



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCIELI BORTOLUZZI MENEGAT

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE DE
ZYMOMONAS MOBILIS POR FERMENTAÇÃO CONTÍNUA**

FRANCIELI BORTOLUZZI MENEGAT

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE DE
ZYMOMONAS MOBILIS POR FERMENTAÇÃO CONTÍNUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato

Londrina
2012

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

M541o	<p>Menegat, Francieli Bortoluzzi Otimização da produção de asparaginase de <i>Zymomonas mobilis</i> por fermentação contínua / Francieli Bortoluzzi Menegat.-- Londrina, PR : [s. n.], 2012. 57 f. : il., tabs., figs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. João Batista Buzato Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012. Inclui Bibliografia</p> <p>1. Biotecnologia – Teses 2. Asparaginase 3. Enzimas microbianas – Análise 4. Enzimas – Aplicações terapêuticas 5. <i>Zymomonas mobilis</i> 6. Fermentação contínua I. Buzatto, João Batista, Orient. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. T</p> <p>CDD 20. ed. 660.62</p>
-------	---

FRANCIELI BORTOLUZZI MENEGAT

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ASPARAGINASE DE
ZYMOMONAS MOBILIS POR FERMENTAÇÃO CONTÍNUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Buzato
UEL – Londrina – PR

Prof. Dra. Josiane Vignoli
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
UEL – Londrina – PR

Londrina, 15 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os dias ter concedido forças para eu não desistir;

Ao professor João Batista Buzato, pela oportunidade, orientação e ensinamentos;

À todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia;

Aos meus pais, Eugênio e Sônia, que sempre lutaram para dar o melhor a seus filhos e nunca mediram esforços para nos proporcionar oportunidades aos estudos;

Ao meu irmão Cristiano, pelo incentivo e cobrança na finalização deste curso;

Ao meu esposo Marcelo, por todo o incentivo, compreensão, força e apoio para alcançar meus objetivos;

Aos colaboradores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Nelson e Elda;

Aos meus colegas de curso, especialmente Bruna, Gê e Valéria;

A Prati, Donaduzzi e a Universidade Paranaense *campus* Toledo, pela permissão concedida em realizar os ensaios nas dependências do laboratório;

As minhas colegas e amigas do laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade da Prati, Donaduzzi pelo auxílio prestado durante as baterias de fermentação.

DEDICO...

*A minha amada família,
pai, mãe, irmão e ao meu
amado esposo Marcelo,
por todo o apoio e incentivo
durante esta etapa.*

BORTOLUZZI MENEGAT, Francieli. **Otimização da produção de asparaginase de *Zymomonas mobilis* por fermentação contínua.** 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

RESUMO

A asparaginase é uma enzima com atividade antileucêmica industrialmente produzida por micro-organismos, principalmente bactérias gram negativas. *Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram negativa que utiliza glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono e é conhecida por sua eficiência para produzir etanol, sorbitol, levana, ácido glicônico e mais recentemente tem despertado interesse no uso desse micro-organismo na produção de asparaginase. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de asparaginase de *Z. mobilis* por fermentação contínua, pelo uso do delineamento experimental e da metodologia da superfície de resposta, testando as variáveis: sacarose, extrato de levedura e asparagina. A condição ótima alcançada, com produção de 117,45 UI/L foi na taxa de diluição $0,20 \text{ h}^{-1}$, utilizando 0,5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de sacarose e 1,3 g/L de asparagina. Observou-se que a relação carbono:nitrogênio (1:0,025) exerceu forte influência na resposta da atividade de asparaginase. A utilização de *Zymomonas mobilis* por fermentação contínua, utilizando compostos de baixo custo provenientes da agroindústria, demonstrou ser uma alternativa promissora na produção biotecnológica desta enzima.

Palavras-chave: Asparaginase. *Zymomonas mobilis*. Fermentação contínua. Box-Behnken. Atividade antitumoral.

BORTOLUZZI MENEGAT, Francieli. **Production optimization of *Zymomonas mobilis* asparaginase by continuous fermentation.** 2012. 54f. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) - State University of Londrina. Londrina, 2012.

ABSTRACT

Asparaginase, an enzyme with antileukaemic activity, is an enzyme industrially produced by microorganisms, mainly gram negative bacteria. *Zymomonas mobilis* is a gram negative bacterium that utilizes glucose, fructose and sucrose as carbon source and has been known for its efficiency to produce ethanol, sorbitol, levan, gluconic acid and has recently aroused interest to use this microorganism to produce asparaginase. This work has aimed the optimization by experimental design and response surface methodology of the production of *Z. mobilis* asparaginase by continuous fermentation. The studied variables were: sucrose, yeast extract and asparagine. The optimized condition achieved 117.45 IU/L when dilution rate of 0.20 h^{-1} , yeast extract 0.5 g/L, sucrose 20 g/L and asparagine 1.3 g/L were used. It has observed that the ratio carbon:nitrogen (1:0,025) strongly influenced the response of asparaginase activity. The use of *Zymomonas mobilis* by continuous fermentation, using low cost agroindustrial materials, has shown to be a promising alternative for biotechnological production of this enzyme.

Keywords: Asparaginase. *Zymomonas mobilis*. Continuous fermentation. Box-Behnken. Antitumor activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de preservação.....	25
Tabela 2 -	Composição do meio de fermentação.....	26
Tabela 3 -	Delineamento experimental com os limites inferior e superior de cada variável testada	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Microscopia da bactéria <i>Z. mobilis</i> (PALHA et al., 2002)	14
Figura 2 -	Visão geral do metabolismo de carboidratos da <i>Z. mobilis</i> (SPRENGER, 1996).....	15

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1 -	Composição do meio de fermentação	36
Tabela 2 -	Delineamento de Box-Behnken com os níveis de variação das variáveis testadas	37
Tabela 3 -	Matriz contendo os ensaios numerados, variáveis decodificadas e resultados obtidos de asparaginase.....	38
Tabela 4 -	Variáveis decodificadas e resultados obtidos	39
Tabela 5 -	Valores obtidos em cultivo otimizado de <i>Z. mobilis</i> em diferentes taxa de diluição	41

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

Figura 1 - Gráfico da Superfície de Resposta da atividade de asparaginase	40
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	<i>ZYMOMONAS MOBILIS</i>	15
3.2	<i>Z. MOBILIS</i> E A FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	19
3.3	A ENZIMA ASPARAGINASE	20
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAIS	26
4.1.1	Micro-organismo	26
4.1.2	Meio de Cultura	26
4.1.2.1	Meio de preservação	26
4.1.2.2	Meio de fermentação.....	26
4.2	MÉTODOS.....	27
4.2.1	Preservação do Micro-organismo	27
4.2.2	Preparo do Inóculo.....	27
4.2.3	Preparo de Meios de Cultura	27
4.2.4	Biorreator	28
4.2.5	Fermentação Contínua	28
4.2.6	Coleta das Amostras.....	28
4.3	MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS.....	29
4.3.1	Delineamento Experimental	29
4.4	Determinações Analíticas	29
4.4.1	ATIVIDADE DE ASPARAGINASE	29
4.4.2	DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA.....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

6	ARTIGO	32
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	ANEXO	49
	ANEXO A - Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do artigo 1 no periódico Acta Scientiarum. Technology	50

1 INTRODUÇÃO

A enzima asparaginase (asparagina amidohidrolase), um agente terapêutico importante para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, atua pela diminuição catabólica de asparagina sérica. Nas células neoplásicas, isto provoca a inibição da síntese de proteínas bloqueando a proliferação celular. Essas células tumorais são deficientes em asparagina sintetase, não podendo produzir quantidades suficientes de asparagina, para a manutenção da viabilidade celular. Entretanto, o uso contínuo de asparaginase de *Escherichia coli* apresenta efeitos colaterais tóxicos e além do que, o custo de produção é elevado. Sendo assim, há uma busca de outros micro-organismos produtores de asparaginase com menor toxidez e capazes de usar matérias-primas e componentes nutricionais alternativos para minimizar o custo.

Entre os micro-organismos extensivamente estudados nos últimos anos e que tem despertado interesse biotecnológico, encontra-se a bactéria *Zymomonas mobilis* que apresenta potencial para a produção, em larga escala, de etanol, levana, sorbitol, ácido glicônico e mais recentemente asparaginase.

Nos bioprocessos industriais, a fermentação contínua propicia os maiores valores de produção e produtividade e na produção de asparaginase de *Z. mobilis*, para minimizar os custos, compostos provenientes da agroindústria (sacarose e extrato de levedura) constituem uma alternativa a serem avaliadas na composição do meio de cultivo. Sendo assim, este trabalho propôs otimizar a produção de asparaginase de *Z. mobilis*, pelo uso do delineamento experimental e da metodologia da superfície de resposta, testando as variáveis: sacarose, extrato de levedura e asparagina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de asparaginase de *Zymomonas mobilis*, por fermentação contínua, usando substratos de baixo custo provenientes da agroindústria.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações do indutor – asparagina: 0,1; 0,5 e 0,9 g/L;
- Avaliar o efeito de sacarose (10; 20; 30 g/L) como fonte de carbono;
- Avaliar o efeito do extrato de levedura como fonte de nitrogênio e vitaminas em diferentes concentrações: 0,5; 1,0 e 1,5 g/L;
- Determinar a biomassa e a atividade de asparaginase;
- Avaliar os resultados de produção da asparaginase através do delineamento experimental de Box-Behnken; e
- Selecionar dentre 0,20; 0,25 e 0,30 h⁻¹ a melhor taxa de diluição para produção e produtividade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *ZYMOMONAS MOBILIS*

O gênero *Zymomonas* possui apenas uma espécie, com duas subespécies, *mobilis* e *pomaceae* (SWINGS; DE LEY, 1977).

