

Avaliação do efeito de Tunicamicina no crescimento, produção e secreção de uma α -amilase produzida por *Cryptococcus flavus*

Manoel Cardoso de Barros¹, Roberto do Nascimento Silva², Cirano José Ulhoa³

1. Introdução

As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente sob a forma unicelular, podendo se reproduzir por esporulação, gemulação ou por fissão. São classificadas de acordo com as características sexuais como ascomicéticas ou ascoporógenas (esporos resultantes de cariogamia e meiose em ascos), basidiomicéticas (esporos resultantes de cariogamia e meiose em basídios) ou como pertencentes aos fungos imperfeitos (Deuteromycetes), e em categorias menores baseado em características morfológicas, fisiológicas e genéticas (Walker, 1999).

As leveduras têm um grande significado econômico e social na cultura dos seres humanos, pois vêm sendo utilizadas na produção de bebidas alcoólicas e pães durante séculos.

Atualmente existe um grande interesse da comunidade científica em melhorar a capacidade amilolítica destas espécies, pela adição de genes de amilases advindos de outras espécies de levedura ou mesmo de outros microrganismos (Forgaty & Kelly, 1990; Moraes et al., 1999 Walker, 1999). Esta estratégia poderá trazer benefícios tais como: simplificação dos estágios que precedem a fermentação, aumento da eficiência na conversão do amido e eliminação da etapa de adição de enzimas amilolíticas no processo (Tubb & Hammond, 1987).

Recentemente, Wanderley et al. (2004) isolou uma levedura que foi classificada como *C.flavus*. Essa levedura se mostrou uma grande produtora de α -amilase. O mesmo grupo purificou e caracterizou uma α -amilase secretada por esse microrganismo. A enzima é uma glicoproteína que possui uma massa de 75 kDa, pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 50°C. Uma característica interessante desta enzima é que a mesma possui cerca de 50% de carboidratos em sua massa.

O processo de glicosilação é uma das maiores modificações que ocorrem na estrutura da maioria das proteínas secretadas. Existem dois diferentes tipos de glicosilação de proteínas: O-glicosilação, que ocorre nos grupos hidroxil de resíduos de serina e treonina e a N-glicosilação que ocorre nos resíduos de asparagina na seqüência consenso Asn-X-Ser/Thr. As funções biológicas das glicoproteínas são bem estabelecidas, porém o papel que os carboidratos exercem nessas funções são, na maioria dos casos, ainda desconhecidos e os artigos publicados são contraditórios (Jafari-Aghadam et al., 2005).

A Tunicamicina é um antibiótico que bloqueia a N-glicosilação de proteínas pela inibição de transferência de N-acetilglicosamina fosfato para dolicol fosfato, o primeiro passo na síntese do precursor oligosacarídico (Eriksen et al., 1998). Este antibiótico têm sido utilizado como uma ferramenta para o estudo do papel da N-glicosilação na secreção, atividade e estabilidade de glicoproteínas secretadas por fungos filamentosos (Chiba et al., 1993; Kim et al., 1991 e Ulhoa et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da Tunicamicina no processo de glicosilação de uma α -amilase produzida por *C.flavus* bem como os efeitos desse processo na secreção e crescimento da levedura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Levedura utilizada e manutenção

O isolado de *C.flavus*, obtido da Coleção do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília (CEL/ICB) foi mantido em placas de petri, contendo meio SD (Synthetic Dextros Minimal Médium), constituído de: 0.67% YNB (Bacto Yeast Nitrogen base without amino acids), 2% glicose, 2% bacto-ágar e água destilada (qsp), a temperatura de 28°C.

2.2. Produção de amilases em meio líquido

Colônias isoladas da levedura foram primeiramente inoculadas em 10mL de meio SD glicose (0.67% YNB e 2% glicose). Após incubação sob agitação constante (200 rpm) a 28°C por 24 horas, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos de erlenmeyer de 500mL, contendo 100 mL do meio de indução SD amido (0,67% YNB e 2% amido). Os frascos foram incubados sob agitação constante (200 rpm) a 28°C por aproximadamente 30 horas.

2.3. Avaliação do efeito da Tunicamicina na N-glicosilação da α -amilase

Para a avaliação do efeito da tunicamicina na N-glicosilação, concentrações do antibiótico (0,5; 1,0 e 5 μ g/ml) foram adicionados ao meio de indução de acordo com Ulhoa et al. (2001).

2.4. Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada pelo método que se baseia na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (Fuwa, 1954) utilizando amido como substrato. As dosagens foram feitas com amostras provenientes do meio de cultura e intracelular.

