



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GILCELENE BRUZON

**PRODUÇÃO DE GLUTAMINASE POR *Zymomonas mobilis*  
CP4 NA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE UTILIZANDO  
FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS**

---

Londrina  
2006

**GILCELENE BRUZON**

**PRODUÇÃO DE GLUTAMINASE POR *Zymomonas mobilis*  
CP4 NA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE UTILIZANDO  
FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato

Londrina  
2006

**GILCELENE BRUZON**

**PRODUÇÃO DE GLUTAMINASE POR *Zymomonas mobilis*  
CP4 NA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE UTILIZANDO  
FERRAMENTAS ESTATISTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. João Batista Buzato

---

Profa. Dra Maria Antônia P. C. Celligoi

---

Profa. Dra Márcia Luciana Cazetta

Londrina, 28 de julho de 2006

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais pelo amor, carinho e apoio;*

***“Não faz mal que seja pouco.....***

*O que importa é que o avanço de hoje seja  
maior que o de ontem;*

*Que nossos passos de amanhã sejam mais  
longos que os de hoje;*

*Que sejam humanistas de braços fortes em luta  
solidária com as pessoas deserdadas;*

*Que atuem agora e vivam o presente com a  
certeza de que neste exato instante está se  
erguendo o FUTURO!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter concedido a vida, a fé, a esperança e o amor.

Aos meus familiares pela compreensão e colaboração nos momentos difíceis.  
Pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Orientador João Buzato pela paciência, confiança e direcionamento.

Aos professores Dionízio Borsato e Vandir Medri pelas orientações estatísticas.

A todos os professores: por sempre estarem dispostos a ajudar, incentivando-nos através de suas histórias de vida.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelo apoio e amizade.

A todos os alunos do mestrado em Biotecnologia, pela amizade, pelos “infortúnios”, pelo radinho que alegrou nossos dias e pelos momentos de descontração fora da Universidade.

Às companheiras de república Elaine e Aline, pela amizade, companheirismo por seus conselhos e por emprestarem seus ombros nos momentos de dificuldade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

BRUZON, Gilcelene. **Produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* CP4 na fermentação de glicose utilizando ferramentas estatísticas.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2006.

## RESUMO

A glutaminase é utilizada na indústria como intensificadora de sabor, aroma e para o enriquecimento nutricional dos alimentos. Além disto, possui potencial aplicação farmacêutica podendo ser utilizada na produção de theanina e como agente anti-leucêmico. A bactéria *Zymomonas mobilis* é encontrada em regiões de clima tropical e tem sido estudada para a produção de etanol. Devido a ausência de relatos na literatura a respeito da produção de glutaminase por este microrganismo, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer os fatores de influência para o crescimento de *Z. mobilis* e a sua relação com a produção de glutaminase utilizando ferramentas estatísticas. Através da análise de variância em blocos e teste de Tukey constatou-se a importância dos componentes do meio de cultivo, da ausência de agitação e do tempo de fermentação. Na otimização foi usado meio mínimo variando a concentração de glicose (10, 30, e 50g/L), glutamina (0, 0,5 e 1g/L) e o tempo de cultivo (18, 24 e 30 horas). Obteve-se uma produção máxima de 8,86 U/L de glutaminase. Na cinética de crescimento utilizou-se as condições otimizadas, onde observou-se crescimento tipicamente exponencial. A produção de glutaminase mostrou estar relacionada com a produção de biomassa.

**Palavras-chave:** *Zymomonas mobilis*. Glutaminase. Superfície de resposta.

BRUZON, Gilcelene. **Glutaminase production for *Zymomonas mobilis* CP4 in the glucose fermentation using statistical tools.** 2006. 71f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina 2006.

## ABSTRACT

The enzyme glutaminase is used in the industry as flavor-enhancing and for the nutritional enrichment of food. Besides, its pharmaceutical potential application could be used in both theanine production and as anti-leukemic agent. The bacterium *Zymomonas mobilis* is found in regions of tropical climate and it has been studied for ethanol production. Conditions of cultivation (stillness, shaking and fermentation time) and medium composition (presence and absence of component) for glutaminase production by *Zymomonas mobilis* CP4 using statistical analysis have been carried out. Variance analysis in blocks and test of Tukey showed that components of the medium of cultivation, stillness and time of fermentation were important. In the minimum medium optimization was used glucose (10, 30, and 50g/L), glutamine (0, 0,5 and 1g/L) and time of fermentation (18, 24 and 30 hours). A maximum production of 8,86 U/L of glutaminase was obtained. Glutaminase production Kinetics by *Zymomonas mobilis* CP4 under optimized conditions showed a typically like-exponential growth. The glutaminase production showed to be related with the biomass production.

**Keyword:** *Zymomonas mobilis*. Glutaminase. Response surface methodology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Transformação da glutamina em glutamato e amônia.....15
- Figura 3** – Metabolismo de carboidratos em *Zymomonas mobilis*.....23
- Figura 1 (Artigo)** – Gráfico de Parity mostrando os valores preditos *versus* obtidos de atividade de glutaminase .....61
- Figura 2 (Artigo)** – Contorno da Superfície de Resposta relacionando do tempo e concentração de glutamina para produção de glutaminase (concentração constante de glicose 30 g/L).....61
- Figura 3 (Artigo)** – Cinética da produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* em glicose 30,07 g/L e glutamina 0,723 g/L.....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Leveduras indicadas na literatura como produtoras de glutaminase ...	16
<b>Tabela 2</b> – Fungos indicados na literatura como produtores de glutaminase .....	16
<b>Tabela 3</b> – Bactérias indicadas na literatura como produtoras de glutaminase ....	17
<b>Tabela 4</b> – Composição do meio de preservação .....	30
<b>Tabela 5</b> – Composição do meio para pré inoculo .....	31
<b>Tabela 6</b> – Composição do meio de fermentação para a testar a influência dos componentes no meio de cultivo em fermentação estática e agitada. Concentrações fixas de glicose (30 g/L) e pantotenato (5 mg/L) em todos os meios .....	32
<b>Tabela 7</b> – Composição do meio de fermentação para otimização da produção de glutaminase .....	33
<b>Tabela 8</b> – Variáveis independentes no planejamento experimental .....	34
<b>Tabela 9</b> – Delineamento da matrix central para três variáveis independentes ...	34
<b>Tabela 10</b> – Composição do meio de cultivo para o teste de cinética .....	35
<b>Tabela 1 (Artigo)</b> – Variáveis independentes no planejamento experimental .....	58
<b>Tabela 2 (Artigo)</b> – Delineamento da matrix central para três variáveis independentes .....	58

**Tabela 3 (Artigo)** – Efeito da ausência de componentes no meio de cultivo e das condições de cultivo na produção de glutaminase (U/L) ....59

**Tabela 4 (Artigo)** – Resultados da análise estatística para produção de glutaminase.....59

**Tabela 5 (Artigo)** – Resultados da interação entre os tratamentos – Teste de Tukey .....59

**Tabela 6 (Artigo)** – Valores experimentais para produção de glutaminase.....60

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1 GLUTAMINASE .....	15
3.1.1 Glutaminase em microrganismos .....	16
3.1.2 Produção de glutaminase por microrganismos .....	17
3.1.2.1 Processos fermentativos e efeito indutivo da glutamina e inibição por aminoácidos .....	18
3.1.2.2 Efeito da concentração de sais, temperatura e pH para produção de glutaminase .....	19
3.1.3 Glutaminase em Alimentos.....	20
3.1.4 Atividade Antileucêmica .....	21
3.2 <i>ZYMOMONAS MOBILIS</i> .....	22
3.2.1 Fatores que afetam o crescimento do microrganismo.....	24
3.2.1.1 Fonte de carbono .....	24
3.2.1.2 Fonte de nitrogênio.....	25
3.2.1.3 Demais componentes do meio de cultivo .....	25
3.2.1.4 Agitação .....	26
3.2.1.5 pH.....	26
3.2.1.6 Temperatura.....	26
3.2.1.7 Tempo de cultivo .....	27
3.3 SUPERFÍCIE DE RESPOSTA .....	28
3.4 MÉTODO GRADIENTE DE OTIMIZAÇÃO .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30

4.1 MICRORGANISMO .....	30
4.2 MEIO DE CULTIVO .....	30
4.2.1 Meio de preservação .....	30
4.2.2 Meio para obtenção do inóculo .....	31
4.3 PROCESSO FERMENTATIVO .....	31
4.3.1 Influência dos componentes do meio de cultivo em fermentação estática e agitada .....	32
4.3.2 Otimização da produção de glutaminase em cultivo estático .....	33
4.3.2.1 Delineamento Fatorial .....	34
4.3.3 Cinética do crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> utilizando as condições otimizadas .....	35
4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	36
4.4.1 Determinação da Atividade de Glutaminase .....	36
4.4.2 Determinação da Biomassa .....	37
4.4.3 Determinação da concentração de glicose.....	37
4.4.4 Determinação de Etanol .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>ARTIGO – Produção de glutaminase por <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 utilizando ferramentas estatísticas .....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A – Normas para submissão do Artigo Científico para: Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.....</b>	<b>63</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A glutaminase, também conhecida como L-glutamina amidohidrolase (E.C 3.5.1.2), é uma enzima amplamente distribuída na natureza presente em diversos microrganismos como *Debaryomyces ssp*, *Aspergillus oryzae* e *Micrococcus luteus*.

Por ser tolerante ao sal e ao calor, a glutaminase possui importante aplicação na indústria, podendo ser utilizada para auxiliar no realce de sabor e aroma dos alimentos, colaborando para síntese do ácido glutâmico e diminuição da produção do ácido piroglutâmico na fabricação do molho de soja.

Adicionalmente é uma enzima que possui potencial de aplicação terapêutica como agente anti-leucêmico pois, sendo responsável pela degradação da glutamina, possibilita a morte seletiva das células dependentes deste aminoácido. Pode também ser utilizada para obtenção de theanina, um componente do chá verde japonês, que colabora com o aumento do efeito de agentes antitumorais e auxilia no combate a hipertensão.

A produção biotecnológica de glutaminase através de processos fermentativos tornou-se interessante devido ao baixo custo. A aplicação de instrumentos estatísticos para otimização da produção utilizando planejamento experimental também tem proporcionado a redução de custos, permitindo a execução de um número reduzido de ensaios e a avaliação das interações entre os fatores analisados.

A bactéria *Zymomonas mobilis* encontrada em regiões de clima tropical foi descoberta na década de 70 como eficiente produtora de etanol, sendo capaz de utilizar glicose, frutose e sacarose como fontes de energia. Trata-se de um microrganismo anaeróbio facultativo que teve seu comportamento estudado quando na produção de etanol, levana, sorbitol, ácido glucônico e asparaginase.

Na literatura não há relatos a respeito da produção de glutaminase por *Z. mobilis*. Assim, para relacionar o metabolismo deste microrganismo e a produção de glutaminase são necessários estudos a respeito da utilização dos constituintes do meio de cultivo e das condições aplicadas no processo fermentativo. O presente trabalho procurou avaliar através de instrumentos estatísticos a interação dos constituintes do meio de cultivo, os fatores que mais influenciaram para obtenção da enzima e a relação do crescimento do microrganismo com a produção de glutaminase.

## **2 OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

- Analisar a partir de instrumentos estatísticos a produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* CP4.