Z. mobilis é uma bactéria anaeróbia, embora tolere a presença de oxigênio, gram negativa, cujas células apresentam-se em forma de bastonetes com terminações arredondadas, ocasionalmente elipsoidais, de 2 a 6 μm de comprimento por 1 a 4 μm de largura, que ocorre geralmente em pares e sem formação de esporos (Figura 1) (WENDT, 2001). Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares (FALCÃO, 1982). Utiliza glicose, frutose e sacarose como fonte de energia, em meios com altas concentrações de açúcar, estas bactérias ocorrem como longos filamentos de extremidades dilatadas. Em meio sólido à base de glicose, as colônias apresentam-se lenticulares de bordas regulares, de coloração branca ou creme e com 1,0 a 2,0 mm de diâmetro após 2 dias de incubação a 30°C (SWINGS; DE LEY, 1977; DOELLE et al., 1993).

Figura 1- Microscopia da bactéria *Z. mobilis* (PALHA et al., 2002).

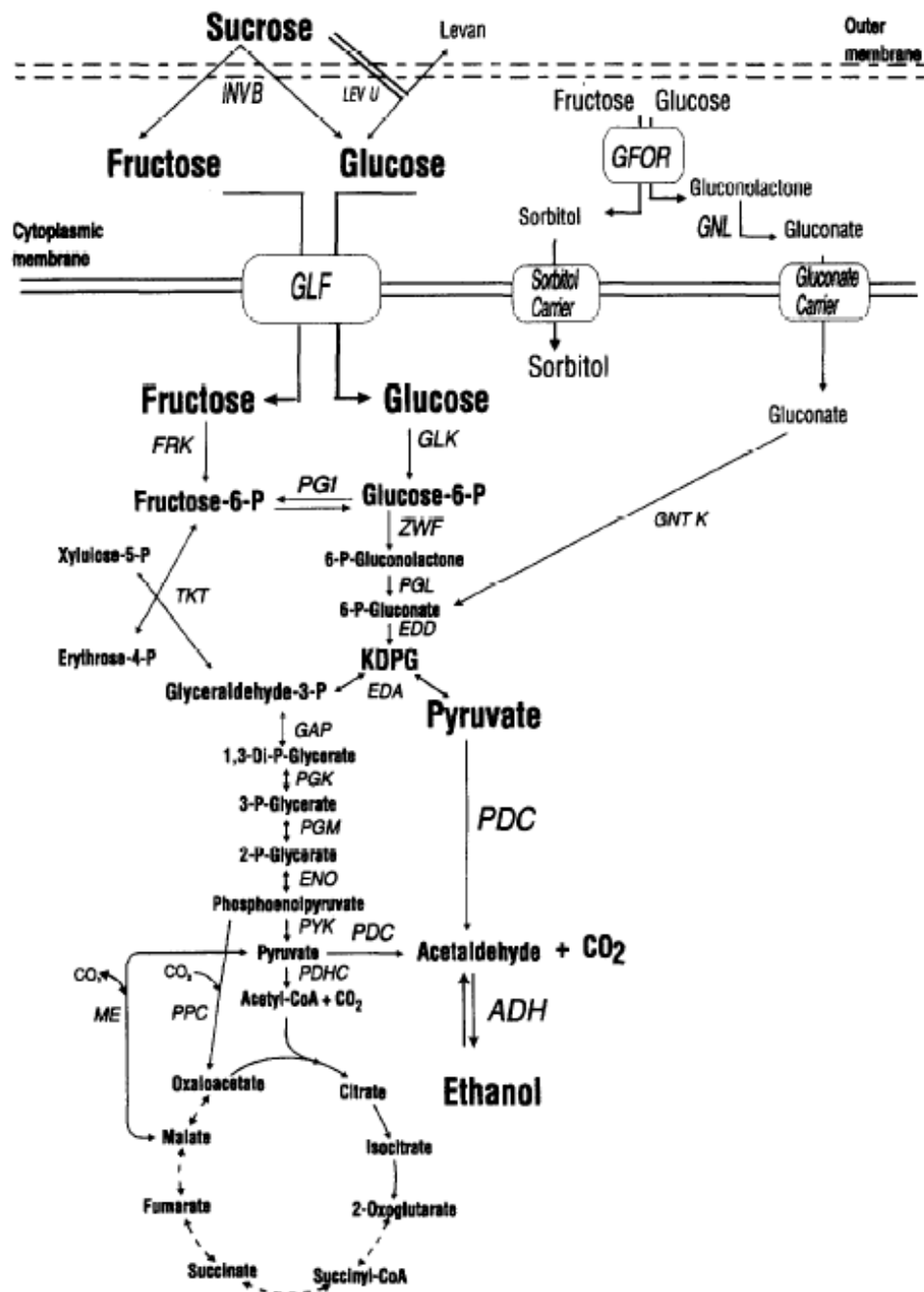


Bactérias do gênero *Zymomonas* são micro-organismos encontrados no meio ambiente, em áreas tropicais da América, Ásia e África, em associação com seiva de plantas de alto teor de açúcares, como a seiva do agave no México e em vinho de palmas, da África tropical (SWINGS; DE LEY, 1977; VIKARI, 1986).

É conhecida por sua eficiência na produção de etanol a partir da glicose pela via metabólica de Entner-Doudoroff (figura 2), onde cada mol de glicose

forma um mol de ATP, em conjunto com as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (SPRENGER, 1996).

Figura 2- Visão geral do metabolismo de carboidratos de *Z. mobilis* (SPRENGER, 1996).



As condições ideais para o crescimento desta bactéria são faixas de temperatura de 30 a 36°C e pH entre 5 a 7. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose em etanol, gás carbônico e ácido láctico, seguindo balanço

metabólico simples. Apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa (SWINGS; DE LEY, 1977). Consumindo sacarose ou mistura de glicose e frutose, os subprodutos da formação de etanol são a levana e o sorbitol. A frutose, formada na hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e fruto-oligômeros pela ação da enzima levanasacarase. *Z. mobilis* não cresce bem quando frutose é a única fonte de carbono. Zachariou e Scopes (1986) demonstraram que a estrutura carbônica do sorbitol deriva exclusivamente da frutose.

Senthilkumar e Gunasekaran (2005) estudaram o efeito das condições de fermentação para a produção de levana por *Z. mobilis*. Esses autores utilizaram concentrações de 50 a 200 g/L de sacarose e verificaram que, sempre quando ocorria um aumento da concentração de sacarose também aumentava a produção de levana. Entretanto, após 24h a concentração de levana diminuía devido a degradação do polímero por levanase.

Além da fonte de carbono, *Z. mobilis* necessita de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes (VIKARI, 1986). *Z. mobilis* requer biotina e pantotenato de cálcio (vitamina B5) para o crescimento em meio de cultivo e, ocasionalmente, alguns outros fatores de crescimento como vitamina B12, riboflavina, tiamina, ácido lipóico e ácido fólico (CROMIE; DOELLE, 1980; SWINGS; DE LEY, 1977).

Belaich e Senez (1965) estudaram o efeito de pantotenato de cálcio no crescimento de *Z. mobilis* e observaram que a limitação desta substância resulta na redução da velocidade específica de crescimento da bactéria. Segundo Sreekumar e Basappa (1995) o pantotenato é uma vitamina essencial para a produção de etanol porque a bactéria não a sintetiza, mas necessita desta substância para produzir compostos orgânicos essenciais para o crescimento celular e, conseqüentemente, para a produção de etanol.

Entretanto, o extrato de levedura deve possuir todos os fatores de crescimento pois a bactéria cresce na presença de somente extrato de levedura e uma fonte simples de carbono. O extrato de levedura, por sua vez, fornece grande quantidade de aminoácidos (cerca de 50% do peso), além de outros nutrientes como, vitaminas do complexo B e o ácido pantotênico (SWINGS; DE LEY, 1977) enquanto que, a asparagina tem o papel de indutor na produção de asparaginase (CAMILIOS NETO, 2005).

Contudo, o cultivo em extrato de levedura caracteriza um crescimento "energeticamente desacoplado", ou seja, energia é produzida a partir da glicose mais rapidamente do que usada para síntese de material celular (BELAICH; SENEZ, 1965).

Diferentes fontes de nitrogênio podem ser adicionadas ao meio de cultura, seja ela na forma de aminoácidos, peptona ou sais de amônia. Aminoácidos e sais de amônia conduzem a um melhor crescimento dos micro-organismos, pelo fato de não promoverem acúmulo de nitritos e nitrato. Segundo Galani et al. (1985), cloreto e sulfato de amônio são as principais fontes de nitrogênio. Sreekumar e Basappa (1995) estudaram várias fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio em fermentações alcoólicas de glicose por *Zymomonas mobilis*. Os autores concluíram que a uréia (0,5 g/L) foi a melhor fonte de nitrogênio, embora seja o sulfato de amônio, que é geralmente usado em meios sintéticos, para a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* (BELAICH; SENEZ, 1965).

O fósforo também possui papel importante nas vias metabólicas, iniciadas através de uma fosforilação do substrato, sendo elemento constituinte das moléculas de ATP que estão presentes no mecanismo energético das células. Este é absorvido, preferencialmente, na forma de sais de potássio mono e diácido. O enxofre, componente estrutural da célula e fundamental na formação de proteínas, pode ser fornecido para a *Z. mobilis* pela metionina, cisteína e sulfatos, sendo sulfato de magnésio a melhor fonte de enxofre, por servir simultaneamente como fonte de magnésio (FRANÇA; RODRIGUES, 1985).

