



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES
DAIANE FELIX REIS

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

BENEVIDES COSTA PESSELA JOAO

Coorientador

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES
DAIANE FELIX REIS

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
doutora em Engenharia e Ciência de
Alimentos

SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

BENEVIDES COSTA PESSELA JOAO

Coorientador

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

R375i Reis, Daiane Felix.
Imobilização de protease de *Bacillus sp.* P45 em diferentes suportes
/ Daiane Felix Reis. – 2016.
79 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio
Grande/RS, 2016.

Orientadora: Dr^a. Susana Juliano Kalil.
Coorientador: Dr. Benevides Costa Pessela Joao.

1. Estabilidade enzimática 2. Matrizes 3. Derivados 4. Rendimento
5. Capacidade de adsorção I. Kalil, Susana Juliano II. Pessela Joao, Benevides
Costa III. Título.

CDU 664

Catálogo na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

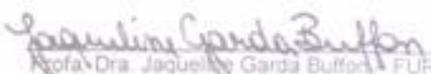
ATA DO EXAME DE TESE

As 8h30min do dia 26 de agosto de 2016, reuniu-se na sala de Seminários da EQA desta Universidade, a Comissão Examinadora de tese de doutorado constituída para o exame da tese "IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES", da Engenheira de Alimentos Daiane Felix Reis, matrícula número 99500, tendo como orientadora a Profa. Dra. Susana Juliano Kalil. As argumentações apresentadas demonstram que a aluna tem domínio do conhecimento utilizado na sua tese. Portanto, a Comissão a considera APROVADA e APTA para receber o Título de DOUTORA em ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS e recomenda que esta ata acompanhe os documentos necessários para a emissão do referido título. A discente tem o prazo de 30 dias para a entrega da versão final da tese (cópias impressas e versão digitalizada) que passará pela avaliação de uma comissão do PPGECA e, após aprovação desta e a entrega da cópia do artigo aceito será solicitada a expedição do seu diploma.

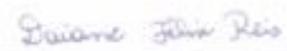

Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG


Prof. Dr. Márcio Antonio Mazutti – UFSM


Profa. Dra. Francine Silva Antelo – FURG


Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG


Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG


Daiane Felix Reis

Aos meus pais, Dejair e Zeneida,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por ter me dado espiritualidade, força e coragem ao longo dessa jornada chamada vida.

Aos meus pais, amados, sempre incansáveis, meus maiores exemplos, pelo amor, incentivo e apoio incondicionalmente. Amo vocês infinitamente!

Ao Felipe, meu amor, pela incrível reciprocidade. Pelos abraços, afagos, parcerias, por me ouvir reclamar tantas vezes e me acalmar, pela sinceridade e paciência. Pelas alegrias e brincadeiras. Por tudo que a gente passou, e não foi pouca coisa.
Agradeço àquele que mudou o tom da minha vida. Te amo!

À Dr. ^a Maira Caleffi, pelo seu espetacular amor e dedicação ao seu trabalho. Talvez sem ela, eu não estaria aqui.

À minha orientadora, Prof. ^a Susana. A primeira palavra que eu pensei em escrever neste parágrafo foi gratidão. Obrigada! Obrigada, por sempre entender dúvidas, ausências e desânimos. Pelas oportunidades, por correr atrás dos meus objetivos, pela disponibilidade e paciência, pelos planos A, B, C e o alfabeto inteiro. És exemplo de humanidade. És exemplo de profissional. Obrigada por me motivar e contribuir com tantos ensinamentos e experiências.

Ao Prof. Benevides Pessela, pela oportunidade de conhecer o “velho mundo” e o “novo mundo”, simultaneamente. Pela coorientação e por proporcionar o intercâmbio no Consejo Superior de Investigaciones Científicas em Madrid.

“Tempos difíceis sempre irão revelar os verdadeiros amigos”.

Ao grupinho digital “*Horses of the world*”: Jojo, Ailton, Lui e Deh. Obrigada pela cumplicidade! Vocês colocaram (e colocam) muitos sorrisos em meu rosto.

À amiga Joana Ores, que carrega em seu peito um coração imenso. Jojo, sem você essa tese não teria sido concluída. Obrigada pelo seu amor e amizade, pelos almoços, cafés, ajudas e disponibilidade, pelas angústias, inquietações e ansiedades compartilhadas. Agradeço todos os dias por Deus ter te colocado na minha vida.

Ao amigo Ailton Lemes. Uma das únicas pessoas que sempre me disse a verdade, por mais que doesse. Àquele que me ensinou a “meter o pé na porta”. Obrigada por sempre estar ao meu lado e ser tão especial, coração!

À amiga Luisa Sala, sempre dedicada e prestativa. Lui, obrigada por me ajudar nessa caminhada. Você é rara e essencial!

À amiga Deborah Otero, agradeço por nossos caminhos terem se cruzado. Deh, sinto tanto tua falta nos meus dias. Obrigada pela amizade, indizadas e apoio, meu “monstrinho”.

Às minhas amigas Mariana e Mikaela. Da graduação para a vida. Mesmo distantes, estamos sempre perto.

Aos companheiros de laboratório Elida, Gabi, Thais, Jéssica, Rafa, Juliana e Samuel. Agradeço pela amizade, pelas palavras e apoio, ajuda nos experimentos, pelos inúmeros cafés, pelas risadas e por compartilhar os momentos do dia-a-dia comigo, sei que não sou fácil.

À Michele Paludo, pela parceria estabelecida há mais de 6 anos atrás. Desde o mestrado com as microalgas, o doutorado sanduíche em Madrid, a especialização em Novo Hamburgo, as viagens e os dias na academia (afinal, temos que manter a forma!). Loira, obrigada pela amizade, apoio, solidariedade e disponibilidade.

À Anne Kamilly, companheira de apartamento. Querida amiga Kamis, obrigada por tornar meus dias madrileños menos solitários, aceitar minhas diferenças e me ouvir no final de cada dia em Madrid.

À professora Janaina, minha orientadora de mestrado. Obrigada pela torcida, amizade, paciência e apoio.

À querida Elisane. Sem você essa tese não teria começado. Obrigada pela amizade, apoio e preocupação.

Ao laboratório de Bioprocessos de Alimentos, lugar onde sempre me senti em casa. Pela disponibilidade dos equipamentos e materiais. Bruno, Vanessa e Chico, obrigada pela amizade e apoio.

Ao laboratório de Biotecnologia do CSIC-CIAL. Pela oportunidade de ter contato com os grandes autores de pesquisa sobre imobilização de enzimas. Que orgulho ter conhecido pessoas tão humildes! Obrigada amigos Daniela Remonato, Paz García, Simone, Sandro, Diogo e César, vocês fizeram os meus dias mais prazerosos.

À minha bolsista de iniciação científica, Odivane Fadanni, por auxiliar no desenvolvimento desta tese. Obrigada pelo carinho, pelas palavras de incentivo e pelo comprometimento com o trabalho.

À técnica do laboratório, Ana Sanzo. Obrigada pela paciência e disponibilidade.

À Islanda, obrigada por ser sempre tão solícita e simpática.

Aos professores da comissão examinadora deste trabalho, pela disposição a contribuir com a melhoria do mesmo.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pelos ensinamentos e disposição para formar excelentes profissionais.

À FURG por permitir um ensino público de qualidade.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Os que me veem passar só me enxergam, poucos me entendem, para ser sincero quase ninguém tenta. No fim das contas, bom mesmo seria se a gente só se aceitasse. Incrível mesmo seria se parássemos de julgar as entranhas alheias. Porque ninguém sou eu a ponto de saber quais tempestades abalam meu peito. Porque ninguém, além de mim, é tão eu que compreenda que por menos ondas no mar, isso não significa calmaria. Maré mansa. Carregamos no peito oceanos inteiros. Travamos dentro das nossas mentes e corações batalhas infindáveis com o nosso ego, com os tsunamis que inundam, abalam e afogam. Os que me veem passar, só me enxerguem, por favor. Ser já é complexo, imagine ser e explicar?!

