



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE
DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* PRODUZIDA POR *Pseudomonas sp.* E
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA BACTÉRIA.**

IASMIM LUCAS DA SILVA

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE
DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* PRODUZIDA POR *Pseudomonas sp.* E
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA BACTÉRIA.**

IASMIM LUCAS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva.

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Iasmim Lucas da.

Otimização purificação e caracterização parcial de L-asparaginase da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* produzida por *Pseudomonas sp.* e identificação morfológica e molecular e molecular da bactéria / Iasmim Lucas da Silva. – Recife: O Autor, 2016.
66 f.: il.

Orientadoras: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Leonor Alves de Oliveira da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

1. Enzimas 2. Bactérias 3. Caatinga I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orient.) II. Silva, Leonor Alves de Oliveira da (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-302

IASMIM LUCAS DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE
DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* PRODUZIDA POR *Pseudomonas sp.* E
IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DA BACTÉRIA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do
grau de mestre.

APROVADA EM: 28/07/2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho - UFPE
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva – UFPE
(Co-Orientadora)

Prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão - UFPE
(1º Examinador)

Prof^a. Dr^a. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho - UFPE
(2º Examinador)

DEDICATÓRIA

“Primeiramente a ‘Deus’, que sempre me deu força e determinação para nunca desistir dos meus sonhos. Dedico também a meus pais Maria do Carmo e Edgar que lutaram e me ensinaram a conseguir os meus objetivos, ao meu afilhado Kauã e em especial Wellma e Laís.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus Pais (Edgar e Maria do Carmo) que sempre me ampararam em tudo na vida, me dando força, garra determinação, saúde, alegria e paciência para prosseguir e nunca desistir dos meus objetivos.

A Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas, onde tive a oportunidade de dar continuidade ao meu aperfeiçoamento dos conhecimentos. Agradeço ao Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI) os quais foram as minhas principais fontes de conhecimento e amadurecimento acadêmico.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela imensa paciência com a minha pessoa, pela compreensão, ensinamentos, orientações e dicas para uma vida melhor. Professora muito obrigada mesmo, levarei os ensinamentos da senhora pra sempre e os tenho repassado para os meus alunos de forma carinhosa e criteriosa também.

A minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva, por ter me oferecido a oportunidade de ingressar no mundo da microbiologia, abrindo as portas do conhecimento a química, bioquímica, biotecnologia e enzimologia, ao lado de grandes profissionais. Obrigada pela confiança depositada em mim e nos meus experimentos. Obrigada pelos ensinamentos e paciência, muito obrigada. Levarei a senhora como um exemplo de paciência e amor a profissão e aos alunos que os cerca.

Agradeço aos meus grupos de amigos: Almas de gato, Ranguieiras, Micro por amor, Retalhos e detalhes e Ozquímicos que me dão força, coragem, risadas, conselhos, puxões de orelhas e momentos mágicos. Hoje posso dizer a todos que sempre seremos pessoas do topo, crescemos juntos não falo no físico, mas no psicológico e socialmente. Amo vocês pessoal.

Em especial a elas: Wellma e Laís o que seria de mim sem vocês? Amo vocês do fundo do meu coração, vocês foram meus pés, meu chão e minhas asas para ter forças para buscar o que sempre almejei. Wellma eu agradeço tanto a Deus por aquele jambo ter caído naquele momento, pois foi a partir daí que a DUPLA DINÂMICA surgiu. Passamos por tantas coisas juntas, nossa eu agradeço muito toda ajuda e amadurecimento profissional que aprendi com você. Laís, Dona Wellen Laís, Deus me deu a amiga mais crítica e concisa que já tive, pensamentos objetivos, mas de um coração maior que a galáxia em que vivemos, obrigada por tudo viu, te amo.

As minhas amigas e companheiras da Pós-graduação, Leila Santos, Isabela Andrade, Camila Borba, Wellma Oliveira e Nelânia Baptista.

E por fim agradeço a galera do LAMAI/Coleção: Camila, Vinicius, Robson, Pércio, Erik, Nelânia, Diana, Manu, Cássio, Thales, Patrícia, Jacilene, Ana, Evelyn, Glêzia, Jéssica, Fátima e principalmente as Professoras Norma e Magali, estas queridíssimas pessoas as quem admiro muito. Deus abençoe estes belos grupos de pesquisa e muito obrigada por me aguentar.

EPÍGRAFE

“O tempo é algo que não volta atrás. Por isso plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores ...”(William Shakespeare).

RESUMO

A L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) é essencial para um curso normal do ciclo celular, estando presente em bactérias, fungos, animais e plantas e não é encontrada em seres humanos. Importante para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda dentre outras doenças leucêmicas e a doença de Hodgkin. As *Pseudomonas* são ocorrentes no solo e água, apresentam a capacidade de produzir enzimas, como é o caso da L-asparaginase do Tipo I e II. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter melhores parâmetros para otimização, purificação parcialmente da L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *Caesalpinia. pyramidalis*. No presente estudo visando otimizar a produção do complexo de L-asparaginase foi realizado um planejamento experimental central composto (2^3) com 4 pontos centrais, sendo as variáveis pH (4, 7 e 10), temperatura (30°C, 40°C e 50°C) e concentração da L-asparagina (0,2%, 0,5% e 0,8%) estudadas. Posteriormente realizou-se a análise estatística das variáveis e a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos que foram avaliados através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA). Em seguida, realizou-se a purificação da enzima L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* através da técnica de cromatografia de troca iônica e uma eletroforese SDS-PAGE. Posteriormente, foi realizada a caracterização da enzima purificada, avaliando os efeitos e estabilidades em diferentes valores de pH e temperaturas, por fim a enzima em diferentes substratos e íons. Finalizando foram efetuadas as identificações morfológica e molecular da bactéria, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) e a nível de espécie usou-se o *primer* 16 S respectivamente. Os resultados obtidos no procedimento de otimização da atividade de L-asparaginase foram obtidos nos ensaios com concentração de L-asparagina a 0,8%, pH 4 e temperatura de 30°C, com valores de atividades 0,5604 U/mL e 0,0632 mg de proteína/mL, respectivamente. Os melhores dados da cromatografia de troca iônica mostraram que das 57 frações coletadas, as de melhor atividade para L-asparaginase, foram as frações de valores 1,1412 U/mL e 1,1417 U/mL, com um rendimento de 0,64% e 18,6 U/mg de atividade específica. Realizou-se uma eletroforese PAGE-SDS para obter o peso molecular da proteína, apresentando como peso molecular de 32 kDa. Na caracterização enzimática, a enzima se mantém estável em pH 7, em relação a temperatura, tivemos a melhor estabilidade 30 °C, a L-asparaginase apresentou melhor efeito nos substratos L-asparagina seguido da L-glutamina e por fim o nitrato de sódio (NaNO_3), cloreto de Mercúrio (HgCl_2), cloreto de magnésio (MgCl_2) e ureia apresentaram os melhores efeitos de íons. Em relação à identificação bacteriana encontrou-se colônias em forma de bastonetes curtos, com longos flagelos e a nível de espécie foi denominada com sendo *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, os resultados obtidos da L-asparaginase caracterizada, isolada da *P. aeruginosa*, mostraram resultados significativos e extremamente importantes para a indústria biotecnológica, apresentando assim a viabilidade e confiabilidade do estudo realizado.

Palavras chaves: L-asparaginase; *Pseudomonas aeruginosa*; Rizosfera; Purificação; Caatinga; DCCR.

ABSTRACT

L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) is essential for the normal course of cell cycle being present in bacteria, fungi, animals and plants and is not found in humans. Important for the treatment of acute lymphoblastic leukemia among other leukemic disease and Hodgkin's disease. The *Pseudomonas* are occurring in soil and water, have the capacity to produce enzymes, such as L-asparaginase Type I and II. Thus, the aim of this study was to obtain the best parameters for optimization, purification part of L-asparaginase secreted by *Pseudomonas sp.* isolated from the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis*. In the present study to optimize the production of L-asparaginase complex was performed a central experimental design compound (2^3) with four central points and the variables pH (4, 7 and 10), temperature (30°C, 40°C and 50°C) and concentration of L-asparagine (0,2%, 0,5% and 0,8%) studied. Later there was the statistical analysis of the variables and analysis of variance (ANOVA) of the results that were evaluated through *Statistica*, version 7.0 (StatSoft Co., USA). Then there was the purification of L-asparaginase enzyme secreted by *Pseudomonas sp.* by ion exchange chromatography technique and SDS-PAGE electrophoresis. Afterwards, the characterization of the purified enzyme was carried out to evaluate the effect and stability at different pH values and temperatures, and finally the enzyme on different substrates and ions. Finalizing were made the morphological and molecular identification of bacteria using the Scanning Electron Microscope (SEM) and the kind of level we used the primer 16S respectively. The results of the optimization procedure for L-asparaginase activity in the assays were obtained with a concentration of L-asparagine to 0,8%, pH 4 and 30°C, with activity values 0,5604 U/mL and 0,0632 mg of protein/mL, respectively. The best data ionic exchange chromatography showed that the 57 collected fractions, the best activity to L-asparaginase were fractions values 1,1412 U/mL and 1,1417 U/mL, with a yield of 0,64 % and 18,6 U/mg specific activity. We performed a SDS-PAGE electrophoresis for the molecular weight of the protein, presenting as molecular weight of 32 kDa. In the enzyme characterization, the enzyme is stable at pH 7 with respect to temperature had better 30 °C stability, L-asparaginase had a better effect on the L-asparagine substrate followed by L-glutamine and finally sodium nitrate (NaNO_3), mercury chloride (HgCl_2), magnesium chloride (MgCl_2) and urea showed the best effects ions. Regarding the bacterial identification met colonies in the form of short rods with flagella long and species level was named as being *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, the results of characterized L-asparaginase, isolated from *P. aeruginosa*, showed significant results and extremely important for the biotechnology industry, thus presenting the viability and reliability of the study performed.

Keywords: L-asparaginase; *Pseudomonas aeruginosa*; Rhizosphere; Purification; Caatinga; DCCR.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1

Figura 1: Boundary of the Caatinga biome (solid line) superimposed over a map of the Northeast of Brazil showing state boundaries (dashed lines)	21
Figura 2: Caatinga vegetation during the dry season in the <i>Sertão</i> sub-region of the Northeast of Brazil, Sousa, Paraíba State (A) and transition from rainy to dry season in the <i>Agreste</i> sub-region of the Northeast of Brazil, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco State (B)	21
Figura 3: Rhizosphere of chamomile (<i>Matricaria recutita</i>)	23
Figura 4: Molecular structure of cellulose	26
Figura 5: Structure of the endoglucanase produced by the microorganism <i>Thermotoga maritima</i>	27
Figura 6: (A) Representation of structures of type I cellobiohydrolase from <i>Trichoderma harzianum</i> and (B) type II cellobiohydrolase from <i>Humicola insolens</i>	28
Figura 7: Representation of the structure of β - glucosidase produced by the microorganism <i>Bacillus polymixa</i>	28
Figura 8: Crystal structure of the Archaeal asparagine synthetase	29
Figura 9: Molecular structure of <i>Escherichia coli</i> L-asparaginase, types I and II, respectively	30
Figura 10: <i>P. pyramidalis</i> in the Agreste sub- region of Brejo da Madre de Deus, State of Pernambuco. Photographed at the Nilo Coelho Monumental Sculpture Park	30
Figura 11: Aspects of leaves, immature fruits, stems and flowers of <i>Poincianella pyramidalis</i>	30

CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2

Figura 1: Gráfico de Pareto para significância dos fatores pH, temperatura e concentração, na produção da L-asparaginase.	49
Figura 2: Gráfico mostrando a relação entre as frações e suas respectivas absorbâncias (500 e 280 nm).	51

Figura 3: Eletroforese de purificação parcial da L-asparaginase.	52
Figura 4: Caracterização enzimática: a) Temperatura ótima; b) Estabilidade térmica.	53
Figura 5: Caracterização enzimática: a) pH ótimo; b) Estabilidade em diferentes pHs.	55
Figura 6: Caracterização enzimática: efeito de diferentes íons metálicos e inibidores da L-asparaginase.	56
Figura 7: Caracterização enzimática: Efeito da L-asparaginase em diferentes substratos.	57
Figura 8: Crescimento biológico da <i>Pseudomonas sp.</i>	57
Figura 9: Identificação morfológica da <i>Pseudomonas sp.</i> A) Coloração de Gram. B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1:

Tabela 1: Plant species endemic to the Caatinga biome and their application	22
Tabela 2: Microorganisms producing bacterial L-asparaginase and their characteristics	25
Tabela 3: Microorganisms producing bacterial cellulases and their characteristics	25

CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2:

Tabela 1: Níveis e variáveis.	41
Tabela 2: Planejamento experimental.	48
Tabela 3: Designer do planejamento 2 ³ apresentando: Estimativa de erro; Variância; Desvio padrão; Coeficiente de correlação; Média Residual.	50
Tabela 4: Purificação Parcial da L-asparaginase da <i>Pseudomonas sp.</i>	51
Tabela 5: Extração de DNA da <i>Pseudomonas sp.</i>	59

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

g/L	Gramas por litros
IBGE	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
M	Molar
MH	Muller Hington Ágar
mL	Mililitros
m/v	Massa por volume
µg/mL	Micrograma por mililitros
µL	Microlitros
µmol	Micromol
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
PGRP	<i>Plant Growth Promotion Rhizobacteria</i>
RPM	Rotações por minutos
TCA	Ácido tricloroacético
U/mL	Unidade de amônia por mililitros
U/mg	Unidades por miligramas
KCl	Cloreto de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. <i>Objetivo geral</i>	18
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
CAPÍTULO 1	19
1. ARTIGO CIENTÍFICO 1	20
ABSTRACT	20
1. INTRODUCTION	21
2. CAATINGA BIOME AND SOIL	21
3. RHIZOSFERA	23
4. ENZYMES	25
4.1. <i>Cellulases</i>	26
4.2. <i>L-asparaginases</i>	27
5. “CATINGUEIRA”, <i>Poincianella pyramidalis</i>	29
6. CONCLUSION	30
7. REFERENCES	31
CAPÍTULO 2	36
2. ARTIGO CIENTÍFICO 2	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. METODOLOGIA	40
2.1. <i>Ensaio de L-asparaginase</i>	40
2.2. <i>Ensaio de proteínas</i>	41
2.3. <i>Otimização da produção de L-asparaginase extracelular</i>	41
2.4. <i>Análise estatística</i>	42

2.5.	<i>Purificação da L-asparaginase</i>	43
2.6.	<i>Caraterização da enzima purificada</i>	43
2.6.1.	Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da L-asparaginase	43
2.6.2.	Efeito da temperatura e estabilidade na atividade de L-asparaginase purificada	44
2.6.3.	Efeito de diferentes íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade de L-asparaginase	45
2.6.4.	Especificidade de L-asparaginase e determinação dos parâmetros cinéticos	45
2.7.	<i>Identificação morfológica da Pseudomonas sp.</i>	45
2.8.	<i>Extração de DNA cromossômico</i>	46
2.8.1.	Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA e do gene Gyrase β por PCR	46
2.8.2.	Análises dos dados da extração de DNA	47
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1.	<i>Otimização da produção de L-asparaginase extracelular</i>	47
3.2.	<i>Purificação da L-asparaginase</i>	50
3.3.	<i>Caracterização da L-asparaginase</i>	53
3.4.	<i>Identificação morfológica da Pseudomonas sp.</i>	57
3.5.	<i>Extração de DNA (16S rDNA)</i>	58
4.	CONCLUSÃO	59
5.	REFERÊNCIAS	60
	CONCLUSÃO GERAL	66

1. INTRODUÇÃO

A Caatinga é uma formação vegetacional exclusivamente brasileira; dentre as espécies vegetais encontradas no Bioma da Caatinga está a *Caesalpinia pyramidalis* Tul., típica da Região Nordeste do Brasil, popularmente conhecida como "catingueira", "pau-deporco" e "mussitaiba" (SARAIVA, 2012). A planta é considerada uma das espécies mais exploradas pela população local como fonte de lenha e carvão vegetal, para fins medicinais, forrageiros, produção de biocombustível, na indústria metálica e indústria de limpeza (MAIA, 2004; SANTANA, 2012).

Contudo, a rizosfera da *C. pyramidalis* abrange uma demanda de micro-organismos no qual há poucos estudos que podem abordar a capacidade rizosférica de organismos produtores de enzimas com potencial significativo biotecnológico. Muitos dos micro-organismos presentes na rizosfera possuem a capacidade de produzir enzimas extracelulares que degradam biomoléculas de elevados pesos moleculares que os mesmos não conseguiriam absorver de modo direto (MELO; AZEVEDO, 2008); além de produzir enzimas utilizadas como indicadores para medir a qualidade do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; YANG *et al.*, 2008; AHEMAD; KIBRET, 2014).

O gênero *Pseudomonas* está principalmente relacionado a infecções humanas, apresentam cepas resistentes a antibióticos (penicilinas anti-pseudomonal, ceftazidime, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e ciprofloxacina) (BEGUM *et al.*, 2013). As *Pseudomonas sp.* ocorrentes no solo, são denominadas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (PGRP, do inglês *Plant Growth Promotion Rhizobacteria*); são bactérias fixadoras de nitrogênio e estão associadas a rizosferas ou ao rizoplano nutrindo-se dos exsudatos expelidos pelas raízes das plantas. De acordo com Stanier (1969) esse gênero apresenta a capacidade de produzir enzimas, como é o caso da L-asparaginase do Tipo I e II.

A L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase, L-ASNase) é essencial para um curso normal do ciclo celular, estando presente em bactérias (*Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas geniculata* dentre outras), micobactérias, leveduras e fungos (PAWAR *et al.*, 2014), incluindo animais e plantas; no entanto, não é encontrada em seres humanos.

A L-asparaginase é responsável por catalisar a L-asparagina (L-Asn) em ácido L-aspártico (L-Asp) e amônia, e em menor medida a hidrólise da L-glutamina (L-Gln) a L-glutamato (L-Glu) exaurindo rapidamente a mistura de extratos celulares de asparagina no corpo (AHMAD *et al.*, 2012).

