



# COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM FARELO DE ARROZ E ESPUMA DE POLIURETANA

N. V. SILVA<sup>1</sup>, W. F. VIEIRA<sup>1</sup> e U. C. FILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: nycolevir@hotmail.com

**RESUMO** – As enzimas L-asparaginase é produto de grande destaque e aplicação chave nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, o que justifica a busca por processos mais eficientes na produção das enzimas. Neste trabalho a comparação da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), foram analisadas e otimizadas, possibilitando um aumento de 128 vezes na produção de L-asparaginase em FES comparado a FS, e, no comparativo dos suportes sólidos houve diferença de 2,8 vezes na produção.

## 1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase é uma enzima encontrada em diversos seres vivos, tais como: animais, bactérias e fungos. É um importante produto utilizado na indústria alimentar, atua na prevenção de acrilamida, produto tóxico gerado pelo processamento de alimentos a altas temperaturas, e, na indústria farmacêutica como produto chave na obtenção de medicamentos utilizados no tratamento de doenças hematopoéticas e câncer, por exemplo Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). (HUANG et al, 2014).

Atualmente, a L-asparaginase terapêutica é produzida através do cultivo de enterobactérias *Escheria coli* ou *Erwinia chrysanthemi* em fermentação submersa (FS). Porém, a L-asparaginase bacteriana tem causado efeitos colaterais aos pacientes, causando hipersensibilidade e inativação imunológica. Mediante a este fato, a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido (FES) é uma opção vantajosa, pois reduz a imunogenicidade e diminui os custos de processo (DANGE; PESHWE, 2015).

A FES se destaca pelo baixo grau de investimento, alto rendimento, pouca utilização de água, além da boa adaptação dos fungos filamentosos nos suporte sólidos, quando comparado a FS (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). A FES permite o uso de resíduos agroindustriais como suportes sólidos, devido ao baixo custo e composições nutricionais das biomassas, no entanto o uso de suporte inerte se destaca por possibilitar uma melhor adaptação do fungo no suporte, aumentar a produção e facilitar etapas futuras de separação do produto nobre desejado (KUMAR; DASU; PAKSHIRAJAN, 2010).



Neste trabalho a produção de L-asparaginase foi realizada por meio do *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES e FS, foi avaliada a composição de meio nutritivo, os suportes sólidos de farelo de arroz e espuma de poliuretana e o tempo de fermentação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas dependências do laboratório de pesquisa do Núcleo de Bioquímica (NUCBIO) da Faculdade de Engenharia Química (FEQUI) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

### 2.1. Microrganismo

O fungo *Penicillium sp.* LAMAI 505 utilizado na produção de L-asparaginase, foi obtido da Central de Recursos Microbianos do Instituto de Biotecnologia da UNESP (CRM – UNESP). Afim de cultivar o microrganismo foi utilizado uma solução nutritiva Czapek, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da solução nutritiva Czapek.

Composto	Fórmula	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3$	2,00
Fosfato de potássio	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,00
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4$	0,50
Cloreto de potássio	$\text{KCl}$	0,50
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4$	0,01
Sacarose	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30,00
Agar <sup>a</sup>	-	20,00

Nota: <sup>a</sup> A adição de Agar representa a solução nutritiva Czapek em estado sólido utilizada no cultivo do *Penicillium sp.* LAMAI 505.

### 2.2. Preparação do inoculo

O *Penicillium sp.* LAMAI 505 foi cultivado primeiramente, em placa petri com solução nutritiva de Czapek sólido (72 h, 25 °C), Tabela 1. Em seguida foi realizada a etapa de crescimento celular, onde o fungo foi transferido da placa petri para o erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de solução nutritiva Czapek (sem Agar, 72 h, 25 °C), devidamente esterilizadas a 121°C por 20 minutos, e levada a massa agitadora a 150 rpm. Após esta etapa as células do *Penicillium sp.* foram separadas por centrifuga (25 °C, 5000 rpm) e utilizadas em diferentes condições operacionais.

### 2.3. Fermentação submersa e fermentação estado sólido

A produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FS e FES, foi analisada em etapas distintas, comparando as condições de meio nutritivo, suportes sólidos e tempo de fermentação. A Tabela 2 mostra os diferentes ensaios experimentais realizados e as condições nutritivas usadas na produção de L-asparaginase de cada ensaio experimental.



Ensaio <sup>a, b</sup>	Asparagina (g/L)	Glicose (g/L)
1	1,0	4,0
2	1,0	10,0
3	1,0	16,0
4	5,0	4,0
5	5,0	10,0
6	5,0	16,0
7	10,0	4,0
8	10,0	10,0
9	10,0	16,0

Tabela 2 – Diferentes condições de meio nutritivo usando na produção de L-asparaginase fúngica.