Matheus Rocha

RESUMO

As proteases (EC 3.4) são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e em fragmentos de proteínas e representam de 60 a 65% do mercado global das enzimas industriais. Embora o emprego dessas enzimas seja bastante difundido, sua aplicação pode ser limitada por fatores como seu elevado custo, instabilidade catalítica e a dificuldade de recuperação. No entanto, muitas destas restrições de uso podem ser evitadas pela utilização de enzimas imobilizadas. A imobilização é uma ferramenta interessante para melhorar a atividade e a estabilidade de enzimas, permitindo sua reutilização. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar as técnicas de imobilização de protease obtida a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45, avaliando-se as propriedades dos derivados imobilizados. A presente tese foi dividida em quatro artigos. No primeiro foi realizado um estudo preliminar para avaliar a viabilidade de imobilização da enzima protease. A imobilização ocorreu através de adsorção física, ligação iônica e covalente. O suporte quitosana ativada com glutaraldeído apresentou melhores resultados em relação à capacidade de adsorção (25,4 U/g de suporte) e a estabilidade operacional (4 ciclos). No segundo artigo, avaliou-se a imobilização multipontual utilizando o suporte glioxil-agarose, resultando em um derivado mais estável, com rendimentos de imobilização de 41,6% em 6 h e 42,1% em 24 h de ensaio, sendo que a capacidade de adsorção do suporte foi de 16,2 U/g. A temperatura e o pH ótimos foram de 30°C e 9,0, respectivamente. Em todas as temperaturas estudadas o derivado foi mais estável em termos de K_d e meia-vida, quando comparado ao suporte de referência bromocianógeno (CNBr). No terceiro artigo, utilizou-se resinas de troca iônica no processo de imobilização. Os maiores rendimentos foram encontrados para os derivados SP Sepharose (80%) e CM Sepharose (77%). Na temperatura de 40°C, o derivado SP Sepharose apresentou o maior valor de meia vida (3,09 h) e o derivado DEAE Sepharose apresentou valor de meia vida de 0,59 h na temperatura de 50°C. Os valores de K_m encontrados para os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose foram de 0,83 e 1,94 mg.mL⁻¹, respectivamente. O quarto artigo abordou a maximização da imobilização dos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose. O derivado SP Sepharose foi mais estável em pH 6,0, com capacidade de adsorção de 33,83 U/g, e para o derivado DEAE Sepharose a estabilidade ocorreu em pH 8,0, com capacidade de adsorção de 22,23 U/g. Os maiores rendimentos encontrados foram de 62,0% em pH 6,0 e de 64,2% em pH 7,0 para SP Sepharose e de 62,5% em pH 8,0 e 62,3% em pH 7,0 para DEAE Sepharose. Na temperatura de 50°C, o suporte SP Sepharose (pH 6,0) apresentou valor de meia vida de 1,09 h e o suporte DEAE Sepharose (pH 8,0) de 1,74 h. Os parâmetros termodinâmicos ΔG^* variaram de 86,38 a 88,43 kJ/mol para ambos derivados; ΔH^* encontrado foi de 101,66 e de 108,10 kJ/mol e ΔS^* 0,044 a 0,067 kJ/mol.K para DEAE Sepharose e SP Sepharose, respectivamente. Os valores obtidos para z foram 17,85 e 17,98°C para os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose, respectivamente. Os valores de D , em horas, variaram de 92,47 a 1,57 para SP Sepharose e 144,81 a 5,80 para DEAE Sepharose.

Palavras-chaves: Estabilidade enzimática. Matrizes. Derivados. Rendimento. Capacidade de adsorção.

ABSTRACT

The proteases (EC 3.4) are hydrolytic enzymes that cleave bonds in proteins and protein fragments. They represent 60-65% of the global market for industrial enzymes. Although the use of these enzymes is widely used, its application may be limited by several factors such as high cost, catalytic instability and difficulty of recovery. However, many of these restrictions of use can be avoided by the use of immobilized enzymes. Immobilization is an interesting tool to improve the activity and stability of enzymes, allowing reuse. This work aimed to evaluate the protease immobilization techniques from *Bacillus* sp. P45 cultivation, evaluating the properties of the derivatives. This thesis was divided into four items: the first was performed a preliminary study to demonstrate the availability of immobilizing the enzyme study. The immobilization occurred via physical adsorption, ionic and covalent binding. The support glutaraldehyde activated chitosan showed better results with respect to the loading capacity (25.4 U/g carrier) and the operational stability (4 cycles). In the second article was evaluated the multipoint immobilization using glyoxyl- agarose support, resulting in a more stable derivative with immobilization yield of 41.6% in 6 h 42.1% in 24 h, and the loading capacity of this carrier was 16.2 U/g. The optimum temperature and pH were 30°C and 9.0, respectively. At all temperatures tested (25, 30, 40 and 50°C), the derivative is more stable in terms of half-life and K_d , when compared to the reference support (CNBr). In the third article, it was used ion exchange resins in the immobilization process. The highest yields were found for derivatives SP Sepharose (80%) and CM Sepharose (77%). At the temperature of 40°C, the derivative SP Sepharose showed the highest half-life (3.09 h) and derived DEAE Sepharose showed a value of half-life of 0.59 h at 50°C. The K_m values found for derivatives SP Sepharose and DEAE-Sepharose were 0.83 and 1.94 mg.mL⁻¹, respectively. The fourth article evaluated to maximize the immobilization of SP Sepharose and DEAE Sepharose. The derivative SP Sepharose was more stable at pH 6.0 with loading capacity of 33.83 U/g, and the derivative DEAE Sepharose stability occurred at pH 8.0 with loading capacity of 22.23 U/g. The highest yields obtained were 62.0% at pH 6.0 and 64.2% at pH 7.0 for SP Sepharose and 62.5% at pH 8.0 and at pH 7.0 of 62.3% to DEAE Sepharose. At the temperature of 50°C, the derivative SP Sepharose (pH 6.0) showed a value of half-life of 1.09 h and DEAE Sepharose (pH 8.0) of 1.74 h. The thermodynamic parameters ΔG^* ranged from 86.38 to 88.43 kJ/mol for both derivatives; ΔH^* was found to be 101.66 and 108.10 kJ/mol, ΔS^* and from 0.044 to 0.067 kJ/mol.K to DEAE Sepharose and SP-Sepharose, respectively. The values were 17.85 for z and derivatives 17,98°C for SP Sepharose, and DEAE Sepharose, respectively. The D values in minutes ranged from 92.47 to 1,57 and for SP Sepharose, 144.81 to 5.80 for DEAE Sepharose.

Key words: Enzymatic stability. Carriers. Derivatives. Yield. Loading capacity.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Suportes iônicos aplicados na imobilização de enzimas	45
---	----

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Tabela 1 - Imobilização de protease parcialmente purificada de <i>Bacillus</i> sp. P45.....	64
--	----

ARTIGO 2

Tabela 1 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr e glioxil-agarose em pH 7 nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C.....	86
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Imobilização da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 em diferentes suportes	102
Tabela 2 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr, Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose à pH 7 nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C	107
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr, Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose.....	108

ARTIGO 4

Tabela 1 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C.....	125
Tabela 2 – Valores ΔG^* , ΔH^* , ΔS^* , D e z obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C.....	126

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Fatores a serem considerados no design de um biocatalisador.....	40
Figura 2 - Classificação dos principais métodos de imobilização.....	40
Figura 3 – Imobilização de proteína em suportes aminados pré-ativados com glutaraldeído.	42
Figura 4 - Estrutura do Eupergit C® e imobilização covalente de uma enzima	42
Figura 5 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima	43

CAPÍTULO III

ARTIGO 1

Figura 1 – Eletroforese da protease bruta e purificada produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. P45. Marcador de massa molar (M); enzima bruta (EB) e enzima parcialmente purificada (EP) ...	63
Figura 2 – Imobilização de protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 em (a) Amberlite IR® 120, (b) argila montmorilonita e (c) quitosana ativada com glutaraldeído	63
Figura 3 – Estabilidade operacional da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada em esferas de quitosana ativada com glutaraldeído	66