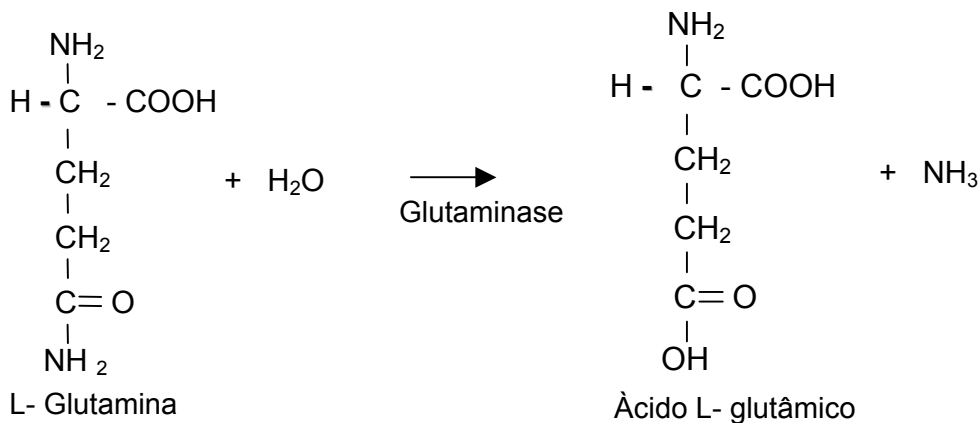
### ***2.2 Objetivos específicos***

- Verificar a influência dos constituintes do meio de cultivo, tempo de fermentação e agitação na produção de glutaminase.
- Otimizar a produção de glutaminase através da metodologia de superfície de resposta aplicando o método do Gradiente.
- Fazer um estudo cinético do crescimento do microrganismo, relacionando-o a produção da enzima, etanol e consumo de açúcar.
- Quantificar: glutaminase, etanol, açúcares redutores e biomassa.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Glutaminase

L-Glutaminase (L-glutamino amidohidrolase EC 3.5.1.2) é a enzima responsável pela hidrólise de L-glutamina para ácido L -glutâmico e amônia (Figura 1) (NANDAKUMAR *et al.*, 2003) estando presente inclusive em nosso organismo. A glutaminase existente na mitocôndria do neurônio produz o glutamato, um neurotransmissor excitatório amplamente distribuído no sistema nervoso central, que é reciclado nos neurônios e nas células gliais, sendo novamente transformado em glutamina, a qual retorna para o neurônio. No organismo humano, parte da glutamina liberada através da desaminação é armazenada como reserva circulante de nitrogênio, podendo cedê-lo para uma série de compostos ou liberá-lo para a urina. Nos tubos renais está presente a glutaminase que hidroliza o nitrogênio amídico liberando amônia para urina.



**Figura 1** – Transformação da glutamina em glutamato e amônia

A família das amidohidrolases, que catalisam a desaminação da glutamina, é composta de duas classes. A primeira classe apresenta glutaminase com grande especificidade, capaz de hidrolisar glutamina para ácido glutâmico. A

segunda classe contém algumas enzimas menos específicas, que hidrolisam tanto glutamina, quanto asparagina, com semelhante eficiência (NANDAKUMAR *et al.*, 2003).

### 3.1.1 Glutaminase em microrganismos

A glutaminase pode ser encontrada nos animais, nas plantas e microrganismos; nestes últimos, estão incluídas as leveduras, os fungos e as bactérias. Nas tabelas 1, 2 e 3 (NANDAKUMAR *et al.*, 2003) estão demonstrados os principais microrganismos, nos quais a atividade de glutaminase foi relatada.

**Tabela 1** – Leveduras indicadas na literatura como produtoras de glutaminase

<b>Leveduras</b>		
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>	<i>Hansenula</i>
<i>Candida scottii</i>	<i>Debaryomyces sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Cryptococcus nadaensis</i>		

**Tabela 2** – Fungos indicados na literatura como produtores de glutaminase

<b>Fungos</b>		
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Tilachlidium humicola</i>	<i>Verticillium malthousei</i>
<i>Beauveria sp.</i>		

**Tabela 3** – Bactérias indicadas na literatura como produtoras de glutaminase

<b>Bactérias</b>		
<i>Acetobacter liquefaciens</i>	<i>Corynebacterium equi</i>	<i>Pseudomonas ovalis</i>
<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas schuyllkilliensis</i>
<i>Acinetobacter glutaminasificans</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhizobium etli</i>
<i>Aeromonas hidrophila</i>	<i>Flavobacterium flavescens</i>	<i>Rhodopseudomonas sphseroides</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Micrococcus glutamicus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Micrococcus lysodeikiticus</i>	<i>Spirillum lunatum</i>
<i>Azotobacter agilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Nocardia sp.</i>	<i>Streptomyces californicus</i>
<i>Bacillus flavum</i>	<i>Proteus marganii</i>	<i>Streptomyces netropsis</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Pseudomonas aurantica</i>	<i>Vibrio costicola</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	<i>Xanthomonas juglandis</i>
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	<i>Pseudomonas boreoplois</i>	
<i>Clostridium welchii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	

De todos os microrganismos listados nas tabelas acima, apenas uma minoria apresenta glutaminase extracelular, como é o caso do *A. oryzae*, *P. fluorescens*, *V. costicola*, *V. cholerae*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Debaryomyces sp.* e *Beauveria sp.* Nos outros microrganismos prevalece a enzima intracelular (NANDAKUMAR *et al.*, 2003). Porém Yano *et al.* (1988) utilizando fermentação em batelada, verificaram a existência de glutaminase intra e extracelular em *A. oryzae*, sendo a primeira de maior atividade na forma nativa e a segunda de maior atividade quando purificada.

### 3.1.2 Produção de glutaminase por microrganismos

#### 3.1.2.1 Processos fermentativos, efeito indutivo da glutamina e inibição por aminoácidos.

Várias são as técnicas de fermentação que podem ser empregadas para produção de glutaminase, dentre elas estão fermentação em batelada, batelada alimentada e contínua e fermentação em estado sólido. Em todas estas técnicas há relatos sobre o efeito indutivo da glutamina para a produção desta enzima.

Alguns pesquisadores como Sabu *et al.* (2000) além de utilizar fermentação em meio líquido, testaram a produção de glutaminase por fermentação em meio sólido, adicionando glicose 0,5% (p/v) como fonte de carbono e glutamina a 0,25% (p/v) como fonte de nitrogênio, a partir de *Beauveria sp.* Após otimização do processo, obtiveram máxima produção de enzima (49,89 U/mL) estabelecendo que a glutamina teve papel indutor, estando diretamente associada ao crescimento microbiano. Kashyap *et al.* (2002) utilizando resíduos agro-industriais e *Zygosaccharomyces rouxii* em fermentação em estado sólido verificaram que não havia necessidade de adição de glutamina ou fontes de nitrogênio para estimular a produção da enzima.

Ziadé *et al.* (2003) diferentemente de Kashyap *et al.* (2002) utilizando *Lactobacillus rhamnosus* e glutamina como agente indutor testaram diferentes tempos de fermentação e verificaram a existência de três fases. Na primeira fase que foi de 0-6 horas observaram indução, porém a formação dos produtos foi muito baixa. Na segunda fase de 6-9 horas (fase exponencial de crescimento) houve diminuição do pH em 0,5 a 0,7 unidade e a amônia começou a ser liberada, servindo de tampão para o sistema. Já na terceira fase, após 9 horas de fermentação, houve aumento de pH de 0,3 a 0,5 unidade e a glutaminase foi detectada.

Kumar e Chandrasekaran (2003) produziram glutaminase em fermentação contínua utilizando células de *Pseudomonas sp* imobilizadas em gel de

alginate de cálcio, tendo uma produção máxima de 36,05 U/mL em meio contendo 2% de glutamina (p/v).

Pinheiro (2001) verificou que o crescimento de *Z. mobilis* foi inibido quando o aminoácido asparagina estava presente no meio de cultivo em concentração acima de 0,5 g/L.

### **3.1.2.2 Efeito da concentração de sais, temperatura e pH para a produção de glutaminase**

Alguns pesquisadores, além de utilizarem diferentes processos fermentativos, realizaram testes para verificar o comportamento da enzima em meios contendo elevada concentração de sais, submetidos a diferentes temperaturas e valores de pH .

Nandakumar *et al.* (2003) relataram casos em que a glutaminase é sal-tolerante e casos em que é inibida pelo mesmo. A glutaminase de *A. oryzae*, utilizada na fermentação do molho de soja, apresentou inibição quando exposta a elevadas concentrações de sais. Porém, glutaminase excretada por microrganismos marinhos, como *M. luteus* e *B. subtilis*, toleram uma concentração de 16 e 25%(p/v) de NaCl respectivamente.

Quanto à temperatura, a glutaminase de *A. oryzae* possui atividade ótima entre 37-45°C, enquanto a glutaminase de *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *M. luteus* apresentam maior atividade a 50°C (NANDAKUMAR *et al.*, 2003).

Muitas glutaminases apresentam grande instabilidade, fato observado por Durá *et al.* (2004), que a partir de suas pesquisas constataram uma redução de 25% da enzima ativa quando variado o pH de 7,5 para 8,5. Neste estudo verificaram também um aumento da estabilidade da enzima após redução do pH para 5,5.

### 3.1.3 Glutaminase em Alimentos

Nakadai e Nasuno (1989) apresentaram três métodos para aumentar a quantidade de ácido glutâmico no alimento: tratamento ácido, aplicação de glutaminase de *C. albidus* e adição de peptidoglutaminase de *B. circulans* e propuseram um quarto método: adição de glutaminase de *Aspergillus* ou *C. albidus*, o qual resultou em aumento de 42% de ácido glutâmico e redução de 38% do ácido piroglutâmico no final da fermentação do molho de soja.

*A. oryzae* é tradicionalmente utilizado na fermentação Koji por secretar uma grande variedade de proteases e peptidases. Na fermentação do molho de soja, o ácido glutâmico e a glutamina são formados a partir de peptídeos pela ação de peptidases e a glutamina é então convertida em ácido glutâmico pela ação da glutaminase. Na ausência da glutaminase a maioria da glutamina liberada pelos peptídeos é quimicamente e irreversivelmente convertida em ácido piroglutâmico que não apresenta sabor (NANDAKUMAR *et al.*, 2003).

A glutaminase acaba contribuindo não somente para melhorar o sabor, mas também para enriquecer nutricionalmente o alimento (KASHYAP *et al.*, 2002) permitindo que o molho de soja possa substituir o uso de glutamato monossódico, considerado alérgico para algumas pessoas (NANDAKUMAR *et al.*, 2003).

Uma outra aplicação da glutaminase é a sua adição no processo de cura da lingüiça. Durá *et al.* (2004) obtiveram glutaminase a partir de *Debaryomyces sp* e estudaram os efeitos dos agentes de cura em relação à estabilidade da enzima. Observaram que sais de potássio e cloreto de sódio diminuem a estabilidade, reduzindo a meia vida da enzima e que nitrito, nitrato e glicose não alteram significativamente a atividade. Porém, o aumento de ácido ascórbico ocasionou uma diminuição da atividade. Além disto, foi constatado que a adição destes agentes na fermentação deve ser feita no início enquanto o pH estiver em 6 a 5,5, pois a diminuição do pH também prejudica a atividade da enzima.

Nandakumar *et al.* (2003) relataram a possibilidade da utilização de glutaminase para obtenção de theanina, um componente do chá verde japonês que aumenta o efeito de agentes anti-tumorais e apresenta-se como agente que combate à hipertensão. Um método para produção de theanina testado por Abelian *et al.* (1993), utiliza glutaminase de *Pseudomonas nitroreducens* em mistura contendo glutamina e etilamina, formando 47 g/L de theanina em um período de 7 horas em temperatura de 30 °C.

#### **3.1.4 Atividade Antileucêmica**

Kallinowski *et al.* (1987) relataram que a glutamina é necessária para as células do tumor em concentração superior a 0,5 mM, constituindo substrato energético para estas células e alta taxa de proliferação (BULUS *et al.*, 1989). Estudos apontaram que combinada com outra enzima como a asparaginase, a glutaminase pode ser utilizada em tratamento de câncer, especialmente leucemia (NANDAKUMAR *et al.*, 2003).