Na década de 80, *Z. mobilis* foi considerada importante promissora para a produção industrial de álcool, pois quando comparada às leveduras, apresenta maiores velocidades específicas de consumo de substratos, de produção de etanol e conseqüentemente maior rendimento (RUANGLEK; MANEEWATTHANA, 2006). Outras características que chamam a atenção para este micro-organismo são o baixo rendimento celular, a alta tolerância ao açúcar, a resistência a altas concentrações de etanol, a formação de poucos produtos secundários, capacidade de utilização do caldo fermentado para o tratamento de doenças e, além de ser capaz de produzir etanol utilizando substratos da agroindústria (PINHEIRO, 2001).

Gunasekarn, Karunakaran e Kasthuribai (1986) estudaram o efeito da adição de melaço de cana-de-açúcar em meios de cultivo para a produção de

etanol, com diferentes linhagens de *Z. mobilis*. As linhagens ATCC 10988 e a NRRL B4286 mostraram máxima produtividade enquanto que IFO 13756, mínima produtividade. A partir desses resultados, o desempenho de *Z. mobilis* ATCC 10988 foi mais bem estudada em diferentes concentrações de açúcares presentes no melaço de cana-de-açúcar.

Millichip e Doelle (1989) utilizaram caldo de sorgo moído como substrato para *Zymomonas* produzir álcool em larga escala, obtendo 13% de etanol. Além do sorgo, o milho e outras matérias-primas amiláceas foram testadas pelos autores para a fermentação em escala industrial de *Z. mobilis*.

Nos últimos anos, além da importância na produção de etanol, estudos tem demonstrado o potencial desse micro-organismo para a produção de levana, sorbitol (ERNANDES, 2009) ácido glicônico (SILVEIRA et al., 1999) e mais recentemente para a produção de asparaginase (CAMILIOS NETO et al., 2006).

3.2 *Z. MOBILIS* E A FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

O processo de fermentação contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, afim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário sendo o volume de cultivo mantido constante através da retirada contínua de meio fermentado (FACCIOTTI, 2001).

O desempenho de *Z. mobilis* tem sido estudado em diferentes processos fermentativos objetivando a produção de etanol. Lee et al., (1979) estudaram a produção de etanol por *Z. mobilis* em cultura contínua com glicose a 10%, 15% e 20%. Os melhores resultados foram obtidos com glicose a 10%, pois em concentrações superiores, este substrato não foi completamente metabolizado mesmo em taxas de diluições baixas. Foi proposto que a inibição do crescimento pelo etanol teria sido responsável pelo fenômeno. Também tem sido reportado que o uso de substratos em elevada concentração foi observado comportamento oscilatório na concentração celular da cultura em fermentações contínuas e impedindo o estabelecimento do estado estacionário da cultura (Jöbses et al., 1986; LI et al., 1997; Costa et al., 2001).

Jöbses et al., (1985) estudaram o crescimento de *Z. mobilis* ATCC 10998 em processos contínuos a 30° e 35°C, observando que a taxa específica de

consumo de substrato foi maior na temperatura mais alta. Estes autores propuseram ainda dois modelos matemáticos: um não estruturado, que apresentou boa descrição no processo a 35°C, mas não a 30°C e um modelo bi-compartimentado estruturado, que descreveu bem o processo nas duas temperaturas.

Tano e Buzato (2001) obtiveram por fermentação contínua de *Z. mobilis* CP4, utilizando sacarose em baixa concentração, uma elevada conversão do substrato em etanol, além do estabelecimento do estado estacionário da cultura. Assim, nessas condições, a bactéria pode atingir um bom desempenho metabólico, para a produção de etanol.

3.3 A ENZIMA ASPARAGINASE

A asparaginase (asparagina amidohidrolase EC 3.5.1.1) hidrolisa o aminoácido asparagina em ácido L-aspártico e amônia (MALADKAR, SINGH e NAIK, 1993). As asparaginases bacterianas (EC 3.5.1.1) são proteínas com alto peso molecular. A forma funcional da enzima existe como um tetrâmero com subunidades idênticas, com massa molecular alcançando de 140 a 160 kDA. Cada monômero consiste em aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos que formam 14 folhas β -pregueadas e 8 α -hélices (KOZAK et al., 2002).

Em 1953 relataram-se as primeiras evidências de atividade antitumoral em soro normal de cobaias animal contra vários tipos de linfomas em ratos e camundongos (KIDD, 1953). Segundo Broome (1963) esta atividade antitumoral devia-se a atividade da asparaginase. Alguns anos mais tarde, verificou-se que a asparaginase poderia ser extraída de *Escherichia coli*, proporcionando a produção em quantidades para experimentações clínicas (MASHBURN; WRISTON, 1964) e posteriormente à produção industrial farmacêutica.

Asparaginase foi a primeira enzima com atividade antitumoral extensivamente estudada em seres humanos (MALADKAR, SINGH e NAIK, 1993), constituindo um produto importante de amplo espectro de atividade antitumoral. Além da leucemia linfoblástica aguda, a enzima tem sido aplicada no tratamento de diversas outras doenças, como a doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (DUVAL et al., 2002).

A asparaginase é uma enzima intracelular produzida por diversos micro-organismos, incluindo bactérias gram negativas, micobactérias, leveduras e fungos, bem como extraída a partir de plantas e do plasma de certos vertebrados. Contudo, nem todas as enzimas têm apresentado atividade antitumoral. A bactéria *E. coli* produz duas asparaginases diferentes, EC-I e EC-II, onde apenas a enzima EC-II possui atividade antitumoral (MÜLLER; BOOS, 1998).

Mashburn e Wriston (1964) mostraram que asparaginase de *Escherichia coli* altamente purificada possui boa atividade antitumoral, ao contrário de um preparado de asparaginase de *Bacillus coagulans*, que não inibe o crescimento de tumor. Uma subsequente avaliação clínica revelou especial valor da asparaginase no tratamento de leucemia aguda.

Mashburn e Wriston (1964) demonstraram a atividade antileucêmica de asparaginase produzida por *E. coli*. Além da produção por *E. coli*, a atividade antileucêmica de asparaginase foi demonstrada por alguns outros micro-organismos tais como *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora* e *Erwinia aroideae* (PETERSON; CIEGLER, 1969), *Streptomyces albidoflavus* (NARAYANA, 2008).

Em estudo realizado por Peterson e Ciegler (1969) foi observado uma redução de células tumorais em ratos com a aplicação de asparaginase obtida por *E. aroideae*.

Atualmente, a asparaginase disponível comercialmente possui duas origens: *E. coli* e *Erwinia* (*E. chrysanthemi* e *E. carotovora*), embora outras asparaginases bacterianas do gênero *Erwinia* tenham sido caracterizadas pela expressão heteróloga da enzima em células de *E. coli* (KRASOTKINA et al., 2004). As formulações enzimáticas apresentam mecanismos de ação e toxicidade idênticos, embora suas propriedades farmacocinéticas são distintas. As principais drogas existentes no mercado são Elspar[®], Crasnitin[®] e Kidrolase[®] (de origem de *E. coli*) e Erwinase[®] (de origem de *E. chrysanthemi*) (DUVAL et al., 2002).

Entretanto, o atual uso de asparaginase de *E. coli* causa efeitos colaterais tóxicos em administração contínua (PRAKASHAM et al., 2007; KOTZIA; LABROU, 2005) e além, de ser de custo elevado de produção. Sendo assim, tem-se despertado o interesse na busca de outros micro-organismos produtores dessa enzima com menor toxidez bem como, capazes de usar matérias-primas de baixo custo no processo de fermentação.

Em 2007, Casotti et al. utilizaram garapa e extrato de levedura, matérias-primas de baixo custo da agroindústria, para produção de asparaginase por *Z. mobilis* CP4 e relataram uma produção de atividade de 9,75 UI/L da enzima quando em presença de extrato de levedura a 5,5 g/L e de asparagina a 1,0 g/L.

Camilios Neto et al. (2006) também usaram matérias-primas da agroindústria (melaço e extrato de levedura) para produzir asparaginase de *Z. mobilis*. Estes autores obtiveram 19,90 UI/L de atividade enzimática.

A produção de asparaginase é dependente de diversas condições nutricionais, dentre elas a fonte de nitrogênio e de carbono. Narayana et al. (2008) estabeleceram como condições ótimas para produção de asparaginase por *Streptomyces abidoflavus*. A atividade obtida foi de 5,93 UI/mg, utilizando de extrato de levedura (2%) e maltose (1%), pH 7,5 e temperatura de 35°C em um tempo de fermentação submersa de 72 horas.

É importante destacar o trabalho de Pinheiro (2001), que iniciou estudos de fermentação da bactéria *Z. mobilis* visando a produção de asparaginase, utilizando meio sintético com asparagina como única fonte de nitrogênio.

Abud (2005) também estudou a produção de asparaginase por *Z. mobilis* e verificou que utilizando a glicose como fonte de carbono, juntamente com peptona, como fonte de nitrogênio, foi possível obter atividade 6,50 UI/g de células.

Abdel-Fattah e Olama (2002) conduziram o ensaio de fermentação para produção de asparaginase de *P. aeruginosa* em meio sintético, sem agitação, sem controle pH, a 30°C durante 16 horas. Esses autores obtiveram atividade enzimática de 142,8 UI/g de células.

Minin e Alegre (1992) estudaram a produção de asparaginase por *Erwinia aroideae* em fermentações em batelada e mostraram que a concentração ótima de lactose é igual a 10 g/L, sendo que quantidades maiores podem levar à inibição da síntese enzimática. Quando foi adicionado asparagina ao meio de crescimento, foi observado também uma melhora na produção de asparaginase e nenhuma inibição do crescimento foi observada para concentrações de asparagina até 16 g/L. Os autores também observaram um aumento do pH durante a fermentação como resultado da ação da asparaginase sobre a asparagina, além de observarem que o início da produção de asparaginase se inicia antes do começo da fase de crescimento.