ARTIGO 2

Figura 1 - Fluxograma do preparo do suporte glioxil-agarose	78
Figura 2 – Cinética de imobilização de protease de <i>Bacillus</i> sp. P 45 no suporte glioxil- agarose	81
Figura 3 – Perfil de temperatura da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada em CNBr.....	83
Figura 4 – Perfil de pH da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada em CNBr ..	83
Figura 5 – Temperatura ótima da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada em glioxil-agarose	84
Figura 6 – pH ótimo da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada em glioxil-agarose.....	85

ARTIGO 3

Figura 1 – Cinética de imobilização da enzima parcialmente purificada produzida pelo <i>Bacillus</i> sp. P45 utilizando os suportes iônicos CM Sepharose, Q Sepharose, DEAE Sepharose e SP Sepharose.....	100
Figura 2 – Temperatura ótima da protease de <i>Bacillus</i> sp. P45 imobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose	104

Figura 3 – pH ótimo da protease de *Bacillus* sp. P45 immobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose..... 104

Figura 4 – Estabilidade da protease de *Bacillus* sp. P45 immobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose à 4°C 105

ARTIGO 4

Figura 1 – Cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 por adsorção iônica com 123

Figura 2 – Cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 por adsorção iônica com DEAE Sepharose..... 124

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
CAPÍTULO II.....	33
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	35
3.2 PROTEASES.....	36
3.3 ESTABILIDADE DE ENZIMAS.....	38
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	39
3.4.1 Imobilização por ligação covalente.....	41
3.4.2 Imobilização por adsorção física.....	44
3.4.3 Imobilização por adsorção iônica.....	44
3.4.4 Imobilização por inclusão/encapsulamento.....	46
3.6 IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES.....	47
3.7 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
CAPÍTULO III.....	51
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	51
ARTIGO 1.....	53
IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE <i>Bacillus</i> sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES ...	53
RESUMO.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 MICRO-ORGANISMO, INÓCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	58
2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA.....	58
2.3 ELETROFORESE.....	59

2.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	59
2.4.1 Imobilização em Amberlite IR [®] 120.....	59
2.4.2 Imobilização em argila montmorilonita.....	59
2.4.3 Imobilização em quitosana.....	60
2.4.4 Imobilização em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído.....	60
2.4.5 Imobilização em Eupergit [®] C	60
2.4.6 Imobilização em DEAE-Cellulose [®]	60
2.4.7 Imobilização em QAE-Sephadex [®]	60
2.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	61
2.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL DA PROTEASE IMOBILIZADA.....	61
2.7 TRATAMENTO DE RESULTADOS	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5 CONCLUSÃO	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ARTIGO 2.....	71
IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE PROTEASE DE Bacillus sp. P45 EM GLIOXIL-AGAROSE	71
RESUMO.....	73
1 INTRODUÇÃO	75
2 MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1. MICRO-ORGANISMO, INOCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA	76
2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA.....	77
2.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA.....	77
2.3.1 Imobilização enzimática em CNBr ativado	77
2.3.2 Imobilização enzimática em glioxil-agarose.....	77

2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	78
2.5 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	79
2.6 ESTABILIDADE TÉRMICA	79
2.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	80
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	82
3.3.1 Temperatura e pH ótimos	82
3.3 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA	85
4 CONCLUSÃO.....	87
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ARTIGO 3	91
IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE DE <i>Bacillus</i> sp. P45 EM RESINAS DE TROCA IÔNICA.....	91
RESUMO	93
1 INTRODUÇÃO.....	95
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	96
2.1 MICRO-ORGANISMO, INOCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA.....	96
2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA	97
2.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	97
2.4.1 Imobilização em bromocianógeno ativado.....	97
2.4.2 Imobilização em resinas de troca iônica.....	97
2.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	98
2.6 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	98
2.7 ESTABILIDADE TÉRMICA	99
2.8 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	99

2.9 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.2 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	100
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA	103
3.4 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM DA ENZIMA IMOBILIZADA	105
3.5 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA	106
4 CONCLUSÃO	109
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ARTIGO 4.....	113
IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE Bacillus sp. P45 EM SP SEPHAROSE E DEAE SEPHAROSE.....	113
RESUMO	115
1 INTRODUÇÃO	117
2 MATERIAL E MÉTODOS	118
2.1 MICRO-ORGANISMO, INÓCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA	118
2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA.....	118
2.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	119
2.3.1 Imobilização enzimática em bromocianógeno (CNBr) ativado.....	119
2.3.2 Imobilização enzimática por adsorção iônica	119
2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO	120
2.5 ESTABILIDADE TÉRMICA.....	120
2.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS..	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	122
3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	124
4 CONCLUSÃO	127
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
CAPÍTULO IV.....	131

4 CONCLUSÃO GERAL	133
CAPÍTULO V	135
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

O estudo de proteases iniciou-se no fim do século XVI motivado pelo interesse na fisiologia do sistema digestivo humano. Entretanto, já na antiguidade, tecidos animais, vegetais e outros materiais biológicos ricos em proteases eram, de forma empírica, usados no preparo de queijos e no tratamento dos couros, tendo sido as proteases as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (BON et al., 2008).

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais, responsáveis por mais de 60% do mercado mundial e são aplicadas em diversos processos biotecnológicos na indústria de alimentos: na síntese de peptídeos, no processo de amaciamento de carne, nas indústrias de panificação e de bebidas. Além disso, elas são utilizadas em produtos farmacêuticos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil (BRANDELLI, 2008; JABALIA; MISHRA; CHAUDHARY, 2014; RAO et al., 1998).

Estas enzimas podem ser obtidas a partir de animais, bactérias, fungos e plantas, no entanto, as de origem microbianas são as mais comuns (BEKA et al., 2014; DAROIT; SANT'ANNA; BRANDELLI, 2011; LEITE-JÚNIOR; TRIBST; CRISTIANINI, 2014; MERHEB-DINI et al., 2010), destacando-se as proteases produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus*. Entre estas estão as produzidas pelo *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009), o qual foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica. As proteases por ele produzidas apresentam grande potencial para utilização na hidrólise de proteínas e para aplicação em processos bioindustriais (SIRTORI et al., 2006).

Uma das características importantes das enzimas é a especificidade pelo substrato, pois a molécula é disposta tridimensionalmente de tal forma que apenas determinados substratos atinjam seu sítio ativo, encontrando-se nessa região grupos específicos da proteína num posicionamento adequado à reação. No entanto, as enzimas, geralmente, são altamente sensíveis ao calor, ao pH e a presença de certos compostos, podendo facilmente desnaturar-se, perdendo sua estrutura tridimensional, essencial para a atividade catalítica (KENNEDY; REHM, 1987). No caso de proteases, a maior causa da inativação é a auto degradação proteolítica (KLIBANOV, 1983).

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para aumentar a estabilidade das enzimas, tais como uso de estabilizantes, modificação química na estrutura da proteína, engenharia genética, imobilização em suportes sólidos, dentre outras. O processo de imobilização é uma

ferramenta importante para melhora da atividade e da estabilidade enzimática (GUISAN, 2006; KLIBANOV, 1983).

Os componentes principais de um sistema de enzima imobilizada são a enzima, a matriz e o modo de ligação. As enzimas podem ser ligadas ao suporte por interações através de adsorção física, de ligações iônicas, covalentes ou de inclusão (GUISAN, 2006). As propriedades da enzima imobilizada são controladas pelas características da enzima e do material do suporte. A interação específica entre a enzima e o suporte promove uma imobilização com distintas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Pelo ponto de vista industrial, a simplicidade e a relação custo-eficácia são propriedades fundamentais das técnicas de imobilização. Porém, a reutilização industrial a longo prazo das enzimas imobilizadas também requer a preparação de derivados muito estáveis com propriedades funcionais adequadas, tais como a atividade e a seletividade (BASÍLIO, 1994; GUISAN, 2013).