Além da glicose, a célula do tumor utiliza glutamina em grande quantidade, pois fornecem ATP para a rápida proliferação de células malignas, sendo a glutamina o maior substrato oxidativo tanto em tumores como em células normais de mamíferos. A progressão maligna pode não ser influenciada somente por características genéticas e instabilidade da transformação fenotípica, mas também por pequenas modificações que podem ocorrer em muitos estágios de desenvolvimento do tumor (SANTOS *et al.* 2004).

### 3.2 *Zymomonas mobilis*

*Z. mobilis* é uma bactéria gram negativa, de 2 a 6 µm de comprimento por 1 a 4 µm de largura, que ocorre geralmente em pares e sem formação de esporos (WENDT *et al.*, 2002). É uma bactéria anaeróbia facultativa (SWINGS e DELEY, 1977) encontrada no meio ambiente em regiões de clima tropical, normalmente associada com plantas de alto teor de açúcares nas seivas (CONWAY *et al.*, 1992). Descoberta na década de 70, como eficiente produtora de etanol, é capaz de utilizar glicose, frutose e sacarose como fonte de energia (DOELLE, *et al.* 1993).

Uma pequena produção de biomassa é normalmente observada em *Z. mobilis*, cujo crescimento celular e fermentação não são vinculados. Isto ocorre porque este microrganismo utiliza a via de Entner-Doudoroff para catabolismo do carbono e produz somente 1 mol de ATP por mol de glicose consumido (CONWAY *et al.*, 1992). (Figura 2)

Trata-se de uma potencial produtora de etanol (Ruanglek *et al.*, 2006), sorbitol (Vignoli *et al.*, 2006) e levana (Kang *et al.*, 2006). O etanol é obtido a partir da última reação da via fermentativa pela redução reversível do acetaldeído catalisado pela isoenzima álcool desidrogenase (SREEKUMAR *et al.* 1999). Lee e Huang (2000) testaram um modelo matemático para produção de etanol utilizando *Z. mobilis* em meio contendo glicose e frutose (20 g/L), obtendo 0,45 g/g de etanol quando em concentração de 20 g/L de frutose. Tao *et al.* (2005) utilizaram uma cepa de *Z. mobilis* tolerante à acidez em condição de não esterilização, obtendo uma produção de etanol de 0,488 g/g.

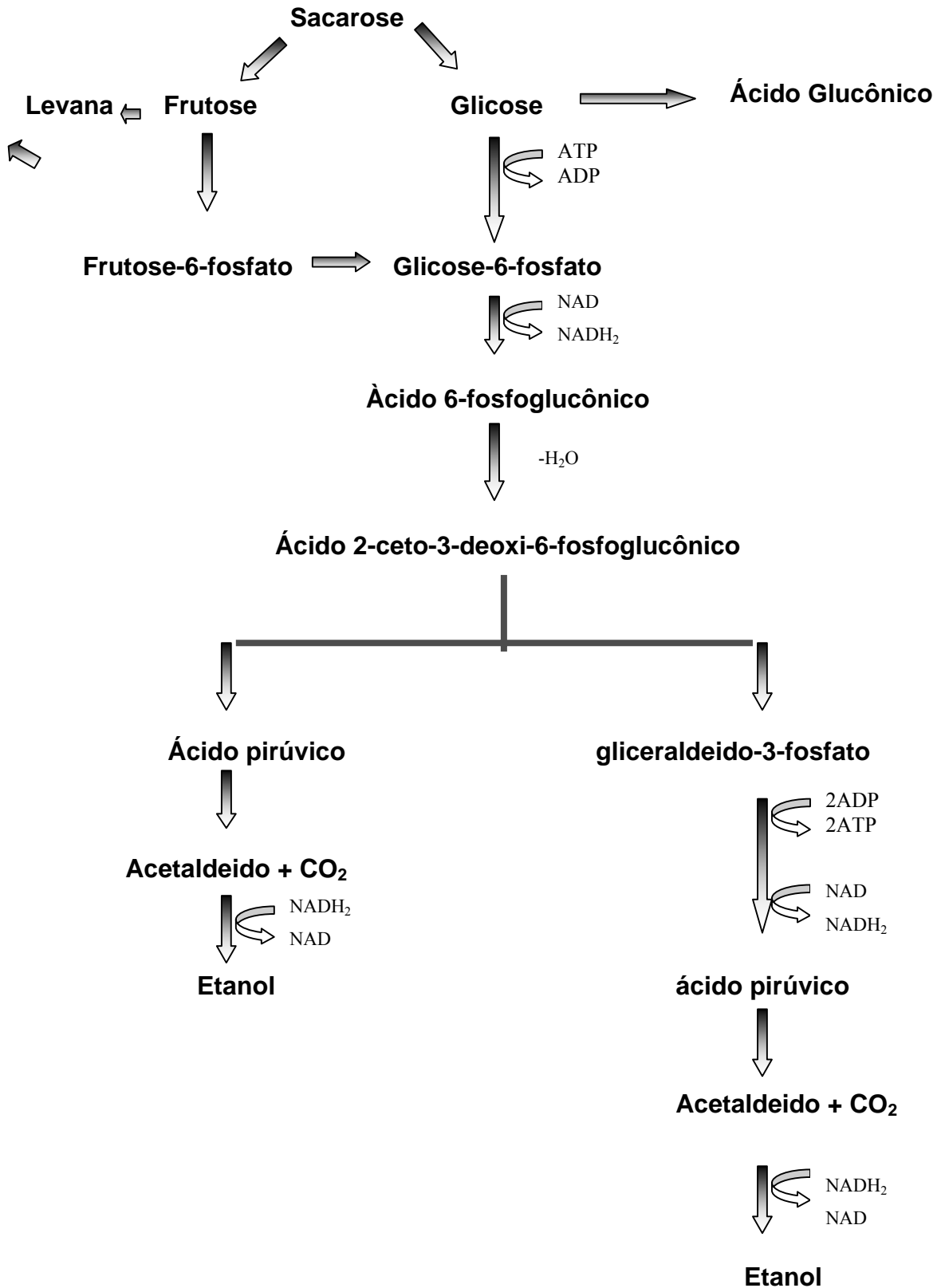


Figura 2 – Metabolismo de carboidratos em *Zymomonas mobilis*

O sorbitol é sintetizado a partir de frutose e glicose, por uma reação catalisada por glicose-frutose oxidoreductase (SPRINGER apud CAZETTA *et al.*, 2005). Para produção de sorbitol, também foi desenvolvido um modelo estatístico, utilizando células livres e imobilizadas de *Z. mobilis* (VIGNOLI *et al.* 2006) obtendo uma produção de sorbitol de 25 g/L com células livres e 50 g/L com células imobilizadas.

A levana, um homopolissacarídeo, produzido extracelularmente a partir de sacarose e rafinose, vem sendo utilizada como agente anti-tumoral, material para cosméticos e componentes para alimentação animal (WENDT *et al.*, 2002). Estudos feitos por Calazans *et al.* (2000) mostraram que a atividade antitumoral depende do peso molecular do polissacarídeo e que a classe específica deste peso molecular pode ser responsável por este efeito.

Outros produtos têm sido obtidos a partir desde microrganismo, tais como ácido glicônico (FERRAZ *et al.*, 2000) e asparaginase (ABUD, 2003, 2004 e CAMILIOS NETO, 2004).

### **3.2.1 Fatores que afetam o crescimento do microrganismo**

#### **3.2.1.1 Fonte de carbono**

O efeito da concentração inicial de glicose já é estudado há vários anos. King e Hossain (1982) verificaram que concentração inicial de glicose acima de 10% (p/v) já provoca inibição do crescimento e diminui a produção de etanol.

Galani *et al.* (1985) utilizando fermentação em batelada, testaram concentrações de 2, 10 e 20% (p/v) de glicose e constatou que *Z. mobilis* apresentou maior crescimento e produção de proteínas quando em 2% de glicose. Assim, pode-se observar que o aumento da concentração de glicose resulta em

diminuição do crescimento do microrganismo além de ocasionar o aumento do tempo de fermentação (SREEKUMAR *et al.*, 1999).

### **3.2.1.2 Fonte de nitrogênio**

Galani *et al.* (1985) relataram que  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , são as melhores fontes de nitrogênio quando se trata de *Z. mobilis*. Em seus estudos, fizeram uma comparação entre meio mínimo e meio complexo, tendo estes várias combinações de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. O melhor resultado foi obtido quando utilizado meio contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ , os aminoácidos cisteína, serina, treonina, nicotinamida e pantotenato de cálcio. Galani *et al.* (1985) sugerem que glutaminase e asparaginase estão envolvidas na assimilação do nitrogênio, sendo produzidas quando asparagina, aspartato, glutamina e glutamato são utilizadas como fonte de nitrogênio.

### **3.2.1.3 Demais componentes do meio de cultivo**

O uso de extrato de levedura para suplementação do meio de cultivo fornece a vitamina pantotenato de cálcio, aumentando o crescimento das células. Porém para a produção de etanol, não é necessária a adição deste suplemento (BARATTI *et al.*, 1986). A inclusão de sais específicos na presença de sacarose pode limitar a formação de alguns produtos, como sorbitol e levana, favorecendo a formação de etanol. A presença de cloretos pode fazer com que a produção de biomassa seja diminuída, favorecendo a formação de levana. Em baixas concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a formação de biomassa é estimulada, favorecendo a produção de etanol e inibindo a formação de outros produtos (KIRK e DOELLE, 1992).

#### **3.2.1.4– Agitação**

*Z. mobilis* tem seu crescimento limitado quando exposta a vigorosa agitação, diminuindo o consumo de glicose e produção de etanol com conseqüente aumento da biomassa (SREEKUMAR *et al.*, 1999). Quando em contato com dióxido de carbono, também apresenta alterações de crescimento (TOMA *et al.*, 2003).

#### **3.2.1.5 pH**

Cromie e Doelle (1981) verificaram uma taxa satisfatória de crescimento de *Z. mobilis* quando em pH entre 5 e 5,5. Em testes executados posteriormente, King e Hossain (1982) observaram um bom desenvolvimento do microrganismo em pH 7, porém neste pH, a produção de etanol foi diminuída.

Lawford e Ruggiero (1990) demonstraram que o crescimento do microrganismo associado ao metabolismo produz uma maior quantidade de etanol quando em pH entre 4 e 4,5.

#### **3.2.1.6 Temperatura**

King and Hossain (1982) relataram que a melhor temperatura para o crescimento de *Z. mobilis* era 34°C, porém consideraram 37°C a temperatura para máxima fermentação. Diferentemente, autores como Galani *et al.* (1985) realizaram seus experimentos a 30°C e verificaram que nesta temperatura o microrganismo apresenta ótimo crescimento.

### **3.2.1.7 Tempo de cultivo**

Galani *et al.* (1985), também relataram em seus estudos que a fermentação de glicose a 2% (p/v) ocorre em 22 horas enquanto em glicose a 10 e 20% (p/v), o tempo de fermentação é aumentado para 66 horas. Desta forma, não é necessário mais que um dia para o desenvolvimento do microrganismo quando se executa fermentação utilizando baixa concentração de glicose.

### 3.3 Superfície de resposta

Em processos biotecnológicos, inúmeros fatores podem influenciar a fermentação, aumentando a produção do metabólito de interesse ou diminuindo a liberação de produtos indesejáveis. Diversos trabalhos têm aplicado a técnica de Superfície de Resposta como ferramenta para otimização das condições de cultivo, determinando valores ótimos de pH, temperatura, aeração, concentração de substrato entre outros.

