

Uso de matérias primas da agroindústria – garapa e extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4

Utilization of raw materials from agroindustry – sugar cane juice and yeast extract – for asparaginase production by *Zymomonas mobilis* CP4

Josiani Fatima Casotti¹; Doumit Camilios Neto¹; Gilcelene Bruzon¹; Robson Alessandro Mattos Machado¹; João Batista Buzato²; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi³

Resumo

Garapa e extrato de levedura foram usados na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. Na otimização utilizou metodologia de superfície de resposta com 2 variáveis (extrato de levedura e asparagina) em 3 níveis (1,0; 5,5 e 10,0 g/L) e uma repetição do ponto central. A fermentação em batelada utilizou garapa diluída a 8 % (P/V) de Açúcares Totais e inóculo de *Zymomonas mobilis* CP4 na concentração de 2 mg/mL. Após a fermentação de 18 horas, a maior produção obtida de asparaginase foi de 9,75 U/L em extrato de levedura em 5,5 g/L e asparagina em 1,0 g/L.

Palavras-chave: Garapa, *Zymomonas mobilis*, asparaginase, fermentação

Abstract

Sugar cane juice and yeast extract have been used for asparaginase production by *Z. mobilis* CP4. A complete factorial design of two variables (yeast extract and asparagin) at three levels (1.0; 5.5 and 10.0 g/L) with one replication at the central point was used. Batch fermentation utilised sugar cane juice diluted at 8 % (W/V) of Total Sugars and an inoculum of 2 mg of cells/mL. After fermentation time of 18 hours, the highest production of asparaginase was 9.75 U/L using both yeast extract (5.5 g/L) and asparagin (1.0 g/l).

Key words: Sugar cane juice, *Zymomonas mobilis*, asparaginase, fermentation

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir da fermentação da garapa e melado de cana-de-açúcar. Desde o advento do PROALCOOL, o Brasil avançou na tecnologia de produção de etanol bem como no aumento da área de plantio de cana. A produção industrial de etanol gera o fermento que é

comercializado para a fabricação de ração animal, suplemento alimentar humano e extrato de levedura. Ainda que a importância da produção de etanol como energia renovável para o Brasil e a geração de empregos sejam inegáveis, o açúcar da cana pode ser utilizado como substrato para a produção de metabólitos de valor agregado maior que o etanol.

¹ Alunos de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL.

² Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL. E-mail: buzato@uel.br.

³ Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia/CCE/UEL.

* Autor para correspondência

A asparaginase, um agente anti-neoplásico, é utilizada no tratamento de leucemia aguda. A enzima catalisa a hidrólise de asparagina em ácido aspártico e amônia, levando a depleção de asparagina em células tumorais que são incapazes de produzir esse aminoácido. Assim a depleção de asparagina, causada pela administração endovenosa de asparaginase, provoca a morte de células malignas. O atual uso de asparaginase de *Escherichia coli* causa efeitos colaterais tóxicos em administração contínua (PRAKASHAM et al., 2007; KOTZIA et al., 2005) e além de ser de custo de produção elevado. Sendo assim, tem havido a busca de outros microrganismos produtores dessa enzima com menor toxidez bem como, capazes de usar matéria prima de baixo custo na fermentação.

Zymomonas mobilis uma bactéria gram-negativa que utiliza glicose, frutose e sacarose e produz etanol e CO₂. A cepa CP4 foi isolada de uma bebida fermentada e consumida pelo povo de Recife, denominada de Caldo Picado (MORAIS et al., 1993). Esta bactéria vem sendo utilizada experimentalmente na fermentação da garapa de cana-de-açúcar há mais de 20 anos (VUUREN; MEYER, 1982; RHEE et al., 1984; HUERTAZ-DÍAZ; CACHO; BERNARD, 1991; TANO; BUZATO, 2003). Estudos tem demonstrado também o potencial desse microrganismo para a produção de levana (BORSANI et al., 2006), sorbitol (CAZETTA et al., 2005; VIGNOLI; CELLIGOI; SILVA, 2006), ácido glicônico (SILVEIRA et al., 1999) e mais recentemente para a produção de asparaginase (ABUD et al. 2003).

