

Engenharia metabólica de Ácido Fólico

Ilustrações cedidas pelos autores

Engenharia metabólica em *Lactococcus lactis* para aumentar a produção de ácido fólico

Ana Carolina Sampaio Dória Chaves, Dra.

Doutora em Tecnologia de Alimentos
Bolsista da Fapesp (Fundação de amparo
à pesquisa do estado de São Paulo)
Faculdade de Engenharia de Alimentos -
UNICAMP Campinas, SP
acchaves@hotmail.com ou
Acarolinachaves@aol.com

Jeroen Hugenholtz, Dr.

Pesquisador do NIZO food research e
Wageningen Centre for Food Science
(WCFS) EDE - Holanda
hugenholt@nizo.nl

Alda Luiza Santos Lerayer, Dra.

Pesquisadora do TecnoLat / ITAL (Instituto de
Tecnologia de Alimentos)
Campinas, SP
alerayer@ital.org.br

Resumo

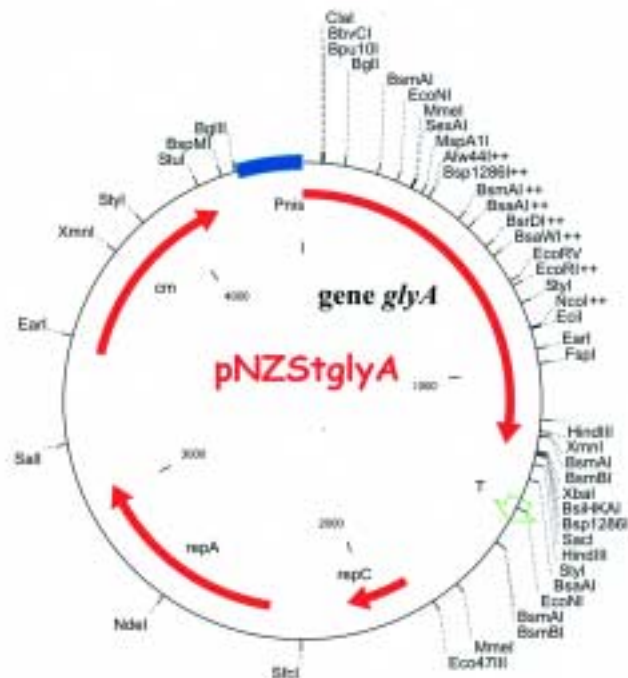
Neste trabalho a engenharia genética foi utilizada para elucidar a importância da via metabólica da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT) proveniente de duas bactérias lácticas, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*, na formação de ácido fólico. O gene *glyA* (que codifica a enzima SHMT) teve sua expressão otimizada no sistema NICE e, consequentemente, observou-se um aumento na produção da enzima SHMT, proporcional ao nível de indução com nisina. Esta superprodução da enzima foi observada de duas maneiras: em gel de poliácridamida (no qual visualiza-se um claro aumento na banda com 46kDa) e pelo aumento da atividade

enzimática. Cultivando-se as linhagens de *L. lactis* com superexpressão do gene *glyA* em meio GM17, foi observado um aumento significativo da produção de ácido fólico, proporcional ao nível de indução com nisina, confirmando desta maneira o envolvimento da SHMT no metabolismo de ácido fólico.

Introdução

O ácido fólico é uma importante vitamina do complexo B (B9) que contribui no combate à anemia, na regeneração celular e melhora a insuficiência cardiovascular (devido à substancial queda no teor de homocisteína no plasma). A suplementação de ácido fólico durante a gravidez foi associada

Figura 1. Plasmídeo pNZStglyA, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research), construído para promover o aumento da expressão do gene *glyA* de *S. thermophilus* B130 sob controle do P_{Nis} , em *L. lactis* NZ9000. Onde: repA = origem de replicação; repC = repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T = terminador de transcrição e em azul o P_{Nis} = promotor da nisina



ao baixo risco de defeitos no tubo neural favorecendo, assim, o desenvolvimento saudável do bebê. Esta vitamina possui um importante papel na redução da incidência de câncer, devido a sua atuação como cofator em reações envolvendo transferência de carbonos primários (Lin & Young, 2000).

