

Demonstração da produção de L-Asparaginase a partir do kefir de água e leite

Bárbara Carolina Federhen¹

Carla Kereski Ruschel²

Resumo

A enzima L-Asparaginase é amplamente utilizada no tratamento de pessoas que possuem a leucemia linfóide aguda (LLA). Ela transforma a fonte de energia das células cancerígenas, o aminoácido L-Asparagina, em ácido aspártico e amônia, produtos que não são metabolizados por essas células doentes. Gradativamente, as células anormais morrem. Por sua vez, o kefir é uma colônia pró-biótica de micro-organismos pelo qual se obtém uma bebida fermentada bastante consumida, sendo essa colônia constituída principalmente por fungos e bactérias. Considerando que a produção da enzima se dá através de processos biotecnológicos, estudou-se a produção da mesma através do grão de kefir. Para testar a produção da enzima pelo grão e pelos seus sobrenadantes, prepararam-se meios de cultivo para a triagem de fungos e para a triagem de bactérias, que eram compostos pelo aminoácido L-Asparagina e pelo indicador vermelho de fenol. Resultados positivos para a produção da enzima foram evidenciados pela mudança de coloração do meio, que adquire tonalidade rosa, devido à elevação do pH do meio, causada pela liberação de amônia. Foi testada a produção da enzima pelas colônias do kefir d'água e do kefir de leite, assim como seus produtos de fermentação, tendo os resultados positivos para ambos os testes.

Palavras-chave: L-Asparaginase. Kefir. Leucemia linfóide aguda (LLA).

Abstract

The L-Asparaginase enzyme is largely used in the treatment of the people who have the acute lymphoblastic leukemia (ALL). It transforms the energy source of the cancer cells, the L-Asparagina amino acid, into aspartic acid and ammonia, products that cannot be metabolized by these cancer cells. Gradually, the abnormal cells dye. On the one hand, the kefir grain is a probiotic micro-organism colony by which gets a widely consumed brew, being this colony mainly constituted by fungi and bacteria. Concedering that the enzyme production takes place through a biotechnological process, it was studied the enzyme production through the kefir grain. In order to test the enzyme production though the grain and its supernatant, it was made a growth medium to the screening of fungi and bacteria, which was compounded by the L-Asparagina amino acid and a phenol red indicator. Positive results to the enzyme production were viewed by the change of the growth medium coloration, which turns to pink because of the pH elevation caused by the ammonia liberation. It was tested the enzyme production by the water and milk colonies of the kefir, as their fermented products, having positive results for both tests.

Keywords: L-Asparaginase. Kefir. Acute lymphoblastic leukemia.

¹ Aluna do curso Técnico em Química pela Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: barbarafederhen@gmail.com

² Licenciada em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS e professora na Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha (FETLSVC), Novo Hamburgo, RS. E-mail: carlar@liberato.com.br

1 Introdução

A L-Asparaginase é uma enzima muito importante para o tratamento de pessoas com leucemia linfóide aguda. Assim que é injetada a enzima L-Asparaginase 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, as células tumorais morrem, pois não são capazes de sintetizar o aminoácido por si mesmo. Em contrapartida, 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; KANWAR; AZMI, 2007).

O grão de Kefir é um grão pro-biótico, ou seja, trata-se de uma série de colônias constituídas de micro-organismos benéficos à saúde (FARNWORTH, 2005; YÜKSEKDAG; BEYATLI; ASLIM, 2004; OTLES; CAGINDI, 2003). O grão de kefir se apresenta em duas formas: um tipo de colônia é utilizado para a fermentação em água juntamente com açúcar mascavo, e outro tipo de colônia é utilizado para fermentação em leite. Os produtos obtidos diferem-se na consistência, entretanto, não há significativas alterações nos componentes microbiológicos. Diversas bactérias, gram-positivas e gram-negativas, são encontradas no grão de kefir. Além dessas bactérias, encontram-se também leveduras, que são as responsáveis pela fermentação do grão, gerando os produtos de fermentação comumente ingeridos.