Nos últimos anos recebeu importância para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e outras doenças leucêmicas, como mielosarcoma, leucemia mielocítica aguda, linfoma e a doença de Hodgkin (CREDALI *et al.*, 2013). A produção enzimática da L-asparaginase por micro-organismos, portanto, tem atraído mais atenção devido ao baixo custo e por ser um processo ecologicamente correto (UMESH *et al.*, 2007; AMENA *et al.*, 2010). Nos últimos anos diferentes estudos sobre otimização, purificação, e caracterização da L-asparaginase tem sido desenvolvido (BEZERRA *et al.*, 2001; AMENA *et al.*, 2010; COELHO *et al.*, 2012).

Diante do potencial biotecnológico das plantas da Caatinga, a investigação da L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *C. pyramidalis* e a identificação dos mecanismos de ação relacionados representam um passo fundamental para o uso de novos produtos para a indústria farmacêutica. A descoberta implicará em inovações para o Estado de Pernambuco e resultará em maior competitividade no mercado nacional e internacional, com importância científica, socioeconômica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Otimizar, purificar e caracterizar a L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. bem como identificar morfológica e molecularmente a bactéria.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

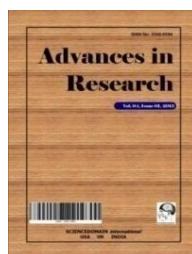
- Otimizar a produção de L-asparaginase extracelular de *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *C. pyramidalis*;
- Purificar a L-asparaginase;
- Caracterizar a enzima purificada;
- Identificar morfológica e molecularmente *Pseudomonas sp.* a nível de espécie.

CAPÍTULO 1

1. ARTIGO

Biotechnological Potential of the Brazilian Caatinga Biome

Este artigo foi publicado na Revista Internacional “*Advances in Research*”



Online ISSN: 2348-0394



Biotechnological Potential of the Brazilian Caatinga Biome

**Iasmim Lucas da Silva¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{2*}
and Leonor Alves de Oliveira da Silva¹**

¹*Department of Antibiotics, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco,
Arthur de Sá, S/N, City University, Recife-PE, 50670-901, Brazil.*

²*Department of Biochemistry, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco,
Avenue Moraes Rego, S/N, City University, Recife-PE, 50670-420, Brazil.*

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors ILS and LAOS managed the literature searches and wrote the first draft of the manuscript. Author LCBBC designed the study and managed the study performed. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/AIR/2015/17426

Editor(s):

(1) Monica Butnariu, Department of Chemistry & Biochemistry, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine from Timisoara, Romania.

Reviewers:

(1) Anonymous, Malaysia.

(2) Tunira Bhadauria, Department of Zoology, Kanpur University, India.

(3) Anonymous, China.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=1154&id=31&aid=9431>

Review Article

Received 13th March 2015

Accepted 22nd April 2015

Published 26th May 2015

ABSTRACT

The Caatinga biome is a unique Brazilian biome predominant in the Northeast of Brazil and situated in the Semi-arid Region. The rhizosphere comprises the narrow zone of soil that is directly influenced by the roots of plants and associated soil microorganisms. It is a dynamic environment with maximum microbial activity due to the presence of root exudates and radicular secretions representing the major carbon source readily available to microorganisms. The typical rhizospheric community in the Caatinga biome comprises microorganisms with different types of metabolism and adaptive responses to changes depending on soil temperature, plant species, nutritional status, age, stress, illness, and other factors. Assays for a variety of soil enzymes give an indication of the functional diversity assumed by the microbes present. A useful characteristic of the rhizosphere isolates is the ability of the rhizobacteria to excrete enzymes such as cellulases and L-asparaginases. Among the important species found in the Caatinga biome is *Poincianella*

*Corresponding author: E-mail: lcbbcoelho@gmail.com;

pyramidalis, which is common in the Northeast of Brazil and is popularly known as “catingueira”. This plant species is heavily exploited by the local population as a source of firewood, charcoal, fodder and for medicinal purposes. This review will consider the structure of the Caatinga biome in terms of its biotechnological potential, with special emphasis on such components as the rhizosphere and enzymes associated with *P. pyramidalis*.

Keywords: *Caatinga*; *soil*; *rhizosphere*; *enzymes*; *cellulases*; *L-asparaginases*; *Poincianella pyramidalis*.

1. INTRODUCTION

The Caatinga biome represents one of the largest seasonal savannas in the world, covering much of the Northeast of Brazil and a small portion of the Southeast. Its countenance constitutes a mosaic of different forest types, characterized by trees and bushes with thorns and several adaptations to counter water deficit. The Caatinga biome has been severely modified by slash-and-burn agriculture, wood harvesting, hunting, and the continuous action of herds of cattle and goats; currently, only a small percentage is well preserved and protected.

The Caatinga supports an assortment of vegetation cover, determined largely by the local climate, topography and geology. The deciduous vegetation helps in the formation of a layer of natural organic matter, which protects the soil in the dry season. The diversity of the rhizosphere is a function of the wide variety of species. Soil microorganisms can serve as a biological marker for understanding the sensitive dynamics of a given system. The microbial community of the Caatinga rhizosphere, which has been little studied, consists of microorganisms with different types of metabolism and adaptive responses to changes depending on soil temperature, plant species and nutritional status, among other factors.

One of the typical plants of the Caatinga and featured in this review, is *Poincianella pyramidalis*. This species is important for the range of compounds produced by its stems, leaves, flowers and roots. This plant has antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, diuretic and antipyretic properties. In addition, it also produces polyphenols and terpenoid compounds, among others.

The published literature of the flora and fauna of the Caatinga biome provides an exiguous level of information on its rhizospheric soil. It is therefore necessary to conduct fieldwork to search for

microorganisms able to produce enzymes and other substances, which are beneficial to human beings. This review analyses the Caatinga biome in relation to its soil and rhizosphere. In particular, this review focuses on the enzymes produced by microorganisms present in the rhizosphere of this biome. Furthermore, it highlights the biotechnological potential of the rhizosphere associated with *P. pyramidalis*, an autochthonous plant of the Caatinga. The rhizosphere associated with this plant has been found to produce enzymes such as L-asparaginases (anticancer agents) and microbial cellulose.

2. CAATINGA BIOME AND SOIL

The Caatinga biome extends from 2°54' to 17°21' S and comprises a portion of the Northeast of Brazil. The biome is situated in the Semiarid Region and covers an area of approximately 844,453 km², which corresponds to about 50% of the Northeast of Brazil and 18% of the national territory [1]. The Caatinga biome includes parts of the States of Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, and a small portion in the north of the State of Minas Gerais (Fig. 1).

The term *Caatinga* comes from the Tupi-Guarani language (*ka'a*-wood; *tinga* - white), meaning white forest. The biome was given this name due to the greyish aspect of the deciduous vegetation during the dry season. The Caatingabiome is the largest seasonal savanna in South America (Figs. 2A and B). This is a more or less continuous area, with a hot and semiarid climate. Plants display features that make them fully adapted to the conditions of the region. Such adaptations include being deciduous, annual herbaceous or succulents, or being predominantly shrubby with prickles and thorns. Furthermore, the biome commonly features continuous canopy coverage and a seasonal herbaceous stratum. The Caatinga is home to many endemic species and is rich in biodiversity [2].



Fig. 1. Boundary of the Caatinga biome (solid line) superimposed over a map of the Northeast of Brazil showing state boundaries (dashed lines)

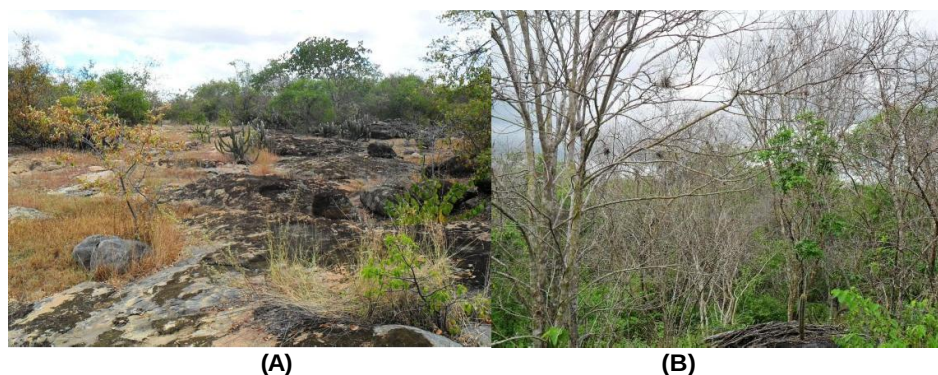


Fig. 2. Caatinga vegetation during the dry season in the *Sertão* sub-region of the Northeast of Brazil, Sousa, Paraíba State (A) and transition from rainy to dry season in the *Agreste* sub-region of the Northeast of Brazil, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco State (B)

The Fabaceae family is one of the most representative of the Caatinga, comprising approximately 300 endemic species distributed among three subfamilies, *Faboideae*, *Caesalpinioideae* and *Mimosoideae* [3]. Forty-two species have been studied in terms of pollination and reproductive systems [4]. Only a few species have been analysed for their ability to fix nitrogen. Such systems highlight the importance of relationships among plants and their symbiotic microorganisms [4-6].

Different parts of plants of the Caatinga biome, such as leaves, flowers, fruits, stems and roots,

are made use of in various ways for folk medicine. These materials are commonly prepared as teas, syrups, macerations, poultices, and powders for inhalation (Table 1). Such widespread use in folk medicine has prompted research into the commercial and therapeutic potential of species from the Caatinga biome. Such research has played a key role in the discovery of new medicinal products [7].

Studies on the density and diversity of microorganisms in soils are scarce in areas of dry tropical conditions, especially in Caatinga soils. Various chemical and physical factors,

which include the availability of nutrients, organic matter, soil moisture and temperature, influence microorganisms in the soil [8]. In arid environments, all these factors are generally unfavorable for microbial growth in soil [9].

The characteristics of the Caatinga biome include high solar radiation, low cloud cover, high mean annual temperature, and very low rates of

relative humidity, high evapotranspiration potential, and most especially, low and irregular rainfall in most areas. According to Brinkmann et al. [10] rainfall constitutes one of the main limiting factors for availability of dry biomass in this area and, therefore, is closely linked to vegetation. Therefore, the Semiarid Region is a sensitive indicator of climate change.

Table 1. Plant species endemic to the Caatinga biome and their applications

Species	Common names	Utilization
<i>Anadenanthera colubrinavar.</i> Cebil	"Angico-vermelho"	Reforestation, firewood and production. Shell: production tannins, treatment of problems, inflammation, cough, bronchitis, flu, and
<i>Amburana cearenses</i>	"Imburana-de-cheiro"	Carpentry, cookery and perfumery. Medicinal properties to treat flu, asthma, cramps, stroke, and aches. The bark and seeds phenolic glycosides, phenolic acids, sucrose, glycosides and phytosterols.
<i>Bromelia laciniosa</i>	"Macambira"	Produces flavonoids. Leaves are for animals and Recommended for gastrointestinal problems, fever, jaundice, hepatitis and dandruff. Powdered leaves used in cooking as a source of protein.
<i>Cereus jamacaru</i>	"Mandacuru"	Used as expectorant, diuretic, anthelmintic and a cardiotonic
<i>Mimosa hostilis</i>	"Jurema-preta"	Bark and leaves used to treat and skin problems, in addition presenting antimicrobial, regenerative and astringent and used as a pectoral painkiller.
<i>Poincianella pyramidalis</i>	"Catingueira"	Production of chemical used as popular medicine, antimicrobial activity.
<i>Spondias tuberosa</i>	"Umbuzeiro"	Food resource for producing ice cream and juices. Rich in acid and mineral salts potassium and magnesium); of tannins and proteins.
<i>Ziziphus joazeiro</i>	"Juazeiro"	In folk medicine, used for treating dermatitis and mycoses. cortex of stalk and leaves is rich saponins and used in manufacture of dandruff shampoo and hair tonic as well as being used to wash fabrics, cotton and glass objects. In addition, the zest of the stem cortex, when dried and powdered, is used as toothpaste.

References: [11,12,13,14,15,16,17,18,19]

The soils of the Semiarid Region and Caatinga biome, produced by weathering of rocks of the Precambrian period, have a crystalline nature, while some areas feature sedimentary deposits. Thus, the predominant clay found is montmorillonite, a clay mineral with Grumosol or Vertisol characteristics, which is very common in level areas (pediplain) of the Caatinga [20].

The soils of the Caatinga biome have geomorphological expressions such as latosols, which are fairly uniform with high levels of weathering; argisols, characterised by high concentrations of clay which may contain yellow, red, gray and reddish-yellow colours; planosols, imperfectly or poorly drained soils showing abrupt transitions; luvisols, usually fairly deep to shallow soils containing clay; and neosols or undeveloped soils [5,6]. The Northeast of Brazil contains many areas with vertisols, clayey to loamy soils which experience changes in volume and is extremely hard with many cracks when dry. Vertisols are found in areas of Caatinga, such as flat or gently undulating areas with depressions or sites of old ponds [20].

The Caatinga is currently in a severe process of desertification, caused mainly by deforestation and misuse of natural resources. Desertification results in reduced crop production and leads to changes in the interactions occurring in the soil, with consequent and often irreversible loss of biodiversity of plants typical of the biome. The microbial diversity of this soil is atypical to that of other biomes, as it developed under conditions of extreme temperatures and in clayey and stony soils which may have been influenced or not by local human actions [5,6].

The Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco (UFPE) is isolating, qualifying and quantifying the microbial community from rhizospheric soil of “catingueira” (*P. pyramidalis*) to analyse the metabolites produced by its rhizobacteria and its biotechnological potential. The results obtained indicate that the rhizobacteria isolated have the ability to produce enzymes of industrial and pharmaceutical interest.

3. RHIZOSPHERE

Soil is a complex environment with many important consequences for nature and humans. This system is characterized by a variety of physical, chemical and biological processes, which are often influenced by environmental

factors. Soil is responsible for providing many of the nutrients in food and acts as a natural system, playing an important role in the water cycle and nutrient turnover. Soil is an abiotic and biotic habitat that includes organisms such as plants, animals and humans as well as microorganisms such as fungi, bacteria and viruses [21].

Microorganisms play important ecological functions such as recycling and maintaining ecosystem health. They can facilitate the absorption of nutrients by plants, help in processes such as fixation of atmospheric nitrogen, change the availability and toxicity of metals, and promote bio-control and bioremediation, as well as the growth of plants. These microorganisms can occur in association with mineral particles and organic matter, and in the rhizosphere of plants [22]. The term “rhizosphere” (Fig. 3) refers to the area of soil affected by the roots of plants, and therefore, has high microbial activity. The rhizosphere has a high concentration of organic nutrients, which come from the roots and favor the development of microbiota. Roots influence the rhizosphere by releasing dead cells, mucilage, exudates, vitamins, carbohydrates, enzymes and other compounds into the soil [21].



Fig. 3. Rhizosphere of chamomile (*Matricaria recutita*)

The composition of the microbial mass of a particular rhizosphere may be influenced by numerous factors such as the species involved, plant age, types of root exudates, soil conditions and status imposed by the environment; the effects associated with the plant are highly selective [22,23]. The soil in the root region controls the growth and development of plants and the association with rhizosphere microflora promotes several beneficial activities. The

rhizosphere is important in processes related to the exchange of O₂ and CO₂ mineralization, plant nutrition, gradients between soil layers, nitrification, and symbiosis, among others [24-26].

Knowledge of soil microorganisms, besides being fundamental to the taxonomic survey of species, can lead to the discovery of metabolic processes used by these organisms. Such processes may be important not only for environmental interactions but also for biotechnological applications of the macromolecules produced, such as enzymes [27,28]. The rhizospheric and endophytic microorganisms of soil of the Caatinga biome include arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), members of the Glomeromycota phylum, actinobacteria of the *Streptomyces* genus and symbiotic or rhizospheric bacteria of β - proteobacteria, belonging to the *Burkholderia* genus, and species such as *Rhizobium tropici*, *Bradyrhizobium elkanii* and *Burkholderia* sp. [27-29].

The project Biodiversity and Bioprospecting of Microorganisms from Caatinga, conducted by the Embrapa Environmental Agency in Jaguariuna, State of São Paulo (2011), involves studies such as rhizosphere isolation and enzymatic analysis of rhizospheric soil samples collected from *P. pyramidalis*. The microorganisms in the samples have been shown to be able to synthesize enzymes for biotechnological uses in the cellulolytic and pharmaceutical industries. Microorganism's producers of L-asparaginase and cellulase belonged to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Corynebacterium*.

An example of microorganisms that live associated with roots is the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) that inhabit the soil and are often isolated with the rhizosphere of various plants. The effects of PGPR on roots and plant development are profound, including production and excretion of enzymes (ammonia lyase, chalcone synthase, peroxidase, proteases, cellulases and L-asparaginases), in addition to their beneficial effects on seed germination, seedling emergence and plant growth [23,30,31].

Rhizobacteria, as beneficial microorganisms, may be symbiotic or free-living saprophytes. The most well studied species include *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium*

spp., *Arthrobacter* spp., *Enterobacter* spp. and *Azotobacter* spp. [32].

Rhizobacteria are also responsible for promoting the production of plant hormones, such as auxins and gibberellins, metabolites of bacterial origin that are known to have a significant effect on plant growth. However, it has been reported that rhizobacteria of the genus *Bacillus* are capable of producing concentrations of hormones that cause deleterious effects on plants, while also have the potential to produce cellulase, xylanase and L-asparaginase [30,33,34]. Another mechanism often studied in rhizobacteria is the solubilizing action of mineral phosphates and production of indole acetic acid (IAA) [35].

Membrane-signaling proteins allow bacteria to receive a range of signals from plants. Such signals may be a result of the plant responding to some type of bacterial infection or an attempt to coordinate bacterial gene expression. Many of these associations are species-specific to each plant, resulting in high microbial diversity for each rhizospheric substrate. The changes promoted by the plant can have direct effects on soil microorganisms present in the rhizosphere and their potential growth. Rhizobacteria are responsible for significant microbial processes that occur in the rhizosphere such as pathogenesis, production of antibiotics, geochemical cycle of minerals and plant colonization [36,37].

