

## **PROTEASE ÁCIDA DE *Aspergillus clavatus*: PURIFICAÇÃO, pH E TEMPERATURA ÓTIMOS.** Talita Ariela Sampaio e Silva, Márcia Regina Brochetto-Braga, Eleonora Cano Carmona. – Inter-áreas: Ciências da Vida - Departamento de Bioquímica e Microbiologia – Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro.

As enzimas proteolíticas são amplamente empregadas na indústria, principalmente no amaciamento de couro, na fabricação de detergentes, no tratamento de água, em indústrias têxteis, de cosméticos, farmacêuticas e em pesquisa básica, como auxiliares no sequenciamento e na determinação da estrutura de proteínas. As proteases microbianas têm sido muito exploradas nas últimas décadas por apresentarem inúmeras vantagens, como o crescimento rápido das culturas e o pequeno espaço necessário para a sua manutenção, a diversidade bioquímica e a facilidade de manipulação genética dos microrganismos. Muitas espécies de *Aspergillus* são conhecidas pela sua atividade proteolítica alcalina, porém, estudos sobre a atividade proteolítica ácida são mais raros, apesar de sua importância em diversos processos industriais. Dentre 879 linhagens isoladas da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, região da Mata Atlântica, Peruíbe, São Paulo, uma linhagem de *Aspergillus clavatus* despertou interesse por apresentar altos níveis de atividade proteolítica. Um estudo com essa linhagem visando a otimização da produção de protease ácida e de protease alcalina revelou maior atividade em meio ácido que em alcalino. Contudo, nenhuma protease ácida foi purificada até o momento.

O presente trabalho teve como objetivos purificar e determinar pH e temperatura ótimos da principal protease ácida extracelular de *Aspergillus clavatus*.

A presente linhagem foi mantida em meio sólido de Vogel, contendo glicose a 1% (m/v) e ágar 1% (m/v). Tais culturas foram incubadas por sete dias a 28°C e utilizadas como fonte de esporos imediatamente após este período. Para o cultivo em meio líquido, foram utilizadas suspensões de conídios em água destilada esterilizada, contendo aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  esporos por mL. O meio foi preparado com solução estoque de Vogel, na proporção de 10 mL para 500 mL de meio líquido, contendo gelatina a 1% (m/v) e glicose a 1% (m/v). Os esporos foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido, sendo incubados por 3 dias a 30°C, para obtenção de máxima atividade proteolítica. Após este período, o filtrado de cultura foi utilizado como fonte de enzimas. A atividade da protease ácida foi determinada através da incubação da fonte enzimática com solução de hemoglobina 2% (m/v) em uréia e tampão citrato de sódio 0,1M, pH 5,0. Em intervalos de tempo apropriados, a reação foi interrompida pela adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v). As amostras foram centrifugadas a 3900 g, sendo feita a leitura espectrofotométrica a 280nm do sobrenadante. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o aumento de 0,1 na absorbância a 280nm, por mL de amostra, por hora. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford modificado (SEDMACK & GROSSBERG, 1977), utilizando-se soro albumina bovina como padrão. A leitura espectrofotométrica foi feita a 595 nm. O pH ótimo de atividade da protease ácida foi determinado realizando-se ensaio enzimático como descrito anteriormente, usando-se tampão McIlvaine em diferentes valores de pH, de 2,0 a 8,0, a 37°C. A temperatura ótima de atividade da enzima foi determinada incubando-se a mistura de reação em diferentes temperaturas, no intervalo de 20 a 65 °C, utilizando-se tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5.

O filtrado de cultura, obtido nas condições de cultivo para obtenção da máxima atividade proteolítica ácida (TREMACOLDI *et al*, 2004), foi utilizado para a purificação. Para preservar a atividade proteolítica ao longo das etapas de purificação, testaram-se: DTT (agente redutor), EDTA (agente quelante), PMSF (inibidor de serino-proteases) e glicerol (agente estabilizador). Os resultados mostraram que a atividade foi preservada na presença de DTT 1mM, EDTA 2 mM e glicerol 10%, sendo estas substâncias utilizadas durante o processo de purificação. A principal protease ácida de *A. clavatus* foi purificada utilizando-se uma metodologia de duas etapas, como mostrado na Tabela 1.

A amostra obtida após a purificação foi liofilizada e submetida a PAGE-SDS, para avaliação de sua pureza (Figura 1). Utilizou-se gel de concentração de 8 a 18% em acrilamida. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 % (m/v) em metanol:ácido acético:água (4:1:5, v/v/v), e descorado

com solução de metanol:ácido acético e água (3:1:6, v/v/v). Após coloração, foi possível observar uma única banda de proteína, com massa molecular de 30,4 kDa, comprovando que a protease ácida foi purificada com a metodologia utilizada.

Após a purificação, o pH e a temperatura ótimos da protease ácida foram determinados, utilizando-se a metodologia anteriormente descrita. Os testes revelaram que o pH ótimo é de 2,5 (Figura 2) e a temperatura ótima, de 50 °C (Figura 3).

Diante desses resultados, foi possível concluir que a metodologia de purificação estabelecida é suficiente para o isolamento da principal protease ácida de *Aspergillus clavatus*, sendo obtido fator de purificação de 37,2 e recuperação de 37,9 %. O pH ótimo de catálise é de 2,5, não sendo detectada atividade em pH 6,0, perfil semelhante apresentado pela aspartil-protease do fungo micorrízico *Hebeloma crustuliniforme* (ZHU *et al*, 1990) . A temperatura ótima é de 50 °C, com grande perda de atividade a 60 °C; este resultado é semelhante ao da aspartil-protease de *Neosartorya fischeri* (WU e HANG, 1998).

