



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

Seleção de Linhagens Produtoras de Transglutaminase

Romulo Cardoso Valadão¹, Sthefanie da Silva Ribeiro², Rosalie Reed Rodrigues Coelho², Lucielen Oliveira dos Santos¹, Janine Passos Lima da Silva³, Mônica Caraméz Triches Damaso⁴

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Tecnologia

BR 465, km, 7 – Seropédica/RJ, 23890-000. E-mail: linolasco@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro/RJ

³Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 – Guaratiba, Rio de Janeiro/RJ, 23020-470.

⁴Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica S/N, Av. w3 Norte (final)-Brasília/DF, 70.770-901

E-mail: monica.damaso@embrapa.br

RESUMO

As transglutaminases (EC 2.3.2.13) ou TGases são enzimas transferases capazes de catalisar reações do tipo acil-transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos aminas. Quando na ausência desses últimos, esta enzima catalisa uma desaminação dos resíduos de glutamina, utilizando moléculas de água como acil-aceptores. As TGases têm uma grande importância na indústria alimentícia, pelo fato de causarem um efeito polimerizante em alimentos ricos em proteína originando mudanças físicas na estrutura desses alimentos aumentando consideravelmente o seu valor agregado. Este trabalho objetivou a seleção de linhagens de actinomicetos e bacilos com potencial para a produção de TGases. De 100 linhagens testadas, dentre elas actinomicetos e bacilos, observou-se que 41 apresentaram alguma atividade de TGase em 5 dias e outras 33 linhagens, em 10 dias de fermentação. Seis linhagens, todas de actinomicetos, apresentaram uma atividade entre 0,01 e 0,34 U/mL.

Palavras-chave: transglutaminase, actinomicetos, bacilos, screening,

INTRODUÇÃO

Conhecidos por sua organização filamentosa, os actinomicetos, ou actinobactérias, são um filo de bactérias que se assemelham a fungos filamentosos. Ocorrem amplamente no solo, onde possuem relevante papel biológico, especialmente os representantes do gênero dos *Streptomyces*, na produção de antibióticos e enzimas (BERGEY'S, 1989).

As Transglutaminases (TGases) são capazes de modificar proteínas através de reações de transferência de acila entre um grupo G-carboxiamida de peptídeos ligados a resíduos de glutamina (doadores de acila) e uma variedade de aminas primárias (aceptores de acil), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em certas proteínas. Assim, a ligação cruzada entre proteínas através da ação de TGases pode alterar algumas propriedades dos alimentos, tais como solubilidade, estabilidade térmica, gelificação emulsificação e reologia (HINZ *et al.*, 2007). Sendo assim, as TGases possuem grande potencial de aplicação na reestruturação de alimentos ricos em proteínas, como carnes, peixes e derivados lácteos, proporcionando melhora na estabilidade, na ligação de água e nas propriedades mecânicas e texturais destes alimentos (ZHU, 1995; BONATO, 2006).



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

As TGases são encontradas em vários organismos, variando de bactérias a mamíferos (LIN *et al.*, 2006). A sua produção por microrganismos foi desenvolvida devido à escassez dessa fonte em mamíferos aos difíceis processos de separação e purificação ao preço extremamente alto do produto final obtido por esta fonte (YAN *et al.*, 2005). A primeira TGase microbiana (EC 2.3.2.13) citada na literatura foi de *Streptovorticillium* sp. e gerou grande interesse devido a possibilidade de produção em grande escala (ANDO *et al.*, 1989).

Este trabalho objetivou selecionar linhagens de actinomicetos e bactérias com potencial para a produção de TGases.

MATERIAL E MÉTODOS

a. Microrganismos e meios de cultivo

Cem linhagens, dentre elas 97 actinomicetos e 3 bacilos, pertencentes ao banco de culturas do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/UFRJ foram investigadas quanto à produção da TGase.

As linhagens mantidas a -18°C em solução a 20% de glicerol, foram reativadas em meio de cultivo descrito por SHIRLING e GOTTLIEB (1966): extrato de levedura (4,0 g/L), glicose (10,0 g/L), ágar-ágar (13,0 g/L), ajustado a pH 7,0 e esterilizado a 121°C por 20 min. As linhagens foram incubadas a 30°C por até 7 dias.