A metodologia da superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas utilizadas para otimização, a qual tornou-se popular devido sua teoria completa, eficiência e simplicidade (BOX & DRAPER, 1987). O modelo segundo Box & Behnken (1960), é um modelo que consiste na repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental e no conjunto de pontos situados nos pontos médios de cada extremidade de um cubo multidimensional que define a região de interesse. Serve também para estimar a variância do erro (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Este método facilita o processo de otimização devido ao reduzido número de ensaios a serem executados e permite avaliar a interação entre as variáveis analisadas.

Trata-se de um modelo metodológico empírico que relaciona um grupo de variáveis que podem ser controladas experimentalmente. Tem sido aplicado em pesquisas relacionadas a alimentos e para otimização de processos fermentativos (KALIL *et al.*, 2000 e BANDARU *et al.*, 2006).

Para otimização dos componentes do meio de cultivo, Sreekumar *et al.* (1999) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para estudar a produção de etanol por *Z. mobilis*. Selecionaram cinco fatores: Glicose (5-25 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-4 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0-4g/L), extrato de levedura (0-10g/L) e concentração do inoculo  $\log_{10}$  (6-10) células viáveis, obtendo melhor produção de etanol (7,63 g/L) em: 120,4g/L de glicose, 0,96 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,5 g/L de extrato de levedura e concentração do inoculo de  $\log_{10}$  8,4 células. Observaram também que excesso de nitrogênio aumenta a biomassa e diminui a produção de etanol.

### 3.4 Método Gradiente de Otimização

O método Gradiente é um modelo de otimização de busca indireta e faz uso de derivadas para determinar a direção da busca do ótimo. A otimização consiste na derivada parcial da função objetivo (função resposta) em relação as variáveis independentes em um determinado ponto inicial, dando origem à uma matriz gradiente . Através dessa matriz é calculada a direção do ótimo (CARNEIRO *et al.* 2005).

Para a otimização das funções objetivo utilizou-se o programa computacional OTGRAD, desenvolvido em linguagem Fortran, que apresenta uma seqüência de entrada de dados, que são fornecidos pelo usuário, como: número de variáveis independentes com seu limite superior e inferior, número de variáveis dependentes com seus respectivos limites superior e inferior, variáveis que se deseja maximizar ou minimizar ou, ainda, escolher um valor alvo para a otimização (CARNEIRO *et al.*, 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, cedida pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho” – UNESP - Rio Claro

### 4.2 Meio de Cultivo

#### 4.2.1 Meio de preservação

A composição do meio de preservação está indicada na Tabela 4. Os componentes foram preparados para 25 mL em frasco Erlenmeyer de 125 mL, autoclavados a 121°C por 20 minutos. O meio estéril foi transferido para placas de Petri, onde o microrganismo foi repicado. As células foram conservadas em câmara fria a 4°C, e as culturas renovadas a cada 30 dias.

**Tabela 4** – Composição do meio de preservação

<b>Composição</b>	<b>Concentração-(g/L)</b>
Sacarose	100
Extrato de levedura	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1
Agar	20

#### 4.2.2 Meio para obtenção do pré-inóculo

Para obtenção do inóculo foi selecionado o meio de cultura mínimo segundo Galani *et al.* (1985). Os componentes utilizados para a obtenção do inóculo estão indicados na Tabela 5. Os componentes foram preparados para 25 mL em frascos Erlenmeyer de 250 mL, autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Uma porção da bactéria foi transferida para os frascos, permanecendo por 24 horas em condição estática a 30 °C. Após este tempo, o meio foi centrifugado a 9050 x g a 5°C por 15 minutos e as células tiveram a concentração ajustada para 0,2 g/L.

**Tabela 5 – Composição do meio para pré inóculo**

<b>Composição</b>	<b>Concentração – (g/L)</b>
Glicose	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
Pantotenato de cálcio	5 (mg/L)

#### 4.3 Processo Fermentativo

O processo fermentativo foi dividido em três etapas. Na primeira etapa foi testada a influência dos componentes do meio de cultivo em condição estática e de agitação sobre a produção da enzima. Na segunda etapa, através do processo fermentativo de batelada e utilização da metodologia de superfície de resposta, foram determinados: a melhor concentração da fonte de carbono, de glutamina e o melhor tempo de fermentação para a produção de glutaminase. Na terceira etapa, foi feito um acompanhamento cinético do crescimento do microrganismo e produção de glutaminase. Os meios utilizados em todos os

experimentos do processo fermentativo foram selecionados de acordo com a composição de meio mínimo, proposta por Galani *et al.* (1985), com adição de alguns componentes para testes específicos.

#### 4.3.1 Influência dos componentes no meio de cultivo em fermentação estática e agitada

Foram preparados 6 diferentes meios para este teste, os quais foram submetidos a incubação estática e agitada. Os componentes do meio de fermentação, exceto o pantotenato de cálcio (esterilizado por filtração), foram preparados para 25 mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL e autoclavados a 121°C por 20 minutos. A composição de cada um dos meios está apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6** – Composição dos meios de fermentação para testar a influência dos componentes no meio de cultivo em fermentação estática e agitada. Concentrações fixas de glicose (30g/L) e pantotenato (5mg/L) em todos os meios.

Componentes							
Meio	Glicose	Pantotenato (5 mg/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 g/L)	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (0,5 g/L)	Glutamina (0,5 g/L)
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	+
3	+	+	+	-	+	+	+
4	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	+	+	-

Foram inoculadas 0,2 g/L de células em cada frasco Erlenmeyer, em seguida foram incubados na condição estática em estufa a 30 °C e sob agitação em

mesa agitadora a 150rpm e 30°C, por tempos de 18 e 24 horas. Após a fermentação, o meio foi centrifugado a 9050 x g a uma temperatura de 5°C por 15 minutos para separar a biomassa do sobrenadante. Em seguida foram realizadas as determinações analíticas, sendo executado o teste de variância em blocos e o teste de Tukey através do programa Estatística (STATSOFT, 2005).

#### 4.3.2 Otimização da produção de glutaminase em cultivo estático

Os componentes do meio de fermentação, exceto o pantotenato de cálcio, foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, em volumes de 25 mL e em seguida autoclavados a 121°C por 20 minutos. A composição deste meio está demonstrada na Tabela 7.

**Tabela 7** – Composição do meio de fermentação para otimização da produção de glutaminase.

Composição	Concentração – (g/L)
Glicose	10, 30 e 50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
Pantotenato de cálcio	5 mg/L
Glutamina	0, 0,5 e 1

Foi inoculada 0,2 g/L de células em cada frasco Erlenmeyer. Os frascos foram incubados em condição estática a 30 °C pelos tempos determinados a partir do delineamento fatorial.

### 4.3.2.1 Delineamento fatorial

Foi utilizada a metodologia estatística de superfície de resposta. Açúcar  $X_1$  (g/L), tempo  $X_2$  (h) e glutamina  $X_3$  (g/L), foram utilizadas como variáveis independentes como apresentado na Tabela 8 e 9. A atividade de glutaminase (U/L) foi usada como variável dependente.

**Tabela 8** : Variáveis independentes no planejamento experimental

Variáveis	Níveis codificados		
	1	0	+1
Glicose $X_1$ (g/L)	10	30	50
Tempo $X_2$ (h)	18	24	30
glutamina $X_3$ (g/L)	0	0,5	1

**Tabela 9**: Delineamento da matrix central para três variáveis independentes (valores mostrados na Tabela 8).

Ensaio no.	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Após a fermentação, o meio foi centrifugado em 9050 x g a uma temperatura de 5°C por 15 minutos para separar a biomassa do sobrenadante. Em seguida foram realizadas as determinações analíticas. Os resultados foram analisados pelos programas Statistica e otimizados pelo OTGRAD.

#### 4.3.3 Cinética do crescimento de *Zymomonas mobilis* utilizando as condições otimizadas.

Foi conduzido um acompanhamento cinético de crescimento do microrganismo em triplicata nas condições otimizadas. Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio (Tabela 10). Todos os componentes do meio de fermentação, exceto o pantotenato de cálcio (esterilizado por filtração) foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Para tanto foi inoculada 0,2 g/L de células em cada um dos frascos. Em seguida os mesmos foram incubados em condição estática a 30°C e as amostras foram coletadas nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 horas.

Cada amostra coletada foi centrifugada em 9050 x g a uma temperatura de 5°C por 15 minutos para separar a biomassa do sobrenadante e em seguida foram realizadas as determinações analíticas.

**Tabela 10:** Composição do meio de cultivo para o teste de cinética

Composição	Concentração – (g/L)
Glicose	30,07
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,5
Pantotenato de cálcio	5 mg/L
Glutamina	0,73

## 4.4 Determinações analíticas

### 4.4.1 Determinação da Atividade de glutaminase

A atividade enzimática foi medida segundo Imada *et al.* (1973). Para esta determinação foi utilizado o precipitado obtido pela centrifugação, re-suspendido com 0,9 mL de solução salina (0,85%) para a obtenção de uma solução de biomassa. Em seguida em outro tubo, foram acrescentados: 0,1 mL da solução preparada anteriormente, 1 mL de glutamina (0,04 M), 0,9 mL de tampão borato 0,1 M (pH 8,5), incubado a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 1,5 M e este preparado foi centrifugado em 6238 x g por 20 minutos.

Em outro tubo, foram acrescentados 4,5 mL de água destilada, 0,5 mL do sobrenadante da reação anterior e 0,1 mL de Reagente de Nessler. Após 15 minutos, com o aparecimento de coloração, foi feita leitura em espectrofotômetro a 400 nm. Os testes foram realizados em triplicata e os controles feitos utilizando branco de enzima e de substrato.

O resultado foi expresso em U/L (a unidade de volume refere ao volume de fermentado, portanto os 25mL), considerando uma unidade de glutaminase como a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{m}$  de amônia por minuto a 37°C em pH 8,5 (tampão borato 0,1 M). A amônia liberada, foi determinada pelo método de Nessler, a partir de uma curva padrão, utilizando sulfato de amônia em concentrações entre 2,5 a 20  $\mu\text{g/mL}$ , com posteriores leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm.

#### **4.4.2 Determinação da Biomassa**

Para realização desta determinação foi utilizada a solução de biomassa preparada anteriormente, diluída conforme a necessidade. A biomassa foi estimada por turbidimetria em 605 nm, e a concentração de células expressa em g/L.

#### **4.4.3 Determinação da concentração de glicose**

Sendo o meio de cultivo constituído por glicose, foi feita a determinação da concentração de glicose pelo método de Somogyi – Nelson (1945). Para execução deste método, utilizou-se uma curva de calibração que apresentou diferentes concentrações de glicose, construída a partir de um padrão de glicose (10 a 100 µg/mL).

Foi medida a concentração de glicose inicial, a concentração antes de acrescentar o inóculo no meio de cultivo e após o termino da fermentação. Neste último caso, foi utilizado o sobrenadante obtido pela centrifugação.

#### **4.4.4 Determinação da concentração de Etanol**

Para determinação de etanol foi utilizado o método titulométrico, que consiste na oxidação de etanol a ácido acético quando em contato com dicromato de potássio em meio sulfúrico a quente. O excesso de dicromato de potássio presente foi determinado por titulação com sulfato ferroso amoniacal, tendo orto-fenantrolina como indicador. Para a análise também foi preparado um branco, o qual possui apenas água destilada. A partir da diferença de volume de sulfato ferroso amoniacal, foi calculada a concentração de etanol em g/L presente na amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de artigo, intitulado “Produção de Glutaminase por *Zymomonas mobilis* CP4 utilizando ferramentas estatísticas”.

O artigo foi elaborado segundo normas da revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, as quais estão apresentadas no Anexo A.

## 6 CONCLUSÕES

Verificou-se que os componentes do meio de cultivo não exercem influência significativa quando utilizados em baixas concentrações. Porém, a ausência de agitação e o tempo de cultivo auxiliam diretamente a produção de glutaminase.