Na produção de asparaginase é importante a fonte de nitrogênio sendo prolina, uréia e sais de nitrogênio (nitrato de sódio e sulfato de amônio) não recomendadas (ABUD; PINTO; ALVES, 2005). Entretanto, o extrato de levedura fornece grande quantidade de aminoácidos (cerca de 50% do peso), além de outros nutrientes como, vitaminas do

complexo B e o ácido pantotênico enquanto que, a asparagina tem o papel de indutor na produção de asparaginase (CAMILIOS NETO, 2005). Neste contexto a garapa e o extrato de levedura, matérias primas da agroindústria de baixo custo, foram utilizados para a produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. A fermentação foi otimizada por metodologia de superfície de resposta (BOX; DRAPER, 1987) com delineamento fatorial completo 3² das variáveis: concentração de extrato de levedura e de asparagina.

Material e Métodos

Microrganismo e Meio de preservação: *Zymomonas mobilis* CP4 foi preservado em Placas de Petri contendo meio sólido de composição (g/L): sacarose 20,0; extrato de levedura 2,5; KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂SO₄ 1,0 e agar 15,0. O meio foi esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após incubação a 30°C por 24 horas. As culturas foram mantidas a 4°C e repicadas a cada 30 dias.

Meio de fermentação: O meio empregado utilizou garapa diluída a 8 % (P/V) de Açúcares Totais (AT), extrato de levedura e asparagina nas seguintes concentrações (g/L): 1,0; 5,5 e 10,0 e os sais KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O foram nas mesmas concentrações do meio de preservação. Volumes de 25 mL foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de capacidade de 125 mL e esterilizados a 121°C por 20 minutos.

Planejamento fatorial para produção de asparaginase: Os experimentos foram realizados segundo os princípios da metodologia de superfície de resposta, tendo como variáveis as concentrações de extrato de levedura (E.L.) e asparagina (Asn) no meio de fermentação (Tabela 1). Foi utilizado delineamento fatorial completo 3² com uma repetição do ponto central, totalizando 10 experimentos (Tabela 2).

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis de variação utilizados.

Variáveis Originais	Níveis de variação		
	-1	0	+1
X ₁ – Concentração de extrato de levedura em (g/L)	1,0	5,5	10,0
X ₂ – Concentração de asparagina em (g/L)	1,0	5,5	10,0

Tabela 2. Delineamento fatorial completo 3² das variáveis codificadas e decodificadas.

Ensaio	X ₁	X ₂	E.L. (g/L)	Asn. (g/L)
1	-1	-1	1,0	1,0
2	-1	0	1,0	5,5
3	-1	1	1,0	10,0
4	0	-1	5,5	1,0
5	0	0	5,5	5,5
6	0	1	5,5	10,0
7	1	-1	10,0	1,0
8	1	0	10,0	5,5
9	1	1	10,0	10,0
10	0	0	5,5	5,5

Fermentações em batelada: Foi usado inóculo de concentração de células de 2,0 mg/mL e em quantidade de 10 % (v/v) do volume total de fermentação. Os frascos Erlenmeyers foram incubados a 30°C, sem agitação e sem controle de pH. Após 18 horas de incubação, a fermentação foi interrompida e a biomassa foi avaliada. O conteúdo dos frascos Erlenmeyers foi centrifugado a 9.005,8g, sob refrigeração (4°C) por 10 minutos para separação da biomassa e sobrenadante. No sobrenadante foi avaliada a concentração de A.T. e etanol. Na biomassa foi avaliada a atividade de asparaginase.

Determinação de biomassa: A biomassa foi avaliada em leituras a 605 nm e comparada com uma curva de calibração. A curva de calibração foi feita da seguinte maneira. Alíquotas de suspensão de biomassa foram submetidas à secagem, até peso constante, enquanto que outra alíquota, da mesma suspensão, foi submetida em diluições para a obtenção de leituras espectrofotométricas. Em seguida os valores correspondentes ao peso seco (mg/mL) e absorvância foram graficados.

Determinação de açúcares totais: Utilizou-se o método segundo Dubois et al. (1956). Foi usada

uma curva de calibração de sacarose, variando a concentração de 0 a 100 µg/mL. As leituras foram feitas em 490 nm.