**Bolsa:** CNPq/PIBIC

SEDMACK, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, n. 1-2, p. 544-552, 1977.

TREMACOLDI, C.R.; WATANABE, N.W.; CARMONA, E.C. production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v. 20(6), p 639-642, 2004.

WU, L.C.; HANG, Y.D. Purification and characterization of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 71-75, 1998.

ZHU, H.; GUO, D.; DANKIK, B.P. Purification and characterization of an extracellular acid proteinase from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 837-843, 1990.

Tabela 1. Purificação da principal protease ácida de *A. clavatus*.

Etapa	Atividade (U/mL)	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteínas (ug/mL)	Atividade específica (ug/mL)	Recuperação (%)	Fator de Purificação
Filtrado bruto	10,1	390	3931,2	2,80	3,6	100,0	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40-90% sat.	83,2	19	1581,5	1,20	69,4	39,6	19,3
CM-Sephadex C-50 pH 4,0	124,5	12	1490,4	0,93	133,9	37,9	37,2

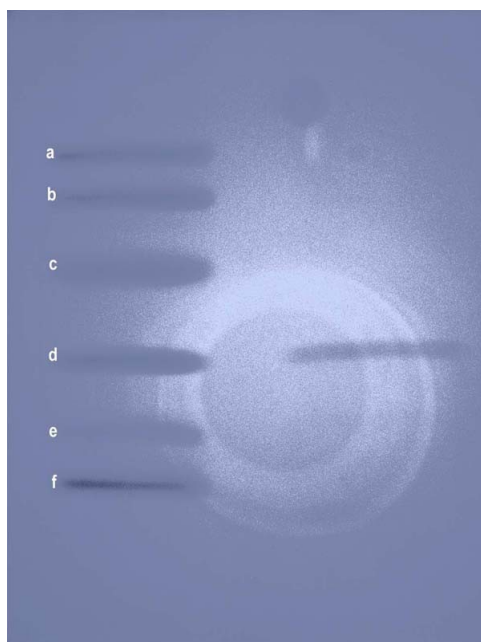


Figura 1. Perfil eletroforético em PAGE-SDS gradiente de 8 a 18% de acrilamida. (1) Padrões, de cima para baixo: (a) fosforilase b; (b) albumina de soro bovino; (c) ovoalbumina; (d) anidrase carbônica; (e) inibidor de tripsina; (f)  $\alpha$ -lactalbumina. (2) amostra de protease ácida purificada.

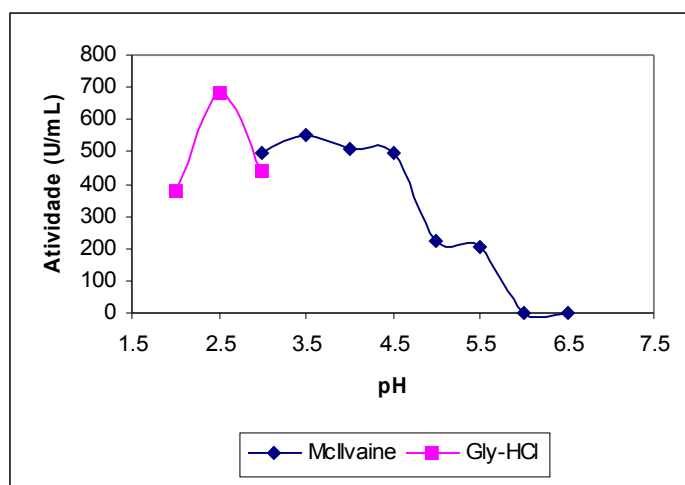


Figura 2. Influência do pH sobre a atividade protease ácida de *A. clavatus*. Os ensaios foram realizados a 50°C, utilizando-se os tampões glicina-HCl entre 2,0 e 3,0, e McIlvaine entre 3,0 e 8,0.

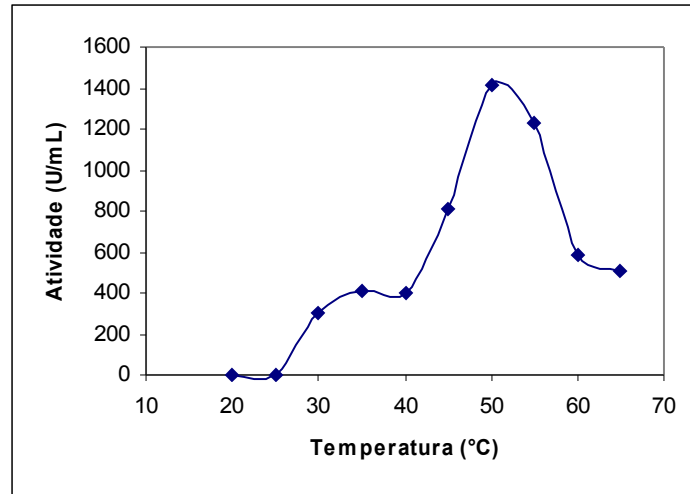


Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade protease ácida de *A. clavatus*. A amostra foi incubada com hemoglobina e tampão glicina-HCl pH 2,5.