Levando em conta que a enzima pode ser produzida por meio de processos biotecnológicos, por exemplo, através de micro-organismos, o grão de kefir pode vir a ser uma fonte alternativa, ainda que estudos aprofundados devam ser realizados, e poderá influenciar positivamente no tratamento dos pacientes portadores da leucemia linfóide. Dentre todos os micro-organismos constituintes do grão de kefir, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura, que possui potencial para a produção da

enzima (DUNLOP; ROON, 1975). Atualmente, a L-Asparaginase é produzida em escala industrial, através dos procariotos *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, sendo esses, responsáveis por severas reações imunológicas nos pacientes (OHNUMA *et al.*, 1970).

O trabalho tem como principal objetivo verificar a produção da enzima L-Asparaginase pelas colônias dos grãos de kefir, bem como verificar a presença da enzima nos produtos de fermentação, comumente ingeridos pela população.

2 Materiais e métodos

2.1 Fermentação do kefir d'água e do kefir de leite

A preparação da bebida fermentada foi feita, adicionando-se três colheres de sopa de açúcar mascavo (equivalente a 8,5 g) e três colheres do grão a meio litro de água deionizada em um Erlenmeyer. A fermentação ocorreu, durante 4 dias, em estufa, com temperatura de 22 °C (figura 1).

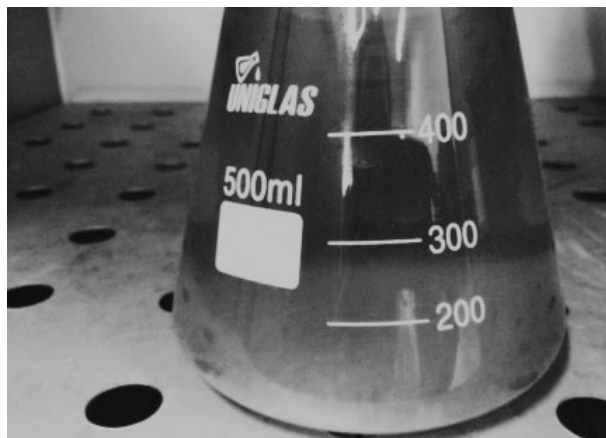


Figura 1: Fermentação do kefir d'água
Fonte: As autoras (2013).

A fermentação do kefir de leite foi realizada, usando-se a colônia do kefir de leite. A essa colônia adicionou-se 400 mL de leite, previamente, fervido e frio. A fermentação se deu em 24 horas a 22 °C.

Os grãos de kefir não são comercializados. Para obtê-los, foi realizado contato com doadores do Rio Grande do Sul que concederam as colônias. O grão utilizado para a fermentação em

água foi obtido através de um doador de Pelotas, e o grão utilizado para fermentação em leite foi obtido através de um doador de Novo Hamburgo.

2.2 Triagem dos fungos (leveduras) produtores de L-Asparaginase em placas de Petri

Os micro-organismos, após darem origem à bebida fermentada, foram testados para averiguar a possibilidade de produção da enzima. Sabendo-se que a composição do kefir é diversificada, preparou-se um meio especial para a triagem de fungos produtores da enzima presentes no grão de kefir d'água, assim como no grão de kefir de leite.

Foram realizados testes em placas de Petri que continham o meio Czapek DoX modificado, composto por 2 g de glicose, 10 g de L-Asparagina, 1,52 g de KH_2PO_4 ; 0,54 g de KCl; 0,52 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar, 15 mL de solução 0,25% etanólica de vermelho fenol, por litro, ajustado para pH 6,2 (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997).

Os micro-organismos (quantidade correspondente a três alçadas) foram colocados em placas que continham o meio estéril, e essas placas foram levadas à estufa na temperatura de 22 °C. A análise foi realizada em duplicata para ambos os tipos de colônias do kefir (água e leite). Simultaneamente, uma placa contendo o meio estéril foi submetida às mesmas condições das análises para averiguar a possibilidade da mudança do pH se dar, devido a alguma alteração no meio nutricional.

2.3 Triagem de bactérias produtoras de L-Asparaginase em placas de Petri

Foram realizados testes em placas de Petri que continham o meio composto por 6,0 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl; 5 g de L-Asparagina; 2 mL de solução 1 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 mL de solução 0,1 M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mL de solução 20% de glicose, 20 g de ágar e 15 mL de solução etanólica 0,25% de vermelho de fenol, por litro, ajustado para pH 7,0 (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997).

Foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente, isto é, as placas contendo o meio para bactérias e os micro-organismos foram incubados em estufa a 22 °C. Também, simultaneamente, uma placa estéril, contendo o meio para crescimento de bactérias, foi levado à estufa nas mesmas condições (figura 2).

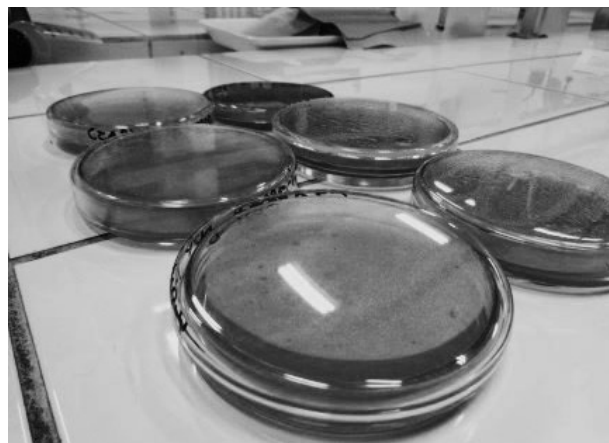


Figura 2: Placas estéreis para triagem de fungos (esquerda) e para a triagem de bactérias (direita)

Fonte: As autoras (2013).

2.4 Produção da enzima pelo sobrenadante e pelo sobrenadante filtrado

Com o intuito de verificar a produção da enzima pelo sobrenadante obtido, após fermentação dos grãos, repetiu-se a formulação dos meios descritos anteriormente (tanto para as bactérias, como para os fungos). O diferencial foi a retirada do ágar, componente que atribui solidez ao meio de cultivo. Em tubos que continham o meio estéril, adicionou-se 1 mL do produto de fermentação do kefir d'água e incubou-se os tubos em estufa a 22 °C. A análise foi realizada em duplicata para o sobrenadante do kefir d'água.

Os sobrenadantes de ambos os tipos de kefir foram filtrados normalmente com papel filtro e, após remoção das partículas mais grosseiras, o filtrado passou por uma membrana que impedia a passagem de partículas maiores que 0,45 μm e, posteriormente, por uma membrana 0,2 μm , tornando o meio estéril. Essa etapa tem como finalidade remover as células e esporos

provenientes do processo de fermentação, a fim de verificar se a enzima produzida é excretada para o meio extracelular dos micro-organismos.

Os meios líquidos para cultivo de fungos

e para cultivo de bactérias estéreis, também foram submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura, a fim de averiguar uma possível interferência do meio nutricional (figura 3).

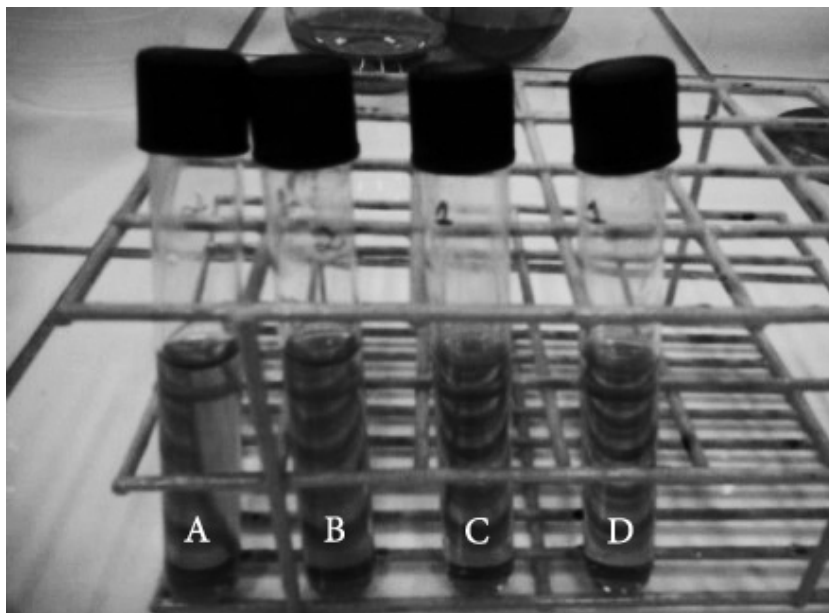


Figura 3: Meio líquido para bactérias (A e B) e fungos (C e D) respectivamente

Fonte: As autoras (2013).

