



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação das condições de detecção de atividade colagenolítica de *Actinomadura sp.*

Elizianne Pereira Costa¹, Felype Thomaz de Brito Rocha², Wendell Wagner Campos Albuquerque², Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa², Janete Magali de Araújo¹ e Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas
– 50670-901 Recife – PE

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal
52171-900 Recife – PE

RESUMO

Ensaio de detecção de atividade proteolítica utilizam, normalmente, substratos cromogênicos, sendo um dos mais empregados o ensaio colagenolítico com azocoll. O objetivo deste trabalho foi analisar a interferência da velocidade na reação enzimática de extrato bruto de Actinomadura sp. L175 com azocoll a 37°C com e sem incubação em banho-maria. O extrato bruto obtido após 120h de cultivo submerso da actinobactéria foi submetido à avaliação da atividade colagenolítica com azocoll sob agitação constante de 100, 200, 250, 300 e 400 rpm com agitador magnético a 37°C. A atividade enzimática mostrou-se proporcional ao índice de rotação. Os picos de atividade foram observados a 300 rpm sem banho-maria (314,6 U/mL) e 400 rpm com banho-maria (295,1 U/mL). Esses resultados demonstram que tanto a frequência de agitação quanto a incubação em banho-maria influenciam a atividade colagenolítica e o rendimento da reação depende do controle dessas condições.

Palavras-chave: rendimento de reação; *Actinomadura*; atividade colagenolítica; agitação

INTRODUÇÃO

Enzimas proteolíticas são hidrolases que clivam ligações peptídicas liberando aminoácidos ou peptídeos. Elas estão relacionadas à manutenção das vias metabólicas normais, manutenção do sistema imunológico e na alimentação. Entretanto, também estão ligadas a processos patológicos como o câncer, artrite reumatoide e doença de Alzheimer, bem como à capacidade de infecção e reprodução de patógenos e na sua habilidade em obter nutrientes para crescimento (Rawlings, 2013).

A especificidade das enzimas está relacionada à ligação entre a enzima e o substrato, entretanto a reação enzimática também depende da concentração da enzima e concentração do substrato (Pandey & Ramachandran, 2006; Furlan & Pant, 2006). A detecção de proteases produzidas por animais, plantas e micro-organismos é feita a partir de hidrólise de substratos específicos para análise de extratos enzimáticos ou enzimas puras. Esses substratos são, normalmente, substâncias protéicas ligadas a moléculas cromogênicas que, a partir da clivagem das ligações peptídicas, liberam o corante que é detectado espectrofotometricamente (Komsa-Penkova et al, 1997, Arnaut et al, 2006; Karn & Karn, 2014).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Azocoll é um substrato insolúvel composto de colágeno desnaturado ligado covalentemente a um corante vermelho que é liberado após a hidrólise das ligações peptídicas. A atividade colagenolítica com azocoll é largamente utilizada nos estudos para produção de proteases com capacidade de degradar componentes da pele, sendo um dos métodos mais fáceis para sua detecção (Arnout et al, 2006; Dettmer et al, 2012; Thekkiniath et al, 2013; Wang et al, 2015).

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da agitação na detecção da atividade colagenolítica de extrato enzimático obtido por fermentação submersa de *Actinomadura* sp. L175 utilizando azocoll incubado ou não em banho-maria.

MATERIAL E MÉTODOS

O extrato enzimático utilizado nas análises foi obtido através do cultivo submerso da linhagem de actinobactéria *Actinomadura* sp L175 em meio de farinha de soja modificado – MS2 – descrito por Porto et al (1996) e composto por extrato proteico de resíduo de café (1,0%), NH₄Cl (0.1%), MgSO₄·7H₂O (0.06%), K₂HPO₄ (0.475%), glicose (1,0%), e solução mineral (0,1%). O resíduo de café foi previamente autoclavado em água (121°C / 20min) para obtenção do extrato proteico que compõe o meio de cultura. O cultivo ocorreu em agitador orbital utilizando como inóculo 1mL de suspensão de esporos e células bacterianas em solução de Tween 80 (0,1% v/v), com concentração de 10⁶ células/mL (D.O.625nm ≈ 0,100) em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura durante 120h com velocidade de 150 rpm a 37°C. Após esse período, o líquido fermentado foi filtrado em filtro Whatman n.1 e o líquido livre de células foi considerado como extrato enzimático e utilizado para a quantificação proteica e atividade enzimática.