Determinação de etanol: Utilizou-se o método de dosagem de etanol segundo Kaye e Haag (1954). O rendimento de fermentação foi calculado segundo a equação: $[(\text{Etanol}) / (0,511 \times \text{Açúcar consumido})] \times 100$, assumindo que $1 \text{ glicose} \rightarrow 2 \text{ Etanol} + 2 \text{ CO}_2$

Determinação de asparaginase: A atividade de asparaginase foi determinada de acordo com Imada et al. (1973). O centrifugado de células era ressuspense em 1,0 mL de tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,6 e 1,0 mL de asparagina 0,01 M, a 37°C por 30 minutos. A reação era interrompida adicionando-se 0,1 mL de ácido tricloroacético 1,5 M. A amônia liberada foi determinada pelo Método de Nessler, colocando 0,5 mL do clarificado centrifugado da reação em 7,0 mL de água bidestilada e 1,0 mL do Reagente de Nessler a temperatura ambiente por 10 minutos, realizando leitura em 480 nm. O branco usado foi uma amostra com tempo de reação de zero minuto. A concentração de amônia foi determinada com base em uma curva de calibração construída

com solução de sulfato de amônio. Uma unidade de asparaginase (U) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µMol de amônia por minuto.

Resultados e Discussão

Zymomonas mobilis foi cultivada em garapa diluída na concentração de açúcares totais de 78,48 g/L. O consumo de açúcar variou de 84 a 90 % e a produção de etanol atingiu valores teóricos de 66,3 a 98,8 %. Os valores elevados de consumo de açúcar e produção de etanol indicam que a fermentação foi completa, com alta atividade metabólica do microrganismo nas condições testadas.

A asparaginase é obtida industrialmente pelo cultivo de *Escherichia coli*. Entretanto, outros microrganismos também têm sido considerados como potenciais produtores desta enzima. Recentemente *Zymomonas mobilis* vem sendo estudada em fermentações objetivando a produção de asparaginase. Galani, Drainas e Typas (1985) foram os pioneiros em relatar a presença de asparaginase em fermentações conduzidas por *Zymomonas mobilis*. Esses autores relataram que a maior atividade de asparaginase foi obtida quando o meio

de cultura continha asparagina. O interesse da asparaginase de *Zymomonas mobilis* foi retomado mais recentemente quando Abud et al. (2003) relataram estudos de produção em meio de glicose e asparagina. A atividade enzimática obtida foi de 4,6 U asparaginase/g células.

Camílios Neto (2005) e Camílios Neto, Buzato e Borsato (2006) otimizaram as condições de cultivo utilizando delineamento fatorial na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*. Foi usado melaço diluído a 10 % de Açúcares Redutores Totais acrescido de extrato de levedura e asparagina. Os resultados obtidos indicaram que o extrato de levedura mesmo na concentração mínima de 2,0 g/L estava em excesso. Entretanto a adição de asparagina ao meio de fermentação aumentou a atividade de asparaginase. O maior valor obtido de asparaginase foi de 19,90 U/L quando se usou extrato de levedura em 2,0 g/L, na presença de asparagina (variável discreta) e em 21 horas de fermentação.

Este trabalho avaliou produção de asparaginase na fermentação da garapa, no qual foi otimizado, o efeito do extrato de levedura e de asparagina através de metodologia de superfície de resposta. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3 e Figura 1.

Tabela 3. Valores finais de biomassa, açúcar consumido, rendimento de fermentação e atividade de asparaginase na fermentação da garapa por *Zymomonas mobilis* CP4.

Ensaio	Biomassa (g/L)	Açúcar consumido (%)	Rendimento de fermentação (%)	asparaginase (U/L)
1	0,91	86	70,45	5,75
2	0,87	89	95,69	5,75
3	0,79	84	86,56	6,00
4	1,00	88	99,20	9,75
5	0,98	90	76,40	7,25
6	0,93	90	66,30	7,25
7	0,94	89	98,80	5,50
8	0,72	90	90,00	5,75
9	0,74	87	83,40	2,00
10	0,98	86	98,10	7,75

Os valores apresentados na Tabela 1 foram analisados pela metodologia de superfície de resposta (programa computacional STATÍSTICA 7.1) e obteve-se a seguinte equação: $Y = 3,90817 +$

$1,7948X_1 + 0,24537 X_2 - 0,1543 X_1^2 - 0,0185 X_2^2 - 0,0463 X_1X_2$; onde: Y = atividade de asparaginase; X_1 = concentração de extrato de levedura; X_2 = concentração de asparagina. A análise estatística

mostrou que a variável X_1 como a interação X_1 e X_2 foram significativas e a variável asparagina (X_2) não foi significativa ($p < 0,5$). A otimização da equação preditiva utilizando o aplicativo OPGRAD, mostrou que a melhor condição para produção de asparaginase foi a que utilizou concentração de extrato de levedura 5,5 g/L e concentração de asparagina de 1,0 g/L, obtendo-se uma produção de 9,75 U/L. A figura de superfície de resposta (Figura 1) ilustra o efeito do extrato de levedura e da asparagina no meio de cultivo para a produção de asparaginase.

