biorreator.

L-glutaminase isolada dessa actinobactéria teve um rendimento de um pouco mais de 50% quando produzida nas condições otimizadas em biorreator. Contudo, apresentou resultados significativos nas caracterizações enzimáticas em diferentes condições de estudos. A L-glutaminase se manteve ativa e estável ao longo de uma ampla faixa de pH e temperatura. A enzima também apresentou afinidade com substrato indutor (L-glutamina), L-asparaginase e ácido glutâmico. Além disso, a atividade da enzima mostrou-se suscetível a alterações diante da adição de íons metálicos.

O método de identificação microscópica, possibilitou a identificação parcial da actinobactéria como pertencente ao gênero *Actinomadura*.

L-asparaginase e L-glutaminase são enzimas com potencial antitumoral. Os resultados obtidos neste trabalho, foram relevantes para a área biotecnológica, trazendo dados sobre os modelos de produção e caracterização, além de reforçar a importância de pesquisar novas fontes microbianas, tais quais actinobactérias, para a exploração de novos metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H.-P.VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, 80(1), 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15

DEANGELIS K.M., BRODIE E.L., DESANTIS T.Z., ANDERSEN G.L., LINDOW S.E., FIRESTONE M.K. (2008). "Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots." **The ISME Journal** 3(2): 168-178. DOI: 10.1038/ismej.2008.103

GESTO D. S. , CERQUEIRA N. M. F. S. A. , FERNANDES P.A., RAMOS M. J.(2013). Unraveling the Enigmatic Mechanism of L-Asparaginase II with QM/QM Calculations. **Journal Of The American Chemical Society**. Porto, p. 7146-7158. abr. 2013.

LAZZARINI A., CAVALETTI L., TOPPO G., MARINELLI F. (2001). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 399–405

LIMA, A. L. A.; RODAL, M. J. N. (2010). Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, n. 11, p. 1363- 1373.

MAMEDE, M.A.; ARAÚJO F.S. (2008). Effects of slash and burn practices on a soil seed bank of Caatinga vegetation in Northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 72, p. 458–470.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.(2006). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Ufla, 729 p.

QUEIROZ, L. P. (2009). Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Ba: UEFS, 467 p.

SANTOS J. S., MENDES S. S., CONDE D. C., DELMONDEZ R. C., MANN R. S., THOMAZZI S. M. (2012). Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. **Scientia plena**. Sergipe, p. 1-8.

SIDDALINGESHWARA K.G.; LINGAPPA K. (2011) Production and Characterization of LAsparaginase - A Tumour inhibitor. **International Journal of PharmTech Research** CODEN (USA): 3 (1), pp 314-319.

TRUJILLO, M. (2008). Actinobacteria. **Encyclopedia Of Life Sciences**, [s.l.], p.1-16, 15 jul. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020366.

UNISSA R., SUDHAKAR M., REDDY A. S. K., SRAVANTHI K. N. (2014). A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 5, n. 11, p.4617-4634. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.5(11).4617-34.

ABDALLAH N. A., AMER S. K, HABEEB. M. K.(2013). Production, purification and characterization of L-glutaminase enzyme from *Streptomyces avermitilis*, Afr J Microbiol Res, Vol. 7, 1184-1190.

ALTEKAR M. , HOMON C. A., KASHEM M.A, MASON S. W. , NELSON R. M., PATNAUDE L.A., YINGLING J., TAYLOR P.B. (2006). Assay Optimization: A Statistical Design of Experiments Approach. **Journal Of The Association For Laboratory Automation**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.33-41. DOI: 10.1016/j.jala.2005.11.001.

ANBU P., GOPINATH S.C., CHAULAGAIN B.P., TANG T.H., CITARTAN M. (2013). Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-2. DOI: 10.1155/2013/204014.

ANESE M, QUARTA B, FRIAS J.(2011). Modelling the effect of asparaginase in

reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chem.* 126:435-40.

ARIF HM, HUSSAIN Z.(2014). Important sources and medicinal applications of L-asparaginase. *Int J Pharm Sci Rev*;3:35-45.