Para a produção de TGases, foi utilizado meio de cultivo descrito por ANDO *et al.* (1989): amido solúvel (20 g/L), peptona (20,0 g/L), extrato de carne (2,0 g/L), potássio fosfato dibásico (2,0 g/L) e sulfato de magnésio (1,0 g/L), ajustado a pH 7,0 e esterilizado a 121°C por 20 min.

b. Fermentação submersa das linhagens com potencial para produção de transglutaminase

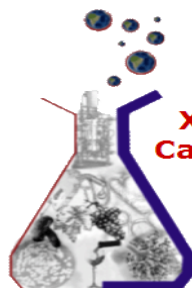
As linhagens selecionadas foram reativadas e inoculadas em 15 mL de meio de cultivo com uma alçada de cada microrganismo previamente crescido em Agar. A fermentação submersa foi conduzida em frascos cônicos de 125 mL, incubados a 30°C sob agitação de 180 rpm. Foram retiradas alíquotas aos 5 e 10 dias de fermentação para avaliar a produção de TGases nesses períodos.

c. Obtenção do extrato enzimático e determinação de atividade de TGases

Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas do meio fermentado e transferidas para microtubos tipo Eppendorf que, por sua vez, foram centrifugados a $14.000\times g$ por 3 min. O sobrenadante foi utilizado para avaliação da atividade de TGase.

A atividade enzimática foi determinada conforme GROSSOWICZ *et al.* (1950). O Reagente "A" foi preparado com Tampão Tris-acetato 200 mM e pH 6,0 contendo 100mM de hidroxilamina, 10mM de glutatona reduzida e 30 mM de substrato CBZ-Gln-Gly. O Reagente "B" continha: solução 1:1:1(v/v/v) de HCl 3 N, ácido tricloroacético a 12%, e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 5% dissolvido em HCl 0,1 N.

Em 400 μL de extrato enzimático adicionou-se a mesma quantidade de reagente "A". Após a homogeneização incubou-se por 10 min a 37°C e interrompeu-se a reação adicionando 400 μL do reagente "B". Procedeu-se a leitura da amostra em espectrofotômetro a 525 nm. A curva-padrão foi feita com ácido L-glutâmico- γ -monohidroxâmico.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

Uma unidade de atividade enzimática TGase foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1,0 μmol de hidroxamato por minuto nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

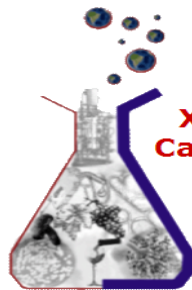
Das cem linhagens de actinomicetos e bacilos, testadas para produção de TGase, quarenta e uma apresentaram atividade de TGase em 5 dias de fermentação, enquanto trinta e três linhagens precisaram de 10 dias para expressar alguma atividade de TGase (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens que apresentaram produção de TGases e suas respectivas atividades (U/mL) em 5 e 10 dias de fermentação

Linhagens*	5 dias	10 dias	Linhagens*	5 dias	10 dias
606**	0,02	0,00	IGLO-14	0,02	0,00
AMR**	0,01	0,03	L28	0,00	0,02
FP4E**	0,01	0,03	LX-01	0,02	0,00
52	0,02	0,00	LX-16	0,02	0,03
80	0,06	0,00	LX-18	0,02	0,02
578	0,05	0,04	MD-05	0,01	0,00
594	0,14	0,00	MD-10	0,00	0,00
788	0,00	0,04	MD05	0,01	0,00
810	0,00	0,03	MG-28	0,03	0,01
3112	0,01	0,01	MG-65	0,04	0,00
3261	0,00	0,01	MG-82	0,02	0,00
375-05	0,00	0,02	OP-07	0,01	0,00
375-16	0,01	0,01	OP-20	0,01	0,01
375-19	0,01	0,02	OP-25	0,01	0,00
Albulus	0,04	0,00	P-63	0,00	0,02
C	0,07	0,00	P19	0,00	0,09
C04	0,00	0,05	P59	0,00	0,03
Cel-17	0,06	0,01	RM-02	0,02	0,00
Cel-43	0,11	0,11	SI-65	0,00	0,01
CG-08	0,12	0,03	SI-C11	0,00	0,04
CG-75	0,02	0,00	SI-C26	0,00	0,03
D	0,02	0,00	SL-09	0,06	0,00
DRO-08	0,00	0,04	SL-13	0,00	0,01
FOP-07	0,07	0,00	SL-30	0,00	0,01
FOP-08	0,05	0,00	SR-09	0,00	0,01
FOP-33	0,13	0,00	SR-14	0,05	0,01
IGAR-01	0,05	0,00	V01	0,02	0,03
IGLO-04	0,00	0,01	V05	0,00	0,02
IGLO-10	0,05	0,00	V02	0,34	0,00