Além do uso para tratamento antitumoral, recentemente na indústria de alimentos, asparaginase vem sendo utilizada para reduzir a formação de acrilamida. Alimentos fritos, particularmente a batata frita, bem como biscoitos assados, contém uma quantidade significativa de acrilamida (agente cancerígeno formado pela reação de asparagina com açúcares redutores). Uma alternativa para reduzir a formação deste composto em alimentos é o uso da L-asparaginase que hidrolisa seletivamente o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (AMREIN et al., 2001; ROSEN, 2002).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O delineamento fatorial de Box-Behnken é um modelo utilizado para procedimentos de otimização. Consiste na repetição do ponto central para se medir a variabilidade experimental, juntamente com um conjunto de pontos situados nos pontos médios de cada extremidade de um cubo multidimensional que define a região de interesse (BOX; BEHNKEN, 1960).

O delineamento de Box-Behnken é satisfatório para exploração de superfícies de resposta quadráticas e para construção de modelos polinomiais de segunda ordem, facilitando assim o processo de otimização pelo pequeno número de ensaio necessários (KARNACHI; KHAN, 1996).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é atualmente um conjunto de técnicas mais utilizado para otimização pois apresenta eficiência, simplicidade e uma completa teoria (BOX; DRAPER, 1987).

De acordo com Myers e Montgomery (1995), a metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são utilizadas para modelar e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por muitas variáveis até obter um valor ótimo, e onde a relação entre a variável de resposta e as variáveis independentes seja desconhecida.

Abdel-Fattah e Olama (2002) conduziram o ensaio de fermentação para produção de asparaginase de *P. aeruginosa* e realizaram uma avaliação com 15 variáveis distintas para verificar quais eram mais significativas no processo de otimização da cultura para a produção da enzima. Neste ensaio ficou estabelecido

como condições ideais para obter uma atividade máxima da enzima de 142,8 UI/g de célula, o pH 7,9, caseína hidrolisada (3,1%) e água de milho macerado (3,7%).

Gaurav e Kumar (2010) utilizaram o delineamento de Box-Benhken para otimização das condições de cultivo para *Pseudomonas* sp K2 na produção de asparaginase, onde obtiveram uma produção máxima de 0,99 UI/mL da enzima, quando o meio estava a uma temperatura de 37°C, pH 9,0 e a concentração de asparagina era de 2%. Os resultados experimentais obtidos demonstraram um bom ajuste ao modelo proposto validando e proporcionando confiabilidade ao modelo.

Na produção de asparaginase por *E. coli* ATCC 11303 Kenari, Alemzadeh e Maghsodi (2010) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para avaliar quais as condições ótimas de produção de asparaginase por este micro-organismo. Através da metodologia de superfície de resposta o meio com suas condições otimizadas, contendo lactose 1,08%, triptona 1,79%, extrato de levedura 1,6%, fosfato de potássio 2% e asparagina 0,19%, possibilitou um aumento da atividade de asparaginase de 0,1 para 1,03 UI/mL quando comparado ao meio basal. Metodologia estatística também tem sido usada na produção de asparaginase de *A. niger* em fermentação em estado sólido de torta de farelo de semente de leguminosa (BABU et al., 2010). Enquanto que, Agarwal et al., (2011) otimizaram a produção de asparaginase *Serratia marcescens* quando estudaram as variáveis asparagina, extrato de levedura, glicose e peptona.

Contudo a metodologia estatística tem sido pouco usada em cultivos de *Z. mobilis* utilizando substratos da agroindústria. Cazetta et al. (2005) conduziram experimentos de *Z. mobilis* na fermentação de melaço para a produção de sorbitol. Esses autores realizaram delineamento experimental e superfície de resposta para estabelecer uma condição otimizada de produção desse metabólito. Ernandes et al. (2010) testaram a produção de etanol por *Z. mobilis* na fermentação de garapa e outras variáveis. Esses autores seguiram planejamento fatorial do tipo 2^{7-2} . Vaheed et al., (2011) utilizaram metodologia de superfície de resposta e *Z. mobilis* na produção de etanol de extrato açucarados de uma leguminosa nativa do oriente médio (alfarroba).

Camílios Neto et al. (2006) foram os pioneiros no uso de métodos estatísticos na produção de asparaginase de *Z. mobilis*. Esses autores utilizaram as variáveis melaço, extrato de levedura e asparagina. Na condição otimizada as três variáveis foram significativas. Enquanto que, Casotti et al. (2007) utilizaram garapa e

extrato de levedura, como variáveis de um estudo estatístico, na produção de asparaginase por *Z. mobilis*. Esses autores verificaram que o uso de garapa implicou em uma quantidade de extrato de levedura diferente de Camilios Neto et al. (2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *Zymomonas mobilis* ATCC 35001 adquirido da Fundação André Tosello (Campinas-SP).

4.1.2 Meio de Cultura

Para realização dos experimentos foram utilizados 2 tipos de meio: preservação e fermentação, cujas composições estão descritas a seguir.

4.1.2.1 Meio de preservação

A composição do meio de preservação de *Z. mobilis* está apresentada na tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Composição do meio de preservação.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Glicose	10
Extrato de Levedura	5
Agar	15

4.1.2.2 Meio de fermentação

A composição do meio de fermentação é apresentada na tabela 2, a seguir:

Tabela 2 - Composição do meio de fermentação.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
CaCl ₂ .H ₂ O	0,0025
NaCl	0,008
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	3,5
Sacarose ^a	10,0; 20,0 e 30,0
Asparagina ^a	0,1; 0,5 e 0,9
Extrato de Levedura ^a	0,5; 1,0 e 1,5

^a Delineamento fatorial, variáveis contínuas nos níveis (-1; 0; +1).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do Micro-organismo

A bactéria *Z. mobilis* foi mantida em frascos com glicerol 30%, armazenados em freezer (-10 a -30°C) e meio de preservação (Tabela 1).

4.2.2 Preparo do Inóculo

O micro-organismo mantido no meio de preservação era repicado para tubo de ensaio contendo o meio de fermentação conforme Tabela 2, e incubado a 30°C ± 1 por 18 a 24 horas. Em seguida inoculado no biorreator.

4.2.3 Preparo de Meios de Cultura

Os componentes foram dissolvidos em água destilada separadamente em grupos (sulfatos, fosfatos, cloretos, sacarose, asparagina e extrato de levedura). As soluções foram esterilizadas por 20 minutos a 121°C. A solução de sacarose foi esterilizada por 45 minutos a 121°C, em volume de 6 litros e contida em recipiente de 20 litros. Após os meios estarem resfriados, os mesmos foram misturados assepticamente.

4.2.4 Biorreator

A fermentação contínua foi realizada em um biorreator com capacidade de 0,5 L e volume de trabalho de 0,3 L com as seguintes características: diâmetro de 10 cm, altura de 15 cm e saída lateral de 0,5 cm de diâmetro localizado na altura de 8 cm da base. O biorreator usado apresenta na tampa as entradas para alimentação do sistema, sensor de aquecimento e termômetro. O sistema foi alimentado continuamente por meio de uma bomba peristáltica, com velocidade ajustável. As linhas de alimentação eram de silicone, autoclaváveis e o meio era armazenado em um reservatório de 20 L de capacidade cuja saída, do tipo “oliva”, localizada na porção inferior. A temperatura foi controlada em $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ e a agitação constante obtida pelo uso de agitador de bancada acoplado a uma barra magnética localizada no interior do biorreator.

4.2.5 Fermentação Contínua

Primeiramente, a fermentação foi iniciada com o inóculo preparado a partir de transferências de diversas alçadas de células, do meio de preservação, para frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio de fermentação. Estes frascos foram incubados a 30°C por 18-24 horas. Decorrido este tempo, a cultura estando na sua fase exponencial de crescimento, foi transferida para o biorreator contendo o meio de fermentação.

As fermentações foram conduzidas em batelada por aproximadamente 8 horas, até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento, após o que, iniciava-se a alimentação contínua da cultura. O valor da taxa de diluição empregada foi de $0,20\text{ h}^{-1}$. Na última etapa, com o meio otimizado, testaram-se as taxas de diluição $0,20$; $0,25$ e $0,30\text{ h}^{-1}$.

4.2.6 Coleta das Amostras

Uma alíquota de volume suficiente do fermentado foi coletada para realização das análises. Sendo que 5 mL era usado para determinar a biomassa, e o restante centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, a 5°C . A biomassa era ressuspensa em 1 mL de solução salina para posteriormente realizar determinação da atividade da asparaginase.

4.3 MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS

4.3.1 Delineamento Experimental

Foi utilizado um delineamento fatorial incompleto 3^3 (três variáveis em 3 níveis) de Box-Behnken, conforme Tabela 3. O programa computacional utilizado para a análise estatística foi Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Tabela 3 - Delineamento experimental com os limites inferior e superior de cada variável testada.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Ex. Lev. ^a	Sac ^b	Asn ^c
	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
1	-1	-1	0	0,5	10,0	0,5
2	1	-1	0	1,5	10,0	0,5
3	-1	1	0	0,5	30,0	0,5
4	1	1	0	1,5	30,0	0,5
5	-1	0	-1	0,5	20,0	0,1
6	1	0	-1	1,5	20,0	0,1
7	-1	0	1	0,5	20,0	0,9
8	1	0	1	1,5	20,0	0,9
9	0	-1	-1	1,0	10,0	0,1
10	0	1	-1	1,0	30,0	0,1
11	0	-1	1	1,0	10,0	0,9
12	0	1	1	1,0	30,0	0,9
13	0	0	0	1,0	20,0	0,5
14	0	0	0	1,0	20,0	0,5
15	0	0	0	1,0	20,0	0,5

^a Extrato de Levedura (g/L); ^b Sacarose (g/L); ^c Asparagina (g/L)

4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.4.1 Atividade de Asparaginase

Foram utilizados 2 tubos de ensaio, 0,1 mL da biomassa ressuspensa em solução salina foi transferida em cada tubo adicionando 1,0 mL da solução de asparagina a 0,04 M e 0,4 mL de tampão Tris -HCl 0,05 M, pH 8,6. Ambos os tubos, controle e teste, foram incubados em banho-maria a 37°C. No tubo

controle, foi adicionado anteriormente a incubação, 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1,5 M adicionar e na amostra teste, esta mesma solução foi adicionada após 30 minutos de incubação para interromper a reação. Após isso, centrifugou-se por 20 minutos a 8000 rpm. Em 0,5 mL do sobrenadante adicionou-se 4,5 mL de água e 0,1 mL de reagente de Nessler. A mistura foi mantida em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e posteriormente realizou-se leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 400 nm (PETERSON; CIEGLER, 1969).

