

Eixo Temático: Biologia Aplicada

**ET-09-001**

**PARÂMETROS IDEAIS PARA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE A PARTIR DE *Streptomyces parvulus* C1.129**

Islan D'Eric Gonçalves da Silva<sup>1</sup>, Luiz Eduardo Felix de Albuquerque<sup>1</sup>, Hanna Katarina Lopes Ferreira, Wanda Juliana Lopes e Silva<sup>1</sup>, Suellen Emilliany Feitosa Machado, Glêzia Renata da Silva Lacerda<sup>1,2</sup>, Silene Carneiro do Nascimento<sup>1</sup>, Gláucia Manoella de Souza Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Coleção de Microrganismos, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. E-mail: gleziarenata@gmail.com.

<sup>2</sup>Faculdade Maurício de Nassau, Unidade Caruaru-PE.

<http://dx.doi.org/10.21472/congrebio2016.et-09-001>

**RESUMO**

A L-Asparaginase é considerada uma enzima importante para tratamento da leucemia linfoblástica aguda. Esta enzima é capaz de lisar a L-Asparagina em ácido aspártico e amônia. Alguns microrganismos são capazes de sintetizar essa substância, como fungos filamentosos, leveduras, bactérias e actinobactérias. O presente estudo refere-se à avaliação das condições ideais para a produção de L-Asparaginase a partir do microrganismo *Streptomyces parvulus* C1.129, que é uma actinobactéria pertencente à Coleção de Cultura de Microrganismos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA - 3408). Inicialmente foi realizado um ensaio qualitativo onde foi adicionado o inóculo padronizado em meio ágar M9 e CZ adicionando vermelho de fenol como um indicador e L-asparagina como substrato. O microrganismo foi submetido a fermentações, a fim de quantificar a L-Asparaginase, onde foram avaliados vários parâmetros, tais como fontes de carbono (caldo M9 e TGY), tempo de fermentação (24 a 120 horas), o pH (5-9) e temperatura (25 °C a 50 °C). Os parâmetros do ensaio quantitativo foi avaliado medindo a quantidade de amônia formada pela nesslerização, em que 1 U de L-Asparaginase foi igual à quantidade de enzima que liberou 1 µM de amônia por minuto a 37 °C. A análise qualitativa mostrou a produção da enzima por meio de um halo cor de rosa em torno das colônias. O ensaio quantitativo evidenciou que o meio M9 foi o mais adequado para a produção da L-asparaginase, com 101,9 U/mL de enzima, um valor de 3,75 vezes maior comparado ao meio TGY. As cinéticas de produção de enzima mostrou um pico num período de 96 horas, com quantidade de enzima que atingiu 189,9 U/mL. A temperatura de 35 °C foi considerada ideal para a produção da enzima, chegando a 273,83 U/mL entre as temperaturas testadas. O pH 6 foi considerado o melhor para a produção de L-asparaginase, em comparação com os outros valores de pH, tendo uma quantidade de 937,18 U/mL. A definição das condições ideais de produção da enzima são fatores de grande importância para a produção de L-Asparaginase em larga escala. As actinobactérias isoladas de solo e a raízes das plantas da Caatinga, tem demonstrado uma grande capacidade de produzir diversas enzimas. Dessa forma, o estudo destes micro-organismos oriundos do bioma Caatinga é importante devido ao seu alto potencial biotecnológico e possível aplicação dos seus compostos na indústria farmacêutica.

**Palavras-chave:** Actinobacteria; L-Asparaginase; Produção.

**INTRODUÇÃO**

As actinobactérias pertencem a um grupo de bactérias Gram-positivas que está amplamente distribuído na natureza e representam um elemento de grande importância para a

população de micro-organismos do solo, pois produzem metabólitos secundários de forte interesse para a biotecnologia (SILVA-LACERDA et al., 2016).

Estudos afirmam que as actinobactérias também são responsáveis pela produção de várias enzimas extracelulares tais como: celulases, quitinases, proteases e amilases. Estes micro-organismos apresentam saída atraente, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em um período de tempo relativamente curto (SILVA et al., 2012). As enzimas são proteínas biocatalisadoras de um enorme repertório de reações químicas, que são essenciais para a quebra de moléculas relacionadas com o crescimento e, conseqüentemente, com a vida de todos os organismos (HOLLIDAY et al., 2009).

