

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estudo das atividades das proteases secretadas por *Aspergillus awamori*

Hélvio José Jalles Monteiro^{1,2}, Maria Antonieta Ferrara^{1,2}, Elba Pinto da Silva Bon² e Raquel Elisa da Silva López¹

¹Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - Farmanguinhos – Departamento de Química de Produtos Naturais - Grupo de Bioquímica de Proteases e Inibidores de Proteases de Origem Natural – Avenida Brasil, 4365 CEP 21045-900 – Rio de Janeiro – RJ

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química – Departamento de Bioquímica- Laboratório de Tecnologia Enzimática – Rio de Janeiro- RJ

RESUMO

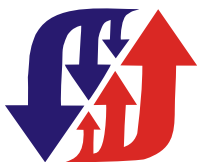
O fungo filamentosso *Aspergillus awamori* tem grande capacidade de secretar proteínas para o meio de cultivo e suas enzimas são extensivamente empregadas em muitos processos biotecnológicos. Contudo, suas proteases secretadas têm sido muito pouco estudadas. Neste trabalho, o sobrenadante de cultivo de *A. awamori* foi coletado, clarificado e liofilizado objetivando o estudo da sua atividade proteolítica. O perfil eletroforético desta fração demonstrou várias bandas de proteínas entre 125 a 20 kDa, sendo as majoritárias com 110 e 46 kDa. Contudo, as proteínas com atividade proteolítica tinham massas na faixa de 70-77 kDa. As proteases da fração de *A. awamori* apresentaram picos de atividades proteolíticas em distintas faixas de pH, indicando que proteases de várias classes são secretadas pelo fungo, sendo que a principal atividade refere-se às aspártico-proteases. Tais enzimas catalisam na temperatura ótima em torno de 50°C e são bastante estáveis em altas temperaturas. Tais resultados sugerem que o produto de secreção de *A. awamori* é uma importante fonte de enzimas proteolíticas, especialmente de aspártico-proteases, com importante atividade, termoestabilidade que hidrolisa tanto proteínas quanto substratos peptídicos.

Palavras chaves: *Aspergillus awamori*, sobrenadante de cultura, atividade proteolítica, aspártico-proteases, termoestabilidade.

INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são conhecidas pela alta taxa de secreção de proteínas e portanto, são utilizadas para produção heteróloga e autóloga de enzimas (Gouka et al., 1997). Suas enzimas autólogas são empregadas em diversos processos industriais: como a amilases na produção de xaropes, pectinases na clarificação do vinho e da cidra e as galactosidases na degradação de galactosídeos. O próprio *Aspergillus awamori* é utilizado no coquetel de degradação da biomassa, como o bagaço da cana-de-açúcar que é hidrolisado à glicose, para então ser fermentado por micro-organismos na produção de bioetanol (Vries e Visser, 2001).

O fungo filamentosso *A. awamori*, também secreta um grande número de proteases que hidrolisam as ligações peptídicas em proteínas e peptídeos e que parecem estar envolvidas na digestão das moléculas alimentares, na regulação metabólica, na defesa contra patógenos, dentre outros processos cruciais na fisiologia do fungo (Barret, 1994). Contudo, na literatura, existem poucas informações sobre as proteases secretadas pelo *A. awamori*. Foi reportada a presença de duas aspártico-proteases no sobrenadante de cultura desta espécie: A aspergilopepsina A e aspergilopepsina B. A enzima A já foi sequenciada, porém existem pouquíssimas informações sobre suas propriedades bioquímicas e seu emprego biotecnológico (Berka et al., 1990). Além disso, muito pouco é sabido sobre a aspergilopepsina B, pois esta enzima ainda não foi sequenciada ou caracterizada bioquimicamente. Portanto os



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

objetivos deste estudo é conhecer melhor a atividade proteolítica dos sobrenadantes de cultura de *A. awamori*.

MATERIAL E MÉTODOS

A. awamori (cepa 2B.361 U2/1) foi cedido do pelo Departamento de Microbiologia do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz. Este fungo foi crescido em meio Breccia modificado. As células foram decantadas por centrifugação (2.000 x g/ 10 min/ 4°C) e o sobrenadante coletado. Este sobrenadante foi clarificado (10.000 x g/ 30 min/ 4°C) e liofilizado obtendo-se a fração de *A. awamori* para obtenção das proteases secretadas.