Nota: <sup>a</sup> Sais minerais ilustrado na Tabela 1; <sup>b</sup> Os ensaios foram realizados em triplicata a 25°C e 72 h de fermentação.

A Tabela 3 mostra as 12 diferentes condições experimentais de concentração de asparagina, suportes sólidos e proporção de líquido no suporte sólido adotadas na produção de L-asparaginase por FES.

Tabela 3 – Diferentes condições de produção de L-asparaginase em FES com suportes sólidos de espuma de poliuretano e farelo de arroz.

Ensaio <sup>b</sup>	Meio sólido <sup>a</sup>	Asparagina (g/L)	Proporção de líquido do suporte sólido (% v/v)
1	A	0,0	25,0
2	A	0,0	50,0
3	A	0,0	75,0
4	A	1,0	25,0
5	A	1,0	50,0
6	A	1,0	75,0
7	E	0,0	25,0
8	E	0,0	50,0
9	E	0,0	75,0
10	E	1,0	25,0
11	E	1,0	50,0
12	E	1,0	75,0

Nota: A – Suporte sólido de farelo de arroz; E – Suporte sólido inerte de espuma de poliuretano;  
<sup>a</sup> Sais minerais ilustrado na Tabela 1. <sup>b</sup> Os ensaios foram realizados em triplicata a 25°C e 72 h de fermentação.

## 2.4. Método de análise de L-asparaginase

A atividade da L-asparaginase foi determinada segundo Drainas et al., (1997), onde 0,5 mL de amostra foi misturada com 1,5 mL de tampão Tris - HCl (pH 8,6, 50 mM), 0,2 mL de L-asparagina (100 mM) e 0,2 mL de hidroxilamina (1 M) é incubada (30 minutos, 37 °C). Após a reação é terminada com adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico TCA/HCl e

centrifugada por 10 minutos (10000g, Avanti J-26XP Series) e em seguida o teor de ácido  $\beta$ -hidroxilâmico é obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240) utilizando a Equação 1.

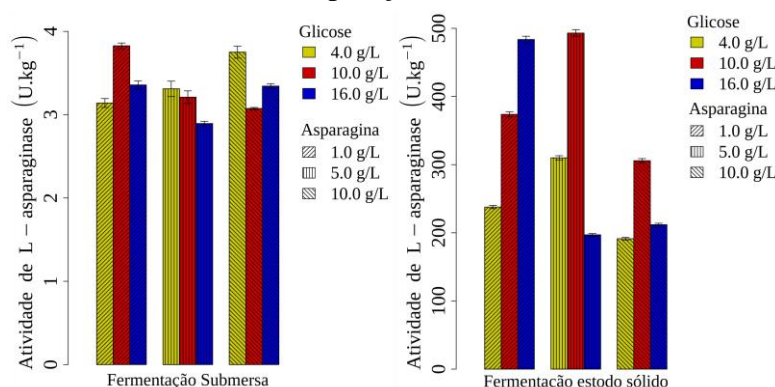
$$\lambda \left( \frac{U}{kg} \right) = 1000 * \left( \frac{\delta * Vol_{Ext} * F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} * 0,4 * \theta * m_{Sólido}} \right) \quad (1)$$

Nota:  $\delta$ - Leitura no espectrofotômetro,  $Vol_{Ext}$  - Volume de extração,  $F_{Diluição}$ - Fator de diluição,  $Vol_{Amostra}$  - Volume da amostra,  $\theta$  - tempo de reação em banho maria e  $m_{Sólido}$ - massa de suporte sólido

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FS e FES, utilizando diferentes composições nutritivas de glicose e L-asparagina. Pode-se observar que as atividades máximas de L-asparaginase obtidas foram de 3,85 U/kg ( 1,0 g/L de L-asparagina e 10,0 g/L de glicose) em FS e 493,1 U/kg ( 5,0 g/L de L-asparagina e 10,0 g/L de glicose), gerando um aumento de 128 vezes na atividade de L-asparaginase em FES comparado a FS. Além disso, o *Penicillium sp.* se mostrou capaz de produzir a L-asparaginase, visto que na literatura tem-se que Janakiraman e Meghavarnam (2017), em FES com *Fusarium culmorum* (ASP-87), encontraram a atividade de 1250,0 U/kg em biomassa de arroz. Considerando os resultados apresentados pela Figura 1, a FES foi selecionada para próxima etapa.

Figura 1 – Produção de L-asparaginase em fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES) com diferentes composições de meios nutritivos.

