

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA TRANSGLUTAMINASE PELO FUNGO *ALTERNARIA* SP.

Milena Sayuri Kaminaga Oshikata¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti²
 Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI
 oshikatamilena@gmail.com; preamorandim@fei.edu.br

Resumo: A busca por novas fontes de enzimas para aplicações biotecnológicas tem crescido de maneira intensa sendo, os fungos, fontes promissoras. Visando colaborar com esses estudos, no presente trabalho foi avaliada a produção de transglutaminase pelo fungo *Alternaria* sp., bem como a otimização da condição de crescimento para produção da enzima desejada pelo mesmo, sendo verificada como melhor condição para produção de transglutaminase uma temperatura de 19°C, pH igual 5,7 e tempo de fermentação de 12 dias.

1. Introdução

As transglutaminases são enzimas pertencentes a classe das transferases encontradas em várias espécies de animais, vegetais e, principalmente, microrganismos como os fungos endófitos, obtidos a partir de diversas partes de plantas como, por exemplo, caules e folhas de mandioca [1,2]. Essas enzimas, são responsáveis por catalisar reações de transferência de grupos acila entre grupos carboxila e, aminas primárias como, por exemplo, as reações entre grupos amino da lisina e, grupos carboximida de glutamina, o que as tornam muito importantes durante a formação de ligações peptídicas inter e intramoleculares entre proteínas [3]. As transglutaminases também são capazes de catalisar reações de reticulação entre glutaminas e lisinas e desamidação de glutaminas [1], o que mostra a importância da realização de estudos na busca de novas fontes de enzimas para aplicação em diversos ramos como, por exemplo, na área médica no desenvolvimento de ligações cruzadas em córneas visando o tratamento de problemas oftalmológicos, foco do presente trabalho.

2. Metodologia

O fungo *Alternaria* sp. (CA5) isolado a partir de caules de mandioca foi submetido a três repiques consecutivos em meio batata dextrose agar visando a ativação do sistema enzimático. Posteriormente, o mesmo foi submetido à extração enzimática através do processo de trituração na presença de nitrogênio líquido e polivilpípirrolidona, seguida da adição de tampão pH 7,4 compostos por TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Triton 1 % e SDS 1 %. A mistura foi mantida sob agitação durante 30 min e centrifugada a 6000 rpm durante 30 min. Após essa etapa, foi avaliada a concentração proteica e a atividade de transglutaminase e posterior realização do aumento da produção da enzima através da otimização da condição de fermentação.

Dessa forma, CA5 foi submetido ao processo de crescimento em um meio de cultura composto por amido (20 g/L), peptona (20 g/L), extrato de levedura (2 g/L), K₂HPO₄ (2 g/L), KH₂PO₄ (2 g/L), MgSO₄ (1 g/L) e glicose (2 g/L). Foram modificados o tempo, a

temperatura e o pH do meio (Tabela I). Após cada crescimento, foi realizada a determinação da atividade enzimática bem como avaliada a concentração de proteínas.

Tabela I – Otimização da produção de transglutaminase

pH	Tempo (dia)	T (°C)	pH	Tempo (dia)	T (°C)
8,00	13,0	35,0	4,00	5,0	35,0
6,00	9,0	29,0	4,00	13,0	35,0
6,00	9,0	39,1	8,00	5,0	23,0
6,00	9,0	18,9	4,00	13,0	23,0
6,00	2,3	29,0	4,00	5,0	23,0
9,36	9,0	29,0	6,00	9,0	29,0
8,00	13,0	23,0	2,64	9,0	29,0
8,00	5,0	35,0	6,00	15,7	29,0

A atividade enzimática foi determinada através da adição de duas soluções à enzima: solução A (tampão TRIS acetato 200 mM pH 6, solução de hidroxilamina 100 mM, glutatona 10 mM e α -N-Carbobenziloxi-Gln-Gly 20 mM) e solução B (HCl 3 M, tricloroacético (TCA) 12% e solução de FeCl₃.6H₂O 5% dissolvido em HCl 0,1 M). Foram utilizados 400 μ L de enzima e 400 μ L da solução A. Após 10 minutos a 37°C foram adicionados 400 μ L da solução B, esta foi agitada e analisada por espectroscopia UV/VIS a 525 nm.

Já a concentração de proteínas em todos os extratos enzimáticos foi determinada utilizando-se o método de Bradford. Foram utilizados 800 μ L dos extratos, 800 μ L de água e 2400 μ L do reagente de Bradford. A solução foi agitada e avaliada por espectroscopia UV/VIS a 590 nm. Para obtenção da curva de calibração utilizou-se soluções com diferentes concentrações de albumina sérica. Para a determinação da atividade específica, foi feita a relação entre os dados obtidos de atividade enzimática, em U/mL, e a média da concentração de dosagem proteica, em mg/mL.

3. Resultados e Discussões

Durante o desenvolvimento do presente estudo, inicialmente o fungo CA5 foi submetido ao crescimento em meio BDA (batata dextrose agar) e, posteriormente, ao crescimento em meio líquido modificando-se a temperatura, o tempo e o pH (Figura 1). Após a realização do crescimento em meio líquido em diferentes condições e avaliação da atividade enzimática referente à produção de transglutaminase, dosagem de proteínas e, atividade específica (Tabela II), foi realizada a avaliação da melhor condição de produção utilizando-se o programa Statistica 14.0.0.15.