Many microorganisms in the soil have the ability to produce extracellular enzymes that degrade high molecular weight biomolecules that they would be unable to absorb directly. Enzymes are part of the cell contents released after cell death due to cell lysis or changes in permeability. Plant physiologists have shown that plant roots excrete enzymes into the rhizosphere for nutritional purposes or for destruction of cell membranes. The roots of plants are sources of catalase, tyrosinase, L-asparaginase, urease, amylase, invertase, protease, and lipase, among other enzymes [21] (Tables 2 and 3).

Soil enzymes can act as indicators of soil quality, being sensitive to soil management and directly related to the transformation of nutrients [51] and the microbial community [52]. Quantification of soil enzymatic activity can provide information on changes in metabolic processes, contributing to a better understanding of the effects of microbiological management practices. It can also lead to insights for the biotechnological use of organisms present in the soil

Table 2. Microorganisms producing bacterial L-asparaginase and their characteristics

Microorganisms	Characteristics
<i>Aspergillus niger</i>	Production of extracellular enzymes, organic acids, biotransformation of xenobiotics, bioremediation and pre-treatment.
<i>Bacillus subtilis</i>	Protease, chitinase and lipopeptide antimicrobials are among the metabolites responsible for anti-fungal and anti-bacterial activities of <i>B. subtilis</i> strains.
<i>Escherichia coli</i>	Enteropathogenic bacterium, producer of several enzymes, including type 1 and type 2 L-asparaginase. A precursor to the creation of drugs.
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Bacterium responsible for the production of the pharmaceuticals used against acute lymphoblastic leukemia (ALL).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nosocomial pathogenic opportunist, present in the soil as rhizobacteria and responsible for producing enzymes including L-asparaginase.
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Actinobacterium, responsible for producing L-asparaginase.
References: [38,39,40,41,42,43,44,45]	

Table 3. Microorganisms producing bacterial cellulases and their characteristics

Microorganisms	Characteristics
<i>Aspergillus niger</i>	Producer of hydrolytic enzymes used in a variety of industrial products such as those made by the food, feed, pulp, paper and textile industries.
<i>Bacillus pumilus</i>	Producer of enzymes, growth promoters and cellulolytics used in plant disease biocontrol and sustainable agriculture.
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	Used for isobutanol production. High ethanol productivity from cellobiose, cellulose and grasses.
<i>Clostridium thermocellum</i>	Produces ethanol and organic acids. The bacterium is highly cellulolytic, degrading cellulose through the action of a multi-enzymatic complex tetrad called cellulosome.
<i>Trichoderma reesei</i>	Producer of five cellulolytic enzymes, two cellobiohydrolases and three endoglucanases. Used in manufacturing and to make industrial products.
References: [38,40,46,47,48,49,50]	

There is a need to focus such research on Caatinga soil, which has been little studied to the present.

4. ENZYMES

Enzymes, known as biological catalysts, are mainly of a protein nature with the function of metabolic control. They are highly specific protein biocatalysts, usually consisting of long chains of amino acids with extremely versatile and highly stereospecific peptide bonds. Their catalytic power depends on different substrate concentrations, effects of pH values, temperature and ionic strength in the medium [53,54]. Enzymes, obtained from different sources, can be highly purified by conventional protein or affinity methods [55].

Enzymes promote reaction speeds much higher than reactions obtained in the presence of conventional chemical catalysts; this behavior allows for reductions in the final cost of the process and prevents the formation of undesirable byproducts. Furthermore, due to their high specificity and greater process efficiency, enzymes allow biodegradation, reducing the amount of waste generated [56,57]. In this context, biotechnological and biomedical applications represent a valuable and promising option for exploitation of various types of reactions [58].

Enzymatic reactions are of paramount importance to living organisms. An important feature of such reactions is that they occur at specific sites within the enzyme molecule, called the active site, which binds to the substrate.

Increasing the reaction speed does not change its balance, showing that enzymes differ from other catalysts by the high specificity of enzyme-substrate reactions. The use of enzymes on an industrial level is of great utility since they can optimize and promote the quality of products or make their preparation more economically viable. This ability is because enzymes act on substances that make up a particular product, and for each compound, there are specific catalysts for that reaction [54].

Brazil is a major importer of industrial enzymes, despite the fact that the country provides subsidies for enzyme production from natural products. The potential of Brazil to become a major producer of industrial enzymes is evidenced by the great biological diversity, still little explored, of plants, animals and microorganisms (bacteria, fungi, viruses) which can be found in its many different ecosystems and biomes. Such biological diversity can serve as a source for obtaining new enzyme producers of industrial interest. The large concentration of organic matter and crop residues produced in Brazil are low-cost substrates for fermentation [59].

4.1 Cellulases

Cellulose (Fig. 4) is composed of subunits of D-glucose linked by β -1,4glycosidic bonds. Cellulases are enzymes that act on crude fiber, converting the cellulose into glycosidic components. These are the second largest group of commercially exploited carbohydrases, mainly due to their high efficiency and specificity of degradation. The conversion of cellulose to simple forms of carbon can be useful in bioenergy production [60].

The β -1,4 bond, located on the cellulose chain is the result of a 180° rotation of the plan of alternating units of glucose, resulting in a balanced molecular chain that makes possible the formation of a molecular structure with fibrous and crystalline structures of high strength

and tension. The cellulose chain consists of amorphous, reducing and non-reducing regions [61].

According to Zhang et al. [62], the amorphous region is characterised by its easy hydrolysis. This is the result of this region having few interactions with hydrogen, making it easy to hydrate and more accessible to enzymes. The enzyme complexes produced by various microorganisms have shown the ability to catalyze the hydrolysis of both crystalline and amorphous cellulose into soluble, low molecular weight sugars such as glucose and cellobiose.

Cellulases are present in plant cell walls, produced by tunicates, and synthesized by a wide variety of microorganisms, including fungi and bacteria. These microorganisms can be aerobic, anaerobic, mesophilic or thermophilic. Among them, the genera *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* and *Aspergillus* are the most studied and the best producers of cellulases [61,63]. Cellulases degrade different sequences, structures and hydrolytic mechanisms such as the configuration of the anomeric carbon, inverting or retaining structure [64]. Basic and applied studies on cellulolytic enzymes have demonstrated their biotechnological potential in various industries including food, animal feed, brewing and wine, agriculture, biomass refining, paper and cellulose, textile, as well as laundry and ethanol production [63].

Cellulases have unique conformations for each microorganism without changing their functionality. They can be classified according to their site of action in the cellulosic substrate and are divided into three groups of enzymes, namely: endo - (1,4) - β - D - glucanase (EC 3.2.1.4), exo - (1,4) - β - D - glucanase (EC 3.2.1.91), and β - glucosidase (EC 3.2.1.21), which together constitute the complex of cellulase enzymes. Synergism of such enzymes converts the insoluble cellulosic substrates into soluble sugars [62,65].

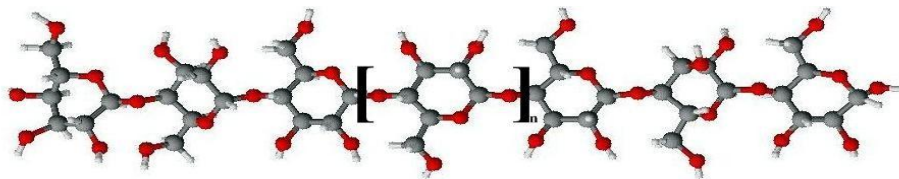


Fig. 4. Molecular structure of cellulose

Endoglucanases (EC 3.2.1.4) are responsible for initiating hydrolysis which internally attacks pulp fibers at random but mostly in the amorphous part of the fiber. They release oligosaccharides of various sizes, also referred as carboxymethylcellulase and cellulases. Fig. 5 features an example of an endoglucanase from the bacterium *Thermotoga maritima*. Endoglucanase act solely in the amorphous portion of cellulose; however, when reducing the cellulose chain, their activity decreases. Their natural action substrate is generally cellulose and xyloglucane, having variable specificity compared to carboxymethyl cellulose (CMC), β -glucan, avicel (crystalline cellulose) and xylan [62].

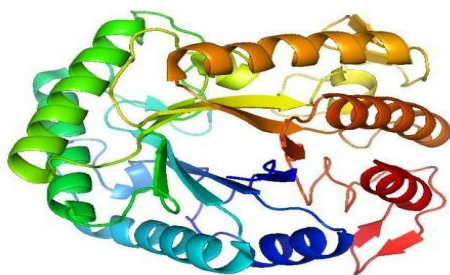


Fig. 5. Structure of the endoglucanase produced by the microorganism *Thermotoga maritima*

Exoglucanases (EC 3.2.1.91) act on the reducing and non-reducing portions of cellulose, cleaving the microcrystalline cellulose and shortening the polysaccharide chains [66]. Exoglucanases are classified according to their enzymatic reactions: 1,4- β -D-glucan hydrolases (EC. 3.2.1.74) and cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), divided into types I and II. The 1,4- β -D-glucan hydrolases, also known as exo- β -glucosidase, are responsible for the hydrolysis of cellulose, directly releasing glucose polymer. Type I cellobiohydrolase enzyme (Fig. 6A) acts by hydrolyzing reducing terminals, while type II (Fig. 6B) hydrolyses non-reducing terminals. These enzymes generally suffer inhibition from their hydrolysis product (cellobiose); also, they have limited specificity on substrates of carboxymethylcellulose and hydroxethylcellulose [67].

β -glucosidase (EC 3.2.1.21) which hydrolyses cellobiose is responsible for the removal of glucose from non-reducing terminals. A representation of this enzyme, produced by *B. polymixa* can be seen in Fig. 7. The absence of exocellulases impairs the process of biomass

saccharification [62]. According to Kuhad et al. [63], anaerobic microorganisms do not release enzymes into the extracellular medium but rather into the cellulosome present in their walls, producing low concentrations of enzymes. Therefore, the result of degradation comes from fermentation processes with ethanol, CO₂ and organic acids.

Microorganisms with oxidative metabolism produce large amounts of enzymes. When these enzymes are secreted into a culture media containing various sources of cellulose (CMC, Avicel) they can then be recovered in the supernatant. This process produces high yields, characteristic of aerobic metabolism. It is important to note that most cellulolytic bacteria in the soil or associated with the rhizosphere of plants (e.g., *Bacillus*, *Micromonospora*, *Thermobifida*) are producers of endospores and secondary metabolites, which are unique abilities that confer selective advantages in nature [65]. According to a study by Soares Jr. et al. [68], bacteria isolated from inhospitable soils such as the Caatinga biome and Antarctica showed significant production of cellulases. The isolates revealed preferentially endoglycolytic activity according to temperature and substrate enrichment. Furthermore, the identification of some isolates by partial sequencing of the 16S rRNA gene indicated that *Pedobacter*, *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* bacteria were the major genera of cellulolytic bacteria isolated from Antarctic soil; the phylum of bacterial Firmicutes (e.g., *Bacillus*) were most commonly isolated from Caatinga samples; *Actinobacteria* were present in both types of soil (e.g., *Mycobacterium* and *Arthrobacter*).

4.2 L-asparaginases

The enzyme L - asparaginase (EC 3.5.1.1, L - asparagine amidohydrolase, L - ASNase), which mainly occurs in microorganisms and plants, is responsible for catalyzing L-asparagine (L-Asn), thereby producing L-aspartic acid (L-Asp) and ammonia. In addition, but to a lesser extent, the hydrolysis of L-glutamine (L-Gln) to L-glutamate (L-Glu) rapidly exhausts the mix of cell extracts of asparagine in the body [69].

L-asparaginase has been used since 1960 to treat acute lymphoblastic leukemia and other leukemia diseases such as myelosarcoma, acute myelocytic leukemia, lymphosarcoma and Hodgkin's disease (Fig. 8).

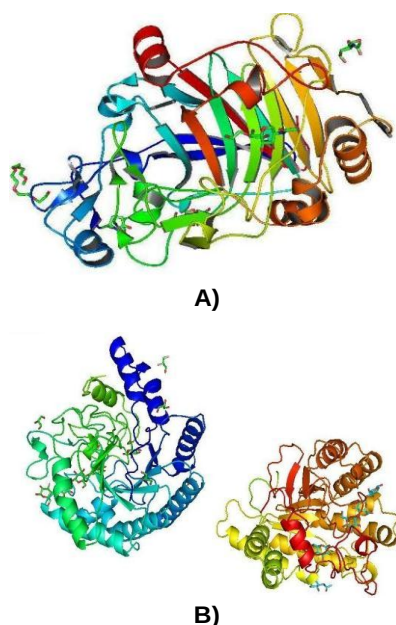


Fig. 6. (A) Representation of structures of type I cellobiohydrolase from *Trichoderma harzianum* and (B) type II cellobiohydrolase from *Humicola insolens*

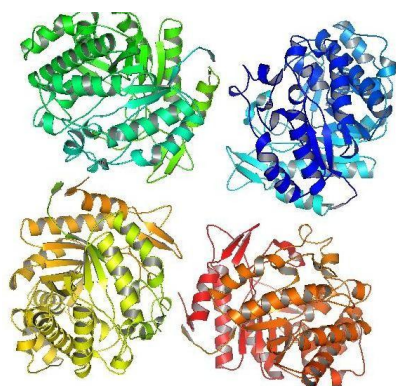


Fig. 7. Representation of the structure of β -glucosidase produced by the microorganism *Bacillus polymixa*

The enzyme is responsible for depleting asparagine in tumor cells, which are unable to produce this amino acid; hence, its absence causes the death of malignant cells [70,71].

The L-asparaginase complex has been isolated and characterized from various microorganisms, including many Gram-negative bacteria, mycobacteria (Gram-positive aerobic, non-motile, acid-resistant bacteria), yeasts, fungi, plants and some vertebrate plasma. Among such sources are *Escherichia coli*, *Erwinia cartovora*,

Enterobacter aerogenes, *Candida utilis*, *Staphylococcus aureus*, *Thermus thermophilus*, as well as *Pisum sativum*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus* and *Pseudomonas stutzeri* [72].

According to substrate specificity, bacterial L-amidohydrolases fall into two broad classes. The first class is represented by EcA asparaginases (*Escherichia coli* L-asparaginase), ErA (*Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase) and WsA (*Wolinella succinogenes* L-asparaginase), in which enzymes primarily use L-asparagine as a substrate. The second class, also named glutaminase asparaginases, is responsible for hydrolyzing L-asparagine and L-glutamine with comparable efficiency, and is represented by PGA (derived from *Pseudomonas* 7A) and AGA (from *Acinetobacter glutaminasificans*) [45].

Type I L-asparaginases are expressed constitutively in the cytoplasm and catalyze the hydrolysis of both L-Asn and L-Gln amino acids; type II L-asparaginases are expressed under anaerobic conditions in the periplasmic space of the bacterial membranes and exhibit higher specificity for L-Asn-hydrolysis [69].

Bacterial L-asparaginases (L-asparagine, L-amidohydrolase EC 3.5.1.1) are enzymes of high therapeutic value due to their use in the treatment of neoplasia. *Escherichia coli* L-asparaginase (Fig. 9) produces two distinct L-asparaginases, whose most significant difference is their affinity for the substrate L-asparagine. The enzyme with the greater affinity is L-asparaginase II or EC-2. This form is tetrameric and is located in the periplasmic space, between the bacterial plasma membrane and the cell envelope. It displays high affinity and is particularly effective for use in certain types of cancer therapies [45,69].

The effectiveness of antileukemic activity of L-asparaginases depends on various enzymatic properties such as the Michaelis kinetic constants (K_M), the pH of maximum activity and the presence and stability of various chelating agents such as EDTA and others. Some agents, such as 2 - mercaptoethanol glutathione increase the activity of the enzyme. Variation in anti-tumor activity has also been associated with the affinity of the enzyme for its substrate. According to changes in the culture medium, such as pH, concentrations and level of oxygen transfer, as well as the microorganism present, synthesis of L-asparaginase may vary [69].

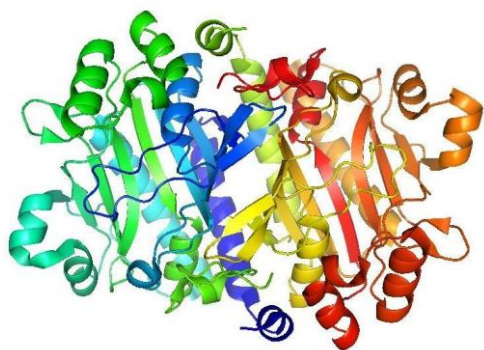


Fig. 8. Crystal structure of the Archaeal asparagine synthetase

The current use of asparaginase obtained from *Escherichia coli* has caused many toxic side effects when administered continuously [73,70] and involves a high cost of drug production. Therefore, researchers have tried different microorganisms and substrate inducers of this enzyme with lower toxicity. The main side effects include neurological, haematological, gastrointestinal, pancreatic, hepatic, renal and metabolic disorders [74,75]. Yeasts, such as *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* and *Pichi* produce two types of biologically and genetically distinct L-asparaginases. One is secreted into the periplasmic space and acts in the hydrolysis of asparagine external to the cell, while the other is an enzyme of internal activity [76].

Plant cell asparagine is the main metabolite responsible for the storage and transport of nitrogen used in the biosynthesis of proteins. In leguminous plants, most enzymes relate to metabolic pathways of atmospheric nitrogen assimilation. According to Bell and Adams [77] the activity of L-asparaginase in soil around roots of *Pinus pinaster* and *P. irradiar* highlighted the need for and importance of further studies based on plant roots in different biomes. This is especially true in the Caatinga biome, understudied in comparison to other ecosystems.

5. “CATINGUEIRA”, *Poincianella pyramidalis*

Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P. Queiroz (Fig. 10) was previously denominated *Caesalpinia pyramidalis* Tul. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 88494, IPA, at the herbarium “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa

Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brazil). The plant belongs to the family Fabaceae, subfamily Caesalpinioideae, genus *Poincianella*, and is considered a typical and representative species of the Semiarid Region of the Northeast of Brazil.

This species, popularly known as “catingueira”, “pau-de-porco” and “mussitaiba” [78] is commonly found on stony soils of the Caatinga biome, and may be associated with various plant species. This plant occurs in the States of Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe and Bahia and is considered endemic to the Caatinga [16].