O ácido fólico pode ser encontrado em diversos alimentos, tais como: folhas verdes, carnes, aves e produtos lácteos. O leite e os leites fermentados representam uma importante fonte de ácido fólico, porém a pasteurização pode reduzir o teor desta vitamina no leite (Scott, 1989). As bactérias lácticas podem ser utilizadas em fermentações para aumentar o conteúdo desta vitamina. Além de *S. thermophilus*, outras bactérias lácticas também são capazes de produzir elevados teores de ácido fólico, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* (Lin & Young, 2000).

Enquanto no leite existe de 20 a 60 µg/L de ácido fólico, em leites fermentados, como por exemplo o iogurte, os níveis podem chegar a 200 µg/L, dependendo das condições de armazenamento e das linhagens utilizadas. O teor final de ácido fólico depende principalmente da linhagem de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) utilizada, uma vez que essa bactéria consome o ácido fólico produzido durante a fermentação pela outra bactéria láctica do iogurte, *S. thermophilus* (Wouters *et al.*, 2002).

A enzima serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1.), também chamada de treonina aldolase (Weeb, 1992), codificada pelo gene *glyA* (Liu *et al.*, 1998), está envolvida no metabolismo de ácido fólico em todos os organismos como, também, na biossíntese de glicina em animais, plantas e microrganismos (Ogawa *et al.*,

2000). Segundo Blakley (1969), essa enzima é essencial na regeneração do composto tetraidrofolato, a partir da sua forma metilada (5,10-metileno tetraidrofolato) e catalisando a síntese de glicina e 5,10-metileno tetraidrofolato, a partir de serina e tetraidrofolato (THF).



Esta reação é muito importante, pois é a maior fonte dos grupos de carbonos primários (C₁), fundamentais para diversas reações. O composto 5,10-metileno tetraidrofolato e as suas formas reduzida e oxidada são requeridos em reações nas quais existe a necessidade de transferência de carbonos primários, como por exemplo: na biossíntese de compostos contendo grupos metil, anéis biossintéticos de

desejáveis aos alimentos, levando ao desenvolvimento de novos produtos, de acordo com as necessidades dos consumidores. As bactérias lácticas, largamente utilizadas na indústria alimentícia e, em especial, no setor de laticínios, constituem um alvo ideal para a utilização de engenharia metabólica uma vez que possuem: (1) um metabolismo relativamente simples, basicamente convertendo o açúcar em ácido láctico; (2) vias metabólicas relativamente bem conhecidas; (3) genomas de algumas espécies já seqüenciados e vários outros em andamento e (4) uma longa história de uso seguro na indústria de alimentos (Kleerebezem *et al.*, 2000).

O mercado dos alimentos funcionais tende a crescer cada vez mais, assim como a busca por alimentos nutritivos e saudáveis. A produção de leites fermentados com teor elevado de ácido fólico é muito interessante para esse mercado e as bactérias lácticas utilizadas na fermentação podem aumentar o valor nutricional destes produtos. O objetivo deste trabalho foi construir linhagens de *L. lactis* com superexpressão do gene *glyA* (que codifica a enzima SHMT) para estudar o envolvimento dessa enzima no metabolismo de ácido fólico.

Material & Métodos

Os genes *glyA* da linhagem B130 de *S. thermophilus* e da linhagem MG1363 de *L. lactis* foram obtidos direta-