* codificação das linhagens no banco de microrganismos do Instituto de Microbiologia da UFRJ

** linhagens de *Bacillus* sp.



**XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011**

INAFERM 2011

Seis linhagens apresentaram valores de atividade entre 0,01 e 0,34 U/mL, ou seja, as linhagens codificadas como 594, Cel-43, CG-08, FOP-33, P19 e V02, todas actinomicetos, foram identificadas como melhores produtoras de TGase, sendo selecionadas para a realização de futuros testes cinéticos e de otimização da produção da enzima.

Trabalhos previamente consultados na literatura mostram que os valores relacionados à produção desta enzima, apresentam-se relativamente baixos quando comparados a outras enzimas também aplicadas na indústria alimentícia, mesmo após a otimização das condições de cultivo. Macedo (2007) obteve, a partir de um screening de 200 linhagens de *Streptomyces* sp. e da otimização do meio de cultivo e dos parâmetros ambientais, uma atividade máxima de 1,40 U/mL com 5 dias de fermentação, representando um aumento de 86% em relação à atividade enzimática no início do seu trabalho. Enquanto que, Yan *et al* (2005) com uma linhagem mutante de *Streptoverticillium mobaraense*, estudando as condições controladas de agitação e aeração, obtiveram uma atividade máxima de 3,32 U/mL em 7 dias de fermentação. Essa dificuldade em se obter linhagens que possam apresentar uma produção expressiva de TGase não se limita aos actinomicetos. Espécies de *Bacillus* também apresentam baixas atividades de TGase, conforme Souza *et al* (2009), o qual obteve após condições otimizadas para uma linhagem de *Bacillus circulans*, uma atividade máxima de 0,37 U/mL com 8 dias de fermentação.

CONCLUSÕES

Dentre 100 linhagens testadas, incluindo actinomicetos e bacilos, seis linhagens de actinomicetos apresentaram melhor desempenho (0,01 e 0,34 U/mL) e são promissoras se comparadas com dados da literatura. O perfil cinético de produção de TGase pelas linhagens selecionadas está sendo avaliado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Matsuura, A.; Nonaka, M.; Uchio, R.; Tanake, H.; Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 2613-2617.

Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*. (1989) v. 4, 2nd edition, Published by Williams & Wilkins, USA, 440 p.

Bonato, P.; Perlo, F.; Teira, G.; Fabre, R.; Kueider, S. (2006) Nuggets with washed mechanically deboned chicken meat: frozen storage stability, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 5, p. 112–117.

Grossowicz, N.; Wainfan, E.; Borek, E.; Waelsch, H. (1950) The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, v.187, p.111-125.

Hinz, K.; Huppertz, T.; Kulozik, U.; Kelly, A. L. (2007) Influence of enzymatic crosslinking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal*, v. 17, n. 4, p. 289-293.

Lin, Y.; Chao, M.; Liu, C.; Tseng, M.; Chu, W. (2006) Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*, *Process Biochemistry*, v. 41, p. 519-524.



Macedo, J. A.; Sette, L. D.; Sato, H. H. (2007) Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. v. 10, n. 4, p. 618-626

Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* 16 (3), 313-340.

Souza, C. F. V.; Matos, G. S.; Flores, S. H.; Ayub, M. A. (2009) Environmental effects on transglutaminase production and cell sporulation in submerged cultivation of *Bacillus circulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 158, p. 302–312.

Yan, G.; Du, G.; Li, Y.; Chen, J.; Zhong, J. (2005) Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 963-968.

Zhu, Y.; Rinzema, A.; Tramper, J.; Bol, J. (1995) Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 44, p. 277–282.