3 Resultados e discussão

Resultados positivos para a hidrólise da L-Asparagina são evidenciados pela formação de um halo rosa ao redor dos micro-organismos. Esse halo rosa demonstra a formação da

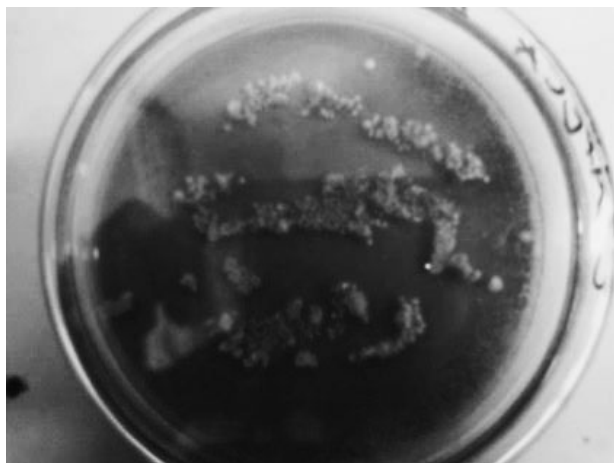


Figura 4: Produção de L-Asparaginase por fungos no kefir d'água

Fonte: As autoras (2013).

amônia que, em solução aquosa, forma hidróxido de amônio, responsável pela elevação do pH do meio, conferindo a esse coloração rosa, devido à presença do indicador vermelho de fenol. Ao verificar a composição dos meios de cultivo, nota-se que a única fonte de amônia é o aminoácido em questão, sendo esse o único componente responsável pela mudança de coloração do meio.

3.1 Triagem dos fungos (leveduras) produtores de L-Asparaginase no kefir d'água e no kefir de leite em placas de Petri

Após dois dias na estufa a 22 °C, houve a completa mudança de coloração do meio de cultivo utilizado para a verificação da produção da enzima pelo kefir d'água (figura 4). A mudança de amarelo para rosa indica o aumento de pH, devido à liberação de amônia.

Em relação ao kefir de leite, após dois dias em estufa a 22 °C, houve a formação de halo

rosa ao redor dos micro-organismos, que são as partes mais escuras (figura 5). O halo rosa indica que houve a formação de amônia, comprovando a hidrólise do aminoácido que ocorre em presença da enzima.

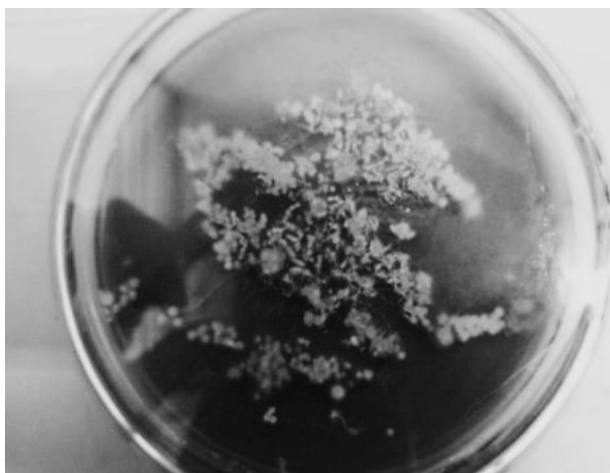


Figura 5: Produção de L-Asparaginase por bactérias no kefir d'água I

Fonte: As autoras (2013).

Após mais quatro dias em estufa a 22 °C, houve a completa mudança de coloração do meio de cultivo que passou de amarelo para totalmente rosado, ficando mais escuro (figura 6).