Na otimização, verificou-se que utilizando o meio mínimo, a melhor concentração de glicose foi 30,0731 g/L, no melhor tempo de fermentação de 24:11 horas e a melhor concentração de glutamina 0,723 resultando em uma atividade de glutaminase de 8,86 U/L.

A bactéria *Zymomonas mobilis* apresentou crescimento tipicamente exponencial em meio definido de crescimento com produção de glutaminase diretamente relacionada ao crescimento do microrganismo e produção de etanol.

## 7 REFERÊNCIAS

ABELIAN, V. H.; OKUBO, T.; MUTOH, K.; CHU, D. C.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. A continuous production method for theanine by immobilized *Pseudomonas nitroreducens* cells. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 76, n.3, p. 195-198, 1993

ABUD, A.K.S; ALVES, T.L.M. e PINTO, J.C. Produção de Asparaginase por *Zymomonas mobilis*. Anais do Colóquio Anual de Engenharia Química. Seropédica - Rio de Janeiro, 2003.

ABUD, A.K.S; ALVES, T.L.M. e PINTO, J.C. Avaliação da qualidade do processo de produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*. Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEC), Curitiba, 2004.

BANDARU, V. V. R.; SOMALANKA, S. R.; MENDU, D. R.; MADICHERLA, N. R.; CHITYALA, A. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sargo starch by co-immobilized amiloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 38, p. 209-214, 2006.

BARATTI, J.; VARMA, R.; BU'LOCK, J. D. High productivity ethanol fermentation on mineral medium using a flocculent strain of *Zymomonas Mobilis*. **Biotechnology Letters**. v. 8, n. 3, p. 175-180, 1986.

BOX, G.E. P.; BEHNKEN, D.W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v.2, p. 455-475, 1960.

BOX, G.E.; DRAPER, N.R. Empirical Model-Building and response surfaces. New York: John Wiley & Sons, 1987.

BULLUS, N.; CERSOSIMO, E.; GHISHAN, F.; ABUMRAD N. W. Physiologic importance of glutamine metabolism. **Metabolism**, v. 38, n.8, p. 1-5, 1989.

CALADO, V.; MONTEGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o estatística**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**. n. 27, p. 245-247, 2000.

CAMILIOS NETO, D. ; BUZATO, J. B. ; BORSATO, D. *Zymomonas mobilis* e a fermentação de melão para a produção de asparaginase.. In: VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2004, Rio de Janeiro. Anais do VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática p. 101-101, 2004

CARNEIRO, R. L.; SILVA, R.S.S.F.; BORSATO, D.; BONA, E. Métodos de gradiente para otimização simultânea: estudo de casos de sistemas alimentares. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v.26, n.3, p.351-360, 2005.

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**. V.40, n.2, p. 747-751, 2005

CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 1-28, 1992

CROMIE, S.; DOELLE, H.W. Nutritional effects on the kinetics of ethanol production from glucose by *Zymomonas mobilis*. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**. n. 11, p. 116-119, 1981.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, H.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, p.57-98, 1993.

DEIÚ, P. H. ; DARCY-VRILLON, B.; BLACHIER, F.; MOREL, M. T. Fuel selection in intestinal cells. **Proceed Nutritional Society**. n.54 p.83-94, 1995.

DURÁ, M. A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces spp*. **Food Chemistry**. n. 86 p. 385-389, 2004

FERRAZ, H. C.; ALVES, T. L. M.; BORGES, C. P. Síntese enzimática de sorbitol e ácido glicônico com separação simultânea por eletrodialise. Trabalho apresentado no XIII COBEC – Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Águas de São Pedro-SP, 2000.

GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS M.A. Growth requirements and the stabilishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**. v. 7 n.9 p.673-678, 1985

IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K., ISONO, M., Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**., Great Britain, n.76, p. 85-99, 1973.

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**. n. 35, p.539-550, 2000.

KALLINOWSKI, F.; RUNKEL, S.; FOTMEYER, HP. FORSTER, H.; VAUPEL, P. L- glutaminase a major substrate for tumor cells in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 113, n. 3, p. 209-215, 1987

Kang, A. S.; Hong, K.; Jang, K.; Kim Y. Y.; Choue, R.; Lim, Y. Altered m-RNA expression of hepatic hipogenic enzyme and PPAR $\alpha$  in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. **Journal of nutritional Biochemistry**. n.17, p. 419-426, 2006

KASHYAP, P., SABU, A., PANDEY, A., G., SOCCOL, C.R. Extra-celular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid state fermentation. **Process Biochemistry**. n. 38, p.307-312, 2002.

KING, G. F.; HOSSAIN, M. A. The effect of temperature, pH and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. **Biotechnology Letters**. v.4, n.8, p.531-536, 1982.

KIRK, L. A.; DOELLE, H. W. The effects of potassium and chloride ions on the ethanolic fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis* 2716. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n. 37, p. 88-93, 1992.

KUMAR, S.R.; CHANDRASEKARAN, M. Continuous production of L-glutaminase by na imobilized marine *Pseudomonas sp* BTMS-51 in a packed bed reactor. **Process Biochemistry**. n.15, p.1431-1436, 2003.

LAWFORD, H. G., RUGGIERO, A. Production of fuel alcohol by *Zymomonas*. Effect of pH on maintenance and growth-associated metabolism. **Biotechnology and Applied Biochemistry** n. 12, p.206-211, 1990

LEE, W.; HUANG, C. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. **Biochemical Engineering Journal**. n.4, p. 217-227, 2000

NAKADAY, T.; NASUNO, S. Use of glutaminase for soy sauce made by *Koji* or a preparation of proteases from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 67, n. 158-162, 1989.

NANDAKUMAR, R.; YOSHIMUNE, K.; WAKAYAMA, M.; MORIGUCHI, M. Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.23, p.87-100, 2003

NELSON, N. A Photometric Adaptation of glucose. **Journal of Biology and Chemistry**, n.160, p.611, 1945.

PINHEIRO, I. O. Fermentações de *Zymomonas mobilis* em meio mínimo usando asparagina como fonte de nitrogênio. Tese de Doutorado. PEQ/COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro- RJ 144p. Brasil, 2001

Ruanglek, V.; Maneewatthana, D.; Tripetchkul, S. Evaluation of thai agro industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**. n. 41, p. 1432-1437, 2006

SABU, A., KEERTHI, T.R., KUMAR, S. R., CHANDRASCKARAN. L-Glutaminase production by marine *Beauveria sp*. Under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, n.35, p.705-710, 2000.

SANTOS, M. A.; BORGES, J.B.R.; ALMEIDA, D. C. G.; CURI, R. Metabolism of the microregions of human breast cancer. **Cancer Letters**. p. 1-6, 2004.

Somogy, M. A., A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**. V. 160, p. 61-68, 1945

SREEKUMAR, O.; CHAND N.; BASAPPA, S. C. Optimization and Interaction of Media Components in Ethanol Production Using *Zymomonas mobilis* by Response Surface Methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, n. 3, p. 334-338, 1999.

TAO, F.; MIAO, J. Y.; ZHng, K. C. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. **Process Biochemistry**. n.40, p. 183-187, 2005.

TODAR, K. **The diversity of metabolism in prokaryotes**. Disponível em: <[textbookofbacteriology.net/metabolism.htm](http://textbookofbacteriology.net/metabolism.htm)> Acesso em: 06 de jan. de 2006.

TOMA, M. M. ; KALNENIEKS, U.; BERZINS A.; VIGANTS A.; RIKMANIS M.; VIESTURS U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**. n.38, p.1347-1350, 2003.

SWINGS, J.; DELEY, J. Biology of *Zymomonas*. *Journal Bacteriological Reviews*. n.41, p.1-46, 1977

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and imobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa Cylindrica*. **Process Biochemistry**, n. 41, p. 240-243, 2006

WENDT, R. Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – Campinas -SP, 2002 76p

YANO, T.; ITO, M.; TOMITA, K.; KUMAGAI, H.; TOCHKURA, T. Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of fermentation and Technology**, v.66, n. 2, p. 137-143, 1988.

ZIADÉ, A. W.; DÉCOMBAZ, C.G.; AFFOLTER, M. Functional characterization of a salt-and thermotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*. **Enzyme and Microbial technology**. n. 32, p.862-867, 2003

## ARTIGO

Produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* CP4 utilizando ferramentas estatísticas.

## **Produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* CP4 utilizando ferramentas estatísticas**

Gilcelene Bruzon, João Batista Buzato, Maria Antônia P. C. Celligoi

Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, caixa postal 6001, 86051-990 Londrina, Estado do Paraná, Brasil

Email: [buzato@uel.br](mailto:buzato@uel.br)

Fone: (43) 33714270 – Fax: (43) 33284216

### **Resumo**

A glutaminase é utilizada na indústria como intensificadora de sabor, aroma e para o enriquecimento nutricional dos alimentos. Além disto, possui potencial aplicação farmacêutica podendo ser utilizada na produção de theanina e como agente anti-leucêmico. A bactéria *Zymomonas mobilis* é encontrada em regiões de clima tropical e tem sido estudada para a produção de etanol. Devido a ausência de relatos na literatura a respeito da produção de glutaminase por este microrganismo, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer os fatores de influência para o crescimento de *Z. mobilis* e a sua relação com a produção de glutaminase utilizando ferramentas estatísticas. Através da análise de variância em blocos e teste de Tukey constatou-se a importância dos componentes do meio de cultivo, da ausência de agitação e do tempo de fermentação. Na otimização foi usado meio mínimo variando a concentração de glicose (10, 30, e 50g/L), glutamina (0, 0,5 e 1g/L) e o tempo de cultivo (18, 24 e 30 horas). Obteve-se uma produção máxima de 8,86 U/L de glutaminase. Na cinética de crescimento utilizou-se as condições otimizadas, onde observou-se crescimento tipicamente exponencial. A produção de glutaminase mostrou estar relacionada com a produção de biomassa.

**Palavras chave:** *Zymomonas mobilis*, glutaminase, superfície de resposta

## I- Introdução

A glutaminase também conhecida como L-glutamina amidohidrolase (E.C 3.5.1.2) é uma enzima amplamente distribuída na natureza encontrada em leveduras como *Debaryomyces ssp* [6], em fungos como *Aspergillus oryzae* [14] e em bactérias como *Micrococcus luteus* [24].

A glutaminase é tolerante ao sal e ao calor, importante para indústria de alimentos, podendo ser utilizada no realce de sabor e aroma, na elevação da síntese do ácido glutâmico que provoca a diminuição da produção do ácido piroglutâmico na fabricação do molho de soja shoyo [15] e no processo de cura de lingüiça [6].

Adicionalmente é uma enzima que possui potencial de aplicação médica como agente antileucêmico, pois sendo responsável pela degradação da glutamina, possibilita a morte seletiva das células dependentes deste aminoácido [18] e para obtenção de theanina, que colabora para o aumento do efeito de agentes antitumorais e auxilia no combate a hipertensão [1].

A bactéria *Zymomonas mobilis*, encontrada em regiões de clima tropical, é eficiente produtora de etanol, sendo capaz de utilizar glicose, frutose e sacarose como fontes de energia [22]. Trata-se de um microrganismo anaeróbio facultativo [21] extensivamente estudado para produção de etanol [17], levana [10] e sorbitol [25].

Há relatos de enzimas do metabolismo de nitrogênio produzidas por *Z. mobilis* [7], porém não há nenhuma informação a respeito da produção de glutaminase. O presente trabalho avaliou através da análise de variância em blocos e da metodologia de superfície de resposta a importância, as melhores concentrações dos constituintes do meio de cultivo e as condições de cultivo para produção de glutaminase por *Z. mobilis*.

A aplicação de planejamento experimental tem permitindo a execução de número reduzido de ensaios e avaliação das interações entre os fatores analisados [2, 9]

## II - Materiais e Métodos

**Microrganismo** : Foi utilizada a bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, mantida em meio de cultura contendo em g/L: sacarose 100, extrato de levedura 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1, ágar 20. As culturas foram mantidas a 4°C e renovadas a cada 30 dias.