A amônia liberada foi determinada pelo método de Nessler, baseando-se em uma curva padrão de sulfato de amônio e as absorvâncias lidas no comprimento de onda de 400 nm. A atividade de asparaginase é definida como a quantidade da enzima necessária para liberar 1 μ mol de amônia por minuto a 37°C em pH 8,6 (tampão Tris-HCl 0,05 M) (PETERSON; CIEGLER, 1969).

4.4.2 Determinação da Biomassa

A biomassa obtida pela centrifugação foi lavada, ressuspensa em solução salina (0,85%) e distribuída em alíquotas iguais de 1 mL em cadinho de porcelana previamente aferidos. Concomitantemente a esse procedimento foram realizadas diluições em série com uma das alíquotas e leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 610 nm, utilizando solução salina (0,85%) para zerar o espectrofotômetro. Em seguida, os valores correspondentes ao peso seco (g/L) e absorvância foram plotados no gráfico para construção da curva de calibração de biomassa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões deste trabalho estão apresentados no artigo submetido ao periódico Acta Scientiarum – Technology.

6 ARTIGO

Otimização da produção de asparaginase de *Zymomonas mobilis* por fermentação contínua

Periódico: **Acta Scientiarum – Technology.**

Este artigo foi redigido conforme as instruções e normas descritas no anexo.

Otimização da produção de asparaginase de *Zymomonas mobilis* por fermentação contínua

Francieli Bortoluzzi Menegat¹, João Batista Buzato^{1*} e Maria Antonia P. C. Celligoi¹

1Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid/ Pr 445 Km 380, 86051-990, Londrina, Paraná Brasil.

**Autor para correspondência.*

E-mail: buzato@uel.br

RESUMO. A asparaginase é uma enzima usada em tratamento clínico como agente quimioterapêutico e em tecnologia de alimentos na prevenção de formação de acrilamida em alimentos fritos e assados. Asparaginase é industrialmente produzida por micro-organismos, principalmente bactérias gram negativas. *Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram negativa que utiliza glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono e é conhecida por sua eficiência para produzir etanol, sorbitol, levana, ácido glicônico e mais recentemente tem despertado interesse no uso desse micro-organismo na produção de asparaginase. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de asparaginase de *Z. mobilis* por fermentação contínua, pelo uso do delineamento experimental e da metodologia da superfície de resposta, testando as variáveis: sacarose, extrato de levedura e asparagina. A condição ótima alcançada, com produção de 117,45 UI/L foi na taxa de diluição 0,20 h⁻¹, utilizando 0,5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de sacarose e 1,3 g/L de asparagina. Observou-se que a relação carbono:nitrogênio (1:0,025) exerceu forte influência na resposta da atividade de asparaginase. A utilização de *Zymomonas mobilis* por fermentação

contínua, utilizando compostos de baixo custo provenientes da agroindústria, demonstrou ser uma alternativa promissora na produção biotecnológica desta enzima.

Palavras – chave: asparaginase, *Zymomonas mobilis*, fermentação contínua.

ABSTRACT. Production optimization of *Zymomonas mobilis* asparaginase by continuous fermentation. Asparaginase, an enzyme used in clinical treatment as a chemotherapeutic agent and in food technology to prevent acrylamide formation in fried and baked food. Asparaginase is industrially produced by microorganisms, mainly gram negative bacteria. *Zymomonas mobilis* is a gram negative bacterium that utilizes glucose, fructose and sucrose as carbon source and has been known for its efficiency to produce ethanol, sorbitol, levan, gluconic acid and has recently aroused interest to use this microorganism to produce asparaginase. This work has aimed the optimization by experimental design and response surface methodology of the production of *Z. mobilis* asparaginase by continuous fermentation. The studied variables were: sucrose, yeast extract and asparagine. The optimized condition achieved 117.45 IU/L when dilution rate of 0.20 h^{-1} , yeast extract 0.5 g/L, sucrose 20 g/L and asparagine 1.3 g/L were used. It has observed that the ratio carbon:nitrogen (1:0,025) strongly influenced the response of asparaginase activity. The use of *Zymomonas mobilis* by continuous fermentation, using low cost agroindustrial materials, has shown to be a promising alternative for biotechnological production of this enzyme.

Keywords: asparaginase, *Zymomonas mobilis*, continuous fermentation, Box-Behnken, antitumor activity.

Introdução

A asparaginase (asparagina amidohidrolase EC 3.5.1.1) hidrolisa o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia. Asparaginase é uma enzima intracelular produzida por diversos micro-organismos, incluindo bactérias gram negativas, micobactérias, leveduras e fungos, bem como extraída de plantas e do plasma de certos vertebrados. Foi a primeira enzima com atividade antitumoral extensivamente estudada em seres humanos (MALADKAR, SINGH e NAIK, 1993). A

bactéria *E. coli* produz asparaginase que possui atividade antitumoral (MÜLLER; BOOS, 1998), Contudo quando utilizada continuamente causa efeitos colaterais tóxicos (PRAKASHAM et al., 2007; KOTZIA; LABROU, 2005) e além de ter um custo de produção elevado.

Além do uso para tratamento antitumoral, recentemente asparaginase começou a ser usada em tecnologia de alimentos, na redução da formação de acrilamida (composto tóxico carcinogênico) em alimentos fritos e assados (AMREIN et al., 2001; ROSEN, 2002).

Sendo assim, tem-se despertado o interesse na busca de outros micro-organismos produtores dessa enzima com menor toxidez bem como, capazes de utilizar matéria-prima de baixo custo no processo de fermentação.

Entre os micro-organismos extensivamente estudados nos últimos anos e que tem despertado interesse biotecnológico, encontra-se a bactéria *Zymomonas mobilis* que além de produzir etanol, apresenta potencial para a produção de asparaginase, assim como, levana, sorbitol (ERNANDES et al., 2010) e ácido glicônico (SILVEIRA et al., 1999). *Z. mobilis* é uma bactéria gram negativa que utiliza glicose, frutose e sacarose como fonte de energia (SWINGS ; DE LEY,1977). O catabolismo de carboidratos e produção de etanol ocorre através da via de Entner-Doudoroff (SPRENGER, 1996).

Dentre os processos fermentativos, a fermentação contínua possibilita a obtenção dos maiores valores de produção e produtividade e na produção de asparaginase de *Z. mobilis*, para minimizar os custos, compostos provenientes da agroindústria (sacarose e extrato de levedura) constituem uma alternativa a ser avaliada na composição do meio de cultivo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de asparaginase de *Z. mobilis* por fermentação contínua, pelo uso do delineamento experimental e da metodologia da superfície de resposta, testando as variáveis: sacarose, extrato de levedura e asparagina.

Material e métodos

Micro-organismo e meios de cultura

Foi utilizado *Zymomonas mobilis* ATCC 35001 mantida em meio inclinado contendo glicose (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e ágar (15 g/L) e armazenada em geladeira (2 a 8°C).

A composição do meio de fermentação está apresentada na Tabela 1. Os componentes eram solubilizados em água destilada e esterilizados separadamente em grupos (sulfatos, fosfatos, cloretos, sacarose, asparagina e extrato de levedura) e misturados assepticamente.

Tabela 1 - Composição do meio de fermentação.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
CaCl ₂ .H ₂ O	0,00025
NaCl	0,008
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	3,5
Sacarose ^a	10,0; 20,0 e 30,0
Asparagina ^a	0,1; 0,5 e 0,9
Extrato de Levedura ^a	0,5 ; 1,0 e 1,5

^aDe acordo com delineamento fatorial (tabela 2).

Fermentação Contínua

O cultivo contínuo foi realizado em um reator com capacidade de 0,5 L e volume de trabalho de 0,3 L. A temperatura era controlada em 30°C ± 1 e a agitação constante. O cultivo era alimentado continuamente com meio novo autoclavado (proveniente de um reservatório) pelo uso de bomba peristáltica, de velocidade ajustável. A princípio, as fermentações foram conduzidas em batelada por aproximadamente 8 horas, até que a cultura atingisse a fase exponencial de crescimento, após o que, iniciava-se a alimentação contínua da cultura. O valor da taxa de diluição empregada foi de 0,20 h⁻¹ na fase de teste das variáveis. Na etapa de produção volumétrica, com o meio otimizado, testaram-se as taxas de diluição 0,20; 0,25 e 0,30 h⁻¹.

Determinações Analíticas

A atividade de asparaginase foi determinada de acordo com Peterson e Ciegler (1969), considerando-se uma unidade de asparaginase (UI) a quantidade da enzima necessária para liberar 1 µmol de amônia por minuto a 37°C em pH 8,6 (tampão Tris-HCl 0,05 M). A atividade de asparaginase foi expressa em UI/L de fermentado. A biomassa foi estimada espectrofotometricamente em comprimento de

onda de 610 nm e o peso seco correspondente foi obtido a partir de uma curva de calibração.