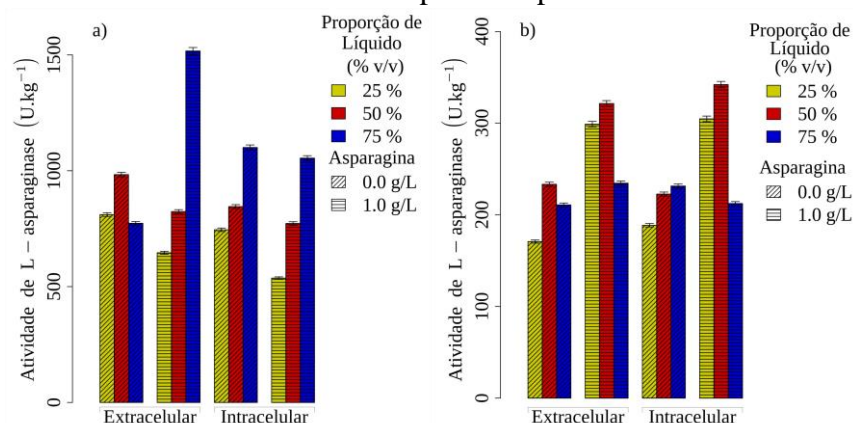


Nota: A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada utilizando farelo de arroz como suporte sólido.

A Figura 2 mostra a produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em FES com suporte inerte de poliuretana (Figura 2, a) e biomassa de arroz (Figura 2, b), em diferentes condições operacionais e composições de meios nutritivos (concentração de glicose fixa em 10,0 g/L). Pode-se observar que fungo produz a enzima de forma extracelular e intracelular, sendo que na FES com suporte inerte a produção extracelular se destacou, enquanto na FES com farelo de arroz a produção intracelular foi o destaque. As atividades máximas de L-asparaginase obtidas foram de 1516,7 U/kg em FES com espuma de poliuretana e 533,7 U/kg

em FES com farelo de arroz, sendo que a FES com suporte inerte de espuma de poliuretana aumentou 2,8 vezes a atividade de L-asparaginase comparado ao suporte de farelo de arroz. Considerando os resultados ilustrados na Figura 2, a FES com espuma de poliuretana foi selecionada para análise do tempo de fermentação em condições otimizadas.

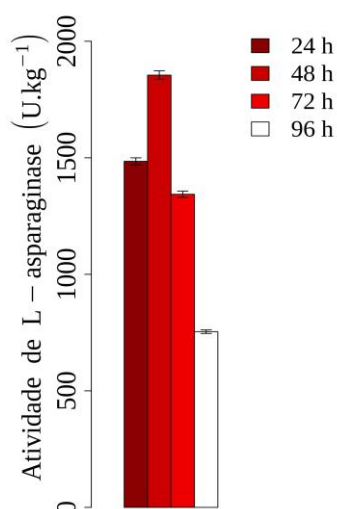
Figura 2 – Comparativo da produção de L-asparaginase por FES com suportes sólidos de farelo de arroz e espuma de poliuretana.



Nota: a, b – representam a produção de L-asparaginase em fermentação em estado sólido utilizando respectivamente, espuma de poliuretana e farelo de arroz como suportes sólidos.

A Figura 3 mostra a análise da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 por FES com espuma de poliuretana. Pode-se observar que o tempo de fermentação de 48h foi o mais eficiente com atividade de L-asparaginase de 1854,7 U/kg, gerando um aumento de 1,22 vezes comparado com a melhor condição operacional apresentada na Figura 2 e 3,8 vezes comparando com a melhor condição operacional apresentada na Figura 1.

Figura 3 – Análise da produção de L-asparaginase por FES com espuma de poliuretana no tempo.





## 4. CONCLUSÃO

A produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* LAMAI 505 em fermentação submersa e fermentação em estado sólido possibilitou-se observar a capacidade do fungo filamentoso produzir a enzima de forma intracelular e extracelular. Na FES destacou-se a produção de L-asparaginase, aumentando em 128 vezes a produção em comparação a fermentação submersa. Além disso, a FES com o suporte inerte de poliuretana incrementou a produção de L-asparaginase em 2,8 vezes em relação a FES com farelo de arroz. Outro fato importante foi a redução do tempo de fermentação de 72h para 48h, aumentando a produção de L-asparaginase em 1,22 vezes.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, 2012 / 08617-7) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Minas Gerais (FAPEMIG, APQ - 03927-16) para apoio financeiro.

## REFERENCIAS

- DANGE, V.; PESHWE, S. Purification and biochemical characterization of L- asparaginase from *Aspergillus niger* and evaluation of its antineoplastic activity. *Int. J. Sci. Res.*, v. 4, n. 2, p. 564–569, 2015.
- DRAINAS, C., KINGHORN, J. R., PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*, *Journal of General Microbiology*. 21, 493-501, 1997.
- HUANG, L. et al. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 5, p. 1561–9, 1 mar. 2014.
- KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Localization and production of novel l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 2, p. 223–229, fev. 2010.
- MEGHAVARNAM, A. K., JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87), *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 11, 124-130, 2017.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146–161, dez. 2013.