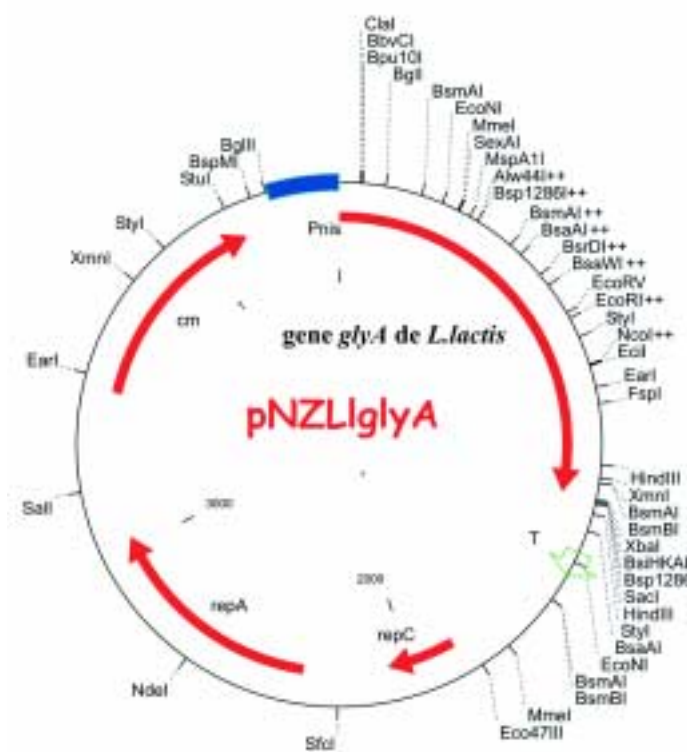


Figura 2. Plasmídeo pNZLIglyA, derivado do vetor pNZ8148 (NIZO Food Research), construído para promover o aumento da expressão do gene *glyA* de *L. lactis* sob controle do P_{NIS}, em *L. lactis* NZ9000. Onde: repA = origem de replicação; repC = repressor; cm = gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol, T = terminador de transcrição e em azul o P_{NIS} = promotor da nisina

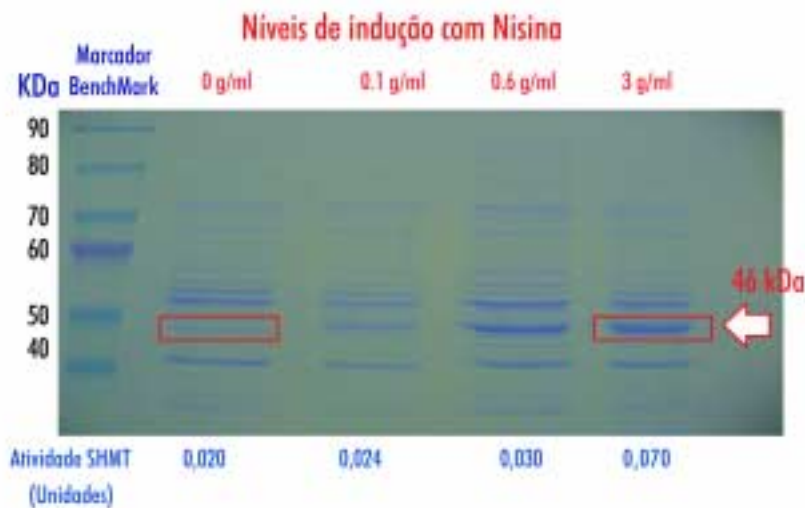


Figura 3. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostrando o aumento da produção da enzima SHMT em *L. lactis* NZ9000 contendo o gene *glyA* de *S. thermophilus* sob controle do promotor da nisina e determinação da atividade SHMT (conversão de serina em glicina) nos diversos níveis de indução. Uma unidade da atividade SHMT corresponde à formação de um η mol de glicina por minuto de reação por miligrama de proteína no extrato enzimático

mente a partir do DNA cromossômico por meio de uma reação de PCR (Polymerase Chain Reaction). Estes genes foram clonados no vetor comercial pGEM®-T (Promega, Madison/EUA) gerando os plasmídeos pLglyA (*glyA* da linhagem MG1363 de *L. lactis*) e pStglyA (*glyA* da linhagem B130 de *S. thermophilus*). Subseqüentemente, as seqüências destes genes foram determinadas utilizando-se o seqüenciador automático ALFred (Automatic Laser Fluorescent DNA Sequencer da Pharmacia Biotech). As reações de seqüenciamento foram realizadas com um Kit comercial (Autoread Sequencing, Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

O sistema NICE (NICE SYSTEM®) desenvolvido e patenteado pelo NIZO Food Research (Ruyter *et al.*, 1996) é um sistema de expressão de proteínas induzido por nisina. Os genes *glyA* de *S. thermophilus* e de *L. lactis* presentes nos plasmídeos pLglyA e pStglyA, foram obtidos por meio de digestão com as enzimas *Xba*I e *Bsp*HI e inseridos no vetor pNZ8148, sob controle do promotor da nisina, resultando nos plasmídeos: pNZLglyA (Figura 1) e pNZStglyA (Figura 2). Células competentes de *L. lactis* (linhagem NZ9000) foram transformadas por eletroporação, com estes dois plasmídeos, geran-

do as linhagens mutantes *LglyALL* (com superexpressão do gene *glyA* de *L. lactis*) e *LglyAST* (com superexpressão do gene *glyA* de *S. thermophilus*).