Delineamento experimental

A avaliação das diferentes condições para produção de asparaginase por *Z. mobilis* foi conduzida de acordo com o modelo proposto por Box-Behnken (1960), (delineamento fatorial incompleto 3^3 com 3 repetições no ponto central). As variáveis utilizadas foram: concentração de extrato de levedura (X_1), concentração de sacarose (X_2) e concentração de asparagina (X_3), (Tabela 2). Para as análises estatísticas utilizou-se o programa computacional Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Tabela 2 - Delineamento de Box-Behnken com os níveis de variação das variáveis testadas.

Ensaio	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

Variáveis originais	Níveis de variação		
	-1	0	1
X_1 Extrato de Levedura (g/L)	0,5	1,0	1,5
X_2 Sacarose (g/L)	10	20	30
X_3 Asparagina (g/L)	0,1	0,5	0,9

Resultados e discussão

O delineamento experimental fatorial tem sido utilizado por diversos autores em estudos na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* (CAMILIOS NETO et al., 2006 e CASSOTI et al., 2007) e outros micro-organismos (ABDEL-FATTAH; OLAMA 2002; GAURAV; KUMAR 2010; KENARI, ALEMZADEH E MAGHSODI 2010; BABU et al., 2010; AGARWAL et al. 2011).

Na tabela 3 apresentada, encontra-se a matriz do delineamento utilizado neste trabalho juntamente com os valores experimentais obtidos para a atividade de asparaginase. Observa-se que o ensaio 7, cujas concentrações de extrato de levedura, sacarose e asparagina foram 0,5; 20 e 0,9 g/L, respectivamente, apresentou maior atividade enzimática de 99,09 UI/L. A maior concentração de asparagina, foi um fator que proporcionou melhores valores de atividade da asparaginase. A presença do aminoácido asparagina, relacionado com a produção de asparaginase foi demonstrada pelos trabalhos pioneiros de Galani, Drainas e Typas (1985). Esses autores conduziram fermentação submersa por *Zymomonas mobilis* em meio de cultivo na presença e ausência de asparagina.

Tabela 3 - Matriz contendo ensaios numerados, variáveis decodificadas e resultados obtidos de asparaginase.

Ensaio	Variáveis Decodificadas			Atividade Asparaginase (UI/L)
	Extrato de Levedura (g/L)	Sacarose (g/L)	Asparagina (g/L)	
1	0,5	10	0,5	4,69
2	1,5	10	0,5	21,19
3	0,5	30	0,5	12,55
4	1,5	30	0,5	78,96
5	0,5	20	0,1	17,33
6	1,5	20	0,1	24,00
7	0,5	20	0,9	99,09
8	1,5	20	0,9	26,37
9	1,0	10	0,1	7,44
10	1,0	30	0,1	55,19
11	1,0	10	0,9	14,47
12	1,0	30	0,9	58,00

13	1,0	20	0,5	49,45
14	1,0	20	0,5	46,21
15	1,0	20	0,5	44,20

Na tabela 4, são demonstrados os quatro resultados obtidos nos ensaios cuja concentração de asparagina esteve no limite superior da condição testada (0,9 g/L). São também mostradas as quantidades usadas de extrato de levedura e sacarose bem como biomassa e a proporção de extrato de levedura e sacarose.

Tabela 4 - Variáveis decodificadas e resultados obtidos.

Ensaio	Extrato de Levedura (g/L)	Sacarose (g/L)	Asparaginase (UI/L)	Biomassa (mg/mL)	EL:S *
7	0,5	20	99,09	38,33	0,025
8	1,5	20	26,37	20,41	0,075
11	1,0	10	14,47	11,93	0,1
12	1,0	30	58,00	33,79	0,033

*EL:S – Proporção de extrato de levedura:sacarose

O ensaio 11 obteve o menor desempenho de *Z. mobilis* nos valores de atividade enzimática e biomassa. A combinação das variáveis testadas, neste ensaio, caracterizou que este foi um meio de cultivo de baixo rendimento e a fermentação não foi satisfatória. Os ensaios 8 e 12, de desempenho progressivo (atividade de asparaginase de 26,37 e 58,00 UI/L, respectivamente) indicaram que a relação ideal entre sacarose e extrato de levedura estaria em uma quantidade de extrato de levedura cada vez menor. Dessa maneira, o ensaio 7 estabeleceu, dentre essas quatro variações de cultivo testadas, que a relação ideal foi 1:0,025 (sacarose:extrato de levedura). Outra observação é que quanto maior a atividade enzimática, maior o valor de biomassa.

Em trabalhos anteriores foi observado que a relação fonte de carbono : extrato de levedura exerceu forte efeito na resposta da atividade enzimática. O trabalho de Camilios Neto et al., (2006) obteve valor máximo de asparaginase de *Z. mobilis* de 16,55 UI/L. Esses autores usaram como variáveis diferentes concentrações de melaço e extrato de levedura. Esses valores inferiores de

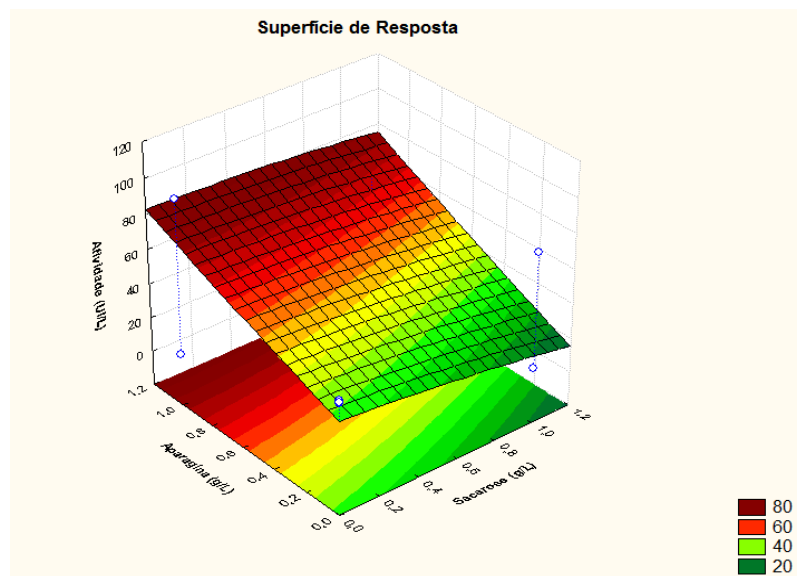
asparaginase parecem estar influenciados pela elevada concentração de açúcares redutores totais do melão. Lee et al., (1979) reportaram que o uso de glicose em elevadas concentrações, conduzia a fermentações incompletas pois o açúcar não era totalmente metabolizado. Além disso, os minerais presentes no melão poderiam ter inibido o crescimento (DÍAZ et al., 1991), particularmente os sais de magnésio e potássio encontrados nesse substrato (LAWFORD et al., 1982). Casotti et al., (2007) utilizaram como variáveis garapa e extrato de levedura em elevadas concentrações e asparagina a 1,0 g/L. Esses autores obtiveram 9,75 UI/L como a melhor atividade de asparaginase. Esse resultado reflete que, embora a garapa e o extrato de levedura sejam substratos ricos e constituem excelente meio para crescimento de micro-organismos, não favoreceram a produção de asparaginase, apenas estimularam a fermentação alcoólica (consumo de açúcar de 90%) e produção de biomassa.

Os resultados da atividade foram analisados pela metodologia de superfície de resposta (Figura 1) (STATÍSTICA 7.0) da qual obteve-se a seguinte equação ajustada para o modelo utilizando o delineamento fatorial incompleto 3³:

$$\hat{Y}_1 = 45,2067 + 0,1213X_1 + 2,4988X_2 + 12,3375X_3 - 10,6758X_1^2 - 5,1858X_2^2 + 3,1967X_3^2 + 12,4750X_1X_2 - 23,8175X_1X_3 + 8,1775 X_2 X_3, \text{ onde:}$$

\hat{Y}_1 : Representa a atividade esperada de asparaginase; X_1 a concentração de extrato de levedura; X_2 a concentração de sacarose e X_3 a concentração de asparagina.

Figura 1 - Gráfico da superfície de resposta da atividade de asparaginase.



O gráfico de superfície de resposta indica que para aumentar a atividade de asparaginase, a concentração de sacarose e extrato de levedura devem permanecer no nível inferior, enquanto que a quantidade de asparagina deve ser aumentada.

Para avaliar a etapa de produção volumétrica, um ensaio foi conduzido com a concentração de asparagina em 1,3 g/L em diferentes taxas de diluição: 0,20; 0,25 e 0,30 h⁻¹. Na tabela 5 são demonstrados os resultados obtidos.

Tabela 5 - Valores obtidos em cultivo otimizado de *Z. mobilis* em diferentes taxas de diluição.

D (h ⁻¹)	Biomassa (mg/mL)	Asparaginase (UI/L)	Caldo Fermentado (mL)	Produtividade (UI/L/h)
0,20	42,51	117,45	60	7,05
0,25	32,77	86	75	6,45
0,30	30,68	60	90	5,40

Na taxa de diluição de 0,20 h⁻¹, os valores de atividade e produtividade foram 15,6% superiores, porém em igual volume de fermentado produzido, daqueles obtidos do ensaio 7, que usou quantidade menor de asparagina. Esses resultados confirmam que o aumento de asparagina estimula a atividade de asparaginase.

