



Triagem de fungos produtores de L-asparaginase e estudo da produção da enzima

Évelyn Kinoshita Sasaki¹, Hélia Harumi Sato

1. eve.sasaki@gmail.com

Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos – Laboratório de Bioquímica de Alimentos
Palavras-chave: Produção – L-asparaginase – Acrilamida - Triagem



Introdução

A L-asparaginase é uma enzima que foi lançada recentemente no mercado para redução da formação da acrilamida em alimentos que contém açúcares redutores e asparagina e são submetidos a temperaturas superiores a 100°C como batatas fritas, biscoitos e produtos de panificação. A acrilamida é formada por meio da reação de Maillard em alimentos contendo açúcares redutores e o aminoácido L-asparagina, submetidos à alta temperatura. A reação de Maillard é importante para a formação de compostos de aromas e coloração desejáveis em alimentos, no entanto ocorre a formação de acrilamida que é potencialmente cancerígena. Uma alternativa para a redução da formação deste composto em alimentos é o uso da enzima L-asparaginase microbiana que hidrolisa seletivamente o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia, com mínimo impacto sobre a qualidade do produto final (Figura 1).

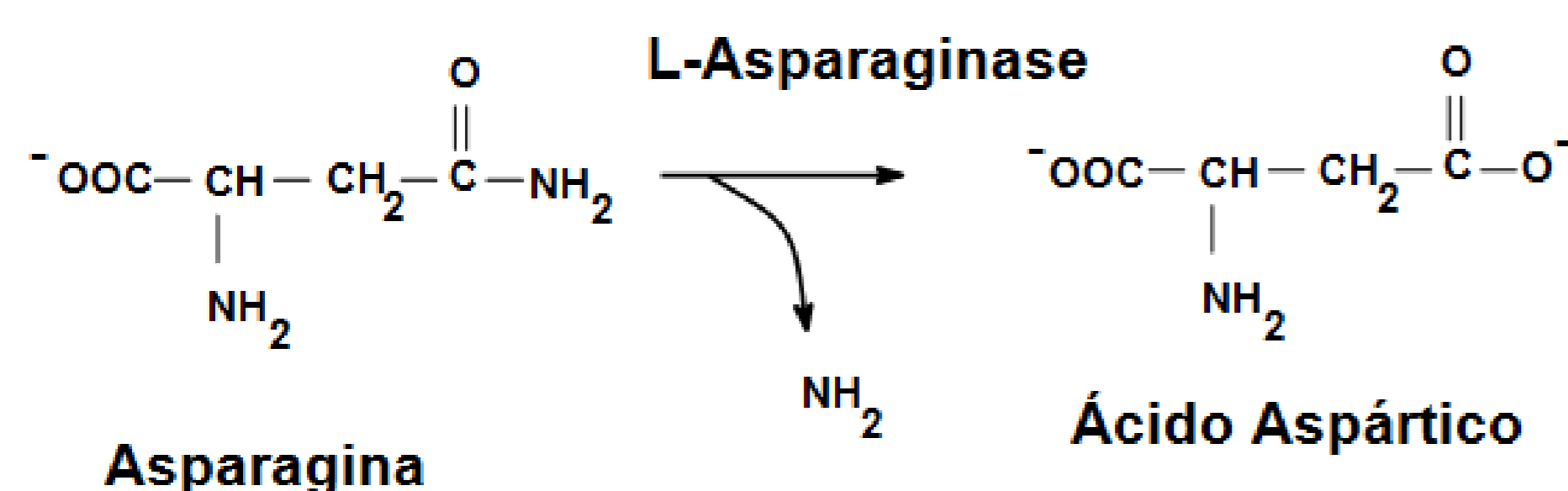


Figura 1 – Hidrólise da L-asparagina catalisada pela L-asparaginase

Material e Métodos

1. Isolamento de micro-organismos:

- Amostras de solo e vegetais foram utilizadas para o isolamento de micro-organismos produtores de L-asparaginase.
- Os micro-organismos foram isolados em placas de Petri por esgotamento.

2. Triagem de fungos produtores de L-asparaginase em placas de Petri (Gulati et al. 1997)

- Testes em placas de petri contendo o meio Czapek Dox modificado, composto por 2,0g de glicose; 10,0 g de L-asparagina; 1,52 g de KH₂PO₄; 0,52 g de KCl; 0,52 g de MgSO₄.7H₂O; 0,01 g de CuNO₃.3H₂O; 0,01 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,01 g de FeSO₄.7H₂O, 20 g de agar, 15mL de solução 0,25% etanólica de vermelho de fenol, por Litro, ajustado para pH 6,2.

