

Assessment of *Zymomonas mobilis* and *Erwinia herbicola* for the anti leukaemia asparaginase production Avaliação de *Zymomonas mobilis* e *Erwinia herbicola* na produção do anti-leucêmico asparaginase

Títulos abreviados:

Microbial production of asparaginase, an anti leukaemia agent

Produção microbiana de asparaginase, um agente anti-leucêmico

Patrick Juliano A. Gomes Wietchorek¹, João Batista Buzato¹, Francieli Bortoluzzi Menegat¹, Maria Antonia P. C. Celligoi¹

ABSTRACT

Fermentation utilizing commercial sugar and sugar cane juice by *Z. mobilis* and *E. herbicola* for asparaginase, an enzyme used as anti leukaemia agente, has been carried out. The media composition contained commercial sugar or sugar cane juice (50 g/L of total sugars), yeast extract (1.75 g/L) and nutrient salts. Best values of activity and productivity were 2.65 U/L and 0.38 U/Lh, respectively by *Z. mobilis* when commercial sugar was used.

Keywords *Erwinia herbicola*, *Zymomonas mobilis*, asparaginase

RESUMO

Açúcar cristal e garapa foram usados na fermentação por *Zymomonas mobilis* e *Erwinia herbicola* na produção de asparaginase, enzima usada no tratamento de leucemias. Os meios de cultura, contendo açúcar cristal ou garapa diluída, foram preparados na concentração de 50 g/L de açúcar total e adicionados de extrato de levedura (1,75 g/L) e sais nutrientes. Os melhores valores de atividade de asparaginase e produtividade foram respectivamente 2,65 U/L e 0,38 U/L.h por *Z. mobilis* em açúcar cristal.

Palavras-chave *Erwinia herbicola*, *Zymomonas mobilis*, asparaginase

¹ Departamento de Bioquímica e Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Campus Universitário Londrina Paraná Brasil
patrickwietchorek@hotmail.com
buzato@uel.br autor para correspondência
francieli.bortoluzzi@pratidonaduzzi.com.br
macelligoi@uel.br

INTRODUÇÃO

A necessidade atual de produzir medicamentos a preços mais acessíveis tem estimulado a procura de matérias primas alternativa de baixo custo. O Brasil é o maior produtor de cana para obtenção de açúcar e etanol, gerando como subproduto o fermento, usado na fabricação de extrato de levedura. Ainda que a importância do etanol como energia renovável seja inegável, a garapa e o açúcar, bem como o extrato de levedura, podem ser explorados como substratos para a produção de metabólitos de valor agregado superior ao etanol (CASOTTI et al., 2007). Neste contexto destacam-se os processos fermentativos nos quais o metabolismo microbiano constitui uma ferramenta para transformar matéria prima em produtos de valor elevado. Entre estes, o anti-cancerígeno asparaginase.

Asparaginase é utilizada no tratamento de leucemia linfoblástica aguda e outras doenças leucêmicas, como doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, linfossarcoma e o mielossarcoma. A enzima catalisa a hidrólise de asparagina em ácido aspártico e amônia, levando a depleção da asparagina em células tumorais, que são incapazes de produzir esse aminoácido. Assim a hidrólise de asparagina, causada pela administração endovenosa de asparaginase, provoca a morte de células malignas (PRAKASHAM et al., 2007).

Entretanto, em tratamentos utilizando asparaginase de *Escherichia coli*, a administração contínua da enzima provoca efeitos colaterais tóxicos (PRAKASHAM et al., 2007) além de ser de custo de produção elevado (ABUD et al, 2003). A toxidez é parcialmente atribuída a atividade de glutaminase de asparaginase e que é menos pronunciada na enzima de *Erwinia sp* (KOTZIA; LABROU, 2005; PRAKASHAM et al., 2007) daí a importância também de considerar essa fonte enzimática.

Na produção de asparaginase por *Erwinia aroideae*, a triptona favoreceu especificamente a formação de biomassa enquanto que, o extrato de levedura aumentou tanto a produção de biomassa quanto enzimática ainda que, quantidade elevada de extrato de levedura inibiu a produção de enzima (MININ; ALEGRE, 1992).

Swings e De Ley (1977) relataram a importância do uso de extrato de levedura em cultivos de *Zymomonas mobilis* por conter biotina, fator de crescimento para essa bactéria, além de favorecer a produção de biomassa.