Contudo valores de atividade, biomassa e produtividade diminuem com o incremento da taxa de diluição. Valores de taxa de diluição que excedam a taxa de crescimento máxima do micro-organismo conduzem a diminuição de biomassa. Esses dados caracterizam lavagem celular, uma vez que, o micro-organismo não conseguia reproduzir-se na mesma velocidade de renovação do meio de cultura.

Conclusão

Entre as condições avaliadas a melhor produção de asparaginase de 117,45 UI/L ocorreu quando o meio em suas condições ótimas continha extrato de levedura 0,5 g/L, sacarose 20 g/L e asparagina 1,3 g/L. Valores superiores de 0,20 h⁻¹ na taxa de diluição provocaram queda em todos os parâmetros de produção. Foi possível observar que a relação carbono : nitrogênio exerceu forte influência na resposta da atividade de asparaginase e que a melhor proporção observada foi de 1:0,025.

Agradecimentos

À Indústria Farmacêutica Prati, Donaduzzi Cia Ltda por ceder o laboratório para conduzir os experimentos, bem como à Universidade Paranaense *campus* Toledo por ceder o laboratório para determinação da atividade enzimática.

Referências

ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, A. Z. Asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 115-122, 2002.

AGARWAL, A.; KUMAR, S.; VEERANKI, V. D. Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 307-313, 2011.

AMREIN, T.M.; SCHONBACHLER B.; ESCHER F.; AMADO R. Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4282-4288, 2004

BABU, U. K.; RAMAGOPAL, N.; RAMI-REDDY, D.S. Optimization of L-asparaginase production from isolated *Aspergillus niger* by using solid state fermentation on sesame cake via application of genetic algorithm, and artificial neural network-based design model. **Journal of Biotechnology**, v. 150S, S1–S576, 2010.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three-Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, 1960.

CAMILIOS, D. N.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design. **Acta Science Technology**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 151-153, July/Dec., 2006.

CASOTTI, J. F.; CAMILIOS NETO, D.; BRUZON, G.; MACHADO, R. A.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Uso de matérias primas da agroindústria – garapa e

extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 653-658, 2007.

DÍAZ, H. H.; CACHO, C. L.; BERNARD, L. Fermentation of sugarcane juice and blackstrap molasses by *Zymomonas mobilis* CP4. **Journal of Agriculture Univ. P.R.**, v. 75, p. 43 - 50, 1991.

ERNANDES, F. M. P. G.; BOSCOLO, M.; CRUZ, C. H. G. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. **Acta Scientiarum. Technology**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 21-26, 2010.

GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS, M. A. Growth requirements and establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.7, p.673-679, 1985.

GAURAV, K.; KUMAR, R. Value optimization of medium components for optimum L-asparaginase production by *Pseudomonas* Sp. K2: an application of Box-Benken design. **Biotechnonology An Indian Journal**, v. 4, 2010.

KENARI, S.L.D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, 2010.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **Journal Biotechnology**, v. 119, n. 4, p. 309-323, 2005.

LAWFORD, G. R.; LAVERS, B. H.; GOOD, D.; CHARLEY, R.; FEIN, J. *Zymomonas* Ethanol fermentation: biochemistry and bioengineering. **International Symposium on ethanol from biomass**, Presented at Royal Society of Canada, Winnipeg, Canada, October 13-15.

LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentration. **Biotechnology Letters**, v.10, n. 1, 1979.

MALADKAR, N. K.; SINGH, V. K.; NAIK, S. R. Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, EC-113. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v,35, p. 77-86, 1993.

MÜLLER, H.J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology: Hematology**, v. 28, p. 97-113, 1998.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Applied Microbiology**, v. 18, p. 64-67, 1969.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; LAKSHMI, G. S.; SARMA, P. N. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. – 6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n. 5, p.1382-1391, 2007.

ROSEN, J.; HELLENAS, K. E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst**. v. 127, p. 880-882, 2002.

SILVEIRA, M. M.; WISBERCK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L; BERTASSO, M. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, n.75, p.99-103,1999.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301-307, 1996.

STATSOFT, Inc. **Statistica** (data analyses software system). Version 7, 2004.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 41, p. 1-46, 1977.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, A. Z. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 115-122, 2002.
- ABUD, A. K. S. **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis***. 2005. 220 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- AGARWAL, A.; KUMAR, S.; VEERANKI, V. D. Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 307-313, 2011.
- AMREIN, T.M.; SCHONBACHLER B.; ESCHER F.; AMADO R.; Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4282-4288, 2004
- BABU, U. K.; RAMAGOPAL, N.; RAMI-REDDY, D.S. Optimization of L-asparaginase production from isolated *Aspergillus niger* by using solid state fermentation on sesame cake via application of genetic algorithm, and artificial neural network-based design model. **Journal of Biotechnology**, v. 150S, S1–S576, 2010.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1195-1200, 1965.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three-level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, 1960.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. Empirical model-building and response surfaces, **John Wiley & Sons**. 1. ed., 1987.
- BROOME, J. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparaginase lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **Journal of Experimental Medical Sciences**, v. 118, p.118-121, 1963.
- CAMILIOS NETO, D. **L-asparaginase de *Zymomonas mobilis* na fermentação de melaço: otimização das condições de cultivo utilizando delineamento fatorial**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.
- CAMILIOS, D. N.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design. **Acta Science Technology**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 151-153, July/Dec., 2006.
- CASOTTI, J. F.; CAMILIOS NETO, D.; BRUZON, G.; MACHADO, R. A.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Uso de matérias-primas da agroindústria – garapa e

extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 653-658, 2007.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.; SILVA, R. S. F. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry**, London, v.40, n.2, p.747- 751, 2005.

COSTA, F. H. N.; BUZATO J. B.; CELLIGOI M. A. P. C.; TANO, M. S. Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 3, n. 2, p. 201-207, 2001.

CROMIE, S.; DOELLE, H. W. Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 2, p. 357- 362, 1980.

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.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European organisation for research and treatment of cancer-children's leukemia group phase 3 trial. **Blood**; v. 99, n.8, p. 2734-2739, 2002.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, 2009.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al.(Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 223-246. (Biotecnologia Industrial, v.2).

FALCÃO, M. J. O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego na fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, p. 169-182, 1982.

FRANÇA, F. P.; RODRIGUES, M. C. S. Fermentação Alcoólica Desenvolvida por *Zymomonas mobilis* CP3. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v.27, p. 55-60, 1985.

GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS, M. A. Growth requirements and establishment of a chemically defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v.7, p.673-679, 1985.

GAURAV, K.; KUMAR, R. Value optimization of medium components for optimum L-asparaginase production by *Pseudomonas* Sp. K2: an application of Box-Benken design. **Biotechnonology An Indian Journal**, v. 4, 2010.

GUNASEKARN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. **Journal Bioscience**, v. 10, p. 181-186, 1986.

JÖBSES, I.; EGBERTS, G. ; VAN BAALEN, A.; ROELS, J. Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 984-995, 1985.

JÖBSES, I.; EGBERTS, G.; LUYBEN, K.; ROELS, J. Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentration: oscillations in continuous cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 886-877, 1986.

KARNACHI, A. A.; KHAN, A. M. Box-Behnken design for the optimization, of formulation variables of indomethacin coprecipitates with polymer mixtures. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, p.9-17, 1996.

KENARI, S.L.D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: optimization by response surface methodology, **Food and Bioproducts Processing**, 2010.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of norma guinea pig serum. I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, p. 565-582, 1953.

KOZAK, M.; BOREK, D.; JANOWSKI, R.; KASKÓLSKI, M. Crystallization and preliminary crystallographic studies of five crystal forms of *Escherichia coli* L-asparaginase II (Asp90Glu mutant). **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**; v.58, n. 1, p. 130-132, 2002.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. Cloning, expression and characterisation of *Erwinia carotovora* Asparaginase. **Journal Biotechnology**, v. 119, n. 4, p. 309-323, 2005.

KRASOTKINA, J.; BORISOVA, A. A.; GERVAZIEV, Y. V.; SOKOLOV, N. N. One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p. 215-221, 2004.

LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentration. **Biotechnology Letters**, v.10, n. 1, 1979.

LI, J. H.; DAUGULIS, A. J.; MCLELLAN, P. J. Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 1, p. 99-105, 1997.

MALADKAR, N. K.; SINGH, V. K.; NAIK, S. R. Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*, EC-113. **Hindustan Antibiotics Bulletin** **35**, p. 77-86, 1993.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, J.C. Tumor inhibition effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysical**, v. 105, p. 450-452, 1964.

MILLICHIP, R.; DOELLE, H. M. Large-scale production from milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 141-145, 1989.

MINIM, L. A.; ALEGRE, R. M. Production of enzyme L-asparaginase from *Erwinea aroideae*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p. 277-283, 1992.

MYERS, R. H., MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using design of experiments**. 2. ed, Wiley – Interscience, New York, USA, 1995.

MÜLLER, H.J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology: Hematology**, v. 28, p. 97-113, 1998.

NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHM, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. **Indian Journal Microbiology**, v. 48, p. 331-336, 2008.

PALHA, M. A. P. F.; LOPES, C. E.; LIMA, M. A. G. A.; PEREIRA JR., N. The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 272-278, 2002.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Applied Microbiology**, v. 18, p. 64-67, 1969.

PINHEIRO, I. O. **Fermentações de *Zymomonas mobilis* em meio mínimo usando asparagina como fonte de nitrogênio**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; LAKSHMI, G. S.; SARMA, P. N. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp.. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n. 5, p.1382-1391, 2007.

ROSEN, J.; HELLENAS, K. E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst**. v. 127, p. 880-882, 2002.

RUANGLEK, V.; MANEEWATTHANA, D. Evaluation of thai agro-industrial wast for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1432-1437, 2006.