A expressão do gene *glyA* foi regulada por meio da indução com diferentes concentrações de nisina (0; 0,1 ng/ml; 0,6 ng/ml e 3 ng/ml). Após indução, foram preparados extratos enzimáticos nos quais verificou-se a superexpressão do gene *glyA* pela (1) determinação da atividade enzimática de SHMT, por meio da conversão de serina em glicina (Schirch & Gross, 1968)

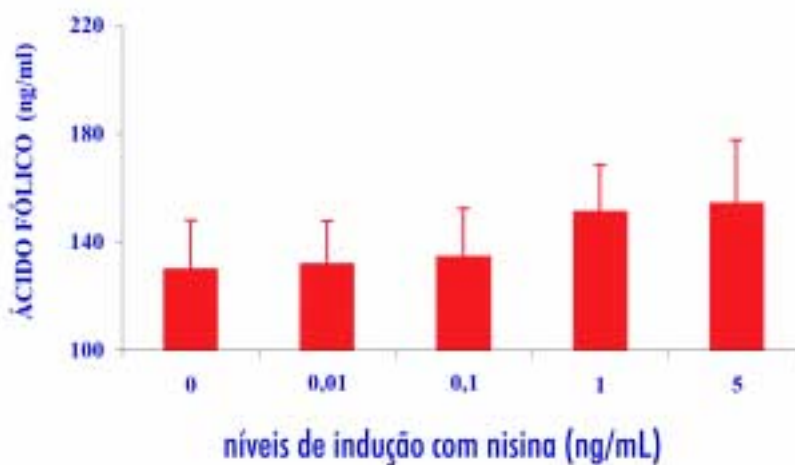


Figura 4. Produção de ácido fólico pela linhagem *LtglyAST*, nos diferentes níveis de indução com nisina

e (2) aplicação destes extratos em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

A concentração de ácido fólico foi determinada por método desenvolvido pelo Nizo Food Research segundo Moloy & Scott (1997); Horne & Patterson (1988) e Phillips & Wriarth (1982 e 1983). Este método consiste em ensaio microbiológico, no qual utiliza-se uma linhagem de *Lactobacillus casei* auxotrófica para ácido fólico. A concentração de proteína dos extratos protéicos foi determinada utilizando-se um kit Bio-Rad GmbH (Alemanha), baseado no método de Bradford (Bradford, 1976).

Resultados & Discussão

Com o experimento NICE, após indução com nisina, foi constatada a superexpressão do gene *glyA*, com conseqüente superprodução da enzima SHMT de *S. thermophilus* e *L. lactis*, que foi observada de duas maneiras: em gel de poliacrilamida (no qual visualiza-se um claro aumento na banda com 46kDa) e pelo aumento da atividade enzimática de SHMT, determinada por meio da conversão do aminoácido serina em glicina (Figura 3).

Cultivando-se as linhagens de *L. lactis* com superexpressão do gene *glyA* em meio GM17, foi observado um aumento significativo da produção de ácido fólico, proporcional ao nível de indução com nisina (Figura 4) confir-

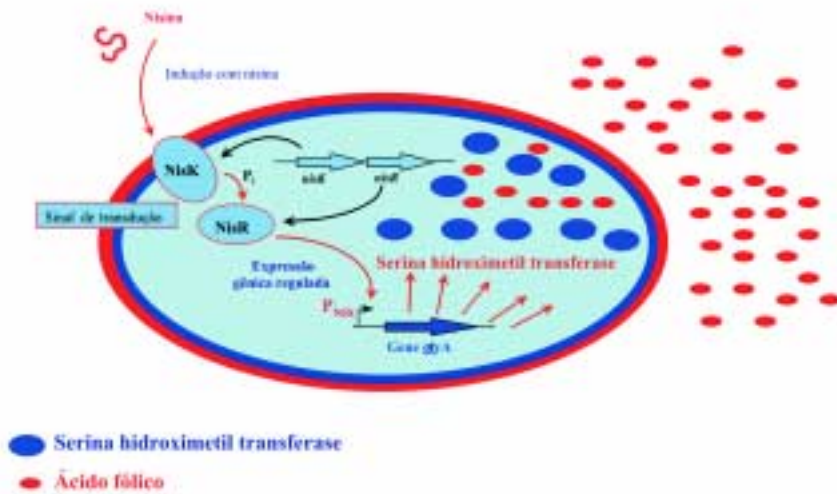


Figura 5. Ilustração do gene *glyA* no NICE SYSTEM® (NIZO Food Research), sob o controle do P_{NiS} com aumento da produção da enzima serina hidroximetil transferase e de ácido fólico

mando, desta maneira, o envolvimento da SHMT no metabolismo de ácido fólico, como já havia sido indicado por Cossins & Chen (1997) e Ogawa *et al.* (2000).