### Condições de Cultivo

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio esterilizado. O inóculo utilizado foi de 0,2 g/L de células. A temperatura de incubação foi de 30°C.

Na primeira etapa de experimentos foi considerada a presença e ausência de cada um dos seguintes componentes (g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1; glutamina, 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1. Glicose (30g/L) e pantotenato (5 mg/L) foram mantidos em todos os testes. Os tempos de cultivo foram de 18 e 24 horas, submetidos à condição estática ou agitação (150 rpm). Os resultados foram submetidos a análise de variância em blocos e ao teste de Tukey.

Nos experimentos de otimização utilizou-se (g/L): glicose, 10, 30 e 50; glutamina, 0, 0,5 e 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 e pantotenato de cálcio, 5 mg/L. Os tempos de fermentação foram 18, 24 e 30 horas. Os resultados foram plotados no programa STATISTICA e OTGRAD.

Para cinética de fermentação utilizou-se os componentes em suas concentrações otimizadas.

Todos os experimentos foram executados em triplicata.

### Métodos analíticos

Os açúcares foram analisados pelo método de Somogy-Nelson [16, 20] e a biomassa foi determinada por turbidimetria a 605 nm. A atividade de glutaminase foi determinada de

acordo com Imada [8], considerando uma unidade de glutaminase, como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto a  $37^\circ\text{C}$  em pH 8,5 (0,1 M Tampão Borato), e a atividade de L-glutaminase foi apresentada em U/L.

### **Delineamento fatorial**

Foi utilizada a metodologia estatística de superfície de resposta. Concentração de Glicose  $X_1$  (g/L), tempo  $X_2$  (h) e glutamina  $X_3$  (g/L), foram utilizadas como variáveis independentes como apresentado na Tabela 1 e 2. A atividade de glutaminase (U/L) foi usada como variável dependente.

**Tabela 1.**

**Tabela 2.**

### **III - Resultados e Discussão**

Na primeira etapa de experimentos foi estudada a composição do meio mínimo, tempo e condição de cultivo (estático e agitação). Os resultados de glutaminase estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.**

O teste estatístico de análise de variância em blocos mostrou que todos os componentes utilizados têm importância para a produção de glutaminase por *Z. mobilis*. A concentração de glicose utilizada estava de acordo Galani *et al.* [7] que enfatizaram que o uso de concentrações elevadas de glicose pode inibir o crescimento do microrganismo e ocasionar aumento do tempo de fermentação. O pantotenato foi utilizado em substituição ao extrato de levedura, utilizado em meio complexo [3, 4].

As fontes de nitrogênio utilizadas foram orgânica e inorgânica. Swings e Deley [21] reportaram a importância de nitrogênio orgânico para o crescimento de *Z. mobilis*. Ziadé *et al.*

[26] verificaram que para elevar a atividade de glutaminase a glutamina deve estar presente no meio de cultivo e Galani *et al.*[7] verificaram que as melhores fontes de nitrogênio inorgânico foram o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e o  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , entretanto este último não foi utilizado por estimular a síntese de levana [12]. No presente estudo, a maior produção de glutaminase se deu quando as fontes orgânica e inorgânica estavam presentes no meio de cultivo.

O  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  foi adicionado devido a relatos sobre sua colaboração na estabilização do RNA e prolongamento da viabilidade celular [5]. Há também relatos que a presença de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  abaixo de 10g/L beneficia a fermentação e ajuda a tamponar o pH do meio [12].

Dos experimentos de composição do meio mínimo, tempo e condição de cultivo, procedeu-se a análise estatística com os valores de glutaminase obtidos. Os valores obtidos de efeito de interação p na análise de glutaminase estão mostrados na Tabela 4.

#### **Tabela 4.**

A tabela 4 mostra que houve interação significativa apenas entre os tratamentos (tempo, cultivo estático e agitação), pois  $p < 0,05$ . Não foi obtida resposta significativa quanto aos blocos (influência dos componentes no meio), pois  $p > 0,05$ . Isto pode ter ocorrido devido a utilização de apenas uma concentração para os componentes do meio. Assim, na ausência de interação, decidiu-se utilizar para ensaios posteriores o meio completo.

Como os tratamentos apresentaram-se significativos, aplicou-se o teste de Tukey para verificar a melhor interação entre os mesmos. Os resultados estão demonstrado na Tabela 5.

#### **Tabela 5.**

A partir deste teste, foi possível observar que houve interação entre os tratamentos 1 e 3, 1 e 4, 2 e 3, 2 e 4.

**1 e 3** –  $p < 0,01$  = Diferença estatística a nível de 1%

**1 e 4** –  $p < 0,05$  = Diferença estatística a nível de 5%

**2 e 3** –  $p < 0,01$  = Diferença estatística a nível de 1%

**2 e 4** –  $p < 0,01$  = Diferença estatística a nível de 1%

A melhor interação observada se deu entre os tratamentos 2 e 3 (sem agitação em tempo de 24 horas) onde  $p$  apresentou o menor valor (0,000295). Assim, a condição estática foi mantida para os demais experimentos.

O teste de Tukey mostrou que a condição estática e tempo de fermentação de 24 horas foram as melhores condições para o cultivo de *Z. mobilis* e produção de glutaminase.

### **Otimização da produção de glutaminase**

Baseando-se nos resultados dos testes da primeira etapa, notou-se que as variáveis, concentração de glicose, de glutamina e tempo de fermentação exerceram influência na produção de glutaminase. O método de otimização utilizado na segunda etapa permitiu a análise da interação entre as variáveis e selecionou as condições ótimas das mesmas. A matriz do delineamento experimental está mostrada nas Tabelas 1 e 2. Quinze experimentos foram executados utilizando diferentes combinações de variáveis. A partir dos resultados (Tabela 6) a equação obtida para glutaminase em função da concentração de glicose, de glutamina e do tempo de fermentação foi:

$$Y_1 = -53,9699 + 0,1022x_1 + 4,9235x_2 + 3,2438x_3 - 0,0016x_1^2 - 0,1017x_2^2 - 2,2157x_3^2$$

#### **Tabela 6.**

Através do gráfico de Parity (Figura 1) observou-se que há uma correlação satisfatória entre os valores experimentais e os valores preditos. Os pontos próximos à linha diagonal indicam um bom modelo, sendo pequena a diferença entre os valores experimentais e obtidos. Para este modelo, a falta de ajuste não foi significativa ( $p = 28,18\%$ ) indicando que ele pode ser utilizado para fins preditivos.

### Figura 1

Os valores da atividade de glutaminase foram plotados no programa Statistica, fixando-se a glicose em 30 g/L, já que este fator mostrou-se menos significativo dentre os fatores testados. O gráfico da região de combinação binária entre os fatores está apresentado na Figura 2.

### Figura 2

Para a otimização da equação preditiva originada pela superfície de resposta foi empregado o programa computacional Otgrad, utilizando o método Gradiente. A otimização (maximização) da resposta investigada, através do método Gradiente, apresentou  $X_1=30,0731$  g/L;  $X_2=24:11$  horas e  $X_3=0,723$  g/L tendo como resposta esperada de glutaminase 8,41 U/L. Para validar o modelo, foi conduzido o experimento com as variáveis independentes no ponto ótimo e obteve-se uma resposta de glutaminase de 8,86 U/L.

Relatos feitos por autores [6] utilizando *Debaromyces sp*, mostraram que a glicose não altera significativamente a atividade de glutaminase, isto pode ser verificado nos experimentos executados no presente trabalho, já que em algumas concentrações diferentes do açúcar, a quantidade de glutaminase não apresentou alterações significativas.

Pesquisas [7] sugeriram que a glutaminase somente é produzida quando na presença de aminoácidos no meio de cultivo, porém no delineamento estatístico deste trabalho, alguns meios de cultivo não continham glutamina em sua composição e ainda assim houve a produção de glutaminase. Isto ocorreu, pois no meio havia uma outra fonte de nitrogênio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , que proporcionou a formação de glutamina na célula.

Pela otimização confirmou-se que a presença de glutamina aumenta a quantidade de glutaminase fato que foi observado no experimento executado na primeira etapa. Verificou-se também, que a presença deste aminoácido promoveu melhoria no crescimento do microrganismo com aumento da produção de biomassa.

A glutamina é requerida como precursor para síntese de DNA e proteína [23]. A presença de glutamina exerceu o efeito de elevar a quantidade da enzima. A indução por aminoácidos na produção de glutaminase também pode ser observada por outros autores [13, 18, 26] quando utilizados diferentes microrganismos e métodos de fermentação.

A produção de glutaminase por *Z. mobilis* foi satisfatória se comparada com a produção testada por Keert *et al.* [11] que utilizaram *Beauveria bassiana* BTMF S10, isolada a partir de sedimentos marinhos, a qual apresentou máxima produção de glutaminase de 46,9 U/L (0,04 U/mL) após 108 horas de fermentação. Porém, pode ser considerada pequena quando comparada a estudos que utilizaram *Beauveria sp* [18], que obtiveram uma produção de glutaminase de 49,89 U/mL após 96 horas de fermentação em estado sólido. Ressalta-se o longo tempo de fermentação que foi três vezes maior que neste estudo.

### **Cinética do crescimento de *Zymomonas mobilis* utilizando as condições otimizadas.**

Em processos fermentativos, o metabólito final primário pode influenciar na obtenção do produto desejado ou no crescimento do microrganismo. A Figura 3 ilustra o acompanhamento cinético de cultivo, utilizando concentrações de glicose 30,07 g/L e de glutamina de 0,72 g/L estabelecidas como ótimas no teste de otimização.

#### **Figura 3**

A fase de adaptação do microrganismo se deu até 18 horas de cultivo, a partir deste período iniciou-se a fase exponencial de crescimento, que durou até o tempo de 24 horas de cultivo. Após este período, o crescimento cessou e houve declínio da biomassa.

A atividade de glutaminase estava presente desde o início da fermentação, mesmo na fase de adaptação do microrganismo. A produção máxima de 8,92 U/L ocorreu durante a fase

exponencial de crescimento em 24 horas de fermentação.

O consumo de glicose foi de aproximadamente 54%, dos quais 96,27% foram destinados para produção de etanol e 3,72% para produção de biomassa e outros metabólitos.

O pH inicial de 5,8 diminuiu para 3,9 e o etanol teve sua produção aumentada quando a glicose do meio sofreu declínio. Considera-se que a produção de etanol acompanha a atividade de glutaminase, isto sugere que o etanol produzido não interfere diretamente na produção da enzima.

#### **IV – Conclusões**

Todos os componentes do meio de cultivo utilizados neste experimento foram importantes para a produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis*. Deve-se dispensar a condição de agitação e utilizar tempo de fermentação de aproximadamente 24 horas.

Na otimização, verificou-se que utilizando o meio mínimo, a melhor concentração de glicose foi 30,0731 g/L, de glutamina 0,723 g/L no tempo de fermentação de 24:11 horas resultando em uma atividade de glutaminase de 8,86 U/L.

A bactéria *Zymomonas mobilis* apresentou crescimento tipicamente exponencial em meio definido de crescimento com produção de glutaminase diretamente relacionada ao crescimento do microrganismo e produção de etanol.

Aparentemente a produção de etanol não interferiu na produção de glutaminase.