A L-Asparaginase é uma enzima que pode ser produzida pelas actinobactérias e é considerada de grande importância para o tratamento de indivíduos com Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). A LLA é uma neoplasia maligna de linfócitos, caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea, sangue periférico e órgãos linfóides (NEHMY et al., 2011). A Leucemia Linfoblástica Aguda é o tipo mais comum de leucemia encontrada na fase infantil, apresentando um pico de incidência entre o segundo e o quinto anos de vida, regredindo nas faixas etárias maiores (PUI et al., 2004).

Assim que a enzima L-Asparaginase é injetada na corrente sanguínea do indivíduo que apresenta a doença, as reservas de L-Asparagina, fonte de energia das células cancerosas, são totalmente convertidas em ácido aspártico e amônia. Sem o aminoácido para metabolizar, ocorre a lise das células tumorais, pois devido à um silenciamento gênico estas células não são capazes de sintetizar o aminoácido por si mesmas. Por outro lado, células normais não são afetadas pela ação da enzima, pois, ao contrário das células cancerosas, são capazes de sintetizar o aminoácido para seu desenvolvimento e sobrevivência (NARTA et al., 2007).

Existem diversos micro-organismos produtores de L-Asparaginase e isso gera uma grande vantagem para a aquisição de enzimas que possam ser de utilidade clínica. Porém, nem todas as L-asparaginases podem ser utilizadas no tratamento da LLA devido à sua elevada citotoxicidade. A padronização das condições de cultivo e produção desta enzima por *S. parvulus* C1.129, representa o primeiro passo para um estudo mais aprofundado sobre aplicação deste composto na medicina. Este micro-organismo já tem sido relatado como potencial produtor de compostos antimicrobianos (SILVA-LACERDA et al., 2016). O grande potencial biotecnológico do gênero *Streptomyces*, a importante aplicabilidade dos compostos por ele produzidos, o pouco conhecimento sobre a bioprospecção dos micro-organismos do bioma Caatinga, são fatores que motivaram este estudo. Além disso, é de extrema importância considerar que as condições ambientais extremas desta região representam um ambiente favorável à produção de novas moléculas bioativas, como a enzima L-asparaginase.

## OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo determinar os principais parâmetros de produção da enzima L-asparaginase produzido pelo microrganismo *Streptomyces parvulus* C1.129, visando a grande importância biotecnológica e econômica da enzima que possui um amplo uso clínico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagem *Streptomyces* e condições de cultivo

*Streptomyces parvulus* C1.129 pertence à Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA-3408). A linhagem se encontrava preservada em óleo mineral e foi reativada em caldo ISP-2 (International *Streptomyces* Project) (SHIRLING e GOTTLIEB 1966) a 37 °C, durante 48 horas. Em seguida, a cultura de *Streptomyces* foi transferida para placas com meio ISP-4 ágar e incubadas a 37 °C por 48 a 120 h, para obtenção de culturas frescas para realização dos experimentos.

### **Produção da L-asparaginase**

*S. parvulus* C1.129 foi cultivado em meio M9 líquido [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 6 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g/L; NaCl, 0,5 g/L; L-asparagina, 5 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,014 g/L; Glicose, 2 g/L; H<sub>2</sub>O Destilada, 1 L] e no meio TGY [Glicose, 100 g/L; Tiptona, 5 g/L; Extrato de Levedura, 5 g/L; L-asparagina, 4 g/L; H<sub>2</sub>O Destilada, 1 L] e a atividade enzimática foi medida após 120 horas de fermentação. Após a determinação do meio de cultivo que permitiu melhor produção da L-asparaginase, iniciou-se os estudos da influência do tempo (24 a 120 horas), temperatura (25 °C a 50 °C) e pH (5 a 9). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores médios com desvio padrão (SD) foram calculados.

### **Quantificação da L-Asparaginase**

Durante cada etapa de fermentação, alíquotas do fermentado foram retiradas e centrifugadas por 20 minutos a 6.160 g, para separação da biomassa do sobrenadante. Em seguida, a atividade da L-asparaginase foi determinada pela quantidade de amônia formada por Nesslerização (IMADA et al, 1973). Uma mistura de 0,5 mL de extrato de enzima (sobrenadante livre de célula), 0,5 mL de Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo L-Asparagina a 16 mM foi incubada por 30 min a 37 °C. A reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 1,5 M, centrifugada a 6.160 g por 3 min e 0,5 mL do sobrenadante foi diluído em 2,25 mL de água destilada e adicionado 0,25 mL do Reagente de Nessler. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Uma solução de sulfato de amônio foi utilizada para a preparação da reta padrão. Uma unidade internacional (UI) de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µM de amônia por minuto a 37 °C.