A imobilização enzimática tem sido estudada por muitos anos, o que pode ser verificado pelo surgimento de trabalhos de pesquisa e documentos de revisão indicando um crescente interesse nessa área. Mais de 10 mil trabalhos relacionados ao processo de imobilização das enzimas foram publicados no ano de 2016. Segundo Pessela (2002), apesar da grande evolução dos métodos de imobilização, ainda não há metodologias gerais para imobilização em qualquer sólido e para qualquer enzima, que utilize de uma forma rápida, simples e qualitativa, ou seja, apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados neste processo, não há um método aplicável para todas as enzimas.

Hidalgo et al. (2015) estudaram o uso da protease de *Bacillus* sp. P7 na hidrólise de caseinato de sódio bovino, obtendo peptídeos com atividades antimicrobiana e antioxidante. A protease de *Bacillus* sp. P45 também vem sendo aplicada há alguns anos, na degradação de resíduos agroindustriais, como a farinha de penas de frango (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011), em estudos de purificação através do uso de membranas filtrantes (SEVERO; OLIVEIRA; MACHADO, 2011), no desenvolvimento de uma estratégia de purificação, utilizando a integração de sistema aquoso bifásico e ultrafiltração (SALA et al., 2014). Mais recentemente foi estudada a aplicação da enzima como agente coagulante do leite bovino (LEMES et al., 2016).

Com relação ao estudo de enzimas proteolíticas imobilizadas, os trabalhos apresentados na literatura são escassos, bem como a avaliação dos parâmetros termodinâmicos, cinéticos e de estabilidade enzimática dos derivados. Vale ressaltar que o conhecimento sobre

as características da enzima imobilizada são aspectos importantes quando se considera a sua aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que pode fornecer informações sobre sua estrutura e promover o desenvolvimento de processos economicamente viáveis (JURADO et al., 2004).

Desta forma, considerando o exposto acima, esta tese realizou o estudo de diferentes técnicas de imobilização da protease obtida a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45, avaliando também as propriedades do derivado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a imobilização da protease obtida de *Bacillus* sp. P45 em diferentes suportes investigando as propriedades da enzima imobilizada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imobilização da protease utilizando diferentes métodos através dos suportes: Amberlite IR[®] 120, argila montmorilonita, quitosana, quitosana e glutaraldeído, Eupergit[®] C, DEAE- Cellulose[®] e QAE-Sephadex[®], bem como determinar a estabilidade operacional do derivado selecionado;
- Avaliar a imobilização da enzima através de ligações covalentes multipontuais, utilizando o suporte glioxil-agarose; e através de ligações iônicas, utilizando resinas de troca iônica, determinando os parâmetros de estabilidade térmica e cinética enzimática;
- Maximizar a imobilização da protease em trocadores iônicos SP Sepharose Fast Flow e DEAE Sepharose Fast Flow, bem como avaliar os parâmetros termodinâmicos, de estabilidade térmica e de cinética enzimática.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENZIMAS

As enzimas são catalisadores biológicos, de natureza principalmente proteica, que participam de várias reações bioquímicas. Estas moléculas apresentam extraordinário poder catalítico, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos. A propriedade catalítica das reações catalisadas por enzimas é que a reação ocorre confinada em uma pequena região da enzima denominada sítio ativo. A molécula que liga no sítio ativo e sobre a qual a enzima age é denominada substrato. A superfície do sítio ativo é delimitada por resíduos de aminoácidos com grupamentos nas cadeias laterais que ligam o substrato e que catalisam a sua transformação química. O complexo enzima-substrato é fundamental para a ação enzimática. Ele também é o ponto de partida para o tratamento matemático que define o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Essas moléculas possuem um alto grau de especificidade pelo substrato, acelerando reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, e de elevada importância nos processos biotecnológicos. Seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio. Condições ambientais afastadas das ótimas podem provocar a desnaturação da biomolécula, isto é, mudança da estrutura tridimensional nativa, frequentemente irreversível, acompanhada de perda da atividade catalítica (BON et al., 2008; LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

As enzimas são classificadas em seis classes, com base no tipo de reação química catalisada. Um número de quatro dígitos é atribuído a cada uma das enzimas pela *Enzyme Commission*: o primeiro indica a classe, o segundo indica a subclasse e está relacionada com o tipo de grupo químico no qual atua, o terceiro indica um subgrupo dentro da subclasse e está relacionado com grupos químicos envolvidos na reação e o quarto é o número serial da enzima no seu correspondente subgrupo. As seis classes são:

1. Oxidorredutases, as quais catalisam as reações de óxido-reduções;
2. Transferases, que catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra;
3. Hidrolases, as quais catalisam reações de hidrólise;
4. Liases, que constituem o grupo das enzimas que catalisam reações de quebra de ligações;
5. Isomerases, onde ocorre a catálise de reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero; e
6. Ligases,

representadas pelas enzimas que catalisam ligações covalentes de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia (ILLANES, 2008).

O número de enzimas integrantes da lista da *Enzyme Commission* é cerca de 4000, sendo que no ano de 2016, até o presente momento, mais de 100 novas enzimas foram identificadas. No entanto, somente um pequeno número são utilizadas comercialmente (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Sistemas de catálise enzimática tem sido utilizados em vários campos, tais como em indústria de alimentos, detergentes, indústria farmacêutica, produtos agroquímicos, entre outros. As enzimas hidrolíticas como as lipases, celulasas e proteases são as mais comumente usadas. As razões para que estas tenham grande interesse atrativo à indústria deve-se a sua ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade na utilização bem como a ampla especificidade para determinados substratos e a não necessidade de cofatores (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

As enzimas podem ser extraídas de tecidos animais (por exemplo, pancreatina, tripsina e pepsina) e vegetais (por exemplo, papaína, bromelina e malte). Porém, as enzimas industriais são, na sua maior parte, oriundas de micro-organismos. A obtenção de catalisadores de origem microbiana é de interesse industrial, devido à grande variedade de atividades catalíticas e à possibilidade de produção em ampla escala durante um período curto e com menor custo de produção (BON et al., 2008)

3.2 PROTEASES

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases (EC 3.4) são enzimas hidrolíticas que clivam ligações nas proteínas e em fragmentos de proteínas (RAO et al., 2008). Representam de 60 a 65% do mercado global das enzimas industriais (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014), sendo que a maioria delas são as proteases alcalinas, utilizadas na indústria de alimentos, no processo de amaciamento de carne, na síntese de peptídeos, preparo de fórmulas infantis, panificação e cervejarias. Além disso, são utilizadas em produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil, no processo de depilação e transformação do couro, na síntese de hidrolisados proteicos e obtenção de peptídeos bioativos (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; BASILIO, 1994; BRANDELLI, 2008; CORRÊA et al., 2011; VERMA et al., 2011).

O estudo de proteases iniciou-se no fim do século XVI motivado pelo interesse na fisiologia do sistema digestivo humano. Entretanto, já na antiguidade, tecidos animais, vegetais

e outros materiais biológicos ricos em proteases eram, de forma empírica, usados no preparo de queijos e no tratamento dos couros, tendo sido as proteases, as primeiras enzimas com aplicação tecnológica (BON et al., 2008).

Devido ao fato de que as proteases de origem animal e vegetal não atenderem a demanda do mercado global, as proteases microbianas ganham destaque, uma vez que os micro-organismos representam uma excelente fonte de enzimas, por conta da sua ampla diversidade bioquímica e sua susceptibilidade para a manipulação genética (RAO et al., 1998).