3. Triagem de bactérias produtoras de L-asparaginase em placas de Petri (Gulati et al. 1997)

- Testes em placas de petri contendo o meio composto por 6,0 g de Na₂HPO₄.2H₂O; 3,0 g de KH₂PO₄; 0,5 g de NaCl; 5 g de L-asparagina; 2 mL de solução 1M de MgSO₄.7H₂O; 1 mL de solução 0,1M de CaCl₂.2H₂O; 10 mL de solução 20% de glicose, 20 g de agar e 15mL solução etanólica 0,25% de vermelho de fenol, por Litro, ajustado para pH 7,0.

4. Estudo da produção da L-asparaginase frascos Erlenmeyers por fermentação submersa

- Os micro-organismos foram cultivados em frascos contendo 50 mL de meio de cultivo com composição idêntica ao meio descrito no item 2 (fungos) e 3 (bactérias), porém sem a adição de vermelho de fenol e agar. Os fungos filamentosos foram fermentados a 33°C, 160 rpm por 96h e em seguida os meios de cultura foram filtrados em algodão. A atividade de asparaginase foi determinada no filtrado. Os frascos inoculados com as bactérias foram incubados a 37°C, 200 rpm por 24h. Após fermentação o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 xg e o sobrenadante usado como extrato enzimático bruto, para determinação da asparaginase.

5. Determinação de Atividade de L-asparaginase:

- A mistura de reação 0,5 mL de solução de L-asparagina (0,04M), 0,8 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0, foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de ácido tricloroacético 15% e 0,5 mL de reagente de Nesller. A absorbância das soluções foi medida a 450 nm em espectrofotômetro.
- Foi preparada uma curva padrão de cloreto de amônio. Uma unidade de atividade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de amônia por minuto nas condições de estudo.

Resultados e Discussão

1. Isolamento de micro-organismos

- Foram isoladas cinquenta e quatro linhagens de fungos filamentosos de amostras de solo e vegetais. Sete linhagens de bactérias foram obtidas da coleção de cultura do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA/Unicamp.

2. Triagem de micro-organismos produtores de L-asparaginase em placas de Petri:

- Entre as 54 linhagens de fungos testadas, vinte e cinco apresentaram halo de coloração rosada em meio de cultura contendo L-asparagina e vermelho de fenol após 72h de incubação a 30°C. Dentre as 7 linhagens bacterianas apenas uma linhagem de *Serratia plymuthica* ATCC 15928 apresentou halo.

- A Figura 2 ilustra a formação de halo de coloração rosada, ao redor da cultura do fungo *Aspergillus beiju*, uma linhagem da Coleção de Cultura do Laboratório de Bioquímica de Alimentos. Este resultado indica a produção de amônia a partir da hidrólise do substrato pela L-asparaginase, em meio contendo L-asparagina e vermelho de fenol. Por outro lado, não houve a formação de halo de coloração rosada, ao redor do fungo, no meio de cultivo controle contendo nitrato de sódio e vermelho (Figura 3).



Figura 2- Formação de halo de coloração rosada pela linhagem de *A. beiju* em meio contendo L - asparagina e vermelho de fenol.



Figura 3- Linhagem de *A. beiju* em meio contendo nitrato de sódio e vermelho de fenol.

3. Resultados da fermentação.

- Nos testes de fermentação submersa das linhagens de fungos e bactérias previamente selecionadas em frascos Erlenmeyer agitados não foi detectada produção de L-asparaginase. Mais estudos utilizando diferentes meios de cultivo e condições de fermentação são necessários para avaliar a produção de L-asparaginase pelos micro-organismos selecionados nos testes de placas de petri.

Conclusões

Neste trabalho foram isoladas 54 linhagens de fungos filamentosos de amostras de solos e vegetais para a seleção de micro-organismos produtores de L-asparaginase. Vinte e cinco linhagens de fungos apresentaram halo de coloração rosada em placa de Petri contendo meio de cultivo contendo L-asparagina, sais e vermelho de fenol, indicativo da produção da enzima. Uma linhagem bacteriana pertencente ao laboratório de Bioquímica de Alimentos também apresentou halo de coloração rosa em placa de Petri. Contudo, nenhuma das linhagens apresentou produção de L-asparaginase após fermentação em frascos Erlenmeyer agitados contendo meio de cultura líquido contendo L-asparagina, glicose e sais.

Referências Bibliográficas

- Gulati, R.; Saxena R.K.; Gupta. R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 24, p. 23 - 26, 1997.
- Sreenivasulu, V.; Jayaveera, K.N.; Mallikarjuna Rao P. Solid-State fermentation for the production of L-asparaginase by *Aspergillus* sp. **Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, p. 21-25, 2009.