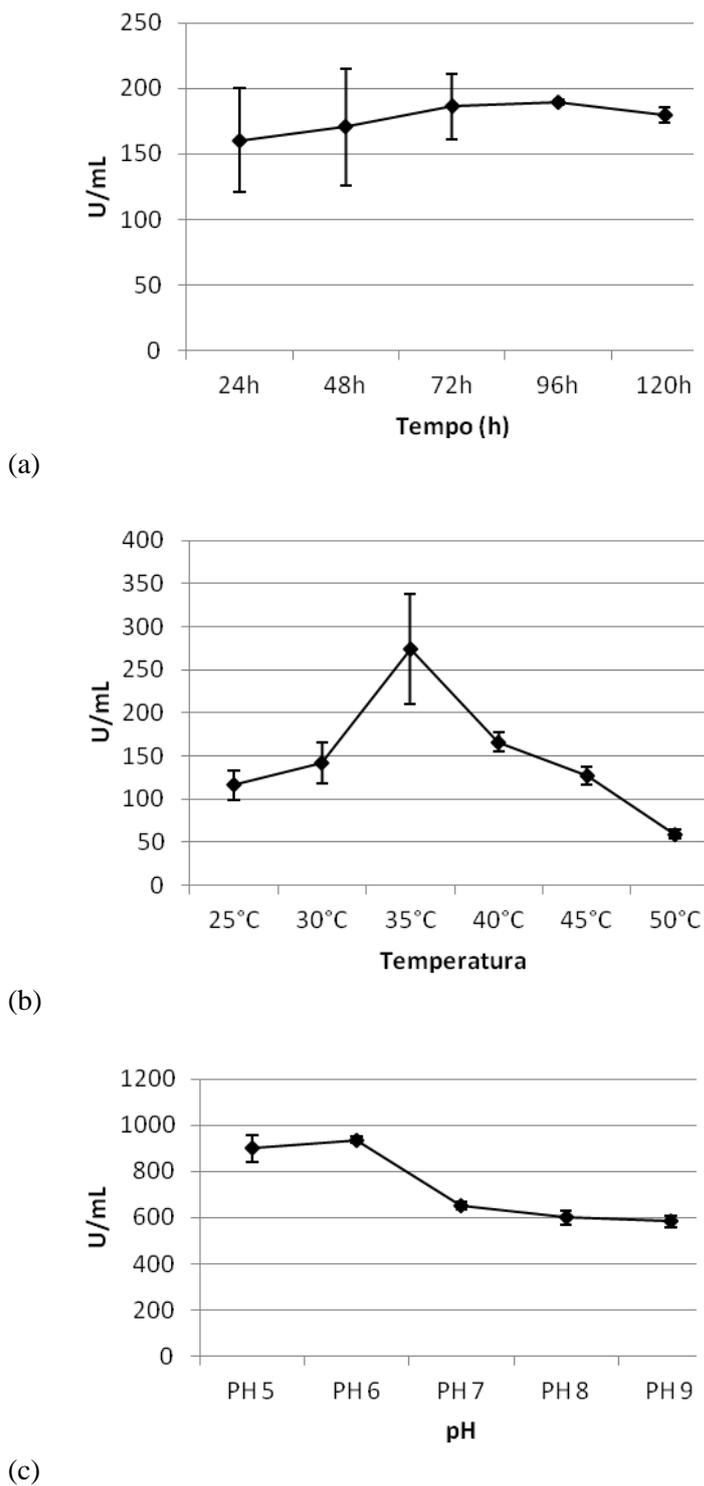
### **Análises Estatísticas**

As análises estatísticas do experimento foram realizadas utilizando o programa Excel®2010 (Microsoft®).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Determinação das condições ideais para produção da enzima**

Com a finalidade de determinar as melhores condições para produção da enzima L-Asparaginase, alguns parâmetros como meio de cultura, tempo, temperatura e pH foram testados. Foi possível determinar que *S. parvulus* C1.129 apresentou melhor atividade enzimática de 101,90 U/mL quando cultivado no meio M-9 e comparado com a atividade enzimática da L-asparaginase no meio TGY (27,11 U/mL). O tempo ideal foi de 96 h de fermentação, apresentando um pico de 189,91 U/mL. Dentre as temperaturas que foram testadas (25 °C a 50 °C), a temperatura de 35 °C apresentou melhor atividade com resultados que chegaram a 273,82 U/mL. O último parâmetro a ser testado foi o pH que variou entre 5 e 9, sendo o pH 6 o que mais se destacou como a melhor condição para a produção da enzima, com atividade enzimática de 937,18 U/mL.