P. pyramidalis is characterised by the absence of spines and grows on average to between 4-6 m high, though it can reach up to 12 m. This plant usually achieves this height when it grows in areas with good water gradient and deep soils, which produces a straight trunk. On drier sites and shallow soils, the species reaches 0.80-1.00 m high and features a twisted trunk. Its bark, as an adult, is predominantly brown with patches of yellow or green, light gray, and white. The leaves are bipinnate, flowers are yellow and arranged in short branches; the fruit is a flat pod, and seeds are thrown long distances by dehiscence of the pod (Fig. 11) [16].

P. pyramidalis peels are used in folk medicine for intestinal treatments such as dysentery and diarrhea processes, while the yellow flowers are used to treat respiratory infections [19]. There have been several studies which show the species to feature anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial properties [79-81], besides being endowed with diuretic and antipyretic properties [78].

P. pyramidalis wood supplies firewood, charcoal and stakes. Its logs and branches, due to the large amount of lignin and cellulose they contain, can produce fuel alcohol and metallurgical coke; also, the wood ash has a high content of potassium, used in soap making [16]. Several metabolites have been isolated from *P. pyramidalis*, such as lupeol, β -sitosterol, chalcone, kaempferol, apigenin, lignane, and methyl stigmasterol gallate. The presence of diterpenes, flavonoids and other phenolic compounds are characteristic of this genus. Phenylpropanoids, biflavonoids, lignans, triterpenes, and gallic acid have also been isolated from *P. pyramidalis* [82-84].

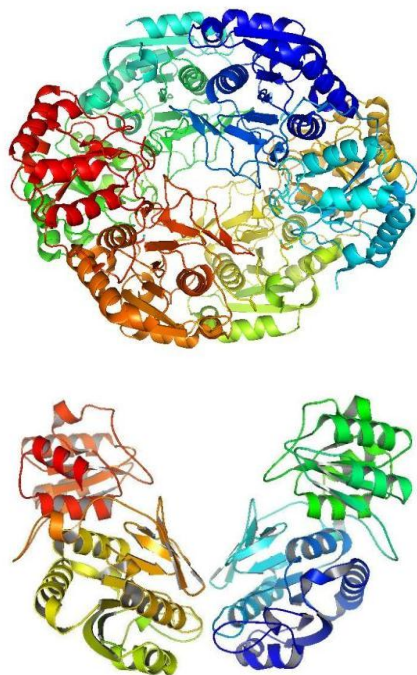


Fig. 9. Molecular structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, types I and II, respectively



Fig. 10. *P. pyramidalis* in the Agreste sub-region of Brejo da Madre de Deus, State of Pernambuco. Photographed at the Nilo Coelho Monumental Sculpture Park

Compounds obtained from a trunk extract of *P. pyramidalis* using chloroform include 4,4'-dihydroxy-2'-methoxychalcone, syringaresinol, and methyl gallate. Assays using crude ethyl acetate extracts obtained from the leaves and roots of *P. pyramidalis* and tested against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* showed zones of inhibition for *S. aureus* species. *P. pyramidalis* used in reforestation projects in areas of the Caatinga biome and has been

shown to grow in all environments of the biome, either rocky or wet, thereby favoring recolonization by other types of plants: woody and herbaceous species, grasses or cacti [78].

P. pyramidalis was the plant species chosen as the focus of this review, due to the production of various types of metabolites (plant extracts) and chemicals (polyphenols and terpenoids). Our results of the analyses of the microbial mass present in the rhizosphere of this plant show its potential for the production of L-asparaginase and cellulase.



Fig. 11. Aspects of leaves, immature fruits, stems and flowers of *Poincianella pyramidalis*

6. CONCLUSION

This review considers the Caatinga biome, a Brazilian vegetation type unique in the world. The biome is composed of various rhizospheric communities featuring different types of metabolism, which vary according to soil temperature, plant species, nutritional status, plant age as well as stress and disease resistance, among other factors. A characteristic of isolates from the rhizosphere of the Caatinga biome is the ability of the rhizobacteria to excrete enzymes, such as L-asparaginases and cellulases. These enzymes are used as antitumor drugs and industry products, including cleaning, paper, textile and beverage products. Further studies of the microbiota of the Caatinga biome are needed to better evaluate their biotechnological value. Our examination of the bacteria isolated from the rhizosphere of one common species, *P. pyramidalis*, highlights the usefulness of enzymes excreted by the bacteria as well as the biotechnological potential of the Caatinga biome since such enzymes can be produced in a low-cost and environmentally friendly process.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a Research Grant and fellowship to LCBB. In addition, we are grateful to Scott Vinson Heald for his kind English review.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that there are no conflicts of interest pertaining to the material in this manuscript.

REFERENCES

1. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomas e de Vegetação. Rio de Janeiro; 2013.
2. Silva MV, Macedo AJ, Paiva PMG, Coelho LCBB, Baumvol IJR. A Caatinga e seu Potencial Biotecnológico. 1th ed. Editora Universitária UFPE, Pernambuco; 2013.
3. Giulietti AM, Du Bocage Neta AL, Castro AAJF, Gamarra-Rojas CFL, Sampaio EVSB, Virgínio JF, Queiroz LP, Figueiredo MA, Rodal MJN, Barbosa MRV, Harley RM. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga, in: Silva, JMC, Tabarelli M, Fonseca MT, Lins LV. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. 1th ed. MMA, UFPE. Embrapa Semi-Árido, Brasília; 2004.
4. Machado IC, Lopes AV, Sazima M. Plant sexual systems and a review on breeding system studies in the Caatinga, a Brazilian tropical dry Forest. *Ann Bot.* 2006;97(2): 277-287.
5. Freitas ADS, Sampaio EVSB, Fernandes AR, Santos CERS. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian Caatinga. *J Ari Environ.* 2010;74(3):344-349.
6. Teixeira FCP, Borges WL, Xavier GR, Rumjanek NG. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. *Braz J Microbiol.* 2010;41(1):201-208.
7. Silva MIG, Melo CTV, Vasconcelos LF, Carvalho AMR, Souza FCF. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: A review of the literature. *Braz J Pharmacogn.* 2012;22(1):193-207.
8. Moura MC, Pontual EV, Paiva PMG, Coelho, LCBB. An outline to corrosive bacteria. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 1th ed. Badajoz: Formatex Research Centre, Spain; 2013.
9. Gorlach-Lira K, Coutinho HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007; 38(1):135-141.
10. Brinkmann K, Dickhoefer U, Schlecht E, Buerkert A. Quantification of above ground range land productivity and anthropogenic degradation on the Arabian Peninsula using Landsat imagery and field inventory data. *Rem Sens Environ.* 2011;15(2):465-474.
11. Barrandeguy ME, Prinz K, García MV, Finkeldey R. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* var. Cebil (fabaceae), a native tree from South America. *Am J Bot.* 2012;99(9):372-374.
12. Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF, Medeiros ACD, Pereira JV, Godoy GP, Costa EMMB. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evid-Based Compl Alt.* 2014;2014(1):1-7.
13. Pereira EPL, Ribeiro PR, Loureiro MB, Castro RD, Fernandez LG. Effect of water restriction on total phenolics and antioxidant properties of *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith cotyledons during seed imbibition. *Acta Physiol Plant.* 2014;36(5):1293-1297.
14. Oliveira-Júnior RG, Oliveira AP, Guimarães AL, Araújo ECC, Braz-Filho R, Øvstedal DO, Fossen T, Almeida JRGS. The first flavonoid isolated from *Bromelia laciniosa* (Bromeliaceae). *J Med Plants Res.* 2014;8(14):558-563.
15. Vatta AF, Kandu-Lelo C, Ademolai O, Eloff JN. Direct anthelmintic effects of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: *In vivo* studies. *Vet Parasitol.* 2011;180(3-4):279-286.
16. Maia GN. *Catingueira*. In: Maia, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1th ed. Leitura e Arte, São Paulo; 2004.
17. Abd-Alla MH, El-Sayed El-SA M, Rasme Abdel-H. Biosynthesis of L-Glutaminase by *Streptomyces Variabilis* ASU319 isolated from rhizosphere of

- Triticum vulgaris*. Univ J Microbiol Research. 2013;1(3):27-35.
18. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMFL, Melo JG, Santo JP. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J Ethnopharmacol. 2007;114(3):352-354.
 19. Santos JP, Araújo EL, Albuquerque UP. Richness and distribution of useful woody plants in the semiarid region of northeastern Brazil. J Arid Environ. 2008; 72(5):652-663.
 20. Leal IR, Silva JMC, Tabarelli M, Lacher, TE. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern Brazil. Conservation Biology. 2005;19(3):701-706.
 21. Melo IS, Azevedo JL, Microbiologia ambiental. 2th ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, São Paulo; 2008.
 22. Marschner P, Crowley D, Yang CH. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. Plant and Soil. 2004;261(1-2):199-208.
 23. Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current Perspective. J. King Saud Univ. 2014;26(1)1-20.
 24. Rasche F, Hodl V, Poll C, Kandeler E, Gerzabek MH, Van Elsas JD, Sessitsch A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. FEMS Microbiol Ecol. 2006;56(1):219-235.
 25. Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol. 2009; 68(1):1-13.
 26. Gomes FS, Pontual EV, Coelho LCBB, Paiva PMG. Saprophytic, symbiotic and parasitic bacteria: Importance to environment, biotechnological applications and biocontrol. Adv Res. 2014;2(5):250-265.
 27. Souto PC, Souto JS, Miranda JRP, Santos RV, Alves AR. Soil microbial community and mesofauna under dry forest vegetation in the Semi-arid region of Paraíba, Brazil. R Bras Ci Solo, 2008;32(1):151-160.
 28. Mello CMA, Silva IR, Pontes JS, Goto BT, Silva GA, Maia LC. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in an area of Caatinga, PE, Brazil. Acta Bot Bras. 2012;26(4):938-943.
 29. Freitas ADS, Borges WL, Andrade MMM, Sampaio EVSB, Rosália CESS, Passos SR, Xavier GR, Mulato BM, Lyra MCCC. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. Afr J Microbiol Res. 2014;8(8)788-796.
 30. Abd-Alla MH, El-Sayed, El-SA, M. Rasmey Abdel-H. Biosynthesis of L-Glutaminase by *Streptomyces variabilis* ASU319 isolated from rhizosphere of *Triticum vulgaris*. Univ J Microbiol Research. 2013;1(3):27-35.
 31. Singhal B, Swaroop K. Optimization of culture variables for the production of L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum*. A J Biotechnol. 2013;12(50): 6959-6967.
 32. Hayat R, Ali A, Amara U, Khalid R, Ahmed I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. Ann Microbiol. 2010;60(4):579-598.
 33. Akhtar N, Sharma A, Deka D, Jawed M, Goyal D, Goyal A. Characterization of cellulose producing *Bacillus* sp. for effective degradation of leaf litter biomass. Environ Prog Sustainable Energy. 2013; 32(4):1195-1201.
 34. Mittal A, Nagar S, Gupta VK. Production and purification of high levels of cellulase-free bacterial xylanase by *Bacillus* sp. SV-34S using agro-residue. Ann Microbiol. 2013;63(3):1157-1167.
 35. Karadeniz A, Topcuoglu SF, Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 2006;22(10):1061-1064.
 36. Vasconcellos RLF, Silva MCP, Ribeiro CM, Nogueira CEJBN. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. Sci Agri. 2010;67(6):743-746.
 37. Torres-Cortés G, Millán V, Fernández-González AJ, Ramírez-Saad HC, Fernández-López M, Toro N, Martínez-Abarca F. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. Plant Soil. 2012;357(1-2):275-288.
 38. Souza WR, Gouvea PF, Savoldi M, Malavazi I, Bernardes LAS, Goldman MHS, Vries RP, Oliveira JVC, Goldman GH. Transcriptome analysis of *Aspergillus*

- niger* grown on sugarcane Biotechnol Biofuels. 2011;4(40):1-17.
- 3 Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, M, Varga J, Samson RA, Nielsen Fumonisin and ochratoxin production industrial *Aspergillus niger* strains. One. 2011;6(8):1-6.
- 4 Orberá TM, Serrat MJ, Ortega E. applications of *Bacillus subtilis* strain 16 for the control of phytopathogenic in economically relevant crops. App. 2014;31(1):13-17.
- 4 Kim Yu-K, Lee Shin-C, ChoYoung-Y, Hyun-J, Ko YH. Isolation of *Bacillus subtilis* strains from environments. Int Schol Res 2012;2012(1):1-9.
- 4 Vrooman LM, Stevenson KE, Supko O'Brien J, Dahlberg SE, Asselin BL, UH, Clavell LA, Kelly KM, Kutok Laverdière C, Lipshultz SE, Michon Schorin M, Relling MV, Cohen Neuberg DS, Sallan SE, Silverman Post induction dexamethasone individualized dosing of *Escherichia coli* Asparaginase each improve outcome children and adolescents with diagnosed acute lymphoblastic Results from a randomized study—Farber Cancer Institute ALL Consortium. Clin Oncol. 2013;31(9):1202-1210.
- 4 Karamitros CS, Labrou NE. expression and affinity purification of asparaginase from *E. chrysanthemi* in *coli*. Sustain Chem Process. 8.
- 4 Rai PS. Study on production, and characterization of L- from *Escherichia coli* and *aeruginosa*. I J Pharm Chem Biol 2013;3(3):565-570.
- 4 Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar Dayanand A, Lingappa K. purification and characterization of asparaginase from *gulbargensis*. Braz J Microbiol. 173-178.
- 4 Saha N, Wirth S, Ulrich A. bacterial biodiversity in long-term experimental sites. Afr J Agr Res. 8(3):299-307.
- 4 Higashide W, Li Y, Yang Y, Liao Metabolic engineering of *cellulolyticum* for production of from cellulose. Appl Environ 2011;77(8):27272733.
48. Lil Y, Tschaplinski TJ, Engle NL, CY, Rodriguez Jr M, Liao JC, Schadt Guss AM, Yang Y, Graham DE. inactivation of the *cellulolyticum* lactate and dehydrogenase genes increases ethanol yield from cellulose switchgrass fermentations. Biofuels. 2012;5(2):1-13.
49. Feinberg L, Foden J, Barrett T, KW, Bruce D, Detter C, Tapia R, C, Lapidus A, Lucas S, Cheng J, Pitluck Woyke T, Ivanova N, Mikhailova N, M, Hauser L, Argyros DA, Goodwin Hogsett D, Caiazza N. Complete sequence of the cellulolytic *Clostridium thermocellum* DSM1313. Bacteriol. 2011;193(11):2906-2907.
50. Abdeljabbar DM, Song HJ, Link *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II associated with the outer membrane over expressed in *Escherichia* Biotechnol Lett. 2012;34(1):91-96.
51. Yang L, Li T, Li F, Lemcoff JH, Cohen Fertilization regulates soil activity and fertility dynamics in a cucumber field. SciHortic. 2008;116:21-
52. Araújo SF, Monteiro RTR. biológicos de qualidade do solo. Biosci 2007;23(3):66-75.
53. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. biology of microorganisms. In Microbiology. 12th ed. Pearson Cummings, San Francisco; 2008.
54. Nelson DL, Cox MM. Lehninger of Biochemistry. 5th ed. Artmed, Alegre; 2011.
55. Coelho LCBB, Santos AFS, Napoleão Correia MTS, Paiva PMG. Purification by Affinity Chromatography, Ahmad, R. 1th ed. Protein chapter 3. Rijeka: INTECH Open Publisher, Croatia; 2012.
56. Coelho LCBB, Leite KM, Napoleão Pontual EV, Gomes FS, Carvalho Paiva PMG. Fish waste as source protease inhibitor and antibacterial Marine Biology. 1th ed. Nova Publishers, New York; 2011.
57. Leite KM, Pontual EV, Napoleão Gomes FS, Maciel de Carvalho Paiva PMG, Coelho LCBB. inhibitor and antibacterial activities liver of tilapia fish (*Oreochromis* Advances in Environmental Research. ed. Nova Science Publishers, New 2012.

58. Mendes AA, Oliveira PC, Castro HF, Giordano RLC. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. *Quim. Nova.* 2011;34(5): 831-840.
59. Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. 5th ed. Interciência, Rio Janeiro; 2008.
60. Soares Jr FL, Dias ACF, Fasanella Taketani RG, Lima AOS, Melo Andreote FD. Endo- and activities in bacteria from sediment. *Braz J Microbiol.* 969-976.
61. Sandgren M, Sahlberg J, Mitchinson Structural and biochemical studies of family 12 cellulases: Improved stability, and ligand complexes. *Biophys Mol Biol.* 2005;89(3):246-291.
62. Zhang PYH, Himmel ME, Mielenz Outlook for cellulase screening and selection *Biotechnol Adv.* 2006;24(5):452-481.
63. Kuhad RC, Gupta R, Singh A. cellulases and their industrial *Enzyme Res.* 2011;2011(1):1-10.
64. Gloster TM, Farid MI, Macauley K, JM, Roberts S, Turkenburg JP, ME, Jorgensen PL, Johansen Characterization and three-structures of two distinct xyloglucanases from Families GH5 GH12. *J Biol Chem.* 19189.
65. Deswal D, Khasa, YP, Kuhad Optimization of cellulase production by brown rot fungus *Fomitopsis* sp. under solid state fermentation. *Technol.* 2011;102(10):6065-6072.
66. Bayer EA, Belaich JP, Shoham Y, R. The cellulosomes: machines for degradation of plant cell polysaccharides. *Annu Rev* 2004;58(1):521-554.
67. Sukumaram RK, Singhanian RR, AJ. Microbial cellulases – applications and challenges. *SciInd* 2005;64(11):832-844.
68. Soares Jr.FL, Melo IS, Dias ACF, FD. Cellulolytic bacteria from soils in environments. *World J Biotechnol.* 2012;28(5):2195-2203.
69. Ahmad N, Pandit NP, Maheshwari SK. asparaginase gene - a approach towards drugs for cancer cell. *J Biosci.* 2012;2(4):1-11.
70. Prakasham RS, Rao CS, Rao RS, Lakshmi GS, Sarma PN. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. *J Appl Microbiol.* 2007;102(5):1382-1391.
71. Credali A, Garcia-Calderon M, Dam S, Perry J, Diaz-Quintana A, Parniske M, Wang TL, Stougaard J, Vega JM, Marquez AJ. The K⁺ dependent NSE1, is crucial for plant growth and production in *Lotus japonicas*. *Plant Physiol.* 2013;54(1):107-118.
72. Pawar PB, Joshi KG, Khobragade Deshmukh AM, Adhasure NN. optimization of medium and solid fermentation for L- production. *Global J Bio-Biotechnol.* 2014;3(1):91-96.
73. Kotzia GA, Labrou NE. expression and characterization of *carotovora* L-asparaginase. *J* 2005;119(4):309-323.
74. Pui CH, Evans WE N. Engl. Treatment acute lymphoblastic leukemia. *J* 2006;354(2):166-78.
75. Balakrishnan K, Nair A, Kumar Screening of microbial isolates for fermentative production of L- in submerged fermentation. *J Pharm* 2013;2(3):1-6.
76. Nagarethinam S, Nagappa AN NU, JV, Vanathi BM. Microbial L and its future prospects. *Asian J Med* 2012;1(4):159-168.
77. Bell TL, Adams MA. Ecophysiology ectomycorrhizal fungi associated *Pinus* spp. in low rainfall areas of Australia. *Plant. Ecolog.* 2004;171(1-52).
78. Saraiva AM, Saraiva CL, Gonçalves Soares RR, Mendes FO, Cordeiro Xavier HS, Pisciotano MNC. activity and bioautographic study o antistaphylococcal components *Caesalpinia pyramidalis* Tull. *Braz J Sci.* 2012;48(1):1-8.
79. Salvat A, Antonacci L, Fortunato Suarez EY, Godoy HM. activity in methanolic extracts of plant species from northern *Phytomed.* 2004;11(2-3):230-234.
80. Da Silva CHTP, Sobrinho TJSP, VTNA, Lima DCA, De Amorim Antioxidant capacity and phenolic of *Caesalpinia pyramidalis* Tull. *Sapium glandulosum* (L.) Morong northeastern Brazil. *Molecules.* 4728-4739.