AYARAM, Hiremagalur N.; AHLUWALIA, Gurpreet S.; COONEY, David A. (2000). Enzyme Applications, Therapeutic. **Kirk-othmer Encyclopedia Of Chemical Technology**, [s.l.], p.1-22, 4 dez. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/0471238961.2008051810012501.a01.

BADOEI-DALFARD, ARASTOO. (2016). L-asparaginase production in the pseudomonas pseudoalcaligenes strain JHS-71 isolated from Jooshan Hot-spring. **Molecular Biology Research Communications**, Kerma, v. 5, n. 1, p.1-10.

BALAGURUNATHAN R., SHANMUGASUNDARAM T., PRIYADHARSHINI D., M. SANJIVKUMAR. (2013) Magnesite Ore Soil Actinobacteria – A Source for Novel Enzymes and Antibiotics. *Indo American Journal of Pharm Research*.:3(4)

BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H.-P.VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: MMBR, 80(1), 1–43. DOI: 10.1128/MMBR.00019-15

BASKAR, GURUNATHAN; RENGANATHAN, SAHADEVAN. (2011). Statistical and evolutionary optimisation of operating conditions for enhanced production of fungal l-asparaginase. **Chemical Papers**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.1-12, 1. Springer Nature. DOI: 10.2478/s11696-011-0072-8

BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; MAUGERI FILHO, F.,RODRIGUES, M. I. (2006). Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. *Braz. J. Chem. Eng.* [online].vol.23, n.2], pp.163-170. DOI:10.1590/S0104-66322006000200002

CAMARGO, L. F.; MOREIRA, V; VACCARO, G.(2010). Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no desenvolvimento de novos produtos em uma empresa de saneantes. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.404-420, 22 jan. 2010. UNISINOS - Universidade do Vale do Rio Dos Sinos. DOI: 10.4013/ete.2009.53.11.

CHAUHAN B, DHALIWAL M.K. (2014). Study of L-asparaginase production in *Nocardia* spp. isolated from Mangroves. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*; 4:3476-3484.

CHAVAN DILIP V. MULAJE S. S.¹, MOHALKAR R.Y. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.1730-1742, 1. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.4(5).1730-42

COOK, W. R., HOFFMAN, J. H., BERNLOHR, R. W. (1981). Occurrence of an Inducible Glutaminase in *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 148(1), 365–367.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M. MIGUEL, O. G. ZAWADZKI, S. F. PERALTA-ZAMORA, P. VOLPATO, N. (2008). Planejamento fatorial: Uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica.. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.23-32, 30 jun. 2008. Universidade Federal do Parana. DOI: 10.5380/acd.v9i1.14635

DESAI, SAVITHA; CHOPRA, SONAL; HUNGUND, BASAVARAJ.(2016) Production, purification and characterization of L-Glutaminase from *Streptomyces* sp. isolated from soil. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], p.100-105. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. DOI: 10.7324/japs.2016.60715.

DUVAL M.,SUCIU S., FERSTER A., RIALLAND X., NELKEN B., LUTZ P., BENOIT Y., ROBERT A, MANEL A.M., VILMER E., OTTEN J., PHILIPPE N.

(2002). Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer<remove-image>Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 99:2734–9.

ENSIGN J. C. (1992). Introduction to the Actinomycetes, in *The Prokaryotes*, 2nd Edn. Vol. II, eds Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Hardeer W., Schleifer K. H., editors. (New York, NY: Springer-Verlag;), 811–815.

GRANATO D., CALADO, A. V. M. (2014) The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology, in *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (eds D. Granato and G. Ares), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom. DOI: 10.1002/9781118434635.ch01

GURUNATHAN B, SAHADEVAN R (2011) Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal *L*-asparaginase. *Chiang Mai J Sci* 38: 270-279.

GURUNG N., RAY S., BOSE S., RAI V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **A Broader View: Microbial Enzymes And Their Relevance In Industries, Medicine, And Beyond**. Mohanpur, p. 1-18. 09 jul.