A quantificação de proteases colagenolíticas foi realizado segundo metodologia de Chavira et al (1984) modificado, utilizando o substrato azocoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) previamente lavado em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,0 acrescido de CaCl₂ 1mM. A reação ocorreu em microtubos polipropileno de 2mL durante 1h em estufa biológica na temperatura de 37°C com agitação constante fornecida por agitador magnético em diferentes velocidades (100, 200, 250, 300 e 400 rpm) incubados com ou sem banho-maria. A atividade enzimática foi dosada em espectrofotômetro ($\lambda_{520\text{nm}}$) e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que proporciona a variação 0,1 na densidade ótica em 1h de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ensaio realizado com a enzima obtida do cultivo submerso de *Actinomadura* sp. L175 mostrou alta atividade enzimática, com valor mínimo de atividade colagenolítica de 71,8 U/mL quando realizado na velocidade de 100 rpm incubado em banho-maria. Entretanto, o maior valor detectado foi de 314,6 U/mL na velocidade de 300 rpm sem incubação em banho-maria (Figura 1).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

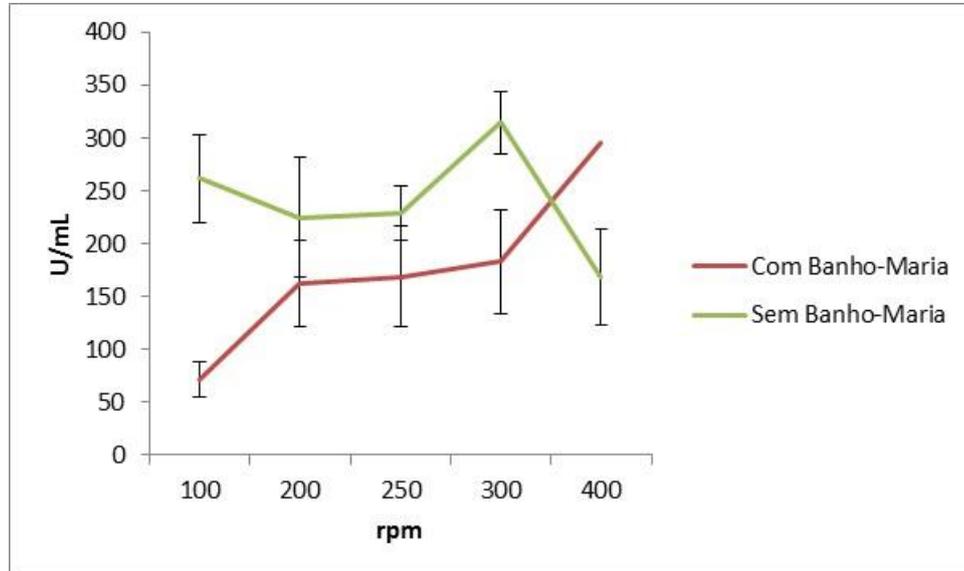


Figura 1 O efeito da agitação na detecção da atividade enzimática de protease colagenolítica de *Actinomadura* sp. L175 utilizando azocoll como substrato.