- 8 Santana DG, Santos CA, Santos Nogueira PCL, Thomazzi SM, CS, Antonioli AR, Camargo EA. effects of the ethanol extract *Caesalpinia pyramidalis* Tul. on inflammatory response and hyperalgesia in rats with acute J Ethnopharmacol. 2012;142(2):44-455.
- 8 Bahia MV, Santos JB, David JP, David Biflavonoids and other phenolics *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). Braz Chem Soc. 2005;16(6):1402-1405.
83. Bahia MV, David JP, David Occurrence of biflavones in leaves *Caesalpinia pyramidalis* specimens. Nova. 2010;33(6):1297-1300.
84. Sá MCA, Peixoto RM, Krewer CC, JRGS, Vargas AC, Costa Antimicrobial activity of Caatinga ethanolic plant extracts against negative and positive bacteria. Rev Cienc Vet. 2011;18(2-3):62-66.

© 2015 Silva et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=1154&id=31&aid=9431>

CAPÍTULO 2

1. ARTIGO

Otimização, purificação e caracterização da L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da *Caesalpinia pyramidalis*

Este artigo será submetido à Revista Internacional “Journal of Applied Microbiology”



Fator Impacto: **2.479**
Online ISSN: 1365-2672
Qualis: B2

Otimização, purificação e caracterização da L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da *Caesalpinia pyramidalis*

I.L. Silva, L.A.O. Silva e L.C.B.B. Coelho.

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

RESUMO

A enzima L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) é presente em bactérias, fungos, animais e plantas sendo ausente em humanos, é essencial para o curso normal do ciclo celular. A L-asparaginase é importante para o tratamento de doenças leucêmicas e a doença de Hodgkin. Dentre as bactérias produtoras desta enzima temos as do gênero *Pseudomonas* que apresentam a capacidade de produzir a L-asparaginase do Tipo I e/ou II. O objetivo deste trabalho foi melhor compreender os parâmetros para otimização, purificação parcialmente e caracterização da L-asparaginase, excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *Caesalpinia pyramidalis*. No presente estudo visando otimizar a produção do complexo de L-asparaginase foi realizado um planejamento experimental central composto (2^3) com 4 pontos centrais, sendo as variáveis pH (4, 7 e 10), temperatura (30°C, 40°C e 50°C) e concentração da L-asparagina (0,2%, 0,5% e 0,8%). Posteriormente a análise estatística das variáveis e a variância (ANOVA) dos resultados obtidos foram avaliados através do programa Statistica, versão 7.0 (StatSoft Co., USA). Em seguida, realizou-se a purificação parcial da enzima L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* realizando-se a técnica de cromatografia de troca iônica, uma eletroforese PAGE-SDS, posteriormente foi feita a caracterização enzimática em diferentes pHs, temperaturas, íons, substratos e por fim a identificação bacteriana a nível morfológico e molecular. Os resultados obtidos na otimização da atividade da L-asparaginase foram nos ensaios com concentração de L-asparagina a 0,8%, pH 4 e temperatura de 30°C, com valores de atividades 0,5604 U/mL e 0,0632 mg de proteína/mL, na cromatografia de troca iônica obteve-se valores de 1,1412 U/mL e 1,1417 U/mL e na eletroforese PAGE-SDS a proteína enzimática apresentou peso molecular de 32 kDa. Na caracterização enzimática, o pH ótimo da enzima foi 7, em relação a temperatura, tivemos a melhor atividade a 30 °C, a L-asparagina apresentou melhor efeito em diferentes substratos seguido da L-glutamina e por fim o nitrato de sódio (NaNO₃), Cloreto de Mercurio (HgCl₂), cloreto de magnésio (MgCl₂) e ureia apresentaram os melhores efeitos de íons. Em relação à identificação bacteriana encontrou-se bactérias em forma de bastonetes apresentando flagelo e a nível de espécie foi denominada com sendo *P. aeruginosa*. Portanto, os resultados obtidos da L-asparaginase caracterizada, isolada da *P. aeruginosa*, mostraram dados extremamente importantes para a indústria biotecnológica, apresentando assim a viabilidade e confiabilidade do estudo realizado.

Palavras chaves: L-asparaginase, *Pseudomonas sp.*, otimização, purificação, caracterização.

ABSTRACT

L-asparaginase enzyme (E.C. 3.5.1.1) is present in bacteria, fungi, plants and animals and is absent in humans, is essential for normal cell cycle progress. The L-asparaginase is important for the treatment of leukemic diseases and Hodgkin's disease. Among the bacteria producing this enzyme have the genus *Pseudomonas* which have the ability to produce L-asparaginase Type I and / or II. The objective of this study was to better understand the parameters for optimization, purification and partial characterization of L-asparaginase, secreted by *Pseudomonas sp.* isolated from the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis*. In the

present study to optimize the production of L-asparaginase complex was performed a central experimental design compound (23) with four central points and the variables pH (4, 7 and 10), temperature (30°, 40° and 50 ° C) and concentration of L-asparagine (0,2%, 0,5% and 0,8%). Later the statistical analysis of the variables and the variance (ANOVA) of the results were evaluated by the Statistica software, version 7.0 (StatSoft Co., USA). Then there was the partial purification of L-asparaginase enzyme secreted by *Pseudomonas* sp performing the ion exchange chromatography technique, a SDS-PAGE electrophoresis, was later made enzymatic characterization at different pHs, temperatures, ions, substrates and finally bacterial identification morphological and molecular levels. The results in the optimization of L-asparaginase activity assays were in concentration of L-asparagine 0,8% pH 4 and 30°C, with activity values 0,5604 U/mL to 0,0632 mg protein/mL, in ion exchange chromatography afforded 1,1412 values U/mL and 1,1417 U/mL and SDS-PAGE electrophoresis the enzyme protein had an apparent molecular weight of 32 kDa. In the enzyme characterization, the optimum pH of the enzyme was 7 with respect to temperature, had the best activity at 30°C, L-asparagine showed a better effect on various substrates followed the L-glutamine and finally sodium nitrate (NaNO₃) mercury chloride (HgCl₂), magnesium chloride (MgCl₂) and urea showed the best effects ions. Regarding the bacterial identification met rod-shaped bacteria having flagella and species level was designated as being *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, the results of characterized L-asparaginase, isolated from *P. aeruginosa* showed extremely important data for the biotechnology industry, thus presenting the viability and reliability of the study performed.

Keywords: L-asparaginase, *Pseudomonas* sp., optimization, purification, characterization.

1. INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga cobre uma grande área no Nordeste Brasil, cerca de um milhão de quilômetros quadrados, a maior parte sobreposição com a região semi-árida (Menezes *et al.* 2012). Presente neste bioma tem-se a *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae, Caesalpinioideae) popularmente conhecida como "catingueira", devido ao bioma típico do semi-árido nordeste do Brasil, conhecido como "caatinga". Apresentam atividades anti-inflamatórias e antibacterianas, antioxidante, elevado teor de tanino e sua rizosfera apresenta micro-organismos produtores de enzimas de importância biotecnológica (celulase, L-asparaginase, xilanases e afins) (Guimarães *et al.* 2015).

A enzima L-asparaginase (CE 3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase, L-ASNase), ocorre predominantemente em micro-organismos, animais e plantas sendo ausente em humanos é responsável por catalisar a hidrólise da L-asparagina (L-Asn) em ácido L-aspartico (L-Asp) e amoníaco (Huang *et al.* 2014; Karamitros *et al.* 2014). L-asparaginases estão entre os principais grupos de proteínas terapêuticas sendo responsáveis por cerca de 40% do total mundial no comércio de agentes anti-leucêmicos e antilinfomas (Warangkar *et al.* 2009; Badoei-dalfard, 2015). A enzima é responsável por agir sobre células tumorais, inviabilizando a entrada do aminoácido L-asparagina em células cancerígenas, portanto,

levando a morte das células malignas devido a ausência da L-asparagina. (Prakasham *et al.* 2007; Credali *et al.* 2013; Silva *et al.* 2015)

O Complexo L-asparaginase foi isolado e caracterizado de vários micro-organismos, incluindo muitas bactérias Gram-negativas, micobactérias, leveduras e fungos incluindo: *Escherichia coli*, *Erwinia cartovor*, *Candida utilis*, *Pisum sativum*, *Aspergillus terreus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como de plantas e plasma de alguns vertebrados (Pawar *et al.* 2014; Silva *et al.* 2015). Muitas bactérias gram-negativas são propensas a terem os dois tipos de L-asparaginases, sendo uma enzima periplasmática de alta afinidade e a outra citoplasmática com baixa afinidade para a enzima L-asparaginase. (Silva *et al.* 2015).

A L-ASNase bacteriana podem ser apresenta duas grandes classes com base na especificidade do substrato. A primeira classe é representada por *Escherichia coli* L-asparaginase (EcA), *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase (ErA), *Wolinella succinogenes* L-asparaginase (WsA) o qual utilizam a L-asparagina como substrato. A segunda classe chamada glutaminase asparaginase é responsável pela hidrólise de L-asparagina e L-glutamina com eficiência comparável e é representada pela PGA (derivado de *Pseudomonas* 7A) e AGA (de *Acinetobacter glutaminasificans*) (Amena *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2010; Silva *et al.* 2015).

A L-ASNase pode ser usado para reduzir a formação de acrilamida em produtos de panificação e sua capacidade antileucêmica tem atraído muita atenção para a sua aplicação no tratamento de malignidades do sistema linfóide, leucemia linfoblástica aguda e linfoma de Hodgkin (Huang *et al.* 2014). No entanto, o uso de enzimas bacterianas para terapia humana provoca vários efeitos colaterais (anafilaxia, pancreatite, diabetes, leucopenia, convulsões neurológicas, e anomalias de coagulação que pode levar à trombose ou hemorragia intracraniana) durante tratamento. (Huang *et al.* 2014; Karamitros e Konrad, 2014). Logo, tentativas estão sendo feitas para encontrar novas L-asparaginases ou maneiras de aumentar o efeito quimioterápico da droga para o tratamento das leucemias.

Embora tenham sido estabelecidos os métodos de produção e de purificação para a obtenção de L-asparaginase de micro-organismo, os rendimentos tem se mostrado baixo (Dashtban-kenari *et al.* 2011). Contudo, a triagem e avaliação dos parâmetros nutricionais dos micro-organismos mostram-se importantes fatores em bioprocessos, tornando um

processo demorado e caro. Em contraste, o planejamento experimental com abordagens estatísticas apresenta vantagens, em relação a tempo de procedimento e custo, (Dasu e Panda, 2000; Reddy *et al.* 2008) e as experiências estatisticamente planejadas diminuem o erro na definição do efeito dos fatores de forma económica (Sharma e Satyanarayana, 2006; Kumar *et al.* 2009).

Entretanto, são mínimas e pouco acessíveis às informações sobre a otimização estatística para a produção L-asparaginase. Os métodos estatísticos são eficazes para aperfeiçoar diversas variáveis, a fim de prever as excelentes situações de desempenho. Assim, o presente estudo, objetivou otimizar a produção do complexo de L-asparaginase produzida pela *Pseudomonas sp.*, realizando um planejamento experimental central composto (2^3) para avaliar o efeito de diferentes parâmetros e, em seguida, visando a purificação parcial da L-asparaginase e caracterização química do complexo enzimático.

2. METODOLOGIA

Todos os substratos foram obtidos da *Merck* (Estação Casa branca, New Jersey, Estados Unidos). Os meios de cultura foram ingredientes da HIMEDIA (Curitiba, Paraná, Brasil). Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e adquiridos a partir de várias fontes comerciais.

2.1. Ensaios de L-asparaginase

Atividade de L-asparaginase foi considerada medindo a concentração de amoníaco libertado pela L-asparagina utilizando o reagente de Nessler (Merck). Foi realizado uma mistura de 100 µL do extrato enzimático e 100 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 9,0) acrescido de 16 mM de L-asparagina incubada por 30 min a 37°C. A reação foi paralizada pela adição de 50 µL de TCA a 1,5 M (Manna *et al.* 1995).

Após centrifugação a 10000 rpm a 4°C por 10 minutos, 100 µL do sobrenadante foi diluído em 450 mL de água destilada e acrescido 150 µL do reagente de Nessler. A reação colorimétrica foi realizada durante 10 min a temperatura ambiente e absorbância foi verificada a 500 nm com o espectrofotômetro (Manna *et al.* 1995; Makky *et al.*, 2014).

2.2. Ensaio de proteínas

Método de Bradford (1976) foi utilizado na determinação do conteúdo de proteínas totais que se ligam ao corante de um modo proporcional à concentração. O corante utilizado é o Comassie Brilliant Blue G-250, o qual existe em duas formas coloridas diferentes, a vermelha e a azul (Manna *et al.* 1995).

2.3. Otimização da produção de L-asparaginase extracelular

Nesta etapa a *Pseudomonas sp* foi semeada em placa de Petri contendo o meio Muller Hinton Ágar (MH) e cultivada a uma temperatura de 37° C por 24 horas. O meio padrão utilizado para o processo de fermentação líquida foi o M-9 descrito por Gulati *et al.* (1997). Para avaliar o efeito do pH, temperatura e concentração de L-asparagina na produção do complexo de L-asparaginase excretado pela bactéria isolada da rizosfera da *C. pyramidalis* realizou-se um planejamento central composto 2^3 , com quatro repetições no ponto central para estimativa do erro experimental, conforme podemos detectar na tabela 1.

Tabela 1 Níveis e variáveis

Variáveis	pH	Temperatura °C	[L-asparagina] %
-1	4,0	30	0,2%
0	7,0	40	0,5%
+1	10,0	50	0,8%

Métodos estatísticos, que resolvem equações polinomiais usando dados quantitativos obtidos a partir de ensaios previstos com precisão, foram usados neste trabalho para concluir a situação ideal para a produção de L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da catíngueira (Yasser *et al.* 2002; Badoei-dalfard, 2015). A análise da significância dos efeitos das variáveis independentes e a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos sobre a produção de L-asparaginase foram avaliadas através do programa *Statistica*, versão 7.0 (StatSoft Co., USA). Neste contexto, o

teste *F* já empregado segundo sugerido por Lima *et al.* (2015).

2.4. Análise estatística

Os ensaios realizados e os valores médios dos resultados e o padrão desvios foram calculados segundo Badoei-Dalfard (2015) e Yasser *et al.* (2002). O software *Statistica* 7.0 foi usado para calcular os efeitos dos três fatores (pH, temperatura e concentração) sobre a resposta (U/mL). Delineamento experimental baseou-se no modelo de primeira ordem:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

Nesta equação *Y* representa a resposta prevista (produção de L-asparaginase), *X_i* representam a variável codificada independente. β_0 e β_i são a constante e os coeficientes de modelo os efeitos lineares, respectivamente. A fim de descrever a natureza da superfície de resposta na região experimental usaram-se fatores de elevado nível percentual de confiança os quais foram são prescritos em três níveis, codificado -1, 0 e +1 para baixa, média e alta concentração (ou valor). Para predizer o ponto ótimo, uma função polinomial de segunda ordem foi montada para correlacionar a relação entre as variáveis e resposta (atividade de L-asparaginase) (Plackett e Burman, 1946; Box e Behnken, 1960). Para os três fatores apresentou-se a seguinte equação 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

A equação polinomial descrita acima representa o *Y* como a resposta prevista, modelo β_0 constante; *X₁*, *X₂* e *X₃* variáveis independentes; β_1 , β_2 e β_3 são coeficientes lineares; β_{12} , β_{13} e β_{23} são coeficientes dos produtos transversais, ou seja, as interações entre os fatores. O programa *Statistica* 7.0 foi utilizado para a análise de regressão dos dados experimentais obtidos. A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação *R*² (Hymavathi *et al.* 2009; Thenmozhi *et al.* 2011; Baskar e Renganathan, 2012).

2.5. Purificação da L-asparaginase

Para a produção de L-asparaginase, foram utilizados três Erlenmeyer (250 mL) contendo cada 100 mL de meio de cultura otimizado na etapa anterior, foi inoculado com 10 ml (10%, v/v) do pré-inóculo da *Pseudomonas sp.* e deixado *overnight* em meio líquido M-9 sem o vermelho de fenol. Os frascos foram incubados a 30°C num agitador rotativo a 120 rpm por 24 h. A enzima bruta foi separada por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos. Para o processo de purificação parcial da enzima L-asparaginase excretada por *Pseudomonas sp.*, foi utilizada a técnica de precipitação com sulfato de amônio em (60% v/v) o qual foi adicionado ao sobrenadante.