IYER, P. AND R.S. SINGHAL,(2009). Screening and selection of marine isolate for L-glutaminase production and media optimization using response surface methodology. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 159: 233-250.

JIANG Y., LI Q., CHEN X., JIANG C. (2016). Isolation and Cultivation Methods of Actinobacteria, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61457

KATIKALA P.K., BOBBARALA V., PRABHAKAR T.P., GUNTUKU G.S. (2009) Screening of L-glutaminase producing marine bacterial cultures for extracellular production of L-glutaminase. *Int J Chem Tech.*; 1:1232-5.

KOCH, A. L. (2003). Were Gram-positive rods the first bacteria? *Trends Microbiol.* 11, 166–170. DOI: 10.1016/S0966-842X(03)00063-5

KRISHNAKUMAR S, ALEXIS R, RAVIKUMAR S (2011) Extracellular production of L-Glutaminase by marine alkalophilic *Streptomyces sp*-SBU1 isolated from Cape Comorin coast. *IJMS* 40:717-721.

KURAPOVA, I., ZENOVA, G. M., SUDNITSYN, I. I., KIZILOVA, A. K., MANUCHAROVA, N. A., NOROVSUREN, Z. H., (2012). Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia Desert Steppe Zone. *Microbiology* 81, 98–108. DOI: 10.1134/s0026261712010092

LUDWIG W, EUZÉBY J, SCHUMANN P, BUSS HJ, TRUJILLO ME, KÄMPFER P, WHITEMAN WB. (2012). Road map of the phylum *Actinobacteria*, p 1–28. In Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, WhitmanWB(ed), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol 5. Springer-Verlag, New York.

MANE, PRAJAKTA; TALE, VIDYA. (2015) Overview of Microbial Therapeutic Enzymes. **Int.j.curr.microbiol.app.sci**, Pune, v. 4, n. 4, p.16-27

MANGAMURI U.K, MUVVA V., PODA S., KAMMA S. (2012). Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. *Mal J Microbiol.* 8(2): 83-91.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SIVAKUMAR, K., AND KIM, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol. Res.* 168, 311–332. DOI: 10.1016/j.micres.2013.02.00

MARTÍNEZ CUESTA, SERGIO et al. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophysical Journal*, [s.l.], v. 109, n. 6, p.1082-1086, set. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.04.020

MEENA B., ANBURAJAN L., DHEENAN P.S., BEGUM M., VINITHKUMAR N.V., DHARANI G., KIRUBAGARAN R.. (2014). Novel glutaminase free l-asparaginase from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.373-388, 2. DOI: 10.1007/s00449-014-1277-3.

MONTGOMERY, D.G.(2001). **Design and analysis of experiments**. John Wiley & Sons, New York.

MORE, S. S.(2013). Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, [s.l.], v. 02, n. 02, p.1-9.DOI:10.4172/2324-9099.1000108.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.208-221.

NEVES, C. F. C., SCHVARTZMAN, M. M. A. M.; J., E.(2002) Variables search technique applied to gas separation. *Química Nova*. v.25, n 2, p.327-329, 2002.

NIGAM, P. (2013). Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.597-611, 23. DOI: 10.3390/biom3030597.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N., SOCCOL, V. T. (1999)The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 29, no. 2, p. 119-131.

PAP, N., BESZÉDES, S., PONGRÁCZ, E. MYLLYKOSKI L., GÁBOR M.,
GYIMES E., HODÚR C., KEISK R. L. (2013). Food Bioprocess Technol 6: 2666.
DOI:10.1007/s11947-012-0964-9

PRAKASH D., NAWANI N., PRAKASH M., BODAS M., MANDAL A.,
KHETMALAS M., KAPADNIS B. (2013) Actinomycetes: A Repertory of Green
Catalysts with a Potential Revenue Resource. **Biomed Research International**, [s.l.], v.
2013, p.1-8, 2013. Hindawi Publishing Corporation. DOI:10.1155/2013/264020

PRUSINER S, STADTMAN ER.(1976). Regulation of glutaminase B in *Escherichia coli-II*. Modulation of activity by carboxylate and borate ions. J Biol Chem. 1976; 251:3457-62.