O teor de proteínas da fração foi mensurado pelo reativo de Bradford, usando a albumina de soro bovino como padrão.

A fração foi submetido à eletroforese em géis de 12% de poli(acrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com a metodologia descrita por Laemmli, para avaliar o perfil de proteínas.

A atividade proteolítica foi estudada inicialmente em géis de 10% de SDS-PAGE contendo gelatina co-polimerizada, e também avaliada contra os substratos proteicos caseína e gelatina, incubando-os com 10µg de proteína da fração de *A. awamori* por 30 min, a reação paralisada com ácido tricloacético e a absorvância da reação lida em espectrofotômetro a 280nm. A atividade peptidásica foi estudada incubando 10µg de proteína da fração de *A. awamori* com 125 µM do substrato *N*- ρ -tosil-L-arginina metil éster (L -TAME) por 15 min e a reação lida em espectrofotômetro a 247nm (Silva-López et al., 2005).

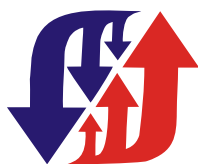
O valor de pH em que a atividade é máxima da fração de *A. awamori* foi estimado incubando-se 10µg de proteína da fração e os substratos caseína e gelatina em tampões (50mM) com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 4,0- 6,5), Tris/HCl (pH 7,0-8,5) e carbonato/bicarbonato (pH 9,0-10,0).

A estabilidade térmica das proteases da fração de *A. awamori* foi avaliada incubando-se, a fração no tampão de pH ótimo, na ausência do substrato, por 24 horas a 60°C. Após este período, foi adicionado (L -TAME) e a reação conduzida por 15 min. Já a temperatura ótima foi determinada utilizando a fração, L -TAME e caseína e tampão de atividade máxima da enzima. A fração foi encubada em temperaturas de 20 até 60°C, com intervalos de 10°C, e a hidrólise do substrato foi determinada a 247nm para o L -TAME e 280nm para a caseína (Silva-López et al., 2005).

A inibição da atividade enzimática foi avaliada incubando previamente a fração com inibidores específicos de diferentes classes de proteases por 30 min. A reação foi disparada pela adição do L -TAME e conduzida por 15 min. Soluções controle foram conduzidas simultaneamente e a porcentagem de inibição estimada tomando-se a solução controle sem adição do inibidor como 100 % da atividade (Silva-López et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração de *A. awamori* apresentou pequenas diferenças nos perfis de proteínas em SDS-PAGE nas condições de redução e não redução, indicando a presença de proteínas simples e com mais de uma cadeia polipeptídica e, mostrou que as bandas majoritárias de cerca de 110 e 46 kDa correspondem a 20 e 27%, respectivamente, do total das proteínas do gel (Fig 1). Em SDS-PAGE gelatina proteínas na faixa de 70-77 kDa apresentaram importante



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

atividade lítica sobre a gelatina. É possível que as proteases não sejam as majoritárias e muitas vezes não aparecem num SDS-PAGE corados com corantes menos sensível como o Azul de Coomassie.

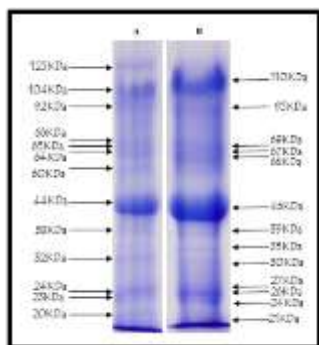


Figura 1 - Perfil proteico em SDS-PAGE 12% em condições de não redução (A) e redução (B).

As proteases da fração de *A. awamori* apresentaram curvas de pH com picos de atividade em diferentes valores de pH como 5,5, 6,5, 7,5 e 9,0, indicando a presença de proteases de diferentes classes como aspártico, cisteíno, serino e metalo-proteases (Barret, 1994).