O precipitado foi recolhido por centrifugação a 4°C, a 10000 rpm durante 15 minutos, dissolvido em tampão Tris-HCl de 50 mM (pH 8,5) contendo KCl a 100 mM e dialisado com o mesmo tampão por 24h a 4°C (Badoei-dalfard, 2015). Após este processo o dialisado foi filtrado com filtro MILLEX GP com membrana de 0,22 µm da Milipore, para posteriormente ser submetida à cromatografia (Coelho *et al.* 2012).

Depois de dialisado o precipitado foi submetido a uma cromatografia em coluna de troca iônica tipo aniônica (HitrapTM QXL) (Coelho *et al.* 1992; Lima *et al.* 2014). As proteínas foram eluídas (1,5 ml/min) com o tampão Tris/HCl a 50 mM (pH 8,5) as proteínas que interagiram com a resina foram eluídas com o referido tampão acrescido de NaCl em (0 – 1,0 M) (Peterson e Ciegler, 1969; Manna *et al.* 1995).

Cada fração foi monitorada à 280 nm e submetida as dosagens de L-asparaginase. As frações ativas foram submetidas as SDS-PAGE e reunidas para posteriormente ser feita à dosagem enzimática, proteica e subsequente a caracterização enzimática da L-asparaginase.

2.6. Caracterização da enzima purificada

2.6.1. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da L-asparaginase.

A determinação do pH ótimo sobre a atividade da enzima purificada foi considerada ao longo da gama de pH de 2,0 a 10,0 usando diferentes tampões de 50 mM: tampão de citrato (pH 2,0 a 6,0), tampão Tris-HCl (pH 7,0 e 8,0) e tampão de glicina-

NaOH (pH 9,0 e 10,0). A atividade da enzima foi medida utilizando 10 µL da enzima, 10 µL dos diferentes tampões, incubada a 37°C por 30 min. Para estabilizar a reação colocou-se 5 µL de TCA (Ácido tricloroacético) e alíquotou 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizar a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm (Amena *et al.* 2010; Badoei-dalfard, 2015).

A estabilidade foi realizada por meio de pré-incubação de 10 µL de enzima purificada, com 10 µL de cada um dos tampões sem L-asparagina, incubou por 24h. Após o período de incubação, retirar 10 µL da amostra incubada, adicionar 10 µL os tampões com L-asparagina incubar na temperatura por 30°C por 30 min, após a reação colocar 5 µL de TCA (Ácido tricloroacético). Por fim, alíquota 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizar a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm. (Amena *et al.* 2010; Moorthy *et al.* 2010).

2.6.2. Efeito da temperatura e estabilidade na atividade de L-asparaginase purificada.

A determinação da temperatura ótima da enzima L-asparaginase foi medida ao longo do intervalo de temperatura de 4-80°C, utilizando 10 µL da enzima, 10 µL do tampão Tris-HCl pH 7 (50mM), incubando nas respectivas temperaturas por 1h. Após o período de incubação adicionou-se 5 µL de TCA, 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizou a leitura em ELISA a uma absorbância de 450 nm (Amena *et al.* 2010).

A estabilidade de temperatura foi medido por pré-incubação de 10 µL de enzima sem o tampão foi incubada nas respectivas temperaturas de 30°, 37°, 44°, 50° e 60°C por 30 minutos. Em seguida foi quantificada a atividade residual de L-asparaginase utilizando 10 µL da enzima, 10 µL do tampão Tris-HCl pH 7 (50mM), incubando nas respectivas temperaturas por 30 min a 37°C, após acrescentou-se 5 µL de TCA, 110 µL de água destilada, 36 µL do reativo de Nessler e realizou a leitura a 450 nm (Wriston e Yellin, 1973; Amena *et al.* 2010; Monica *et al.* 2013).

2.6.3. Efeito de diferentes íons metálicos e compostos químicos sobre a atividade de L-asparaginase.

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade L-asparaginase foi avaliada utilizando o cloreto de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} e Mn^{2+} a 10 mM força. A influência dos inibidores e ativadores também foi considerado usando 10 mM de β -mercaptoetanol, SDS, PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e ureia (Warangkar e Khobragade, 2010; Monica *et al.*, 2013).

O ensaio foi realizado na presença do composto mencionado em reação do ensaio. A atividade foi determinada adicionando 10 μL do tampão Tris-HCl com L-asparagina (pH 7 a 50 mM), seguido 2 μL do íon mais 10 μL da enzima que foi incubado a 37°C por 30 min. Os procedimentos posteriores a incubação seguem a metodologia descrita no tópico 2.6.1. A atividade da enzima em cada amostra foi medida e expressa como uma atividade relativa. A amostra não tratada foi utilizada como controle (Warangkar e Khobragade, 2010; Amena *et al.* 2010).

2.6.4. Especificidade de L-asparaginase e determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito de afinidade da L-asparaginase sobre diferentes substratos foi avaliado sob os seguintes aminoácidos: o ácido glutâmico, L-asparagina, L-glutamina, e L-ornitina. O ensaio foi realizado através da substituição de 100 mM de L-asparagina pelo aminoácido estudado. A atividade foi determinada adicionando 10 μL do tampão Tris-HCl sem L-asparagina (pH 7 a 50 mM), seguido 2 μL do substrato mais 10 μL da enzima que foi incubado a 37°C por 30 min. Os procedimentos posteriores a incubação seguem a metodologia descrita no tópico 2.6.1. (Wriston Yellin, 1973; Kotzia e Labrou, 2007; Badoei-dalfard, 2015)

2.7. Identificação morfológica da *Pseudomonas* sp.

As bactérias estudadas no presente trabalho foram identificadas morfolologicamente

seguindo a metodologia descrita por *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1986) e segundo Moura *et al.* (2015) que consistiu no semeio em placa em Muller Hinton para coloração de gram. Em seguida foi realizado o procedimento de Microscopia Eletrônica de Varredura MEV - QUANTA 200FEG (Junior *et al.* 2013).

2.8. Extração de DNA cromossômico

O DNA cromossômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e a qualidade e concentração foram avaliadas visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%, em tampão TBE 0.5x, a 100 V por 1 h. Em seguida, o gel foi analisado em transiluminador ultravioleta e fotodocumentado (Sambrook e Russell, 2001; Badoei-dalfard, 2015).

2.8.1. Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rDNA e do gene Gyrase β por PCR.

A sequência completa do gene 16S rDNA foi obtida por PCR, utilizando os oligonucleotídeos fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 μ L contendo tampão 10X, dNTPs (10 mM), $MgCl_2$ (50 mM) e *Taq* DNA-polimerase (2.5 U/ μ L) (Invitrogen), iniciadores (10 pmol/cada) e DNA (10-15 ng) (Badoei-dalfard e Karami, 2013).

As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler - BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos consistindo em desnaturação a 95°C por 45 seg, anelamento a 54°C por 45 seg, e extensão 72 °C por 2 min, finalizando com uma extensão a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram purificados seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e sequenciados em sequenciador automático de DNA ABI 3100 utilizando o *BigDye* Kit (Applied Biosystems) (Tamura *et al.* 2007; Badoei-dalfard e Karami, 2013).

2.8.2. Análises dos dados da extração de DNA

As sequências do gene 16S rDNA obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados Genbank (NCBI). Para o alinhamento local, foi usada a ferramenta BLASTn (NCBI) e para o alinhamento múltiplo foram utilizados os softwares MEGA 5.2 e Multialin. O programa ClustalW foi utilizado para a construção de um dendrograma pelo método Neighbor-Joining (Tamura *et al.* 2007; Badoei-dalfard, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização da produção de L-asparaginase extracelular

Realizou-se o planejamento experimental central composto 2^3 com quatro pontos centrais para auxiliar na estimativa do erro experimental, sendo avaliadas variáveis de pH (4, 7 e 10), temperatura (30°C, 40°C e 50°C) e a concentração de L-asparagina (0,2%, 0,5% e 0,8%) na produção do complexo de L-asparaginase excretado pela *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da *C. pyramidalis* Tul.

O modelo experimental utilizado para valorizar a ferramenta da otimização do meio para a produção de L-asparaginase de *Pseudomonas sp.* isolada da rizosfera da catingueira, o que resultou numa melhoria na produção desta enzima em %. O modelo estatístico também foi validado pela repetição dos experimentos sob as condições otimizadas, o que resultou na produção de L-asparaginase, provando assim a validade do modelo.

Todo o planejamento foi realizado em unicata diferindo do ponto central que foi realizado em quadruplicata, a análise da significância dos efeitos das variáveis independentes e a análise da variância (ANOVA) os valores médios dos resultados e os desvios padrão foram calculados utilizando o *Software Statistica 7*, o qual calculou-se os efeitos das interações das variáveis ajustando os resultados obtidos para uma equação linear polinomial correlacionando a resposta do processo dos três fatores. A forma geral da equação polinomial linear mostrada na Eq.1:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

A matriz experimental completa esta mostrada na tabela 2, juntamente com rendimento de L-asparaginase em U/mL. De acordo com as condições experimentais, a maior concentração enzimática (0,5932 U/mL) foi obtida a partir das condições ótimas de planejamento que foram em pH 4,0, a 30°C e com concentração de L-asparagina de 0,8% por 24h, enquanto que a mais baixa (0,0037 U/mL) foi detectada nas condições mais menos favorecidas de L-asparagina. Os melhores rendimentos deram-se com o aumento do substrato indutor da L-asparaginase (0,5 e 0,8%), variando de 0,3557 à 0,5932 U/mL (Tabela 2).

Tabela 2 Planejamento experimental

Ensaio	pH		Temperatura °C		[L-asparagina] %		Rendimento (U/mL)
1	-1	4,0	-1	30	-1	0,2	0,3308
2	+1	10,0	+1	50	-1	0,2	0,2991
3	-1	4,0	-1	30	-1	0,2	0,0037
4	+1	10,0	+1	50	-1	0,2	0,0037
5	-1	4,0	-1	30	+1	0,8	0,5932
6	+1	10,0	+1	50	+1	0,8	0,5479
7	-1	4,0	-1	30	+1	0,8	0,4514
8	+1	10,0	+1	50	+1	0,8	0,4611
9	0	7,0	0	40	0	0,5	0,4101
10	0	7,0	0	40	0	0,5	0,3557
11	0	7,0	0	40	0	0,5	0,3687
12	0	7,0	0	40	0	0,5	0,3642

A atividade máxima da L-asparaginase excretada *Yarrowia lipolytica* NCIM 3472 foi de 39,8623 U/mL utilizando torta de dendê como substrato indutor e tenho como variáveis o teor de umidade do substrato, concentração de glicose, e L-asparagina concentração (Karanam e Medicherla, 2010).

A produção de L-asparaginase por *Serratia marcescens* SB08 também foi validado pela repetição das experiências sob as condições otimizadas, o que resultou na produção da enzima de 256,91 U/mL, provando assim a validade do modelo (VENIL *et al.*, 2009). A atividade de L-asparaginase máxima prevista a partir *Enterobacter aerogenes* foi 19,129 U/mL e a correspondente concentração ótima de citrato de sódio, DAHP e L-asparagina foram 18,76 g/L, 5,72 g/L e 8,58 g/L, respectivamente (Karanam e Medicherla, 2010).

A partir dos resultados obtidos com as dosagens enzimáticas, efeitos dos três fatores (pH, temperatura e concentração do substrato indutor) também foram analisados no programa *Statistica 7.0* por meio de uma planejamento experimental 2³. Podemos inferir que a maior produção do complexo enzimático foi obtida quando o a temperatura foi diminuída e a concentração foi aumentada. Contudo, pode-se observar que a presença de diferentes pHs nos ensaios não interferiram na interação temperatura-substrato (Fig. 1).

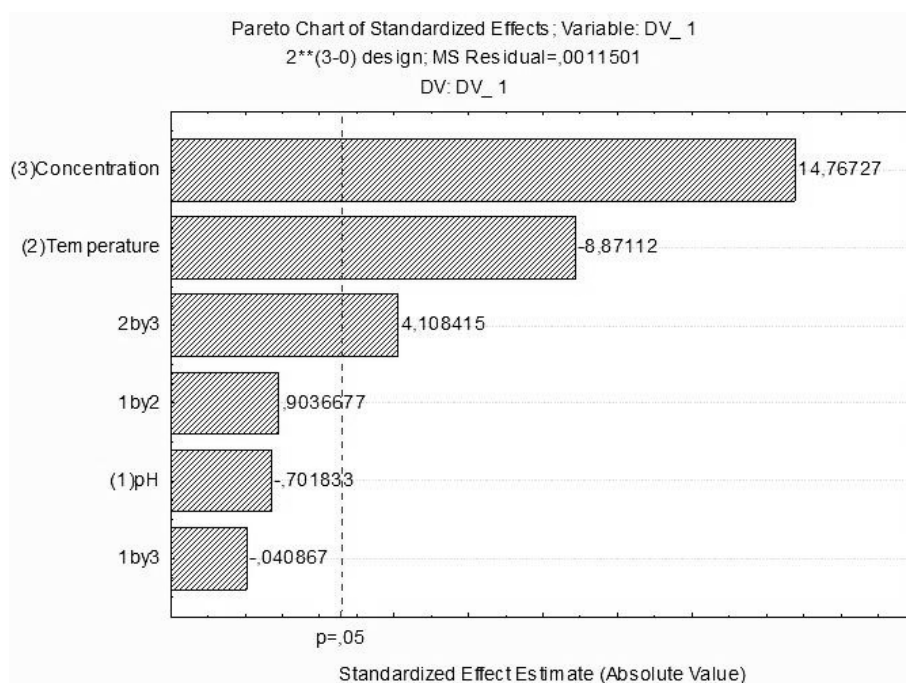


Figura 1 Gráfico de Pareto para significância dos fatores pH, temperatura e concentração, na produção da L-asparaginase.

Fonte: Autor. (1) – Primeiro fator; (2) – Segundo fator; (3) – Terceiro fator; 1by2 – Interação entre pH e temperatura; 1by3 – Interação entre pH e concentração L-asparagina; 2by3 – Interação entre temperatura e concentração; p – Nível de significância.

Desta maneira foi possível propor um modelo para produção enzimática, em sua forma reduzida não incluindo coeficientes que não apresentaram significância (Equação 2). Levando em consideração que todos os fatores e interações foram significativos excetuando-se a interação temperatura e concentração.

$$\hat{y} = 0,349 - 0,008b_1 - 0,106b_2 + 0,177b_3 + 0,010b_1b_2 - 0,0004b_1b_3 + 0,049b_2b_3 + 0,002b_1b_2b_3$$

A análise de variância revelou que a regressão foi significativa ao nível de confiança de 95%, nos ensaios realizados a equação da reta apresentou bom ajuste com coeficiente de correlação (R-sqr) de = 0,98437 e MS Residual = 0,0011499. Valores do

resíduo (0,0056), falta de ajuste (0,0039), erro puro (0,0017); foram obtidos através da análise da variância (ANOVA) para todos os ensaios (Tabela 3).

Tabela 3 Designer do planejamento 2^3 apresentando: Estimativa de erro; Variância; Desvio padrão; Coeficiente de correlação; Média Residual.

Factor	Effect	Std.Err.	t(5)	P	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	0,3491	0,0097	35,666	0,0000	0,3240	0,3743	0,3491	0,0097
pH	-0,0168	0,0239	-0,701	0,5140	-0,0784	0,0448	-0,0084	0,0119
Temp.	-0,2127	0,0239	-8,871	0,0003	-0,2743	-0,1510	-0,1063	0,0119
Conc.	0,3541	0,0239	14,767	0,00002	0,2924	0,4157	0,1770	0,0119
1 by 2	0,0216	0,0239	0,9036	0,4075	-0,0399	0,0833	0,0108	0,0119
1 by 3	-0,0009	0,0239	-0,040	0,9689	-0,0626	0,0606	-0,0004	0,0119
2 by 3	0,0985	0,0239	4,108	0,0092	0,0368	0,1601	0,0492	0,0119

Detectou-se a partir dos resultados da dosagem enzimática uma melhora considerável na produção da enzima, entretanto, também foi constatado que nosso modelo experimental, atendia aos requisitos de um modelo linear, sendo necessários estudos posteriores para melhorar e possivelmente chegar ao ponto ótimo para efetivar a eficiência da otimização.

Contudo, Badoei-Dalfard (2015) utilizou o planejamento composto central (CCD) com 4 variáveis (L-asparagina, glicose, K_2HPO_4 e NaCl). A análise de regressão dos dados também foi realizada para análise da satisfatoriedade do modelo quadrático e possivelmente sugerir a equação polinomial de segunda ordem.

3.2. Purificação da L-asparaginase

Posteriormente definido as condições ótimas de produção da enzima L-asparaginase através da utilização do planejamento DCCR 2^3 , foi fermentado 150 mL do complexo enzimático nas condições ótimas (pH 4,0 a 30°C e 0,8% de L-asparagina), ao qual foi precipitado em 60% de sulfato de amônia e posteriormente este precipitado foi dialisado obtendo 3,0 mL do respectivo complexo, ao qual foi submetido a uma

cromatografia aniônica HiTrap QXL.

Foram coletadas 57 frações contendo 1,5mL cada, em seguida realizou-se a absorbância a 280 nm para acompanhar o teor de proteínas nas respectivas frações e por fim a atividade enzimática. As frações que apresentaram melhor atividade para L-asparaginase, foram as frações 2 e 3, apresentando valores de 1,1412 U/mL e 1,1417 U/mL respectivamente (Fig. 2 e Tabela 4).