As proteases são aplicadas na indústria de laticínios, devido a sua alta especificidade e pelo uso de micro-organismos como *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae*. Além disso, também são utilizadas como aditivos na indústria de detergentes, na indústria de couro, de alimentos, na indústria farmacêutica, entre outras aplicações (GUPTA; RAMNANI, 2006; NILSANG et al., 2005; PILLAI; ARCHANA, 2006; SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Bactérias do gênero *Bacillus* são frequentemente reportadas como fontes de proteases, destacando-se *Bacillus halodurans* JB 99 (SHRINIVAS; KUMAR; NAIK, 2012), *Bacillus subtilis* (ANWAR et al., 2009; KONWARH et al., 2009; PILLAI; ARCHANA, 2008; WANG; SWAISGOOD; SHIH, 2003), *Bacillus mycoides* (ABDEL-NABY et al., 1998), *Bacillus* sp P45 (DAROIT; CORREA; BRANDELLI, 2011), *Bacillus* sp. P7 (CORREA; DAROIT; BRANDELLI, 2010) e *Bacillus licheniformis* (LIN; SHIH; SWAISGOOD, 1996; MAGHSOODI et al., 2013; OKOROMA et al., 2012) e o gênero *Chryseobacterium* (SILVEIRA et al., 2012).

Estima-se que metade da produção comercial de proteases disponíveis são derivadas das cepas de *Bacillus* sp. (BEG; GUPTA, 2003). O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia, com forma de bastonetes, gram-positivos, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo na sua maioria catalase positiva. Os micro-organismos pertencentes a este grupo possuem diversas características vantajosas para produção de proteases, tais como alta taxa de crescimento, menor tempo de cultivo e por serem reconhecidos como seguros (GRAS) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para algumas espécies como por exemplo *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

Dentre as proteases de *Bacillus*, estão as enzimas com propriedades proteolíticas produzidas pelo micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009), o qual foi isolado a partir do intestino do peixe Jaraqui (*Piaractus mesopotamicus*) da Bacia Amazônica, apresentando grande potencial em processos industriais. Distinguem-se das demais enzimas porque podem agir sobre proteínas complexas, como as de soro de leite e da

caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos (BON et al., 2008; DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). Sala et al. (2014) relataram que a protease produzida pelo *Bacillus* sp. P45 apresenta capacidade de hidrólise de diversos substratos, como caseína, albumina de soro bovino e farinha de penas.

Os dados obtidos até o momento para a protease de *Bacillus* sp. P45 envolvem a sua aplicação na degradação em resíduos agroindustriais, como a farinha de penas de frango (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011), a purificação da enzima através do uso de membranas filtrantes (SEVERO; OLIVEIRA; MACHADO, 2011), o desenvolvimento de uma estratégia de purificação, utilizando a integração de sistema aquoso bifásico e ultrafiltração (SALA et al., 2014). Mais recentemente foi estudada a aplicação da enzima como agente coagulante do leite bovino (LEMES et al., 2016).

3.3 ESTABILIDADE DE ENZIMAS

Uma das características biotecnológicas mais importantes das enzimas é a sua estabilidade, pois muitas dessas biomoléculas não são estáveis em condições operacionais. A atividade e a estabilidade térmica dessas biomoléculas são influenciadas por diversos fatores como temperatura, pH, meio de reação, entre outras, que podem afetar sua estrutura tridimensional ou conformação espacial (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). No caso de proteases, a maior causa de inativação é a auto-degradação proteolítica (autólise) (KLIBANOV, 1983).

Além disso, a aplicação industrial de enzimas pode ser limitada por fatores como seu elevado custo, instabilidade catalítica e a dificuldade de recuperação ao final dos processos industriais. O conhecimento da estabilidade enzimática pode auxiliar na otimização da viabilidade do processo enzimático (JURADO et al., 2004; SALEEM et al. 2005; SHIRINIVAS et al., 2012).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para aumentar a estabilidade térmica das enzimas, como o uso de aditivos estabilizantes (FREITAS, 2009), modificação química na estrutura da proteína (KIM; PARK; RHEE, 1990), engenharia genética (HARKKI et al., 1991), imobilização em suportes sólidos (ABDEL-NABY et al., 1998; BRAGA et al., 2014; FARAG; HASSAN, 2004; MATEO et al, 2007; SILVEIRA et al., 2012), dentre outros.

A imobilização é uma estratégia de estabilização de enzimas mais investigada, a qual apresenta vantagens como uso contínuo e melhora catalítica, tornando a tecnologia de

imobilização de enzimas atrativa para fins industriais. No processo de imobilização, a seleção de métodos e suportes é uma etapa essencial do processo para obtenção de biocatalisadores com elevada seletividade e estabilidade térmica (GUISAN, 2006; GUISAN, 2013; MENDES, 2009).

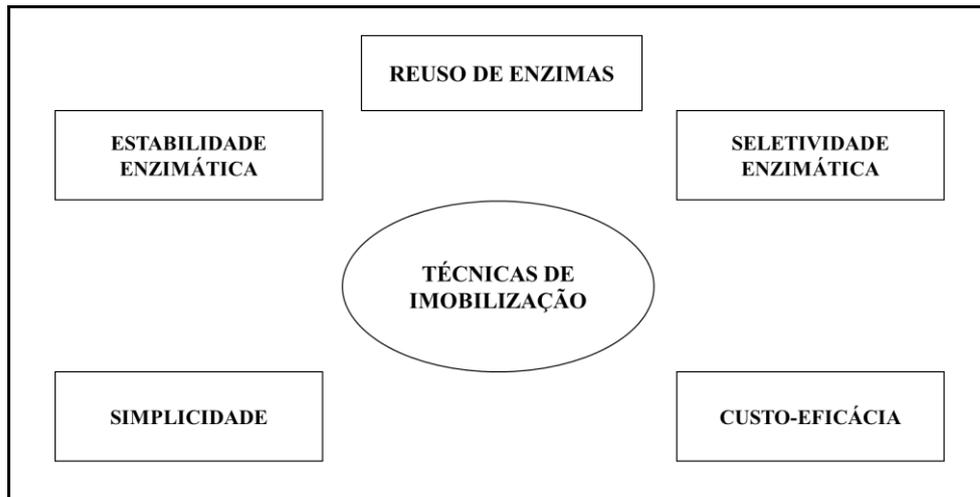
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas começou a ser estudada no início do século XX, ao se observar que o carvão ativo, ao qual havia sido adicionado uma preparação biológica com atividade invertásica, mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavada. No ano de 1971, na primeira Conferência em Engenharia Enzimática, estabeleceu-se o uso do termo enzima imobilizada, para biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados a espaços físicos definidos (BON et al., 2008).

Como já mencionado anteriormente, a imobilização é uma ferramenta interessante para melhora da atividade e estabilidade de enzimas (GUISAN, 2013). Os componentes principais de um sistema de enzima imobilizada são a enzima, o suporte (ou matriz) e o modo de ligação. As enzimas podem ser ligadas ao suporte através de adsorção física, de ligações iônicas, covalentes ou de inclusão/encapsulamento (GUISAN, 2006). As propriedades da enzima imobilizada são determinadas pelas características da enzima e do material do suporte. A interação específica entre a enzima e o suporte promove uma imobilização com distintas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

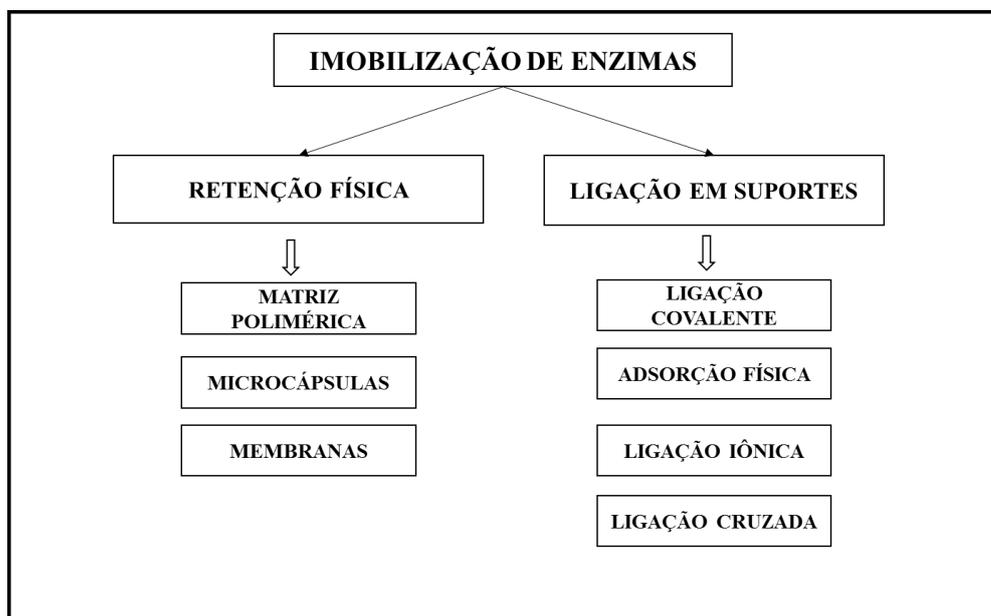
O desenvolvimento de protocolos de imobilização está relacionado com simplicidade, custo-eficácia, seletividade e estabilidade das enzimas, conforme ilustra a Figura 1. Os protocolos de imobilização devem obedecer um número de critérios, tais como:

- (a) Não é necessário o uso de reagentes tóxicos ou perigosos, durante e após o processo de imobilização;
- (b) A possibilidade de associar a imobilização da enzima e a melhoria das propriedades como atividade, seletividade e estabilidade. A preparação de derivados (biocatalisadores imobilizados) ativos e estáveis é a chave para uma aplicação industrial bem sucedida;
- (c) A preparação de derivados úteis para utilização em diferentes reações, em diferentes meios de reação e em diferentes reatores (GUISAN, 2013).

Figura 1-Fatores a serem considerados no design de um biocatalisador

Fonte: adaptado de GUI SAN, 2013.

Existem duas formas de reter uma enzima no interior dos biorreatores: a imobilização de enzima no interior de um suporte e a imobilização ligada na superfície do suporte (BON et al., 2008). Os métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. Esses métodos estão apresentados na Figura 2. O processo de imobilização deve ser conduzido de forma que permita que a enzima mantenha sua conformação ativa e necessária flexibilidade catalítica. O conhecimento das características estruturais da enzima é essencial para a obtenção de um biocatalisador de alto desempenho (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Figura 2 - Classificação dos principais métodos de imobilização

3.4.1 Imobilização por ligação covalente

Dentre os métodos existentes, a imobilização de enzimas por ligação covalente a um suporte sólido é o método mais empregado na preparação de enzimas insolúveis, pois quando a imobilização é bem-sucedida obtém-se um derivado com alta estabilidade devido à força resultante e, neste caso, é difícil ocorrer dessorção da enzima do suporte, mesmo na presença de alta força iônica (KENNEDY; REHM, 1987; TARDIOLI, 2003).

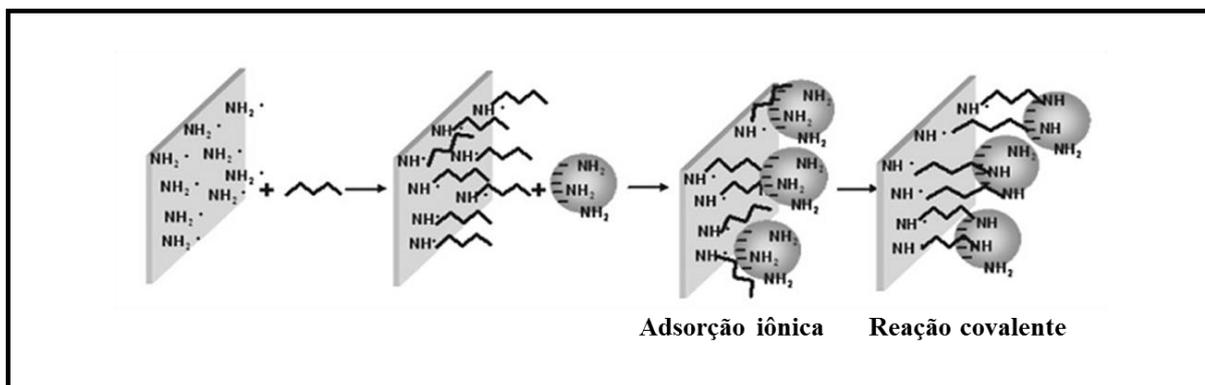
A imobilização por ligação covalente, caracteriza-se pela formação de uma ligação covalente entre os grupos ativos disponíveis do suporte e os grupos funcionais específicos da enzima. Os suportes são escolhidos por seus grupos funcionais, estabilidade mecânica e área superficial. Poucos suportes possuem grupos reativos que permitem o acoplamento direto enzima-suporte, necessitando na maioria das vezes, de ativação. A ativação do grupo ligante é frequentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima. As ativações mais comuns são realizadas com bromocianógeno, aldeídos (como glutaraldeído) ou reagentes bifuncionais (como glioxil) (BASILIO, 1994; TARDIOLI, 2003).

Muitas enzimas são frequentemente imobilizadas em bromocianógeno (CNBr) e são utilizados como derivados de referência, pois o uso desse suporte permite a imobilização covalente unipontual de enzimas em condições suaves. O derivado resultante permite o estudo das proteínas, sem fatores de agregação molecular que podem alterar a inativação enzimática, fato este recorrente na enzima solúvel. Além disso, este suporte permite o estudo dos mecanismos de inativação apenas das propriedades da enzima (dissociação da estrutura quaternária, distorção da estrutura terciária, desorganização da estrutura secundária). A imobilização de uma enzima no interior de uma estrutura porosa como o CNBr ativado pode promover efeitos estabilizadores, impedindo interações entre moléculas ou proteínas. Com o uso desse derivado, é possível obter uma forma da enzima com as menores alterações possíveis de sua conformação nativa, provocadas pelo processo de imobilização, ao mesmo tempo que, diferentemente do que ocorre na enzima solúvel, este derivado geralmente reproduz melhor as condições a serem testadas com imobilizações durante os ensaios da atividade (BOLIVAR et al., 2012; BOLIVAR et al., 2006; TAVANO, 2006).

O glutaraldeído é um reativo para os resíduos de lisina de proteínas, muito utilizado em processos de imobilização de proteínas através de ligação covalente às matrizes amino-ativadas. Em geral, a derivatização da superfície com glutaraldeído requer a presença de grupos amino para ancorar a molécula de glutaraldeído. Como consequência, alguns grupos carregados

prevalecem após a funcionalização e então a interação das proteínas com o suporte é duplo, governados primeiramente por interação iônica e na segunda etapa a ligação covalente é estabelecida, conforme ilustra a Figura 3 (GUISAN, 2013; WALT; AGAYN, 1994).

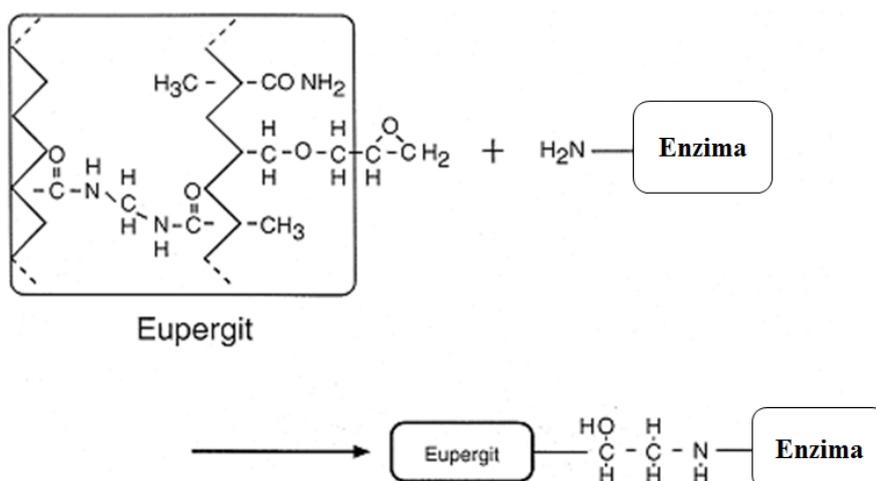
Figura 3 – Imobilização de proteína em suportes aminados pré-ativados com glutaraldeído



Fonte: adaptado de GUISAN, 2013.