#### **V - Agradecimentos**

À CAPES pelo apoio financeiro

## VI - Referências

1. Abelian V H., Okubo T, Mutoh K, Chu D C, Kim M, Yamamoto T A (1993)  
Continuous production method for theamine by immobilized *Pseudomonas nitroreducens* cells. J Ferm Bioeng 76:3: 195-198.
2. Bandaru V V R, Somalanka S R, Mendu D R, Madicherla N R, Chityala A (2006)  
Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sargo starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. Enzyme Microbiol Technol 38: 209-214.
3. Baratti J, Varma R, Bu'lock J D (1986) High productivity ethanol fermentation on a mineral medium using a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. Biotechnol Lett 8: 3: 175-180.
4. Belaich J P, Senez J C (1965) Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. J Bacteriol 8: 1195-1200
5. Dawes E A and Large P J. (1970) Effect of starvation on the viability and cellular constituents of *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. J Gen Microbiol 60: 31-42
6. Durá M A, Flores M; Toldrá F (2004). Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces spp.* Food Chem 86: 385-389

7. Galani I, Drainas C, Typas M A (1985) Growth requirements and the establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol Lett* 7:9: 673-678
8. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M, Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J Gen Microbiol Great Britain* 76: 85-99, 1973.
9. Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI (2000) Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Proc Biochem* 35:539-550.
10. Kang A S, Hong K, Jang K, Kim Y Y, Choue R, Lim Y (2006) Altered m-RNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR $\alpha$  in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *J Nutr Biochem* 17: 419-426
11. Keerthi TR, Suresh PV, Sabu A, Rajeevkumar S, Chandrasekaran M (1999) Extracellular production of l-glutaminase by alkalophilic *Beauveria bassiana* BTMF S10 isolated from marine sediment. *World J Microbiol Biotechnol* 15:751-752
12. Kirk LA, Doelle HW (1993) Rapid ethanol production from sucrose without by product formation. *Biotechnol Lett* 15: 9: 985-990
13. Kumar SR, Chandrasekaran M (2003) Continuous production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas* sp BTMS-51 in a packed bed reactor. *Proc Biochem* 15:1431-1436

14. Masuo N, Ito K, Yoshimune K, Hoshio M, Matsushima K, Koyama Y, Mariguchi M (2004) Molecular cloning, overexpression, and purification of *Micrococcus luteus* K-3-type glutaminase from *Aspergillus oryzae* RIB40. *Protein Express Purif* 38: 272-278
15. Nandakumar R, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M (2003) Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *J Mol Catb: Enzymatic* 23: 87–100
16. Nelson NA (1945) Photometric adaptation of glucose. *J Biol Chem* 160:611
17. Ruanglek V, Maneewathana D, Tripetchkul S (2006) Evaluation of thai agro industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Proc Biochem* 41: 1432-1437
18. Sabu A, Keerthi TR, Kumar S R, Chandrasckaran (2000) L-Glutaminase production by marine *Beauveria sp.* Undersolid state fermentation. *Proc Biochem* 35: 705-710, 2000.
19. Santos M A, Borges JBR, Almeida D C G, Curi R (2004) Metabolism of the microregions of human breast cancer. *Cancer Lett* 1: 1-6
20. Somogy M A (1945) A new reagent for determination of sugar. *J Biol Chem.* 160: 61-68
21. Swings J, Deley J (1977) Biology of *Zymomonas*. *J Bacteriol Review.* 41: 1-46

22. Toma M M, Kalnenieks U, Berzins A, Vigants A, Rikmanis M, Viesturs U (2003) The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. Proc Biochem. 38: 1347-1350
23. Tuner A, Mcgivan J (2003) Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. Biochem J 370: 403-408
24. Yoshimune K, Shirakihara Y, Shiatori A, Wakayama M, Chantawannakul P, Mariguchi M (2006) Cristal structure of a major fragment of the salt tolerant glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3. Biochem Bioph Res Comun. 346: 1118-1124
25. Vignoli J A, Celligoi M A P C, Silva R S F (2006) Development of a statistical model for sorbitol production by free and imobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa Cylindrica*. Proc Biochem. 41: 240-243
26. Ziadé A W, Décombaz CG, Affolter M (2003) Functional characterization of a salt-and thermotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*. Enzyme Microbiol Technol. 32: 862-867

## Tabelas

**Tabela 1:** Variáveis independentes no planejamento experimental

Variáveis	Níveis codificados		
	1	0	+1
<b>Glicose <math>X_1</math> (g/L)</b>	10	30	50
<b>Tempo <math>X_2</math> (h)</b>	18	24	30
<b>Glutamina <math>X_3</math> (g/L)</b>	0	0,5	1

**Tabela 2:** Delineamento da matrix central para três variáveis independentes (valores mostrados na Tabela 1).

Ensaio no.	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

**Tabela 3:** Efeito da ausência de componentes no meio mínimo e das condições de cultivo na produção de glutaminase (U/L)

Componente ausente	Condições de cultivo			
	18h		24h	
	Estático	Agitação	Estático	Agitação
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,69	2,83	6,95	6,63
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,89	3,38	7,87	5,93
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,25	4,56	8,44	5,36
MgSO <sub>4</sub>	5,45	4,91	6,12	8,13
Glutamina	3,47	4,91	5,39	5,74

**Tabela 4:** Resultados da Análise estatística para produção de glutaminase.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercepto	1127,413	1	1127,413	1015,932	0,000000
Tratamento	44,475	3	14,825	13,359	0,000042
Bloco	11,894	7	1,699	1,531	0,211006
Erro	23,304	21	1,110		

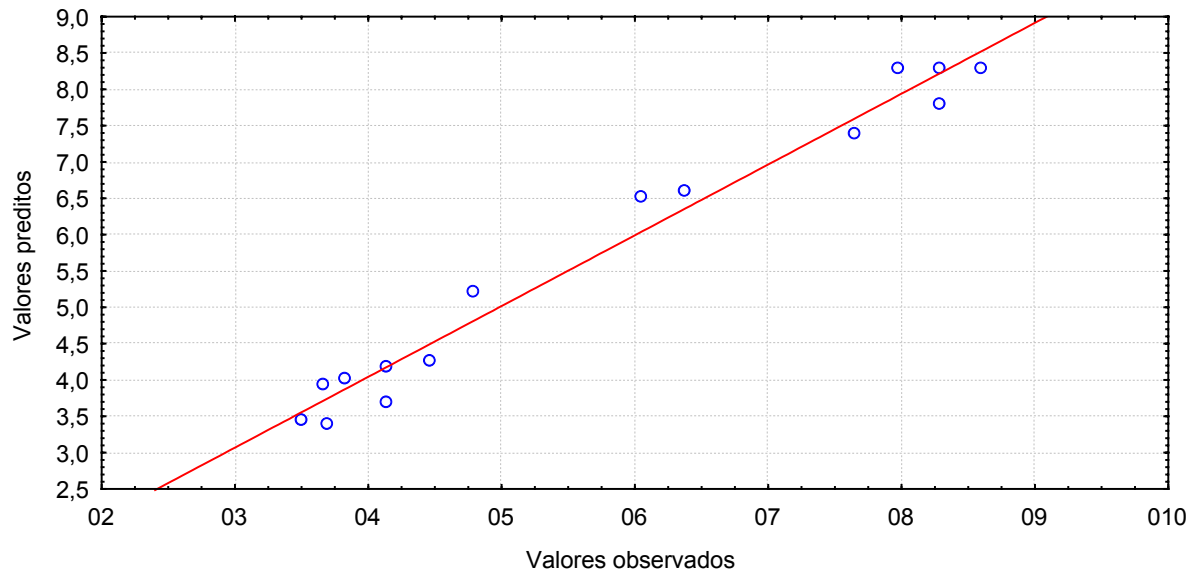
**Tabela 5:** Resultados da interação entre os tratamentos – Teste de Tukey.

Trat	Sem agitação (1)	Com agitação (2)	Sem agitação (3)	Com agitação (4)
(1) 18 h		0,960783	0,000569	0,018481
(2) 24 h	0,960783		0,000295	0,006204
(3) 18 h	0,000569	0,000295		0,385344
(4) 24h	0,018481	0,006204	0,385344	

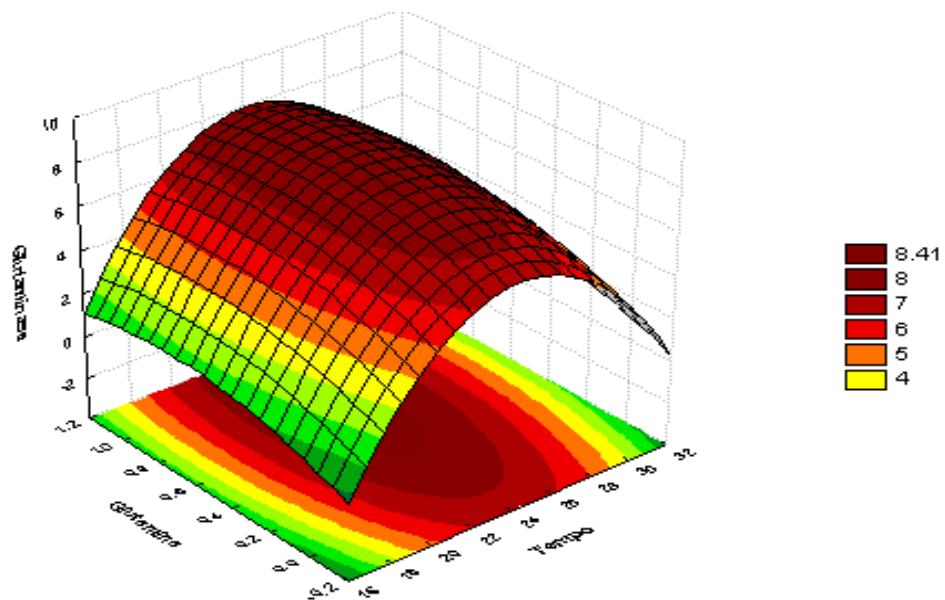
**Tabela 6:** Valores experimentais para produção de glutaminase.

<b>Ensaio no.</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Glutamina (g/L)</b>	<b>Glutaminase (U/L)</b>
1	10	18	0,5	3,50
2	50	18	0,5	3,82
3	10	30	0,5	4,46
4	50	30	0,5	4,14
5	10	24	0	6,05
6	50	24	0	6,37
7	10	24	1	7,65
8	50	24	1	8,28
9	30	18	0	4,14
10	30	30	0	3,69
11	30	18	1	3,66
12	30	30	1	4,78
13	30	24	0,5	8,28
14	30	24	0,5	7,97
15	30	24	0,5	8,60

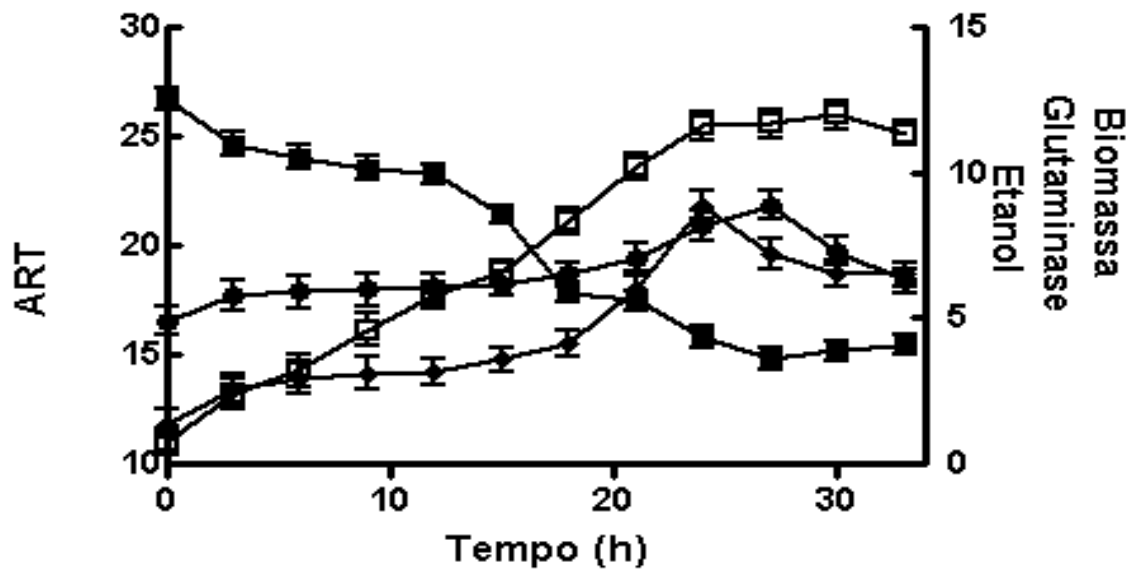
## Figuras



**Figura 1** – Gráfico de Parity mostrando os valores preditos *versus* obtidos de atividade de glutaminase



**Figura 2** – Contorno da superfície de resposta do tempo e glutamina para produção de glutaminase (concentração constante de glucose - 30 g/L)



**Figura 3** – Cinética da produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* em glicose 30,0731 g/L e de glutamina 0,723 g/L ●Biomassa (g/L.10), ◆Glutaminase (U/L), □ Etanol(g/L) e ■ Açúcares redutores totais - Consumo de Glicose durante o crescimento do microrganismo.