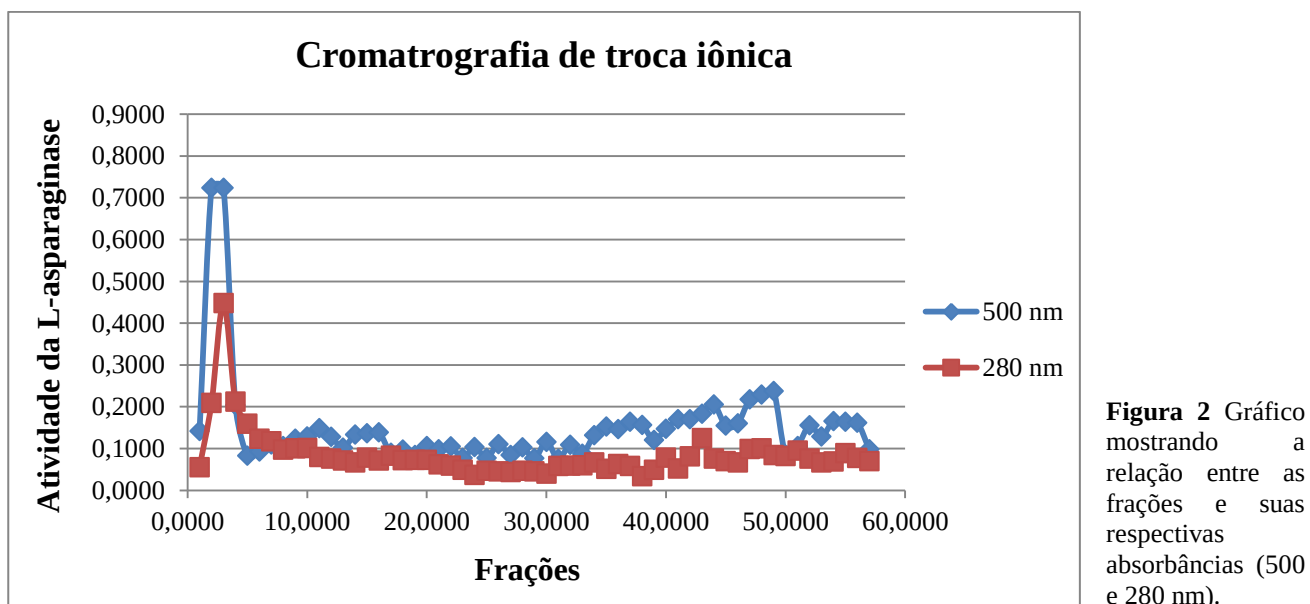


Figura 2 Gráfico mostrando a relação entre as frações e suas respectivas absorbâncias (500 e 280 nm).

Tabela 4: Purificação Parcial da L-asparaginase da *Pseudomonas sp.*

Etapas	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)
Extrato bruto	150 mL	404,625	5,58	72,513	100
Precipitado com (NH ₄) ₂ SO ₂ (0-60%)	3,0 mL	5,286	0,27	19,578	1,3
DEAE Hitrap QXL	3,0 mL	2,586	0,139	18,604	0,64

A purificação parcial do extrato bruto de L-asparaginase que foi afetada pela precipitação com sulfato de amônio (60%) mostrando que a maioria da atividade da enzima foi conservada no precipitado. A L-asparaginase parcialmente purificada por cromatografia de troca iônica da *Pseudomonas sp.* exibiu 0,64% de rendimento e 18,6 U/mg de atividade específica. Contudo, L-asparaginase produzida por outras *Pseudomonas* como é o caso da *P. carotovorum* MTCC 1428 purificado por cromatografia em coluna de Sephadex G-100 exibiu 42,02% de rendimento e 2020,91 U/mg de atividade específica (Kumar *et al.* 2011).

Para avaliar o índice de pureza da proteína purificada foram realizadas

eletroforeses PAGE-SDS a 12%, da enzima purificada utilizando em paralelo com um conjunto molecular marcadores proteicos pré-corado (AMRESCO) para estimar a massa molecular da enzima. O resultado da eletroforese confirmou a purificação parcial das frações 2 e 3 coletadas por cromatografia de troca iônica. Em seguida foi concentrada as duas frações (2,3) e realizada outra eletroforese a 12% com o gel medindo 7 cm de comprimento de corrida e corada com Nitrato de prata (AgNO_3) para rápida visualização da eletroforese.

A L-asparaginase purificada da *Pseudomonas sp.* mostrou uma única banda de proteína de cerca de 32 kDa (Fig. 3). Resultados similares foram relatados para a L-asparaginases de *P. stutzeri* MB-405, *E. coli* e *T. thermophilus* com valores de pesos moleculares que variam de 33 para 34 kDa (Manna *et al.* 1995; Pritsa *et al.*, 2001; Soares *et al.* 2002).

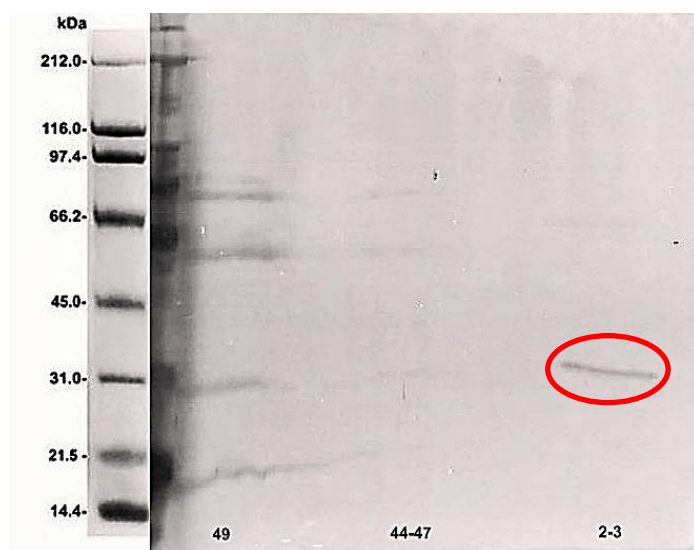


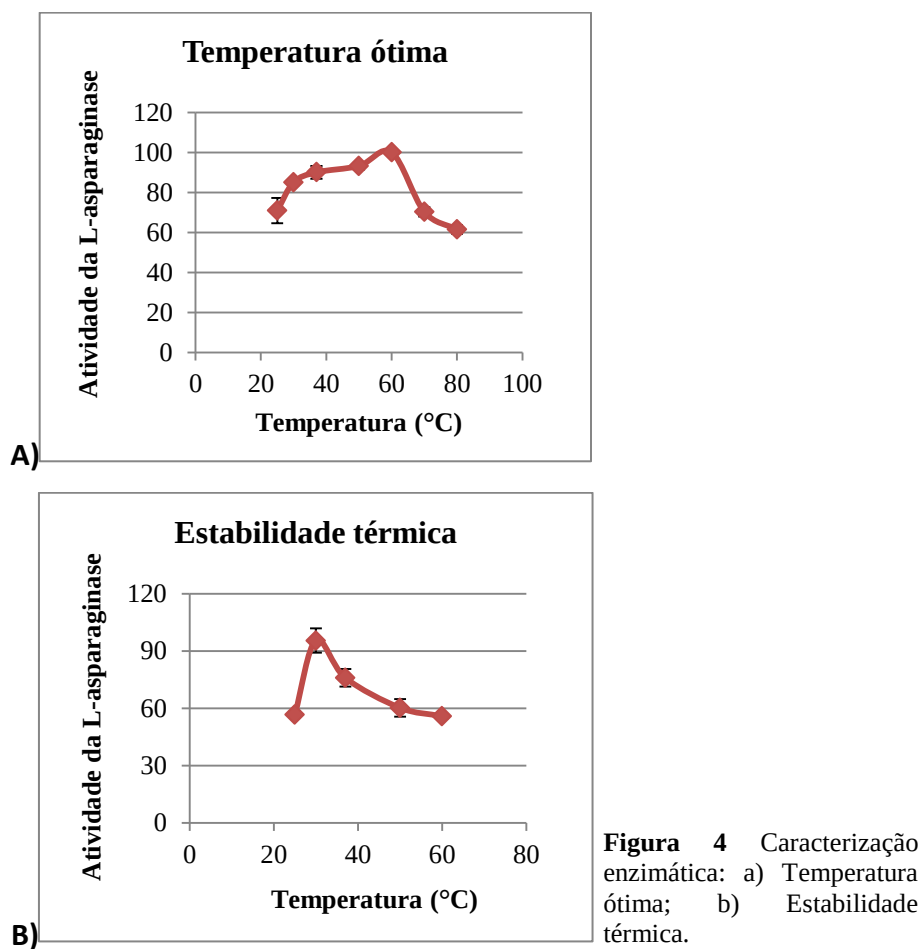
Figura 3. Eletroforese de purificação parcial da L-asparaginase.

Frações: 49, 44-47 e 2-3

Em contraste, a L-asparaginase purificada *Bacillus sp.* (Moorthy *et al.* 2010), *Streptomyces gulbargensis* (Amena *et al.* 2010), *Penicillium brevicompactum* NRC 829 (Elshafei *et al.* 2012), e *Streptomyces albidoflavus* (Narayana *et al.* 2008) exibiram pesos moleculares de 45, 85, 95, e 112 kDa, respectivamente. Um baixo peso molecular (11,2 kDa) da L-asparaginase foi purificado a partir *Streptobacillus sp.* KK2S4 (Makky *et al.* 2014).

3.3. Caracterização da L-asparaginase

A L-asparaginase isolada de *Pseudomonas sp.* deste presente estudo exibiu atividade máxima em uma temperatura ótima de 60°C (Fig. 4a) e a estabilidade térmica apresentou-se em melhor atividade a 30°C (Fig. 4b). Resultados semelhantes foram relatados por L-asparaginase de *Erwinia carotovora* (Maladkar *et al.* 1993), *Pseudomonas stutzeri* MB-405, e *Staphylococcus* (El-bessoumy *et al.* 2004; Badoei-Dalfard, 2015).



Em outros tipos de cepas de bacterianas mostrou que a atividade máxima de L-asparaginase de *P. aeruginosa* 50071 (Narayana *et al.* 2008) e *E. carotovora* (Kamble *et al.* 2006) foram bem detectados a temperaturas de 37°C e 35°C, respectivamente. A L-asparaginase da *P. brevicompactum* NRC829 (Elshafei *et al.* 2012) era ativa a uma temperatura diferente de 30 °C, atingindo 75 °C, porém com um ótimo a 37 °C.

Erwinia sp. L-asparaginase exibiu também uma atividade máxima a 35°C

(Borkotaky e Bezbaruah, 2002), e a atividade máxima de *S. gulbargensis* L-asparaginase foi de 40 °C (Amena *et al.* 2010). Logo, esta propriedade da L-asparaginase presente na *P.aeruginosa* faz com que seja adequada para a remoção da doença do corpo de um paciente quando este é tratado com L-asparaginase in vivo.

O L-asparaginase isolada da cepa *Pseudomonas sp.* deste estudo foi ativa entre valores de pH 4,0 a 7,0. Embora o pH ótimo da enzima esteja em 7 juntamente com a estabilidade que também apresentou-se no pH 7,0. A atividade máxima em um pH fisiológico é um dos requisitos de primordiais para a atividade da L-asparaginase anticâncer, esta enzima é adequada porque a atividade da enzima foi preservada a pH 7,0. Em demais estudos foram observados atividades de L-asparaginase em actinomicetes, o *Serratia marcescens* apresentando pH ótimo variando de pH 5,0 a 9,0 (Khamna *et al.* 2009)(Figura 5).

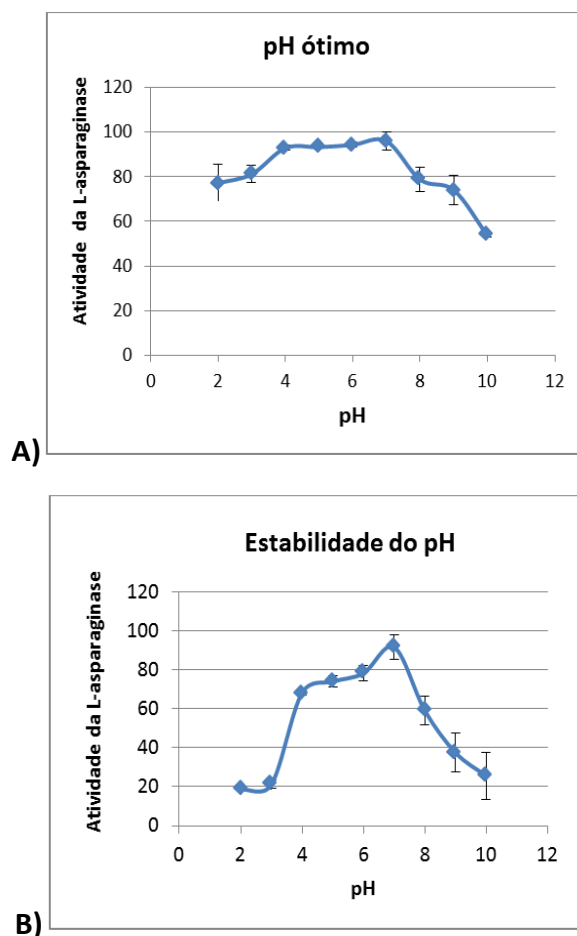


Figura 5 Caracterização enzimática: a) pH ótimo; b) Estabilidade em diferentes pHs.

Demais estudos mostram que o pH ótimo de atividade da L-asparaginase foi em pH alcalino (8,0-9,0) para *Escherichia coli* (Castaman e Rodeghiero, 1993; Liboshi *et al.* 1999) espécies de *Erwinia* (Muller e Boos, 1998) e muitas outras L-asparaginases bacterianas (Balcão *et al.* 2001), mas a L-asparaginase de *E. coli* apresentou valores ótimos de pH ácido de 5,0-6,0. A L-asparaginase de *P. brevicompactum* NRC829 (Elshafei *et al.* 2012) mostraram estabilidade na faixa de pH alcalino (pH 7.5-9.5), pois preservaram cerca de 80% da sua atividade inicial após incubação durante 24 h.

Em relação ao efeito de diferentes íons metálicos e seus inibidores para a espécie de *Pseudomonas sp.* abordada na figura 6, os resultados expressam que houve boa assimilação da enzima com íons Hg^{2+} ($HgCl_2$ rendimento superior a 80%), Mg^{2+} ($MgCl_2$ produto superior a 85%), NO_3^- ($NaNO_3$ com valor maior que 95%), ureia (com ganho de mais de 87%). Contrapondo o estudo, Warangkar e Khobragade (2010) afirmaram uma inibição da atividade da L-asparaginase na presença de Hg^{2+} e Zn^{2+} revela a presença do grupo(s) sulfidrilo reativos. Thiol também foi detectada na L-asparaginase da extraída da *E. carotovora* (Warangkar e Khobragade, 2010).

Entretanto, o aminoácido L-asparagina tem ligantes de nitrogênio em sua cadeia, então os compostos com ligações nitrogenadas como o Nitrato de sódio e a ureia podem ser responsáveis por uma resposta falsa positiva da atividade da enzima L-asparaginase, diferindo dos íons utilizados nos experimentos.

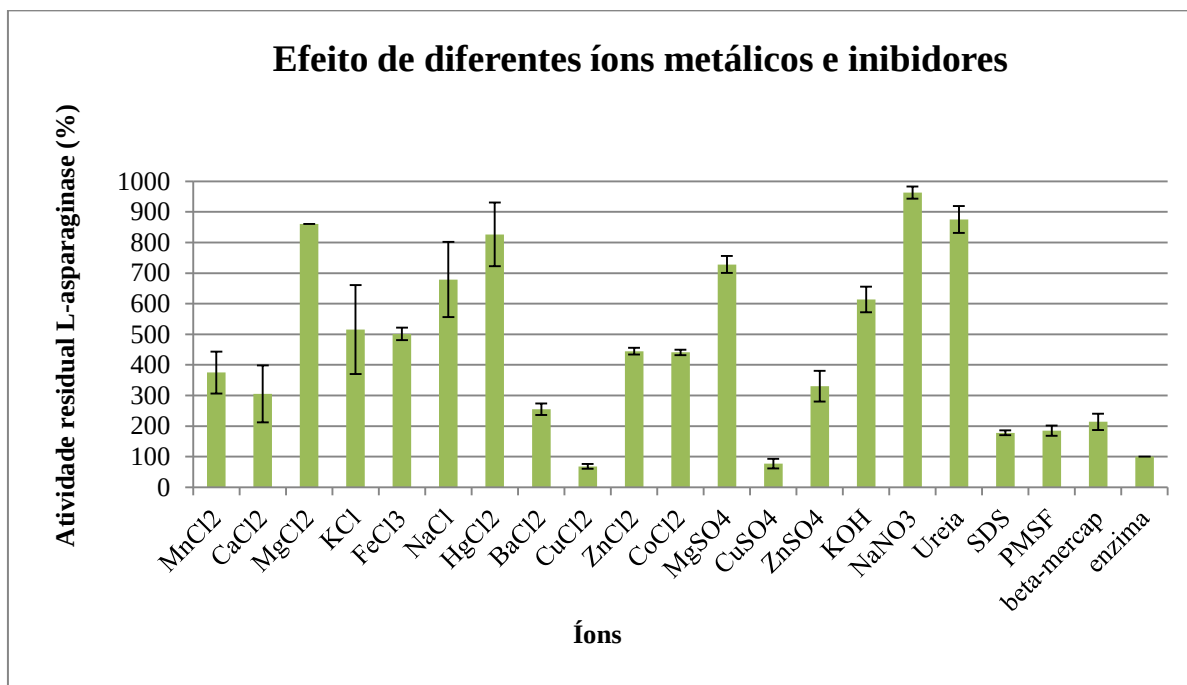


Figura 6
Caracterização enzimática: efeito de diferentes íons metálicos e inibidores da L-asparaginase.

Contudo, os íons Cu^{2+} mostram uma atividade inferior a 10% da atividade enzimática mostrando a não relação deste substrato iônico com a ação da enzima. Em relação aos inibidores SDS, PMSF, β -mercaptoetanol apresentaram rendimentos inferiores a 30% se comparado ao da enzima. Corroborando os dados observados no presente trabalho a L-asparaginase de *P.carotovorum* mostraram a perda total da atividade enzimática em cerca de 21% na presença de 2mM de SDS (Kumar *et al.* 2011). Os resultados para o efeito da L-asparaginase em SDS na espécie de *P. aeruginosa* são bastante semelhante ao da enzima de *Pectobacterium carotovorum* (Kumar *et al.* 2011).