REDA, Fifi M. (2015). Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L- Glutaminase and its anticancer efficiency. Brazilian Journal Of Microbiology, [s.l.], v. 46, n. 4, p.957-968, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1517-838246420130847

REMYA, M. R. VIJAYAKUMAR,(2008). “Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India,” *Medicine and Biology*, vol. 15, no. 1, pp. 13–19, 2008.

ROBERTS J., HOLCENBERG J.S., DOLOWY W.C.,(1972). Isolation, crystallization and properties of *Achromobacteraceae* glutaminase– asparaginase with antitumor activity. J. Biol. Chem., 1972, 247, 84–90.

SABU, A., K.M. NAMPOOTHIRI AND A. PONDEY, (2005). L-Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin. In: Baredo, J.L., (Editor), *Methods in Biotechnology: Microbial Enzymes and Biotransformations*. Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp: 75-90

SAHU M. K., SIVAKUMAR K., POORANI E., THANGARADJOU T., AND KANNAN L. (2007), Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *J. Environ. Biol.* 28, 465 – 474

SANGHAMITRA, D.; GHOSH, S.; SAPTARSHI, P.(2014). LAsparaginase and Lglutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical Properties1. **Applied Biochemistry And Microbiology**, West Bengal, v. 51, n. 4, p.425-431, nov. 2014.

SHIRLING E. B., GOTTLIEB D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. (2015). Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.10-14, 25 set. 2015. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01014

SINGH P., BANIK R.M. (2013) Biochemical characterization and antitumor study of L-glutaminase from *Bacillus cereus* MTCC 1305. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;171:522–531.

SINHA, S., NIGAM, V. K. PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF L-GLUTAMINASE BY *BACILLUS* SP. (2016) **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.120-126, 1 abr. 2016. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.7(4).1620-26.

TADDEI A., RODRÍGUEZ M.J., MÁRQUEZ-VILCHEZ E., CASTELLI C.(2006). Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.222-231, jul. 2006. DOI: 10.1016/j.micres.2005.08.004.

TAREKE E, RYDBERG P, KARLSSON P, ERIKSSON S, TÖRNQVIST M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agr Food Chem* 2002;50:4998-5006.

TRUJILLO, M.(2008). Actinobacteria. Encyclopedia Of Life Sciences, [s.l.], p.1-16, 15 jul. 2008. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020366.

UNISSA R., SUDHAKAR M., REDDY A. S. K., SRAVANTHI K. N. (2014). A review on biochemical and therapeutic aspects of glutaminase. International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research, [s.l.], v. 5, n. 11, p.4617-4634. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. DOI: 10.13040/ijpsr.0975-8232.5(11).4617-34.

VELLARD, M. (2003). The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. Current Opinion In Biotechnology, [s.l.], v. 14, n. 4, p.444-450, ago. 2003. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0958-1669(03)00092-2.

WILLIAMS, S. T. AND CROSS, T. (1971). Isolation, Purification, Cultivation and Preservation of Actinomycetes. Methods in Microbiology 4, 295-334.

YU, J., ZHANG, L., LIU, Q., QI, X., JI, Y., KIM, B. S. (2015). ISOLATION AND characterization of actinobacteria from Yalujiang coastal wetland, North China. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 5, 555–560. DOI: 10.1016/j.apjtb.2015.04.007

ZUO, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. (2014). Recent research progress on microbial l-asparaginases. Appl Microbiol Biotechnol, [s.l.], v. 99, n. 3, p.1069-1079, 11 dez. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-014-6271-9.

Turchetto-zolet, A.C.; Pinheiro F.; Salgueiro F.; Palma-silva, C. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. Mol Ecol. 2013; 22:1193-1213.