Chavira et al (1984) fizeram diversas análises para determinar a melhor metodologia para quantificação com azocoll, encontrando como melhor resultado a reação enzimática ocorrida em velocidade de 330 rpm. Embora no presente estudo a velocidade de 300rpm foi a mais favorável para detecção de atividade colagenolítica sem incubação em banho-maria, a análise desenvolvida em banho-maria, como no estudo realizado por Chavira et al (1984) demonstra que há um aumento na atividade enzimática com o incremento da velocidade de 300 rpm para 400 rpm, com valores de 183,4 U/mL e 295,1 U/mL, respectivamente (Figura 1). Isto se deve, provavelmente, pela homogeneização do meio de reação, uma vez que o azocoll é insolúvel e sedimenta com o tempo. Essa sedimentação impossibilita a interação entre a enzima dissolvida no meio e o substrato.

Adicionalmente, Ha e colaboradores (2012) demonstram que o aumento no tempo de incubação de proteases comerciais não interfere significativamente na atividade colagenolítica mensurada com azocoll, evidenciando que o tempo de incubação de 1h utilizado no presente trabalho foi suficiente para a detecção da atividade colagenolítica.

Houve diferença na detecção da atividade enzimática com e sem incubação em banho-maria, com melhor atividade na reação em sua ausência. O aquecimento por banho-maria dá-se de forma lenta e homogênea até atingir o equilíbrio térmico entre a água e o material a ser aquecido (Peruzzo, 2013). Dessa forma, as análises realizadas na ausência de banho-maria podem ter mostrado valores maiores pelo rápido aquecimento de forma homogênea por causa da agitação, do meio no qual a reação ocorre, favorecendo a atividade da enzima.

CONCLUSÕES

A agitação foi um fator importante na detecção da atividade colagenolítica, uma vez que o aumento da agitação promoveu um aumento na atividade enzimática. Adicionalmente, a



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

realização dos ensaios enzimáticos sem incubação em banho-maria forneceu maiores valores de atividade enzimática do que os ensaios realizados em banho-maria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnaut LG, Formosinho SJ, Burrows H. 2006. Chemical Kinetics: From Molecular Structure to Chemical Reactivity. Elsevier. pp. 33-76.
- Chavira R, Burnet TJ, Hageman JH. 1984. Assaying Proteinases with Azocoll. *Anal. Biochem*, 136:446-450.
- Dettmer A, Cavalli E, Ayub MAZ, Gutterres M. 2012. Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative Bioprocess *Biosyst Eng*. 35:1317–1324.
- Furlan SA, Pant HK 2006 General Properties of enzymes. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Editors. *Enzyme Technology*. New Delhi: Springer. pp 11-36.
- Ha M, Bekhit AE-DA, Carne A, Hopkins DL. 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chem*. 134:95-105.
- Karn N, Karn SK. 2014. Evaluation and Characterization of Protease Production by *Bacillus* sp. Induced By UV-Mutagenesis. *Enz Eng* 3:1-5.
- Komsa-Penkova RS, Rashap RK, Yomtova VM. 1997. Advantages of orange-labelled collagen and gelatin as substrates for rapid collagenase activity measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 3: 237–249.
- Pandey A, Ramachandran S. 2006 General Introduction. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Editors. *Enzyme Technology*. New Delhi: Springer. pp 1-10.
- Peruzzo J. 2013. *A Física Através de Experimentos: Termodinâmica, Ondulatória e Óptica*. Irani (SC).
- Porto ALF, Campos-Takaki GM, Lima-Filho JL. 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 60:115-122.
- Rawlings N D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of action. In: Brix K, Stöcker W. Editors. *Proteases: Structure and Function*. Springer Science & Business Media, pp.1-36.
- Thekkiniath JC, Zabet-Moghaddam M, San Francisco SK, San Francisco MJ. 2013. A novel subtilisin-like serine protease of *Batrachochytrium dendrobatidis* is induced by thyroid hormone and degrades antimicrobial peptides. *Fungal Biol*. 117:451-461.
- Wang L, Cheng G, Ren Y, Dai Z, Zhao Z-S, Liu F, Li S, Wei Y, Xiong , Tang X-F, Tang B. 2015. Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease. *Appl Microbiol Biotechnol*. 99:3949-3959.