O suporte Eupergit C[®] também é bastante utilizado para esse tipo de imobilização e consiste em um polímero acrílico esférico contendo grupos epóxi como componentes ativos. Eupergit C[®] se liga as proteínas via grupos oxirano que reagem em pH neutro e alcalino com os grupos amino das moléculas de proteína (Figura 4) (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

Figura 4 - Estrutura do Eupergit C[®] e imobilização covalente de uma enzima



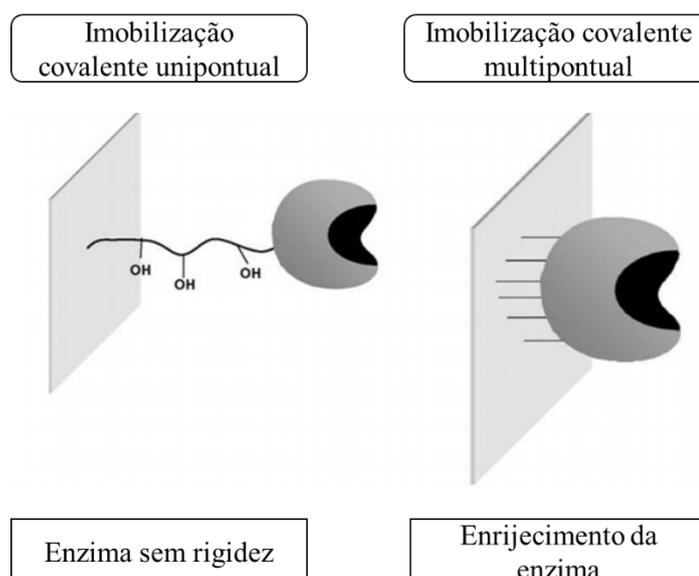
Fonte: adaptado de KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000.

A ligação covalente multipontual consiste na imobilização e estabilização da enzima através da formação de várias ligações covalentes entre grupos amino da enzima (-NH₂) e grupos aldeído do suporte. Esses grupos aldeídos que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte, são introduzidos através de sua ativação prévia, e tornam o suporte fortemente eletrofílico para se ligar aos grupos doadores de elétrons dos aminoácidos da superfície da enzima. O ligeiro distanciamento dos grupos aldeído provocado pela ativação permite a formação de ligações multipontuais – bases de *Schiff* – entre enzima e suporte, ligações adicionais que são menos estáveis, porém que aumentam a estabilidade do derivado obtido. A possibilidade de que ligações adicionais sejam efetivas aumenta consideravelmente com o aumento da densidade superficial dos grupos aldeídos ativados no suporte (BON et al., 2008; GUIÓSÁN, 1988; GUIÓSÁN, 2013).

GUIÓSÁN (1998) relata as razões para escolher os grupos amino dos resíduos de lisina da enzima e o grupo amino terminal para a imobilização multipontual em suportes ativados. Primeiramente, porque a maioria das enzimas apresentam muitos resíduos de lisina que não estão envolvidos no sítio catalítico. Segundo, porque os grupos amino são polares e expostos ao meio na superfície da enzima. O mesmo autor ainda afirma que a ligação unipontual enzima-suporte é reversível, porém a imobilização torna-se irreversível quando ocorre dois ou mais pontos de ligação.

Para se obter derivados estáveis pela técnica de imobilização multipontual, deve-se selecionar um suporte morfologicamente apropriado (Figura 5).

Figura 5 – Efeito da imobilização na estabilidade da enzima



Fonte: adaptado de MATEO et al., 2007.

Suportes porosos, cuja estrutura interna tem grande área superficial, como, por exemplo, sílica, alumina e géis de agarose, promovem um aumento na rigidez de uma pequena área superficial da enzima, que é transladada para toda a estrutura terciária, devido às fortes interações entre todas as partes da molécula de proteína (Figura 5). Géis glioxil-agarose possibilitam a multi-interação enzima-suporte intensa, sem a distorção da estrutura da enzima, devido à ausência de impedimentos estéricos para a reação química amina-aldeído e a estabilidade dos grupamentos aldeídos (BON et al., 2008; GUIZÁN, 1988).

3.4.2 Imobilização por adsorção física

A imobilização por adsorção é a técnica considerada simples, envolve interações de superfície reversíveis entre a enzima e o suporte. A atração da enzima ocorre pela superfície do suporte por meio de forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Geralmente essas são fracas, o que permite a dessorção da enzima durante a utilização. O processo de adsorção não é específico e, algumas vezes, pode provocar a inativação parcial ou total da enzima. Neste caso, somente suportes com alta afinidade pela enzima podem causar menor desnaturação (BASÍLIO, 1994; BON et al., 2008).

Os suportes mais utilizados são: quitosana (ABDEL-NABY et al., 1998), argila (BRAGA et al., 2014; KRAJEWSKA 2004), quitina (KRAJEWSKA 2004), alumina (ABDEL-NABY et al., 1998; COSTA et al., 2001), carvão (FARAG; HASSAN, 2004), vidro (FARAG; HASSAN, 2004), terra diatomácea (MEUNIER; LEGGE, 2010), dentre outros.

3.4.3 Imobilização por adsorção iônica

Pessela (2002) relata que a imobilização iônica de enzimas a suportes ativados com grupamentos iônicos tem sido um dos primeiros métodos de imobilização de enzimas aplicadas a nível industrial. A imobilização de enzimas em resinas de troca iônica envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas, sendo importante que essas forças sejam maximizadas a fim de obter um protocolo de imobilização eficiente (SANTANA; GUINIDI; RIBEIRO, 2011).

Este método apresenta como vantagens a possibilidade de recuperação do suporte quando na inativação da proteína, baixo custo, simplicidade, rápida imobilização, pouca mudança conformacional da enzima, devido ao caráter iônico da ligação e as condições amenas de imobilização, por sua flexibilidade, de forma que o suporte se adapta a estrutura da enzima,

originando uma adsorção (as interações íon-íon são mais fortes do que a adsorção física, porém, mais fracas que a ligação covalente) que conduz à obtenção de derivados estabilizados com significativas atividades catalíticas. Como desvantagem, pode haver liberação da enzima pelo suporte, por variações de pH e força iônica do meio (BON et al., 2008; WEETALL, 1975).

Muitos estudos relatam a imobilização de enzimas em diferentes suportes, dentre eles aniônicos com grupamentos do tipo dietilaminoetil (DEAE) e amino quaternário (Q). Os catiônicos possuem grupos como carboximetil (CM), sulfopropil (SP), dentre outros. Os principais suportes iônicos utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Suportes iônicos aplicados na imobilização de enzimas

Suporte	Enzima	Referência
DEAE Sepharose	β -xilosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Benassi et al. (2013)
	Lipase de <i>Hydrocrea pseudokoningii</i>	Pereira et al. (2015)
Q Sepharose	β -xilosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Benassi et al. (2013)
	Lipase de <i>Hydrocrea pseudokoningii</i>	Pereira et al. (2015)
CM Sepharose	β -xilosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Benassi et al. (2013)
	Lipase de <i>Hydrocrea pseudokoningii</i>	Pereira et al. (2015)
SP Sepharose	β -xilosidase de <i>Aspergillus niger</i>	Benassi et al. (2013)
	β -glucosidase de <i>Aspergillus japonicus</i>	Da Silva et al. (2014)
DEAE Celulose	Protease de <i>Bacillus mycoides</i>	Abdel-Naby et al. (1998)
	Protease de <i>Aspergillus oryzae</i>	Farag; Hassan (2004)
DEAE Agarose	β -glucosidase de <i>Thermus</i> sp. T2	Pessela et al. (2003)
DEAE Sephadex A-25	Protease de <i>Bacillus mycoides</i>	Abdel-Naby et al. (1998)
Amberlite IR 120	Protease de <i>Bacillus mycoides</i>	Abdel-Naby et al. (1998)
	Lacase de <i>Trametes versicolor</i>	Spinelli et al. (2013)
Lewatit	Lipase B de <i>Candida rugosa</i>	Torres et al. (2008)

As resinas de troca iônica são compostas por polímeros de estireno e divinilbenzeno, funcionalizadas com grupos trocadores iônicos, sais quaternários de amônia, para as resinas aniônicas e grupamentos sulfônicos ($-\text{SO}^{-3}$) e carboxílicos ($-\text{COO}^{-}$), para as trocadoras catiônicas. Matrizes catiônicas trocam seu cátion disponível com o

cátion do meio até atingir o equilíbrio. Matrizes aniônicas são semelhantes, trocam aniôns; seu caráter básico deve-se à presença de grupos amônio quaternário, sendo aquelas que tem amônio quaternário uma resina fortemente básica. A troca de íons em uma resina fortemente ácida ocorre independente do pH, já se for uma resina fracamente ácida a troca se dá somente em soluções alcalinas, na sua forma salina, sendo fracas na forma carboxílica. As resinas básicas são muito ionizadas, tanto na forma de hidróxido como na de seu sal, e também possuem ação independente do pH (SKIDMORE; HORTSMANN; CHASE, 1990; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2003).