3. Resultados e discussão

A figura 1 mostra o efeito da tunicamicina no crescimento de *C. flavus* em meio contendo amido. Como se pode observar concentrações acima de 1,0 μ g/mL da droga inibe o crescimento celular de forma significativa. Estes resultados são interessantes do ponto de vista que em fungos filamentosos somente quantidades 50 vezes maior, ou seja, 50 μ g/mL, inibem o crescimento desses organismos (Ulhoa et al., 2001).

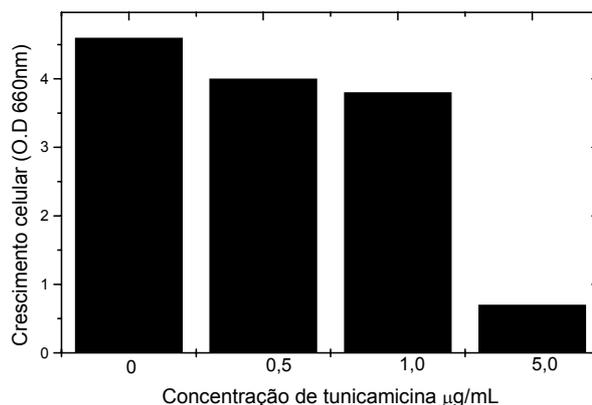


Figura 1. Efeito da tunicamicina no crescimento de *C. flavus*.

A figura 2 mostra os resultados do efeito da tunicamicina na produção bem como na secreção da α -amilase de *C. flavus*. Os resultados mostram que não existe secreção de amilase na presença da droga, ao passo que quase toda a totalidade da enzima se mantém intracelularmente, mostrando uma ligação entre a inibição da glicosilação e secreção de α -amilase nesse organismo.

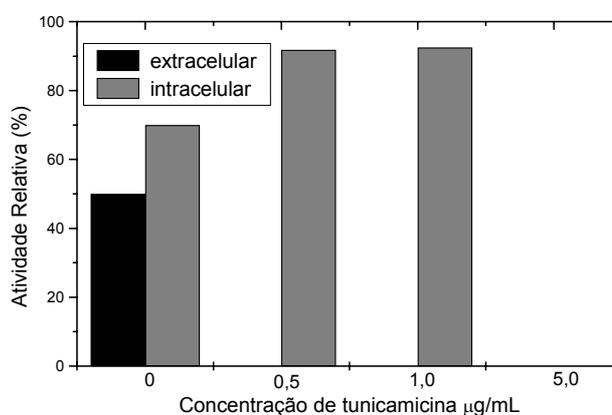


Figura 2. Efeito da tunicamicina na produção e secreção da α -amilase de *C. flavus*.

Estudos futuros deverão ser realizados no sentido de se determinar se a glicosilação desta enzima interfere nas características cinéticas da enzima.

4. Bibliografia

- Walker, G.M. (1999): Yeast Physiology and Biotechnology, 2^a ed. John Wiley & Sons. 1-10.
- Moraes, L.M.P.; Astolfi-Filho, S. & Oliver, S.G.(1995). Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs

that express α -amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. Applied Microbiology Biotechnology. 43:1067-1076.

- Forgaty, Wm. & Kelly, Ct. (1990). Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed. Edited by W.M. Forgaty and C.T. Kelly. Elsevier Science Publischer Ltd., England.
- Tubb, R.S. & Hammond, J.R.M. (1987) Yeast genetics, Priest Campbell (eds) 47-82.
- Wanderley KJ, Torres FA, Moraes LM, Ulhoa CJ. (2004). Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiol Lett. 16;231(2):165-9.
- Jafari-Aghdam J, Khajeh K, Ranjbar B, Nemat-Gorgani M. (2005). Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on structure, activity and stability. Biochim Biophys Acta. 15;1750(1):61-8.
- Eriksen S H, Jensen B., Olsen J. (1998). Effect of N-Linked Glycosylation on Secretion, Activity, and Stability of α -Amylase from *Aspergillus oryzae*. CURRENT MICROBIOLOGY 37:117-122.
- ChibaY, YamagataY, Iijima S, Nakajima T, Ichishima E (1993) The carbohydrate moiety of the acid carboxypeptidase from *Aspergillus saitoi*. Curr microbial 27:281-288
- Kim Jm, Schmid RD (1991) Comparison of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase purified as glycol- and aglyco-proteins. FEMS Microbiol Lett 78:221-226
- Ulhoa CJ, Sankievica D, Limeira PS, Peberdy JF. (2001). Effect of tunicamycin on N-acetyl-beta-D-glucosaminidase produced by *Trichoderma harzianum*. Biochim Biophys Acta. 3;1528(1):39-42.

¹Aluno de Pós-Graduação em Biologia/Universidade de Rio Verde/ Programa de Pós-Graduação Minter

²Coorientador Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Enzimologia

³Orientador Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Enzimologia

Agradecimentos

Este trabalho tem o suporte financeiro da Funape/UFG/CNPq