SENTHILKUMAR, V.; GUNASEKARAN, P. Influence of fermentation conditions on levan production by *Zymomonas mobilis* CT2. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 491-496, 2005.

SILVEIRA, M. M.; WISBERCK, E.; LEMMEL, C.; ERZINGER, G.; COSTA, J. P. L.; BERTASSO, M. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, n.75, p.99-103, 1999.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301-307, 1996.

SREEKUMAR O., BASAPPA, S. C. Effect of different nitrogen-sources on ethanolic fermentation of glucose by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 32, p. 252-254, 1995.

STATSOFT, Inc. **Statistica** (data analyses software system). Version 7, 2004.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 41, p. 1-46, 1977.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Fermentação contínua usando baixa concentração de açúcar da cana e *Zymomonas mobilis* CP4 para produção de etanol. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 22, p. 47-50, 2001.

VAHEED, H.; SHOJAOSADATI, S. A.; GALIP, H. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. **J Ind Microbiol Biotechnol**, p. 38, p. 101-111, 2011.

VIIKARI, L., KORHOLA, M. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 471-476, 1986.

WENDT, R.; **Estudo da Produção da Levana Através de *Zymomonas mobilis***. 2001. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2001.

ZACHARIOU, M., SCOPES, R. K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**, v. 167: (3), p. 863-869, 1986.

ANEXO

ANEXO A

Instruções e normas para o encaminhamento e publicação do artigo 1 no periódico
Acta Scientiarum. Technology.

Acta Scientiarum. Technology Diretrizes para Autores

1. *Acta Scientiarum. Technology*, ISSN 1806-2563 (impresso) e ISSN 1807-8664 (on-line), é publicada trimestralmente pela Universidade Estadual de Maringá.

2. A revista publica artigos originais em todas as áreas relevantes da Tecnologia, incluindo Engenharias, Física, Química, Matemática, Estatística, Geociências e Ciência da Computação.

3. Os autores se obrigam a declarar a cessão de direitos autorais e que seu manuscrito é um trabalho original, e que não está sendo submetido, em parte ou no seu todo, à análise para publicação em outra revista. Esta declaração encontra-se disponível abaixo.

4. Os dados, idéias, opiniões e conceitos emitidos nos artigos, bem como a exatidão das referências, são de inteira responsabilidade do(s) autor(es). A eventual citação de produtos e marcas comerciais não significa recomendação de seu uso por parte do comitê editorial da revista.

5. Os relatos deverão basear-se nas técnicas mais avançadas e apropriadas à pesquisa. Quando apropriado, deverá ser atestado que a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Biossegurança da instituição.

6. Os artigos submetidos deverão ser em inglês. Os autores devem providenciar uma versão com qualidade.

7. Os artigos serão avaliados por no mínimo três consultores da área de conhecimento da pesquisa, de instituições de ensino e/ou pesquisa nacionais e estrangeiras, de comprovada produção científica. Após as devidas correções e possíveis sugestões, o artigo será aceito se tiver dois pareceres favoráveis e rejeitado quando dois pareceres forem desfavoráveis.

8. Os artigos deverão ser submetidos pela internet, acessando este Portal ACTA.

9. O conflito de interesses pode ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira. Conflitos de interesses podem ocorrer quando autores, revisores ou editores possuem interesses que podem influenciar na elaboração ou avaliação de manuscritos.

Ao submeter o manuscrito, os autores são responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros ou de outra natureza que possam ter influenciado o trabalho.

Os autores devem identificar no manuscrito todo o apoio financeiro obtido para a execução do trabalho e outras conexões pessoais referentes à realização do mesmo. O revisor deve informar aos editores quaisquer conflitos de interesse que poderiam influenciar sobre a análise do manuscrito, e deve declarar-se não qualificado para revisá-lo.

10. A revisão de português e a tradução e/ou revisão de língua estrangeira serão de responsabilidade e custeados pelos autores dos artigos aceitos a partir de 2010, mediante comprovação emitida pelos revisores credenciados.

11. Estão listadas abaixo a formatação e outras convenções que deverão ser seguidas:

a) No processo de submissão deverão ser inseridos os nomes completos dos autores (no máximo seis), seus endereços institucionais e o e-mail do autor indicado para correspondência.

b) Os artigos deverão ser subdivididos com os seguintes subtítulos: Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Conclusão, Agradecimentos (Opcional) e Referências. Esses itens deverão ser em caixa alta e em negrito e não deverão ser numerados.

c) O título, com no máximo vinte palavras, em português e inglês, deverá ser preciso. Também deverá ser fornecido um título resumido com, no máximo, seis palavras.

d) O resumo não excedendo 200 palavras, deverá conter informações sucintas sobre o objetivo da pesquisa, os materiais experimentais, os métodos empregados, os resultados e a conclusão. Até seis palavras-chave deverão ser acrescentadas ao final, tanto do resumo como do abstract, que não estejam citadas no título.

e) Os artigos não deverão exceder 15 páginas digitadas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas. Deverão ser escritos em espaço 1,5 linhas e ter suas páginas numeradas no topo à direita e todas as linhas numeradas no lado esquerdo. O trabalho deverá ser editado no MS-Word, ou compatível, utilizando Times New Roman fonte 12.

f) O trabalho deverá ser formatado em A4 e as margens inferior, superior, direita e esquerda deverão ser de 2,5 cm.

g) O arquivo contendo o trabalho que deverá ser anexado (transferido), durante a submissão, não poderá ultrapassar o tamanho de 2MB, bem como, não poderá

conter qualquer tipo de identificação de autoria, inclusive na opção propriedades do Word

h) Tabelas, Figuras e Gráficos deverão ser inseridos no texto, logo depois de citados.

i) As Figuras e as Tabelas deverão ter preferencialmente 7,65 cm de largura, e não deverão ultrapassar 16 cm.

j) As Figuras digitalizadas deverão ter 300 dpi de resolução e preferencialmente gravadas no formato jpg. Ilustrações em cores não serão aceitas para publicação.

k) Deverá ser adotado o Sistema Internacional (SI) de medidas.

l) As equações deverão ser editadas utilizando software compatível com o editor de texto e numeradas à direita.

m) As variáveis deverão ser identificadas após a equação.

n) Artigos de revisão poderão ser publicados mediante convite do Conselho Editorial ou Editor-Chefe da Eduem.

o) A revista recomenda que oitenta por cento (80%) das referências sejam de artigos listados na base *ISI Web of Knowledge* ou *Scopus* com menos de 10 anos. Recomenda-se dar preferência as citações de artigos internacionais. Não serão aceitos nas referências citações de dissertações, teses, monografias, anais, resumos, resumos expandidos, jornais, magazines, boletins técnicos. Recomenda-se evitar documentos eletrônicos.

p) As citações deverão seguir os exemplos seguintes que baseiam-se na ABNT. Citação no texto, usar o sobrenome e ano: Cowie (2001) ou (COWIE, 2001); para dois autores Costa Júnior e Mansur (2008) ou (COSTA JÚNIOR; MANSUR, 2008); três ou mais autores, utilizar o primeiro e após et al. (MARTÍN et al., 2008).

MODELOS DE REFERÊNCIAS

Deverão ser organizadas em ordem alfabética, justificado, conforme os exemplos seguintes que se baseiam na ABNT. Listar todos os autores do trabalho. Os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados, sem o local de publicação.

Artigos

MARTÍN, M.; MONTES, F. J.; GALÁN, M. A. On the contribution of the scales of

mixing to the oxygen transfer in stirred tanks. **Chemical Engineering Journal**, v. 145, n. 2, p. 232-241, 2008.

COSTA JÚNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

GROTTA, D. C. C.; LOPES, A.; FURLANI, C. E. A.; SILVA, R. P.; REIS, G. N.; CORTEZ, J. W. Biodiesel etílico filtrado de óleo residual de soja: desempenho de um trator agrícola na operação de gradagem. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 2, p. 135-138, 2008.

Livros

COWIE, J. M. G. Polymers: chemistry and physics of modern materials. Cheltenham: Nelson Thornes: Chapman & Hall, 2001.

EL-REWINI, H.; ABD-EL-BARR, M. Advanced computer architecture and parallel processing. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

SCHMAL, M. Engenharia das reações químicas e catálise. In: MELO JÚNIOR, P. A. (Ed.). Fronteiras da Engenharia Química I. Rio de Janeiro: E-papers, 2005. p. 21-50.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita e não está sendo avaliada por outra revista.
2. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, Open Office ou RTF (desde que não ultrapasse 2MB).
3. Todos os endereços de páginas da Internet, incluídas no texto (Ex: <http://www.eduem.uem.br>) estão ativos e prontos para clicar.
4. O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final. No máximo 15 páginas.

5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.
6. Enviar indicação de 5 (cinco) consultores (nome e e-mail) no campo "comentários ao editor" logo abaixo.
7. Os manuscritos deverão ser submetidos em INGLÊS.

Declaração de Direito Autoral

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE E CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaro que o presente artigo é original, não tendo sido submetido à publicação em qualquer outro periódico nacional ou internacional, quer seja em parte ou em sua totalidade. Declaro, ainda, que uma vez publicado na revista Acta Scientiarum. Technology, editada pela Universidade Estadual de Maringá, o mesmo jamais será submetido por mim ou por qualquer um dos demais co-autores a qualquer outro periódico. Através deste instrumento, em meu nome e em nome dos demais co-autores, porventura existentes, cedo os direitos autorais do referido artigo à Universidade Estadual de Maringá e declaro estar ciente de que a não observância deste compromisso submeterá o infrator a sanções e penas previstas na Lei de Proteção de Direitos Autorais (Nº9609, de 19/02/98).

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

ISSN 1806-2563 (impresso) e ISSN 1807-8664 (on-line) e-mail: actatech@uem.br