Sumarizando os resultados obtidos neste trabalho, os genes *glyA* de *S. thermophilus* e de *L. lactis* foram isolados, seqüenciados e clonados em linhagens de *L. lactis*. Nas linhagens de *L. lactis* com superexpressão do gene *glyA* foi observado um incremento na produção de ácido fólico (Figura 5).

Os conhecimentos obtidos ao longo deste trabalho podem contribuir para melhorar as características tecnológicas de linhagens de *L. lactis*, assim como também de *S. thermophilus*, visando a produção de leites fermentados e/ou iogurtes com teor de ácido fólico elevado, aumentando, deste modo, o valor nutricional deste produto. Para que os conhecimentos adquiridos com este estudo possam reverter em benefícios para a indústria alimentícia, os genes *glyA* de *S. thermophilus* e de *L. lactis* devem ser clonados em um vetor de grau alimentício (*Food grade*), ou seja, sem o gene de resistência ao antibiótico e contendo somente seqüências de DNA proveniente destes microrganismos.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financi-

ro da Fapesp (bolsa de doutorado de Ana Carolina S. D. Chaves), assim como também do Professor Willem de Vos diretor do centro de pesquisas Wageningen Centre for Food Science (WCFS) em Wageningen na Holanda.

Referências Bibliográficas

1. **Blakley, R. L.** 1969. *In* Frontiers of Biology. Amsterdam: North Holland, Neuberger, A.; Tatum, E. D. (Eds), v. 13. p. 190.
2. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
3. **Cossins E.; Chen, L.** 1997. Foliates and one carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry*, **45**:437-452.
4. **Horne, D. W.; D. Patterson.** 1988. *Lactobacillus casei* Microbiological assay of folic acid derivatives in 96 well microtiter plates. *Clin. Chem.*, **34**:1: 2357-2359.
5. **Kleerebezem M.; Hols P.; Hugenholtz J.** 2000. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**(9-10): 840-848
6. **Leamli, U. K.** 1970. Cleavage

of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 630-685.

7. **Lin, M. Y.; Young, C. M.** 2000. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **10**: 409-414.
8. **Liu, J-Q.; Dairi, T.; Itoh, N.; Kataoka, M.; Shimizu, S.; Yamada, H.** 1998. Gene cloning, nucleotide sequencing, purification, and characterization of low-specificity l-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, v. **255**: 220-226.
9. **Moloy, A. M.; Scott J. M.** 1997. Microbiological assay for serum, plasma and red cell folate using cryopreserved, microtiter plates method, *In* Methods in enzymology, v. **281**, 43-53.
10. **Ogawa, H.; T. Gomi; M. Fujioka.** 2000. Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *The Intern. J. of Biochem. & Cell Biol.* **32**:289-301.
11. **Phillips, D. R.; Wright, A. J. A.** 1982. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate monoglutamates. *Br. J. Nutr.* **47**:183-189.
12. **Phillips, D. R.; Wright, A. J. A.** 1983. Studies on the response of *Lactobacillus casei* to different folate vitamin in foods. *Br. J. Nutr.* **49**:181-186.
13. **Ruyter, P. G. G. A., O. P. Kuipers; W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression system for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3662-3667.
14. **Scott, K. J.** 1989. Micronutrients in milk product. *In*: E. Renner, *Micronutrients in milk and milk-based food products*. London: Elsevier Applied Science, p: 71-123.
15. **Weeb, E. C.** 1992. *In* J. F. G. Vliegthart (ed.), *Enzyme nomenclature NC-IUBMB*, International Union of Biochemistry and molecular biology, Academic Press, INC Publisher Harcourt Brace Jovanovich. San Diego. . p.173 e 460
16. **Wouters, J. T. M.; Ayad, H. E. E.; Hugenholtz, J.; Smit, G.** 2002. Microbes from raw milk to fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v. **12**: 91-109.