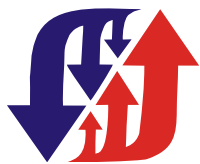
A temperatura interfere na velocidade de uma reação enzimática e, portanto, o estudo da temperatura ótima de uma enzima é essencial para sua caracterização bioquímica (Daniel e Danson, 2013). Em baixas temperaturas, onde a energia cinética é baixa, o encontro do substrato com o sítio ativo é desfavorecido, por outro lado, em altas temperaturas, a enzima pode sofrer desnaturação. A temperatura onde atividade máxima de hidrólise do L-TAME pelas enzimas secretadas de *A. awamori* foi a 50°C, contudo a 60°C ocorreu diminuição da atividade, possivelmente pelo rompimento das pontes de hidrogênio das proteases. A estabilidade térmica das enzimas da fração de *A. awamori* foi estudada incubando a fração à 60°C/24 h sem substrato, pois este estabiliza a estrutura tridimensional das enzimas (Silva-López et al., 2005). A atividade proteolítica da fração foi quase completamente preservada, demonstrando a excelente estabilidade térmica das suas proteases.

Tabela 1 - Atividade residual do ensaio de inibição em todos os pH ótimo de atuação.

Atividade residual (%)					
Inibidor	[]	Tipo de inibidor	pH 5,5	pH 6,5	pH 9,0
Benzamidina	1 mM	Serino	99,6 ± 0,4	91,8 ± 8,2	97,2 ± 2,8
PMSF ^a	1 mM	Serino	100 ± 0,0	100 ± 0,0	83,9 ± 16,1
Iodocetamida	1 mM	Serino/Cisteíno	91,9 ± 9,1	96,4 ± 3,6	99,5 ± 0,5
E64 ^b	1 uM	Cisteíno	94,9 ± 5,1	93,1 ± 6,9	92,8 ± 7,2
EDTA ^c	10mM	Metaló	86,4 ± 13,6	100 ± 0,0	98,2 ± 1,8
Phenantrolina	10 mM	Metaló	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Pepstatina	1 uM	Aspártico	56,2 ± 27,8	73,9 ± 16,3	64,3 ± 13,7

^aPMSF: Fluoreto de fenilmetanossulfonil. ^cEDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético. ^bE64: N-[N-(L-3-trans-carboxyirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine.

Os inibidores específicos das proteases e o estudo do pH ótimo, são úteis para estudar as classes de enzimas proteolíticas encontradas na fração de *A. awamori* (Tabela 1). A atividade das enzimas apresentou uma importante inibição pela pepstatina, que é um inibidor das aspártico-proteases, sugerindo a presença da atividade de proteases desta classe, além do pico de atividade em pH 5,5. Também foi observada pequena inibição pelo PMSF, um inibidor de serino-proteases, sugerindo a presença deste tipo de protease na amostra pois foi observado picos de atividade em valores de pH de 7,5 e 9,5 típico das serino-proteases.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o fungo *A. awamori* secreta para o meio de cultura proteases ácidas e alcalinas com importante atividade proteolítica e estabilidade térmica, capazes de hidrolizar de modo bastante distinto substratos peptídicos e proteicos em distintos valores de pH. Os estudos com inibidores de proteases sugeriram que a atividade de aspártico protease é a predominante. Portanto, este estudo indica que sobrenadante de cultura deste fungo é uma importante fonte de proteases com potencial emprego biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barret AJ. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidase. *Meth. Enzymol.* 244:1-15.
- Berka RM, Ward M, Wilson LJ, Hayenga KJ, Kodama KH, Carlomagno LP, Thompson SA. 1990. Molecular cloning and deletion of the aspergillopepsin A gene from *Aspergillus awamori*. *Gene.* 86:153-162.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Daniel RM, Danson MJ. 2013. Temperature and the catalytic activity of enzymes: a fresh understanding. *FEBS Lett.* 587:2738-2743.
- Gouka RJ, Punt PJ, van den Hondel CA. 1997. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47:1-11.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Silva-López R.E., Coelho M.G., De Simone, S.G. 2005. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol.* 131:85-96.
- Vries PR, Visser J. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 497-522.