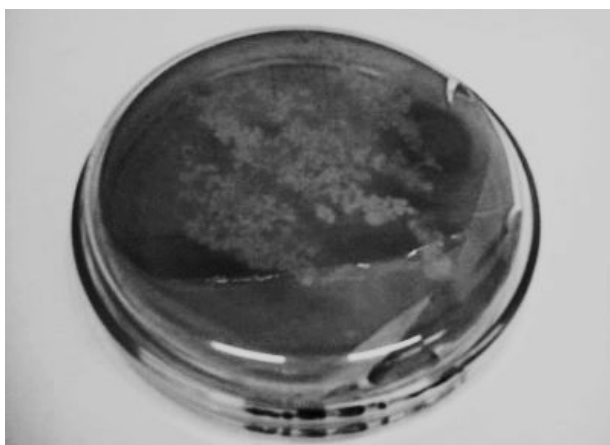


Figura 6: Produção de L-Asparaginase por bactérias no kefir d'água II

Fonte: As autoras (2013).

O meio estéril, passado todo o período de incubação dos testes, não apresentou mudança de coloração.

3.2 Triagem de bactérias produtoras de L-Asparaginase no kefir d'água e no kefir de leite em placas de Petri

Tanto para o kefir d'água, quanto para o kefir de leite, após quatro dias na estufa a 22 °C, houve a formação de um halo rosa ao redor dos micro-organismos colocados no meio de cultivo (figura 7). Esse halo indica a formação de amônia.

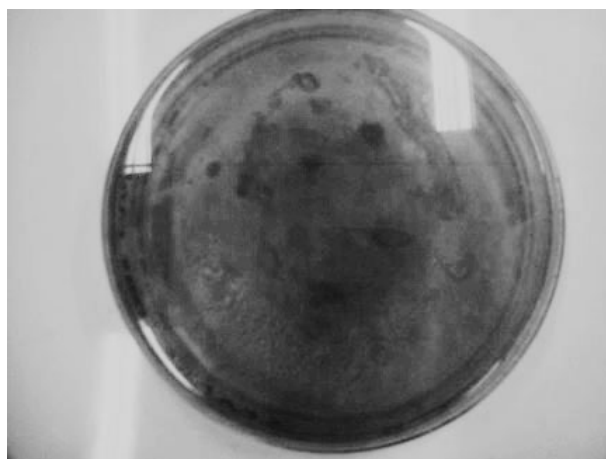


Figura 7: Produção de L-Asparaginase por fungos no kefir de leite I

Fonte: As autoras (2013).

Passados mais dois dias na estufa a 22 °C, os meios de cultivo, contendo as bactérias, apresentou mudança total de coloração do meio, passando de amarelado para rosa, assim como o meio de cultivo que continha a triagem dos fungos (figura 8).

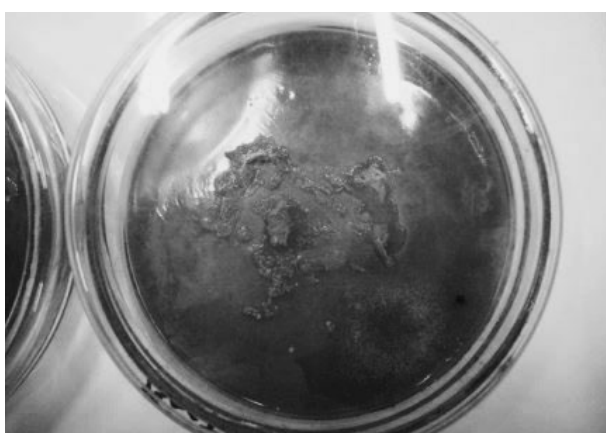


Figura 8: Produção de L-Asparaginase por fungos no kefir de leite II

Fonte: As autoras (2013).

O meio estéril para triagem de bactérias produtoras de L-Asparaginase também não apresentou mudança na coloração, passado todo o período de incubação dos testes (figuras 9 e 10).