Werneck, F., Leite R., Geurgas S., Rodrigues M. 2015. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicoduridae lizards endemic to the semi-arid Caatinga. BMC Evolutionary Biology. Brasil, p. 01-24. maio 2015.

Lima, A. L. A.; Rodal, M. J. N. Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. Journal of Arid Environments, London, v. 74, n. 11, p. 1363- 1373, 2010.

Queiroz, L. P. Leguminosas da caatinga. Feira de Santana, Ba: UEFS, 2009. 467 p.

Santos J. S., Mendes S. S., Conde D. C., Delmondez R. C., Mann R. S., Thomazzi S. M. Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz accessions using RAPD markers. Scientia plena. Sergipe, p. 1-8. 2012.

Deangelis, K.M.; Brodie E.L., Desantis T.Z.; Andersen G.L.; Lindow S.E.; Firestone M.K.. (2008). "Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots." The ISME Journal 3(2): 168-178.

Miao, Vivian; Davies, Julian. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. Antonie van Leeuwenhoek, [s.l.], v. 98, n. 2, p.143-150, 14 abr. 2010. Springer Nature. DOI:

[10.1007/s10482-010-9440-6](https://doi.org/10.1007/s10482-010-9440-6).

Gesto, D. S.; Nuno M. F. S. A.; Cerqueira, Pedro A. F.; Maria J. Ramos. Unraveling the Enigmatic Mechanism of L-Asparaginase II with QM/ QM Calculations. *Journal Of The American Chemical Society*. Porto, p. 7146-7158. abr. 2013.

Siddalingeshwara K.G.; Lingappa K. Production and Characterization of L-Asparaginase: A Tumour inhibitor. *International Journal of PharmTech Research CODEN (USA)*: 3 (1), pp 314-319, 2011.

Zuo, S.; Zhang, T.; Jiang, B.; Mu, W. Recent research progress on microbial l-asparaginases. *Appl Microbiol Biotechnol*, [s.l.], v. 99, n. 3, p.1069-1079, 11 dez. 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00253-014-6271-9.

Shehata, A. N.; Aty, A. A. Optimization of Process Parameters by Statistical Experimental Designs for the Production of Naringinase Enzyme by Marine Fungi. *International Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 2014, p.1-10, 2014. Hindawi Publishing Corporation. DOI: 10.1155/2014/273523.

Silva, I. L. da; Silva, W. Ol.; Silva, L. A. O. L-ASPARAGINASES DE BACTÉRIAS E ACTINOBACTÉRIAS, ISOLADAS DA CAESALPINIA PYRAMIDALIS TUL. *Sodebras, Recife*, v. 110, n. 1, p.41-46, fev. 2015.

Ladeira, S.A.; Andrade, M.V.V.; Delatorre, A. B.; Perez, V.H.; Martins, M.L.L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*, 33, 324-328, 2010.

Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M (1973) Asparaginase and Glutaminase activities of microorganisms. *J Gen Microbiol* 76:85–99

Tizzot M. R. P. A., Fröhner C. R. A., Gonçalves C. G. D., Hill J. A. G., Lima P. G.C., Silva C. J., Borsari A. P., Funayama S. Asparaginase [EC 3.5.1.1] de *Tuiuti*: *Ciência e Cultura*, Curitiba, n. , p.53-72, 2005

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Narayana, K. J. P., K. G. Kumar, M. Vijayalakshmi. “L-Asparaginase Production by *Streptomyces Albidoflavus*.” *Indian Journal of Microbiology* 48.3 (2008): 331–336. PMC. Web. 16 Feb. 2017.

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., Lingappa, K. (2010)

Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz J Microbiol* 41, 173–178.

Agarwal, A.; Kumar, S.; Veeranki, V.d.. Effect of chemical and physical parameters on the production of l-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. *Letters In Applied Microbiology*, [s.l.], v. 52, n. 4, p.307-313, 15 fev. 2011. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2011.03006.x.

More, S. S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*, [s.l.], v. 02, n. 02, p.1-9, 2013. OMICS Publishing Group. DOI:10.4172/2324-9099.1000108.