**Figura 1.** Parâmetros avaliados para determinação das melhores condições de produção da enzima L-asparaginase por *Streptomyces parvulus* C1.129. (a) tempo de fermentação, (b) temperatura de incubação e (c) pH.

No presente estudo foi verificado que a atividade máxima da L-asparaginase produzida pelo *S. parvulus* foi de 937,18 U/mL nas condições ideais ajustadas. Este valor foi

consideravelmente superior do que o relatado por Dias et al. (2016) no estudo usando *A. oryzae* como produtor da enzima, onde foi obtido um valor de 67.49 U/mL. Em comparação, a actinobactéria *S. parvulus* se sobressaiu para produção da enzima quanto ao fungo. A condições ideais de produção da enzima pelo *A. oryzae* foi melhor com 72h de fermentação e pH (8,0). No entanto, neste mesmo tempo de fermentação, *S. parvulus* já apresentava-se capaz de produzir 186,05 U/mL de L-Asparaginase.

O microrganismo *S. parvulus* também apresentou destaque na produção de L-Asparaginase quando comparada com bactérias produtoras, como a *Pseudomonas aeruginosa* relatada por Badoei-Dalfard (2015), que também obteve ótimos resultados, chegando a um pico de 785 U/mL. É importante ressaltar que ambos os estudos foram realizados utilizando condições semelhantes, inclusive o mesmo meio de cultura.

A otimização dos parâmetros nutricionais e metabólicos para cultivo de microrganismos é uma importante estratégia para a produção não apenas de enzimas, mas de uma gama de metabólitos secundários (KHALILZADEH et al, 2004). Os fatores ambientais, tais como o pH, e fontes de carbono e de hidrogênio, tempo e temperatura, podem ter efeitos profundos sobre o início de desenvolvimento dos micro-organismos, e assim, a composição do meio deve ser considerada com muito cuidado no que diz respeito à produção de metabólitos (BARKA et al., 2016).

## CONCLUSÃO

No presente estudo, o micro-organismo foi avaliado em condições diferentes onde foi possível determinar os principais parâmetros da produção da enzima L- asparaginase. Após ser cultivado em diferentes meios de cultura, temperatura, pH e tempo, foi visto que o micro-organismo apresenta um grande potencial biotecnológico, pois apresenta uma eleva da produção da enzima. A adequação dos parâmetros de produção da enzima representa um processo viável e de grande importância para obtenção de compostos altamente bioativos e com aplicabilidade clínica. Para que esta aplicabilidade seja possível, estudos complementares com L-Asparaginase produzida por *S. parvulus* C1.129 serão iniciados após a purificação da enzima.

## REFERÊNCIAS

ANZAI, K.; NAKASHIMA, T.; KUWAHARA, N.; SUZUKI, R.; OHFUKU, Y.; TAKESHITA, S.; ANDO, K. Actinomycete bactéria isolated from the sediments at coastal and offshore area of Nagasaki Prefecture, Japan: diversity and biological activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, p. 215-217, 2008.

BADOEI-DALFARD, A. Purification and characterization of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: production optimization by statistical methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 388-397, 2015.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, A. N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, G. P. V. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-Asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 2016.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B. O.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, p. 560-577, 2009.

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

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N.; MOHAMMADIAN-MOSAABADI, J.; MOHAMMADI, M. R.; BAHRAMI, A.; MALEKSABET, N.; NASSIRI-KHALILLI, M. A.; EBRAHIMI, M.; NADERIMANESH, H. Process development for production of recombinant human interferon-gamma expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 63-69, 2004.

NARTA, K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-Asparaginase in the treatment of leukemia. **MeSH Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 61, p. 208-221, 2007.

NEHMY, R. M. Q.; BRITO, A. C.; MOTA, J. A. C. ; OLIVEIRA, B. M. A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materna Infantil**, v. 11, n. 3, p. 293-299, 2011.

PUI, C. H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute Lymphoblastic Leukemia. **The new England Journal of Medicine**, v. 350 (15), p. 1535-1548, 2004.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVA, K.; CASSETARI, A. S.; LIMA, A. S.; BRANDT, E.; PINNOCK, E.; VANDAMMEC, P.; MOREIRA, F. M. S. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon Region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 253-262, 2012.

SILVA-LACERDA, G. R.; SANTANA, R. C. F.; VICALVI-COSTA, M. C. V.; SOLIDÔNIO, E. G.; SENA, K. X. F. R.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p 1-12, 2016.