Dessa maneira procuram-se outras fontes potenciais de asparaginase com menor toxidez e custos de produção, pois essa enzima atualmente considera-se

seu uso também em tecnologia de alimentos, na diminuição de acrilamida em biscoitos e outros alimentos industrializados (ANESE et al, 2011).

Este trabalho comparou a produção de asparaginase por *Z. mobilis* e *E. herbicola* cultivadas em meio açúcar cristal e garapa .

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e Meios de preservação: *Z. mobilis* foi preservada em Placas de Petri contendo meio sólido de composição (g/L): sacarose 20,0; extrato de levedura 2,5; KH_2PO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 e Agar 15,0. O meio sólido para *E. herbicola* possuía a composição (g/L): peptona bacteriológica 50,0; extrato de carne 30,0 e Agar 15,0. As culturas foram mantidas a 4 °C e repicadas a cada 30 dias.

Meios de Cultivo: No meio de garapa clarificada (homogeneizada com clara de ovo batida, seguida de tratamento em vapor fluente e filtrada) diluída (50,0 g/L de açúcares totais), e em seguida foram adicionados (g/L): KH_2PO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; extrato de levedura 1,75; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0. No meio de açúcar cristal, solubilizada também na concentração de 50 g/L de açúcares totais. Em seguida procedeu-se como o meio de garapa. Volumes de 25 mL foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de capacidade de 125 mL e autoclavados por 20 minutos a 121 °C.

Fermentações: Foi usado inóculo na concentração de células 2,0 mg/mL e em quantidade de 10 %(V/V) do volume total de fermentação. Os frascos Erlenmeyers foram incubados a 28 °C sem agitação. Decorridos os tempos de incubação, o conteúdo dos frascos Erlenmeyers foi centrifugado a 9.005,8 g, sob refrigeração (4 °C) por 10 minutos para separação da biomassa. No sobrenadante foi avaliada a concentração de açúcar total. Na biomassa foi avaliada a atividade de asparaginase.

Determinação de biomassa: A biomassa foi avaliada por turbidimetria em leituras a 605 nm e convertida para concentração usando curva de calibração obtida por gravimetria (peso seco).

Determinação de açúcares totais: Utilizou-se o método segundo DUBOIS

et al. (1956), sendo usada uma curva de calibração de sacarose, variando a concentração de 0 a 100 µg/mL. As leituras foram feitas em 490 nm.

Determinação de asparaginase: A atividade enzimática foi determinada de acordo com IMADA. et al., (1973). O centrifugado de células foi suspenso em 5,0 mL de solução de NaCl 0.9%; após isso, 0,1 mL da solução resultante foi adicionado a 1,0 mL tampão tris-HCl 0,02 M, pH 8,6 e 0,9 mL de asparagina 0,01 M, e foi mantida a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de ácido tricloroacético 1,5 M. A amônia liberada foi então, determinada pelo método de Nessler, colocando 0,5 mL do sobrenadante centrifugado da reação em 4,5 mL de água destilada e 1 ml do reagente de Nessler, à temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida, realizada a leitura em 400 nm. A concentração de amônia foi determinada com base em uma curva de calibração construída com solução de sulfato de amônio. Uma unidade de asparaginase (U) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µMol de amônia por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram testados substratos de baixo custo na fermentação para obtenção de asparaginase. *Z. mobilis* e *E. herbicola* foram comparadas quanto a produção desta enzima, usando açúcar cristal e garapa diluída como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. A tabela 1 mostra os resultados obtidos das fermentações.

Tabela 1. Valores de asparaginase de *Z. mobilis* e *E. herbicola* na fermentação de açúcar cristal e garapa

	<i>Zymomonas mobilis</i>		<i>Erwinia herbicola</i>	
	açúcar cristal	garapa	açúcar cristal	Garapa
Asparaginase (U/L)	2,65	0,5	3,08	1,5
Biomassa (g/L)	5,81	10,0	4,65	3,3
Y* asparaginase/biomassa	0,46	0,05	0,66	0,45
Tempo (h)	7	7	24	24
Produtividade (U/L.h)	0,38	0,07	0,13	0,06

*Índice de conversão (U/g)

O uso de garapa por ambos micro-organismos teve desempenho inferior quando comparado com as fermentações utilizando açúcar cristal. Ainda que na fermentação da garapa, a biomassa produzida por *Z. mobilis* tenha sido cerca de três vezes superior a de *E. herbicola*, obteve-se o menor valor de asparaginase na comparação com todas as fermentações. Cepas de *Z. mobilis* são naturalmente contaminantes de moendas nas usinas, desempenhando ativa fermentação e produzindo elevado valor de biomassa nesse substrato. Contudo o valor de índice de conversão foi bastante baixo. Os dados obtidos levam a exclusão da utilização da garapa como substrato à produção de asparaginase, ainda deve-se considerar também que, este substrato é restrito a uma estação do ano, devido a sazonalidade da cana-de-açúcar.