Sanghamitra, D.; Ghosh, S.; Saptarshi, P. LAsparaginase and Lglutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and Some Physicochemical Properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, West Bengal, v. 51, n. 4, p.425-431, nov. 2014.

Basha N. S., Rekha R., Komala M, Ruby S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, Benin City, p. 353- 360. ago. 2009

Altekar M., Homon C. A., Kashem M.A, Mason S. W. , Nelson R. M., Patnaude L.A., YINGLING J., Taylor P.B.. Assay Optimization: A Statistical Design of Experiments Approach. *Journal Of The Association For Laboratory Automation*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.33-41, fev. 2006. SAGE Publications. DOI: 10.1016/j.jala.2005.11.001.

Kumar N.S.M., Ramasamy R, Manonmani H.K. (2013) Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind Crop Prod* 43:150–158

Venil C. K. , Nanthakumar K., Karthikeyan K. Lakshmanaperumalsamy P. Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: Optimization by response surface methodology. *Iranian Journal of Biotechnology*. Tamil Nadu, p. 10-30. jan. 2009.

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A. E Lingappa, K. (2010) Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz J Microbiol* 41, 173–178.

Badoei-dalfard, A. (2015) Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatal Agric Biotechnol* 4, 388–397.

Balagurunathan, R.; Radhakrishnan, M.; Somasundaram, S.t.(2010). L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments – Selective Isolation,. **Australian Journal of Basic And Applied Sciences**, Tamilnadu, p. 698-705. 2010.

Baltz R. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall. *SIM News* 2005;55(5):186–96.

Barros, R. J. **Aplicações de Enzimas e Biocatálise: Estabilidade enzimática**. 2012. Disponível em: <[http://w3.ualg.pt/~rbarros/documentos/biobio/12-13/AEB - estabilidade_enzimatica.pdf](http://w3.ualg.pt/~rbarros/documentos/biobio/12-13/AEB_estabilidade_enzimatica.pdf)>. Acesso em: 22 fev. 2016.

Bongers, F., Popma, J., Meave, J. e Carabias, J. (1988). Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Chasanah, E.; Tambunan, U. S. F.; Yulianti, T.(2012). Screening And Characterization Of L-Glutaminase Produced By Bacteria Isolated From Sangihe Talud Sea. **Squalen**, Indonesia, v. 7, n. 3, p.115-121, dez. 2012.

Desai, S.; Chopra, S.; Hungund, B.(2016). Production, purification and characterization of L-Glutaminase from *Streptomyces* sp. isolated from soil. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.], p.100-105, 2016. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. DOI: 10.7324/japs.2016.60715

Dubey, S.; SINGH, A.; BANERJEE, U. C.(2011). Response surface methodology of nitrilase production by recombinant *Escherichia coli*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.1085-1092, set. 2011. *FapUNIFESP (SciELO)*. DOI: 10.1590/s1517-83822011000300029.

Gulati, R.; Saxena, R.K.; Gupta, R.(1997). A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. **Letts. Appl. Microbiology**. 24, 23–26. 1997.

Haider, M. A., and Pakshirajan, K. (2007) Screening and Optimization of Media Constituents for Enhancing Lipolytic Activity by a Soil Microorganism Using Statistically Designed Experiments. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141,377–390.

Hymavathi M, Sathish T, Subba R. CH, Prakasham R.S. (2009). Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159: 191-198

Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M (1973) Asparaginase and Glutaminase activities of microorganisms. *J Gen Microbiol* 76:85–99

Kattimani L., Amena S., Nandareddy V., Mujugond P.(2009). Immobilization of *Streptomyces gulbargensis* in. *Iranian Journal Of Biotechnology*, Karnataka, p. 199-204. ago. 2009.

Kennedy, M.; Krouse, D. (1999) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 456–475.