## **ANEXO A**

Normas para submissão do artigo para revista Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.



## **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**

Official Journal of the Society for Industrial Microbiology

Editor-in-Chief: J.J. Cooney

**ISSN: 1367-5435 (print version)**

**ISSN: 1476-5535 (electronic version)**

**Journal no. 10295**

**Springer Berlin Heidelberg**

### **Description**

The *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (JIM&B)* builds bridges between academia and industry whilst keeping you informed of the most important developments. On a truly international basis, *JIM&B* covers all aspects of the industrial applications of biotechnology, fermentation, environmental microbiology, biodegradation, biodeterioration, genomics, bioinformatics, quality control and other areas of applied microbiology.

A publication of the Society of Industrial Microbiology & Biotechnology.

**Impact factor:** 1.273 (2005)

Section "Biotechnology & applied microbiology": Rank 83 of 139

### **Abstracted/Indexed in:**

Abstracts in Anthropology, BIOSIS, Chemical Abstracts Service, Current Awareness in Biol. Sci., Current Contents, Current Contents/ Life Sciences, Index Medicus/MEDLINE, Research Alert, Science Citation Index, SciSearch

### **Instructions for authors**

#### **Editorial procedure**

Manuscripts should be in English and should be submitted electronically, via e-mail, to the Society of Industrial Microbiology at [JIMB@capecod.net](mailto:JIMB@capecod.net). For the subject line of the e-mail, please use: "JIMB: [Abbreviated title...], [First author et al.]" (e.g. JIMB: "Enhanced production of...", Smith et al.). The initial e-mail will serve as a cover letter for the submission and should include a mailing address, e-mail address, telephone number, and fax number of the author for correspondence

Manuscripts are handled in electronic form and should be submitted to the Editor-in-Chief as e-mail attachments. They should be submitted in the current version of MS Word or

as a PDF file. Those using an earlier version of WORD should submit their manuscript as an RTF file. Please contact the Editor-in-Chief (JIMB@capecod.net) if you are unable to conform to these instructions or if your manuscript file is greater than 500 kB in size. For the initial submission, legible lower-quality images may be submitted in order to meet file size restrictions. If required, print-quality images will be requested during the review process. Details on acceptable file formats for electronic submission are listed under

All manuscripts are subject to review by at least two members of the journal's editorial board or other experts.

Upon receipt, manuscripts will be assigned a manuscript tracking number and forwarded to a Senior Editor. The corresponding author will be notified via e-mail when the manuscript is received and informed of the manuscript tracking number and the Senior Editor who will be handling the review. Queries regarding the review and revisions of the manuscript should be directed to the Senior Editor. The manuscript tracking number should be included in all correspondence regarding the submission.

The Senior Editor advises the corresponding author of his/her and the reviewers' comments. If minor or major revisions are recommended, revised manuscripts should be returned to the Senior Editor handling the manuscript. Revised manuscripts should be submitted directly to the Senior Editor as e-mail attachments. At this point in the review process, higher-quality figures may be requested if necessary. Accepted manuscripts will not be forwarded to the publisher without an electronic copy of the final revision. Papers that do not conform to the journal norms will be returned to the authors for revision before being considered for publication. When the Senior Editor is satisfied that the manuscript is ready for acceptance, s/he forwards it to the Editor-in-Chief for final acceptance. The journal accepts manuscripts for the following sections:

- Original Papers should normally not exceed 16 printed pages (one printed page corresponds to about 850 words of text or 3 illustrations with their legends).
- Short Communications should not exceed 3 printed pages.
- Letters to the Editor should not exceed 2 printed pages.
- Review Papers, including mini-reviews, should be critical reviews on subjects of interest to industrial and applied microbiologists. The length of the article will depend on the subject.
- Authors considering preparation of a review should contact the Editor-in-Chief in advance to determine the suitability of the topic.

**General remarks:**

Manuscripts should be typed double spaced, including figure legends, any footnotes to tables or

es, and references.

manuscripts must conform to the current edition of the CBE Style Manual for Biological Journals and are subject to copy-editing.

**Title page:**

The title page must include the name(s) of the author(s), a concise and informative title, the affiliation(s) and address(es) of the author(s), and the e-mail address and telephone and fax numbers of the corresponding author.

**Abstract:**

Each paper, including Reviews, must be preceded by an abstract of approximately 250 words or less presenting the questions being addressed or the hypothesis being tested, the general methods used (e.g. liquid chromatography and mass spectroscopy) and the most important results and conclusions.

**Keywords:**

Up to 5 keywords should be supplied after the Abstract for indexing purposes.

**Abbreviations:**

All abbreviations should be introduced parenthetically in the text when the term first appears (except for standard physiological and biochemical abbreviations). Subsequently only the abbreviation should be used.

**Footnotes:**

Footnotes to the text are numbered consecutively. Those to tables should be indicated by superscript lower-case letters, beginning with "a" in each table. (Asterisks may be used for statistical values or data.)

**Introduction:**

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature. It should conclude with a concise statement of the author's objectives.

**Materials and Methods:**

The Materials and Methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The name of suppliers or sources of equipment and chemicals should be given parenthetically, with the city,

state/province/county and country. This information need not be given for common equipment found in most laboratories (balances, pH meters, spectrophotometers) or common chemicals (NaCl, DNA) the source of which is not crucial to repetition of the work. The grade of chemicals should be stated if it is important for repetition of the work.

**Results:**

Present your findings, stating the major trends shown by data in figures or tables, but do not repeat in the text data that are obvious from the figures or tables. The number of replicates involved and the number of independent repetitions of the experiment or measurement should be stated here or as a footnote to a table.

**Discussion:**

State your conclusions from the data and discuss how they compare with previously published information on the subject. If appropriate, suggest theoretical implications and propose future studies. It may be appropriate to combine Results and Discussion, particularly where the results of one experiment are the basis for the next experiment reported in this paper.

**Acknowledgements:**

These should be as brief as possible. Any grant that requires acknowledgement should be mentioned. The names of funding organizations should be written in full.

**References:**

The list of references should include only works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Abstracts, theses and presentations at meetings are not acceptable as references. Personal communications should be mentioned in the text with the affiliation of the individual providing the communication and not included in the list of references.

**Citations**

in the text should be identified by numbers in square brackets, and the list of references at the end of the paper should be both alphabetized under the first author's name and numbered. References by the same author or team of authors should be listed in chronological order. Here are a few examples of the style of references:

1. Atlas RM (2005) Handbook of media for environmental microbiology. CRC Press, Boca Raton, Fla USA

2. van Ginkel CG, Middlehuis BJ, Spijk F, Abma WR (2005) Cometabolic reduction of bromate by a mixed culture of microorganisms using hydrogen gas in a gas-lift reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32: 1-6

3. Heeschan W, Hahn G (1982) Quality control of media for *Lactobacillus* and *Streptococcus*. In: Corry JE (ed) *Culture media*. GIT, Darmstadt, Germany, pp 109—119

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question, e.g. "...*J Ind Microbiol Biotechnol* 30:1-5. DOI 10.1007/s10295-002-0001-5"

#### **Illustrations and Tables:**

All figures (photographs, graphs or diagrams) and tables should be cited in the text, and both figures and tables should be numbered separately and consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case letters.

#### **Line drawings:**

Please submit high-quality images. Inscriptions should be clearly legible. See "Preparing your manuscript" for preferred file formats.

#### **Halftone illustrations:**

Black-and-white and color halftone illustrations should be submitted as well-contrasted images correctly aligned with the top facing up. Magnification should be indicated by a scale bar.

#### **Size of figures:**

Figures should match the width of either one column (8.6 cm) or two columns (17.6 cm). The maximum length is 23.5 cm, including the legend.

#### **Figure legends:**

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed together at the end of the text.

#### **Tables:**

Each table should have a title. Abbreviations, except widely used ones (e.g. s, M, or cm),

should be identified in a footnote. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters, beginning with "a" in each table. (Asterisks may be used for significance values and other statistical data.)

### **Color illustrations**

Since JIMB does not have funds to support color illustrations, authors wishing to have illustrations in color will be required to pay € 950 (plus 16% VAT), irrespective of the number of color figures in the article.

### **Preparing your manuscript**

-Use a normal, plain font (e.g., Times Roman) for text.

Other style options:

- | -For textual emphasis, use italics.
- | -For special purposes, such as for vectors, use boldface.

-Use the automatic page-numbering function to number the pages.

-Lines should be numbered consecutively throughout the text.

-Do not use field functions.

-For indents use tab stops or other commands, not the space bar.

-Use the table functions of your word processing program, not spreadsheets, to make tables.

-Use the equation editor of your word processing program or MathType for equations.

-Place any figure legends or tables at the end of the manuscript.

-Submit all figures as separate files and do not integrate them into the text.

General information on data delivery:

After acceptance of a manuscript, it will be forwarded electronically to the publisher at the following address:

Journal Production Life Sciences/Chemistry

Springer-Verlag

Tiergartenstr. 17

69121 Heidelberg

Germany

Tel: +49-6221-487-8500

Fax: +49-6221-487-8527

e-mail: Gabriele.Schmitz@springer.com

If additional materials (i.e. print-quality figures) are required, the publisher will contact the corresponding author at the e-mail address listed on the submission. The publisher will also provide proofs electronically to the corresponding author for review prior to publication.

### **Electronic supplementary material**

Electronic supplementary material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of the journal provided the material is:

1. Submitted in electronic form together with the manuscript
2. Accepted after peer review

Legends for ESM tables and figures must be brief, self-sufficient explanations. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version of the article only. It is referred to in the printed version.

### **Proofreading**

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the PDF file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the journal's Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an erratum, which will be hyperlinked to the article.

### **Offprints**

Twenty-five offprints of each contribution are supplied free of charge. Orders for additional offprints can be placed by filling out the order form that is provided with the proofs and returning it together with the corrected proofs. When ordering additional offprints, an author is entitled to receive, upon request, a PDF file of the article for personal use.

**Online First**

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

**Legal requirements**

The author(s) guarantee(s) that the manuscript will not be or has not been published elsewhere in any language without the consent of the copyright holder (the Society for Industrial Microbiology); that the rights of third parties will not be violated; and that the reviewers, editors, publisher, or SIM will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Authors wishing to include figures, tables or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright holder(s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors. Authors of an article published in JIMB may use figures and tabular material in their own subsequent publications without permission, as long as the original JIMB paper is credited. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill these requirements.

Authors must provide a signed Copyright Transfer Statement for their paper. The form will be issued by the typesetter along with the proofs. It should be signed and returned by fax together with the corrected proofs. If the Copyright Transfer Statement is not signed and returned, the article cannot be published.