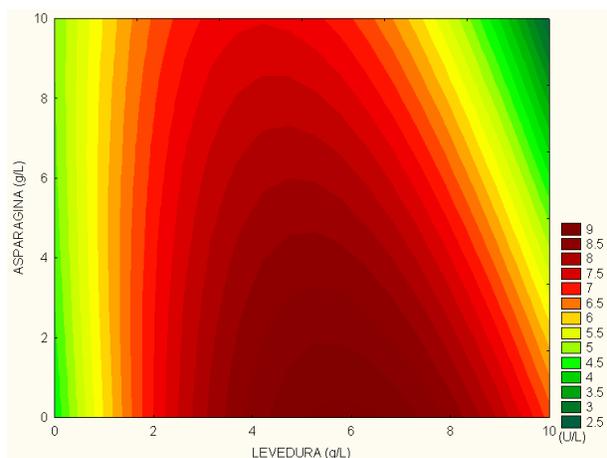


Figura 1. Superfície de resposta para a produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4

Embora a garapa seja um substrato rico e constitui excelente meio para crescimento de microrganismos, Camilios Neto (2005) e Camilios Neto, Buzato e Borsato (2006) obtiveram valores mais elevados de asparaginase na fermentação do melaço. Considerando que a composição do melaço seja pobre em vitaminas e outros fatores de crescimento, e além de apresentar fatores de inibição como sais em excesso (principalmente de potássio e cloreto), o melaço estimularia a expressão enzimática de microrganismo melhor adaptado, explicando os nossos resultados.

Conclusão

Entre as condições testadas, a melhor produção de asparaginase de 9,75 U/L, ocorreu quando em presença de extrato de levedura a 5,5 g/L e de

asparagina a 1,0 g/L. A variação de extrato de levedura foi significativa para produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4 na fermentação de garapa.

Agradecimentos

Doumit Camilios Neto, Gilcelene Bruzon e Robson Alessandro Mattos Machado agradecem o apoio financeiro cedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

Referências

- ABUD, A. K. S.; CARNEIRO, C. C.; ALVES, T. L. M.; PINTO, J. C.; PINHEIRO, I. O. Estudo da cinética da produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: UFSC, 2003. CD-ROM.
- ABUD, A. K. S.; PINTO, J. C.; ALVES, T. L. Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da enzima asparaginase por *Zymomonas mobilis*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005, Recife. *Anais...* Recife: UFPe, 2005. CD-ROM.
- BORSANI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. F. Influence of carbon source and fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by surface response method. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n.3, p.604-609, 2006.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. *Empirical model-building and response surfaces*. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- CAMILIOS NETO, D. *L-asparaginase de Zymomonas mobilis na fermentação de melaço: otimização das condições de cultivo utilizando delineamento fatorial*. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- CAMILIOS NETO, D.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design. *Acta Scientiarum: Technology*, Maringá, v.28, n.2, p.151-153, 2006.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.; SILVA, R. S. F. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, London, v.40, n.2, p.747-751, 2005.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS, M. A. Growth requirements and establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.7, p.673-679, 1985.
- HUERTAZ-DÍAZ, H.; CACHO, C. L.; BERNARD, L. Fermentation of sugarcane juice and blackstrap molasses by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, Rio Piedras, v.75, n.1, p.43-50, 1991.
- IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Journal of General Microbiology*, Great Britain, v.76, n.1, p.85-99, 1973.
- KAYE, S.; HAAG, H. B. Determination of alcohol content. *Journal Forensic Medicine*, Cape Town, v.4, n.1, p.373, 1954.
- MORAIS, J. O. F.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.31, n.1, p.75-91, 1993.
- PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; LAKSHMI, G. S.; SARMA, P. N. L-Asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.102, n. 5, p.1382-1391, 2007
- RHEE, S. K.; PAGAN, R. J.; LEFEBVRE, M.; WONG, L.; ROGERS, P. L. Ethanol production from desalted molasses using *Saccharomyces uvarum* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation Technology*, Osaka, v.62, n.3, p.297-300, 1984.
- SILVEIRA, M. M.; WISBERCK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L.; BERTASSO, M. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, n.75, p.99-103, 1999.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.34, n.3, p.242-244, 2003.
- VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry*, London, v.41, n.1, p.240-243, 2006.
- VUUREN, H. J. J.; MEYER, L. Production of ethanol from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v.4, n.4, p.253-256, 1982.