A asparaginase isolada da *Pseudomonas sp.* é muito específica para o seu substrato normal a L-asparagina (Figura 7). A atividade reduzida da L-glutaminase auxilia na redução do fator de risco para a atividade de tratamento eficaz. A presença da L-glutaminase na clínica pode causar leucopenia, convulsões neurológicas, pancreatite e anomalias de coagulação que levam a trombose ou hemorragia intracraniana (Duval *et al.* 2002).

Nenhuma atividade significativa foi detectada quando a L-asparaginase foi colocada em contato com os substratos, L-ornitina, e ácido L-glutâmico. A propriedade da L-asparaginase da *P. aeruginosa* apresenta-se possivelmente como uma forma adequada para aplicações terapêutica. Os presentes resultados estão de acordo com o que foi relatado por outros estudos (El-bessoumy *et al.* 2004;. Kumar *et al.* 2011).

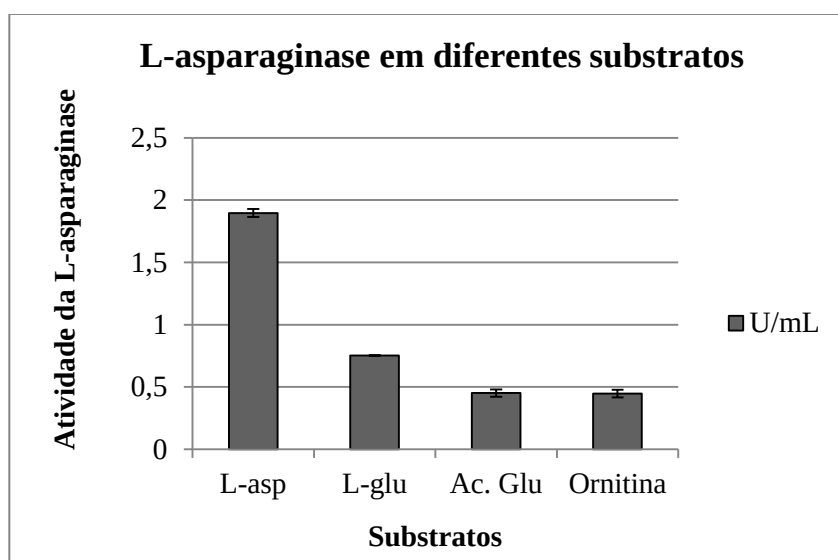


Figura 7: Caracterização enzimática: Efeito da L-asparaginase em diferentes substratos.

3.4. Identificação morfológica da *Pseudomonas sp.*

As características típicas da espécie estudada apresentam coloração amarelo-esverdeada, colônias uniformes, mucosa e brilhosa (figura 8). Apresentam a tendência de formar pigmentos fluorescentes visíveis sob luz ultravioleta ($\lambda = 560$ nm), verificando-se que esta é uma característica variável dentre as estirpes de *Pseudomonas* como exemplo temos as bactérias da *Pseudomonas syringae* (Moura *et al.* 2015), *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (Özen e Ussery, 2012) dentre outras.

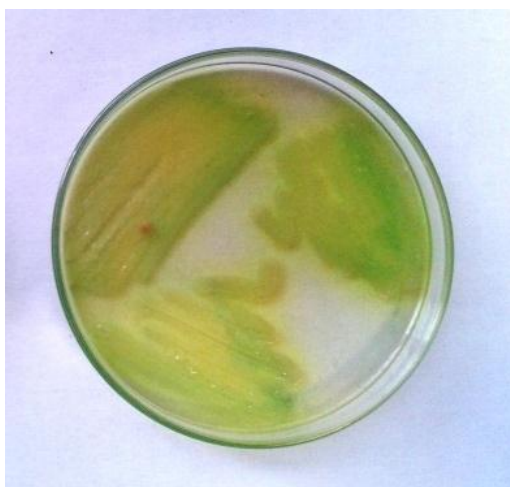
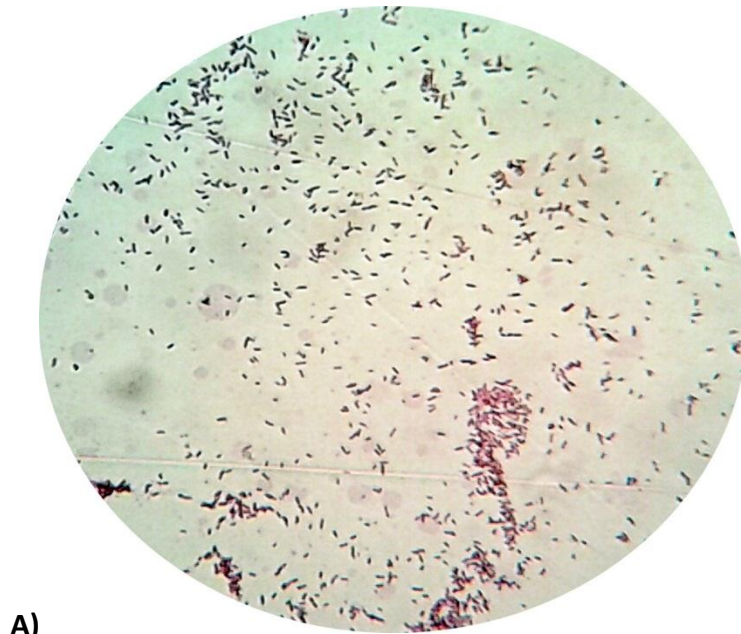
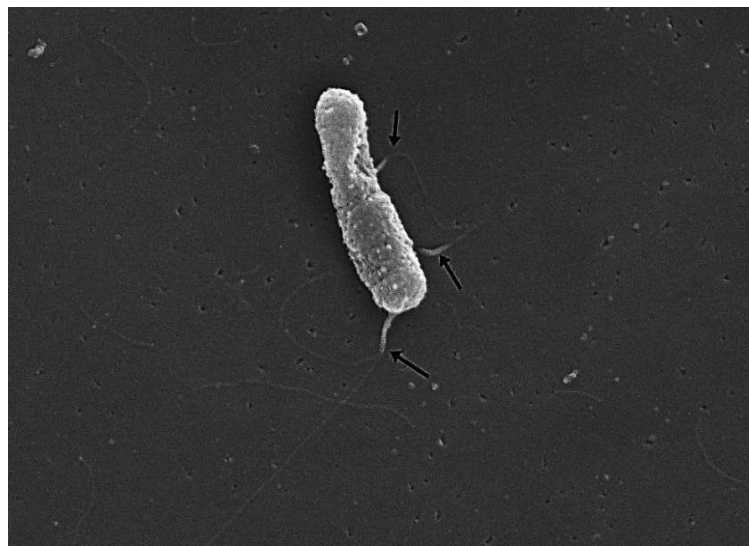


Figura 8: Crescimento biológico da *Pseudomonas sp.*

Para a análise morfológica microscopicamente foram realizadas as técnicas de coloração de gram no qual confirmou ser uma bactéria Gram-negativa (Fig. 9a) em forma de bastonete curtos e por fim para observar as estruturas morfológicas como um todo da *Pseudomonas sp.* Realizou-se o a microscopia eletrônica de varredura no qual evidenciou a presença dos bastonetes e seus flagelos (Fig. 9b) (Moura *et al.* 2015).



A)



B)

HV	mag	□	HFV	spot	det	WD	
30.00 kV	40 000 x		6.40 μm	3.0	ETD	10.1 mm	

2 μm
CETENE - PE

Figura 9: Identificação morfológica da *Pseudomonas* sp. A) Coloração de Gram. B) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3.5. Extração de DNA (16S rDNA)

O gene 16S rDNA é amplamente utilizado como marcador filogenético, pois apresenta sequências altamente conservadas entre regiões variáveis, está presente e desempenha a mesma função em todos os organismos, não é afetado por mudanças ambientais e apresenta um tamanho suficiente para ser utilizado em inferências taxonômicas (Woese, 1987; Acinas *et al.*, 2004).

As sequências de 16S já foram determinadas para um número grande de linhagens bacterianas e estão, em sua maioria, depositadas no GenBank (Gitte e Ulrik, 2010; Benson *et al.* 2012). Com isso, as sequências previamente depositadas podem ser utilizadas para a comparação com as sequências de isolados em estudo.

Portanto, para considerar isolados pertencentes a diferentes espécies é necessário que ela possua uma homologia na sequência do gene 16S rDNA menor que 97%. (Stackebrandt e Goebel, 1994; Kim *et al.* 2014). No presente estudo o isolado 1pS foi identificado como *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando 99% de similiaridade com a sequência do gene 16S rDNA depositada no banco de dados (Tabela 5).

Tabela 5 Extração de DNA da *Pseudomonas sp.*

Isolates	Species	Query value	E value	Identity	Accession
1Ps	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	0.0	99%	EU931548.1

4. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou a otimização, purificação e caracterização da L-asparaginase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa*. A utilização do modelo estatístico favoreceu uma melhor condição de otimização da enzima, a L-asparaginase se manteve ativa e estável ao longo das diferentes condições fisiológicas, bem como especificamente para L-asparagina, como seu substrato natural.

A L-asparaginase isolada desta bactéria sofreu um baixo rendimento utilizando a precipitação com sulfato de amônio a 60% e cromatografia de troca iônica, vindo a sugerir outras formas de purificação parcial desta enzima favorecendo assim melhor rendimento da mesma. Contudo, apresentaram resultados significativos nas caracterizações enzimáticas em diferentes condições de estudos, todas confirmando as informações já presentes na literatura. Deste modo, convém ressaltar que a enzima L-asparaginase apresentou resultados muito importantes para a área biotecnológica, mostrando assim a eficiência dos métodos empregados neste trabalho.

5. REFERÊNCIAS

Acinas, S.G., Klepac-ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L. e Polz, M.F. (2004) Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* **430**, 551–554.

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A. e LINGAPPA, K. (2010) Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz J Microbiol* **41**, 173–178.

Baskar, G. e Renganathan, S. (2012) Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. *Asia-Pac J Chem Eng* **7**, 212–220.

Badoei-dalfard, A. e Karami, Z. (2013) Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: activity optimization by response surface methodology. *J Mol Catal B-Enzym*. **89**, 15–23.

Badoei-dalfard, A. (2015) Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatal Agric Biotechnol* **4**, 388–397.

Balcao, V.M., Mateo, C., Fernandez, L., Lafuente, R., Malcota, F.X. e Guisan, J.M. (2001) Structural and functional stabilization of L-asparaginase via subunit: immobilization on to highly activated supports. *Biotechnol Prog* **17**, 537–542.

Benson, A.D., Cavanaugh, M. e Clark, K., Karsch-mizrachi, I., Lipman D.J., Ostell, J. e Sayers, E.W. (2012) GenBank. *Nucleic Acids Res* **1**, 1–7.

Box, G.E.P. e Behnken, D.W. (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **2**.

Castaman, G. e Rodeghiero, F. (1993) *Erwinia* and *E. coli* derived L-asparaginase have similar effect on hemostasis. *Hematologica* **78**, 57–60.

Coelho, L.C.B.B., Hutchinson, W., Koshy, A., Robinson, D. e Stirling, J.L. (1992) Affinity chromatography of beta-N-acetyl-hexosaminidases on columns with mixed charge and affinity functions. *Appl Biochem Biotechnol* **32**, 171-185.

Credali, A., Garcia-calderon, M., Dam, S., Perry, J., Diaz-quintana, A., Parniske, M., Wang, T.L., Stougaard, J., Vega, J.M. e Marquez, A.J. (2013) The K^+ dependent asparaginase, NSE1, is crucial for plant growth and seed production in *Lotus japonicas*. *Plant Cell Physiol* **54**, 107-118.

Dashtban-kenari, S.L., Alemzadeh, I. e Maghsodi, V. (2011) Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: optimization by response surface methodology. *Food Bioprod Process* **89**, 315–321.

Dasu, V.V. e Panda, T. (2000) Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology. *Bioproc Biosyst Eng* **22**, 45-49.

Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A.M., Vilmer, E., Otten, J. e Philippe, N. (2002) Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer — Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* **99**, 2734–2739.

El-Bessoumy, A.A., Sarhan, M. e Mansour, J. (2004) Production, isolation and purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *J Biochem Mol Biol* **37**, 387–393.

Elshafei, M.A., Mohamed, H.M., Abd-Elmontasr, A.M., Mahmoud, D.A. e Elghonemy,

D.H., 2012. Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC829. *Br Microb Res J* **2**, 158–174.

Gitte, N.H. e Ulrik, S.J. (2010) Direct 16S rRNA gene sequencing of polymicrobial culture-negative samples with analysis of mixed chromatograms. *J Med Microbiol* **59**, 486–488.

Gulati, R., Saxena, R.K. e Gupta, R. (1997) A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganisms. *Lett Appl Microbiol* **24**, 23–26.

Hymavathi, M., Sathish, T., Subba, R. e Prakasham, R.S. (2009) Enhancement of L-Asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Appl Biochem Biotech* **159**, 191-198.

Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q. e Jiang, Z. (2014) Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Appl Environ Microbiol* **80**, 1561-1569.

Júnior, J.A., Ávila, A.F. e Triplett, M.H. (2013) Caracterização morfológica de nanomembranas de poliamida-66 dopadas com grafeno obtidas por electrospinning. *Polímeros* **23**, 74-81.

Khamna, S., Yokota, A. e Lumyong, S. (2009) L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Int J Integr Biol* **6**, 22–26.

Karamitros, C. S. e Labrou, N. E. (2014) Extracellular expression and affinity purification of L-asparaginase from *E. chrysanthemi* in *E. coli*. *Sustain Chem Process* **2**, 1-16.

Karanam, S.K. e Medicherla, N.R. (2010) Application of Doehlert experimental design for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase from Palm Kernal Cake (*Elaeis guineensis*). *J Microb Biochem Technol* **2**, 1–6.

- Kim, M., Oh, H., Park, S. e Chun, J. (2014) Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 346-351.
- Kumar, N.S.M. e Manonmani, H.K. (2013) Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotechnol* **29**, 577–587.
- Kumar, S., Dasu, V. e Pakshirajan, K. (2011) Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresource Technol* **102**, 2077–2082.
- Liboshi, Y., Papst, P.J., Hunger, S.P. e Terada, N. (1999) L-asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 534–539.
- Lima, D.A., Luna, R.L.N., Martín, C. e Gouveia, E.R. (2015) Comparison of bioethanol production from acid hydrolyzates of waste office paper using *Saccharomyces cerevisiae* and *Spathaspora passalidarum*. *Cell Chem Technol* **49**, 463-469.
- Makky, E.A.; Loh, Y.C.; Karim, M.D.R. (2014) Purification and partial characterization of a low molecular weight L-asparaginase produced from corn cob waste. *Biocatal. Agric. Biotechnol* **3**, 265–270.
- Maladkar, N.K., Singh, V.K. e Naik, S.R. (1993) Fermentative production and isolation of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* EC-113. *Hindustan Antibiot Bull* **35**, 77–86.
- Manna, S., Sinha, A., Sadhukhan, R. e Chakrabarty, S.L. (1995) Purification, characterization and antitumor activity of L-Asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. *Current Microbiol* **30**, 291–298.

Menezes, R.S.C., Sampaio, E.V.S.B., Giongo, V. e Pérez-marin, A.M. (2012) Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. *Braz J Biol* **72**, 643-653.

Moura, L., Garcia, E., Agúin, O., Ares, A., Abelleira, A. e Mansilla, P. (2015) Identificação e caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) na região do entre douro e minho (Portugal). *Rev Cien Agrar* **38**, 196-205.

Muller, H.J. e Boos, J. (1998) Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol/Hematol* **28**, 97–113.

Narayana, K.J.P., Kumar, K.G. e Vijayalakshmi, M. (2008) L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Ind J Microbiol* **48**, 331–336.

Pawar, P.B., Joshi, K.G., Khobragade, R.M., Deshmukh, A.M. e ADHAPURE, N.N. (2014) Screening, optimization of medium and solid state fermentation for L-asparaginase production. *Global J Bio-Sci BioTechnol* **3**, 91-96.

Peterson, R.E. e Ciegler, A. (1969) L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Appl Microbiol* **18**, 64–67.

Plackett, R.L. e Burman, J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* **33**, 305-325.

Prakasham, R.S., Rao, C.S., Rao, R.S., Lakshmi, G.S. e Sarma, P.N. (2007) L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. *J App Microbiol* **102**, 1382-1391.

Pritsa, A.A., Papazisis, K.T., Kortsaris, A.H., Geromichalos, G.D. e Kyriakidis, D. (2001) Antitumor activity of L-asparaginase from *Thermus thermophilus*. *Anticancer Drug* **12**, 137–142.

Reddy, L.V.A., Wee, Y., Yun, J. e Ryu, H. (2008) Optimization of alkaline protease production by batch culture *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresour Technol* **99**, 2242–2249.

Sambrook, J. e Russell, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor*, New York, 2001.

Sharma, D.C. e Satyanarayana, T. (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour Technol* **97**, 727–733.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. e Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596–1599.

Thenmozhi M., Krishnan K. Anti-Aspergillus activity of *Streptomyces* sp. VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, India. (2011) *J Environ Sci Eng*, **2**, 1-8.

Venil, C.K., Nanthakumar, K., Karthikeyan, K. e Lakshmanaperumalsamy, P. (2009) Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: optimization by response surface methodology. *Iran J Biotechnol* **7**, 1–9.

Yasser R. e Abdel-fattah, Z.A. (2002) L-Asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solidstate culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Prospects in Biochem* **38**,115-122, 2002.

Warangkar, S.C. e Khobragade C.N. (2010) Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzym Res* **2010**, 1-10, 2010.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Reviews* **51**, 221-271.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- Observou-se que a L-asparaginase é amplamente estudada e presente em diferentes organismos;
- A análise experimental realizada no estudo viabilizou os experimentos e otimizou o tempo, concentração e diferentes pHs;
- A purificação confirmou a presença da L-asparaginase no gênero *Pseudomonas*;
- Faz-se necessário buscar alternativas de precipitação das proteínas dialisadas, para minimizar as perdas de proteínas significativas.
- O método de identificação molecular e microscopia de varredura auxiliaram na identificação a nível de espécie;
- A referida enzima se colocada em condições mais favoráveis resultará numa importante arma farmacológica para a cura de determinado linfomas.