Kyoko K., Hroaki N, An y., Kataoka J., Kitamoto K. .(2004). Glutaminase, its gene and a method of producing it. U.S. Patent. Pat. No. 6830905 B2

Lazarus, P.;Panasci, L. C. Characterisation of L-threonine and L-glutamine transport in murine P388 leukemia cells *in vitro*. Presence of an N-like amino acid transport system. *Biochimica et Biophysica Acta* **856**. 488–495, 1986.

Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K., Kim S.K.(2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria.**Microbiological Research**, [s.l.], v. 169, n. 4, p.262-278, abr. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.micres.2013.07.014.

Meena B., Anburajan L., Dheenan P.S., Begum M., Vinithkumar N.V., Dharani

G., Kirubakaran R.(2014). Novel glutaminase free l-asparaginase from *Nocardiosis alba* NIOT-VKMA08: production, optimization, functional and molecular characterization. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.373-388, 2. DOI: 10.1007/s00449-014-1277-3.

Monica, T., Lincoln, L., Niyonzima, F.N., Sunil, S.M., (2013). Isolation, purification and characterization of fungal extracellular l-Asparaginase from *Mucor Hiemalis*. *J. Biocatal. Biotransform.* 2, 1–9.

Mosbah, H.;Aissa I.; Hassad N.; Farh D. Bakhrouf A.; Achour S. Improvement of biomass production and glucoamylase activity by *Candida famata* using factorial design. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.572-580, 24 jun. 2015. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/bab.1389.

Nagwa, A. A.; Shaimaa, K. A.; Mario, KHALIL HABEEB. Production, purification and characterization of L-glutaminase enzyme from *Streptomyces avermitilis*. **Afr. J. Microbiol. Res.**, [s.l.], v. 7, n. 14, p.1184-1190, 2 abr. 2013. Academic Journals. DOI: 10.5897/ajmr2013.5367.

Reda, F. M. (2015). Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L- Glutaminase and its anticancer efficiency. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.957-968, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s1517-838246420130847.

Robert J, Allister JW, Sethuraman N., Freeman A.G. (2001) Genetically engineered glutaminase and its use in antiviral and anticancer therapy. U.S. Patent, No. 6312939.

Sabu, A., Pandey, A., Jaafar D., M., Szakacs, G. (2005). Tamarind seed powder and palm kernel cake: Two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource Technology**, 96(11), 1223-1228. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.11.002

Sarada, K V. (2013) Production and applications of l-glutaminase using fermentation

technology. **Asia Pacific Journal Of Reaserch**. Vishakapatnam, p. 1-4. ago. 2013.

Sarkar S., Pramanik A., Mitra A., Mukherjee J.(2013) Bioprocess engineering approaches for the production of marine enzymes. **Marine Enzymes For Biocatalysis**, [s.l.], p.131-164, 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1533/9781908818355.2.131

Singh P., Shera S.S., Banik J., Banik R.M.(2013). Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of l-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 137, p.261-269, jun. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.086.

Soares, E. C. L.; Costa, E. P.; Silva, L. C. N.; Araújo, J. M.(2012). Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968.” *Scientia Plena*, 8 (12): 01–07. 2012.

Sunil D. P., Siddalingeshwara K.G., Karthic J. (2014) Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submergrd fermentation. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3:819-823.

Tizzot M. R. P. A., Fröhner C. R. A., Gonçalves C. G. D., Hill J. A. G., Lima P. G.C., Silva C. J., Borsari A. P., Funayama S. (Asparaginase [EC 3.5.1.1] de Tuiuti: Ciência e Cultura, Curitiba, n. , p.53-72, 2005

Vander H., Y., Perrin, C., Massart, D. (2000) *Handb. Analyt. Sep.* 1,163–212.

Velhopereira, Sonashia; Kamat, Nandkumar M. (2013) Actinobacteriological research in India. **Indian Journal of Experimental Biology**. India, p. 573-596. ago. 2013.

Warangkar, S.C. E Khobragade C.N. (2010) Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzym Res* **2010**, 1-10, 2010.

Wriston J.C.; Yellin T., (1973). L-asparaginase:A review. *Adv Enzimol* 39: 185.