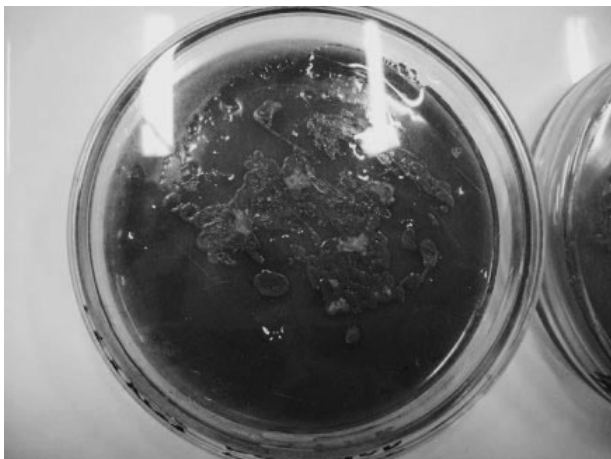


Figura 9: Produção de L-Asparaginase por bactérias no kefir de leite I
Fonte: As autoras (2013).

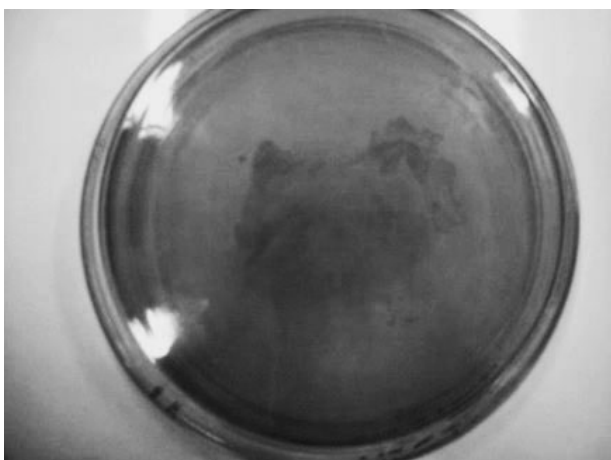


Figura 10: Produção de L-Asparaginase por bactérias no kefir de leite II
Fonte: As autoras (2013).

3.3 Avaliação da atividade de L-Asparaginase presente no sobrenadante do kefir d'água e do kefir de leite

Em relação ao sobrenadante do kefir d'água, passados quatro dias em estufa, a 22 °C, houve a mudança de coloração do meio especial para bactérias, passando de laranja para rosa (figura 11).

Para o meio Czapek Dox Modificado, usado para triagem de fungos, não houve evidência da produção de amônia.

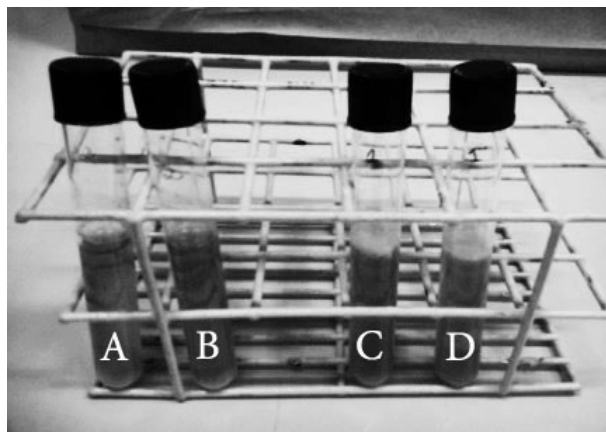


Figura 11: Produção de L-Asparaginase por bactérias (A e B) e fungos (C e D) pelo sobrenadante do kefir d'água
Fonte: As autoras (2013).

Após mais dois dias em estufa, a 22 °C, houve a mudança de coloração do meio Czapek Dox Modificado, evidenciando a formação de amônia (figura 12).

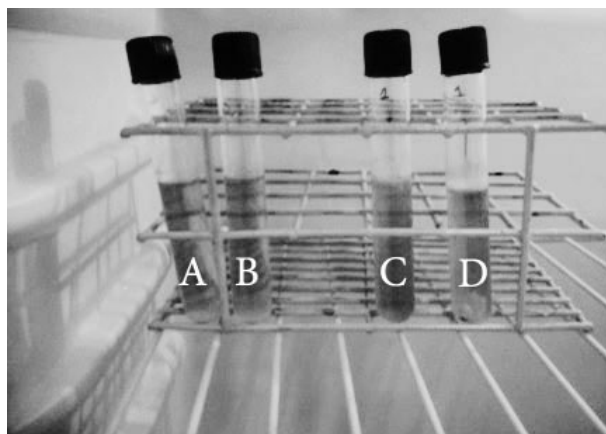


Figura 12: Produção de L-Asparaginase por bactérias (A e B) e fungos (C e D), respectivamente, pelo sobrenadante do kefir d'água
Fonte: As autoras (2013).