O açúcar cristal foi a fonte de carbono que proporcionou os maiores valores de asparaginase tanto com *Z. mobilis* como *E. herbicola*. Ainda que os valores obtidos de índice de conversão e atividade de asparaginase, embora próximos, favoreceram *E. herbicola*, o fator principal a ser considerado é o valor de produtividade. *Z. mobilis* obteve valor de produtividade três vezes do que o obtido por *E. herbicola*, além do tempo de fermentação ser muito prolongado em *E. herbicola*. Sendo assim, é possível concluir que a utilização de *Z. mobilis* na obtenção de asparaginase é muito mais promissora.

Contudo Abud et al. (2003) relataram valores superiores aos do presente trabalho na comparação com *Z. mobilis*. Usando meio sintético contendo asparagina e glicose, esses autores obtiveram atividade de 4,0 UI/L e 15 U/g para índice de conversão. Na tentativa de diminuir o custo de produção, este trabalho usou açúcar cristal ou garapa e extrato de levedura, mas ausente de asparagina como indutor enzimático. O uso de asparagina encarece o custo de produção, pois é disponível apenas sob a forma analítica, não existindo um insumo disponível de baixo custo rico em asparagina, o que tornaria o processo vantajoso. Outros autores que também utilizaram asparagina, observaram valor elevado de asparaginase. Camilios Neto et al (2005) relataram valores superiores de asparaginase (16,55 U/L), quando comparados ao presente trabalho. Esses autores também confirmaram o papel indutor da asparagina, na produção de asparaginase, durante a fermentação do melaço por *Z. mobilis*. Casotti et al (2007) avaliaram a produção por *Z. mobilis* usando garapa, extrato de levedura e asparagina. Esses autores alcançaram atividade de 9,75 U/L.

CONCLUSÃO

Entre os cultivos testados, a melhor condição de fermentação para a produção de asparaginase foi por *Z. mobilis* em açúcar cristal. Entretanto os valores obtidos foram inferiores aos de outros autores que fizeram uso de asparagina como indutor da produção enzimática.

REFERÊNCIAS

- ANESE, M.; QUARTA, B.; FRIAS, J.M. *Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits*. *Food Chemistry* v. 126, n.2, p.435-440,2011.
- ABUD, A.K.S.;CARNEIRO,C.C.;ALVES,T.L.M.;PINTO,J.C.;PINHEIRO,I. O. *Estudo da cinética da produção de asparaginase por zymomonas mobilis*.In:SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 14.,2003. Florianópolis. Anais...Florianópolis: UFSC,2003. CD-ROM.
- ABUD, A. K. S.; PINTO, J. C.; ALVES, T. L. *Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da enzima asparaginase por Zymomonas mobilis*. In:SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15., 2005, Recife. *Anais*..Recife: UFPe, 2005. CD-ROM.
- CAMILIOS NETO, D.; BUZATO, J. B.; BORSATO, D. *L-asparaginase Production by Zymomonas mobilis during molasses fermentation: optimization of culture conditions using factorial design*. *Acta Scientiarum: Technology*, Maringá, v.28, n.2, p.151-153, 2006.
- 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
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. *Colorimetric method for determination of sugar and related substances*. *Analytical Chemistry*, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO,M. *Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms*. *Journal of General Microbiology*, London, v.76, n.1, p.85-99, 1973.
- KOTZIA, G.A.; LABROU, N.E. *Cloning, expression and characterization of Erwinia carotovora l-asparaginase*. *Journal of Biotechnology*, New York, v.119, p.309-323, 2005
- MINIM, L.A.; ALEGRE, R.M. *Produção da enzima l-asparaginase por Erwinia aroidea*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.35, n.2, p.277-283, 1992.
- PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; RAO, R. S.; LAKSHMI,G. S.; SARMA, P. N. *L-Asparaginase production by isolated Staphylococcus sp*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.102, n. 5, p.1382-1391, 2007.
- SWINGS, J.; DE LEY, J.; *The biology of Zymomonas*. *Bacterial Reviews*, London, v.41, n.1, p.1-46, 1977.

Received 17 May 2013
Accepted 06 August 2013