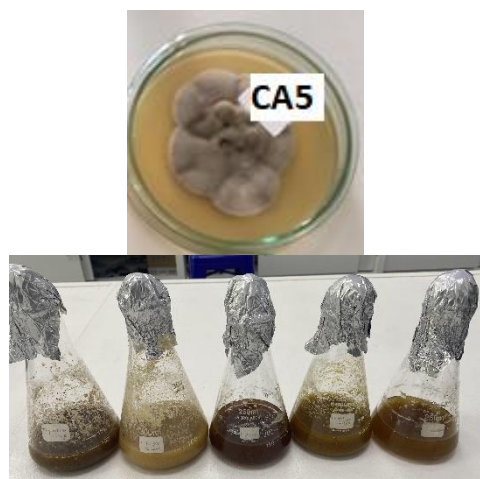


Figura 1 – Crescimento em meio BDA e meio líquido

Tabela II – Atividade de transglutaminase e concentração de proteínas

T (°C)	Tempo (dia)	pH	Atividade específica (U/mg)	Atividade enzimática (U/mL)	[proteína] (mg/mL)
23	5	4	15,81	12,95	0,82
35	5	4	14,08	14,40	1,02
23	5	8	6,80	7,64	1,12
35	5	8	0,00	0,00	0,57
35	13	8	0,00	0,00	0,72
35	13	4	41,82	34,68	0,83
29	9	6	59,07	44,81	0,76
29	9	9,36	0,00	0,00	0,58
29	15,7	6	35,63	27,44	0,77
29	9	2,64	47,67	35,16	0,74
18,9	9	6	45,81	33,23	0,73
29	9	6	13,11	20,68	1,58
29	2,3	6	9,84	12,95	1,32
39,1	9	6	38,56	33,23	0,86

Analisando-se os dados obtidos (Figura 2), verifica-se a enzima transglutaminase desempenhando maior atividade enzimática em condições de temperatura ambiente, na faixa de 18 a 22°C, fermentando em um período de tempo maior, durante 14 a 18 dias e em condições de pH ácido, em torno de 2 a 5.

Com os gráficos obtidos pelo Statistica e através da função de desejabilidade, foi possível determinar a melhor condição para produção de transglutaminase pelo fungo *Alternaria* sp. (Figura 3). Sendo assim, a condição que melhor otimizou a produção da enzima em estudo foi a uma temperatura de 19°C, tempo de fermentação de 12 dias em pH 5,7. Nessa condição a enzima apresentou valores altos de atividade específica em relação às demais condições. Salienta-se também que a utilização de pH acima de 4 até 5,7 (pH ideal estipulado pela função de desejabilidade) bem como tempos a partir de 14 dias, já promovem uma boa produção de transglutaminase.

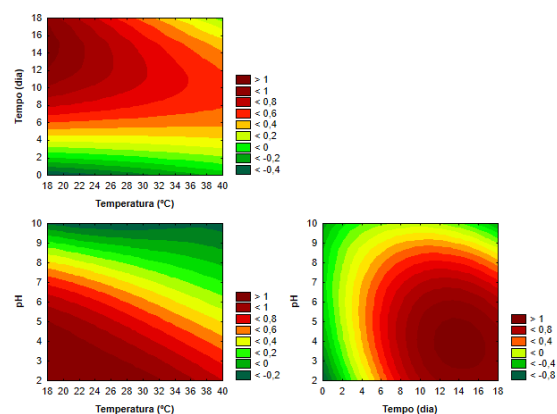


Figura 2 – Superfície de contorno

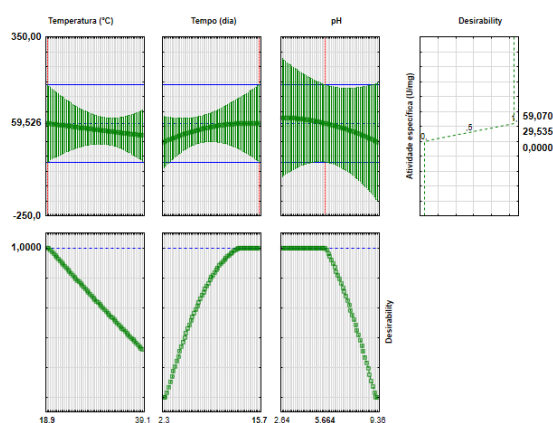


Figura 3 – Determinação da condição ideal para produção de transglutaminase

4. Conclusões

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, verificou-se a eficiência do fungo *Alternaria* sp. (CA5) na produção da enzima transglutaminase. Também foi possível determinar a melhor condição para produção da enzima desejada através da realização de um planejamento estatístico (pH = 5,7, tempo = 12 dias e temperatura = 19°C). Como próxima etapa, serão realizados experimentos para avaliação da eficiência do extrato enzimático na reticulação de córneas visando o desenvolvimento de novos tratamentos para ceratocone.

5. Referências

- [1] D. GIORDANO, A. FACCHIANO. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **509** (2019) 506-513.
- [2] H. ISLEROGLU, I. TURKER. *LWT - Food Science and Technology*, **101** (2019) 653-662.
- [3] A.T. ÖZÇELİK, F. ERSÖZ, M. İNAN. *Protein Expression and Purification*, **159** (2019) 83-90.

Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pelo incentivo ao desenvolvimento do trabalho e suporte necessário.

¹ Aluna de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 08/21 a 07/22.