Os sobrenadantes filtrados do kefir d'água e do kefir de leite, após uma semana em estufa a 22 °C, também conferiu ao meio a coloração rosada, devido à liberação da amônia (figura 13).

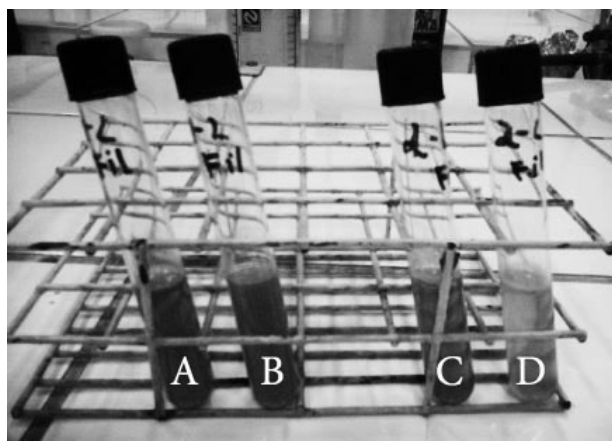


Figura 13: Produção de L-Asparaginase por fungos (A e B) e bactérias (C e D), respectivamente, pelo sobrenadante filtrado do kefir de leite
Fonte: As autoras (2013).

Os meios líquidos estéreis, após todo o período de incubação, não apresentaram mudança de coloração.

4 Conclusão

Através da mudança de coloração dos meios e a formação de halo rosa (nas figuras, estão representados por uma região escura), ao redor dos micro-organismos, pode-se verificar que os micro-organismos presentes, tanto nos grãos de kefir d'água, quanto nos grãos de kefir de leite, são capazes de produzir a enzima L-Asparaginase, convertendo o aminoácido L-Asparagina em ácido aspártico e amônia. Em relação ao kefir d'água, verificou-se que os fungos possuem um maior potencial para a produção da enzima, visto que a conversão da coloração do meio utilizado para a triagem de fungos se deu em menor tempo de incubação, quando comparada à conversão do meio utilizado para a triagem de bactérias. Porém, no kefir de leite, a mudança de coloração, tanto no meio para fungos, quanto no meio para bactérias, deu-se com o mesmo período de incubação.

Pode-se concluir que, além do grão de kefir d'água e de leite, seus sobrenadantes também contém enzima, produzida e excretada pelas bactérias e fungos do grão de kefir. A

observação da mudança de coloração no ensaio do filtrado do produto de fermentação indica que a enzima produzida é excretada para o meio extracelular.

No entanto, apesar de confirmada a produção da enzima, não se descarta a possibilidade de colônias bacterianas nas placas fúngicas e vice-versa.

Esta pesquisa, em momento algum, teve como principal objetivo substituir o tratamento convencional da doença por um tratamento que fosse alternativo, utilizando os grãos de kefir. Entretanto, vale destacar o potencial uso do kefir e de seus produtos de fermentação como complementos às terapias habituais. Para aprofundar mais o estudo, a próxima etapa da pesquisa será quantificar a quantidade de L-Asparaginase produzida e, além disso, realizar um levantamento genético dos micro-organismos que estão envolvidos na produção da mesma.

Referências

- DUNLOP, P.C; ROON, R.J. L-Asparaginase from *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. **Journal Bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 1017-1024, 1975.
- FARNWORTH, E.R. Kefir: a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2005.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-Asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n.1, p. 23-26, 1997.
- NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evolution of L-Asparaginase in treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 61, v. 3, p. 208-221, 2007.
- OHNUMA, T. *et al.* Biochemical and

pharmacological studies with L-Asparaginase in man. **Cancer Research**, v. 30, p 2297-2305, 1970.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**,

Faisalabad, v. 2, n. 2, p. 54- 59, 2003.

YÜKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 663-667, 2004.