Suportes aniônicos (como DEAE Sepharose) e catiônicos (como CM Sepharose) são usados industrialmente na adsorção de enzimas (KLIBANOV, 1983). A enzima Lipozyme (lipase imobilizada em resina de troca iônica) é utilizada na interesterificação em óleos de baixo custo (DE CASTRO et al., 2004). A resina DEAE-Sephadex é empregada na imobilização da enzima aminoacilase para a produção de L-aminoácidos, usados nos setores farmacêutico e de alimentos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

3.4.4 Imobilização por inclusão/encapsulamento

A imobilização por inclusão, também chamada de encapsulamento, consiste em confinar uma proteína em um polímero insolúvel, ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma rede artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (BON et al., 2008, DALLA-VACCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MIKKELSEN; CORTÓN, 2004).

3.6 IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASES

Estudos em relação a imobilização de proteases ainda são escassos, e muitas respostas ainda não foram encontradas. Portanto, a avaliação de diferentes métodos e suportes faz-se necessária para avançarmos na aplicação industrial dessa enzima.

A imobilização de uma protease de *Bacillus mycoides* foi estudada utilizando diferentes métodos e suportes, sendo que os melhores resultados de rendimento de imobilização foram encontrados com quitosana (18,8%), Amberlite IR 120 (28%) e quitosana ativada com glutaraldeído (79,3%) (ABDEL-NABY et al. 1998).

Farag e Hassan (2004) imobilizaram a protease de *Aspergillus oryzae* utilizando diferentes métodos de imobilização como adsorção (carvão, pérolas de vidro e sílica), ligação iônica (DEAE-celulose e Dowex), ligação covalente (quitosana e quitina) e encapsulamento (alginato de cálcio). Dos métodos avaliados, a adsorção física com pérolas de vidro apresentou maior capacidade de adsorção (39,2 U/g) e maior rendimento de imobilização (63,64%).

Kim (2005) imobilizou a protease de *Aspergillus flavus* em alginato de cálcio e obteve redução de atividade catalítica na faixa de 71-78%. Konwahr et al. (2009) utilizaram o processo de imobilização de protease oriunda de *Bacillus subtilis* em nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄. Esse processo resultou em um aumento de quase quatro vezes na atividade enzimática, além de apresentar uma significativa termoestabilidade, estabilidade de armazenamento e reciclabilidade.

Anwar et al. (2009) relataram a imobilização de uma protease de *Bacillus subtilis* em alginato de cálcio, com rendimento de 45%, temperatura e pH ótimos de 50°C e 7,5, respectivamente.

Wang, Swaisgood e Shih (2009) em seu estudo, utilizaram um sistema de bioimobilização de protease de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. O rendimento do sistema foi de aproximadamente 24-28%.

Silveira et al. (2012) realizaram um estudo de uma de *Chryseobacterium* sp. Kr6 imobilizada em quitosana e glutaraldeído. A atividade do derivado permaneceu em 63,4% depois de cinco vezes de reuso.

Devido à demanda industrial por proteases, faz-se necessário mais estudos sobre a estabilidade dessas enzimas através de técnicas de imobilização, visando a sua aplicação em processos biotecnológicos. Além disso, é importante a caracterização das propriedades dos derivados, através da análise dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, que auxiliam no

entendimento dos prováveis mecanismos de desnaturação, que são extremamente importantes nos processos enzimáticos (JURADO et al., 2004; MARTINS; BURKERT, 2009).

3.7 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O estudo das propriedades das proteases, tais como a especificidade do substrato, as condições ótimas de pH catalíticos, os perfis de temperatura e de estabilidade, e a cinética e as características termodinâmicas podem ser utilizadas para prever a aplicação bem-sucedida da enzima (CASTRO; SATO, 2013; CHANG et al., 2013).

Estudos de desnaturação térmica auxiliam no entendimento da relação entre a estrutura e a função de uma enzima em particular. As enzimas são desnaturadas de diversas maneiras para um estado inativado, sendo esta a principal restrição em diversos bioprocessos. A desnaturação é definida como um processo onde as estruturas secundária, terciária e quaternária das proteínas mudam sem a quebra de ligações covalentes (NAIDU; PANDA, 2003).

Cada enzima possui seus ótimos de pH e temperatura e seus parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) pertinentes a cada sistema enzima-substrato, onde a influência da concentração do substrato na velocidade de reação pode ser representada pelo modelo cinético de *Michaelis-Menten*. Os parâmetros cinéticos e, conseqüentemente, a velocidade da reação, podem ser alterados com a imobilização da enzima, em resposta a vários fatores como mudança na estabilidade da enzima (temperatura ou pH), efeitos conformacionais (a estrutura da enzima pode ser alterada durante a imobilização) e efeitos difusionais (a velocidade da reação pode ser limitada pela taxa de difusão do substrato na superfície do suporte) (CLARK; BLANCH, 1997).

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com a temperatura, para a maioria das reações químicas, dentro de uma certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém sua atividade catalítica. As velocidades de reações com alta energia de ativação são muito mais sensíveis a variações de temperatura do que reações com baixa energia de ativação (Teoria de Arrhenius) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

As enzimas são estruturas muito sensíveis quanto à temperatura e ao pH, desnaturando-se em temperaturas elevadas, ou em alguns casos até mesmo a moderadas temperaturas, e fora de uma faixa muito estreita de pH. Logo, o ótimo de temperatura observado nos perfis de atividade em função da temperatura é resultante de dois processos: aumento na

velocidade de reação com a temperatura e crescente desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011; WHITAKER, 1993).

A estrutura tridimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, depende das interações hidrofóbicas e hidrofílicas da enzima, que são afetadas pelo pH. Assim, alterações nesse parâmetro podem alterar o sítio ativo, diminuindo a atividade ou mesmo desnaturar a enzima. Portanto, é necessário trabalhar em condições ótimas de pH e temperatura, onde a atividade enzimática se mantenha por um maior período de tempo, mesmo que nessas condições suas velocidades não sejam máximas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011; WHITAKER, 1993).

Além desses parâmetros, é importante avaliar a cinética e termodinâmica das enzimas, através da determinação de parâmetro como meia-vida ($t_{1/2}$), constante de desnaturação térmica (K_d), energia livre de Gibbs (ΔG^*), entalpia (ΔH^*), entropia (ΔS^*), dentre outros.

A meia vida da enzima é definida como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial. Já o valor para a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para cada temperatura é importante para avaliação das propriedades das enzimas. O K_d é inversamente proporcional à estabilidade da enzima, ou seja, quanto menor o valor de K_d maior será a estabilidade enzimática. Este parâmetro pode ser determinado a partir de um gráfico de logaritmo natural da atividade *versus* tempo (WHITAKER, 1993).

ΔG é uma medida da diferença de energia entre os produtos e os reagentes de uma reação. No entanto, para que ocorra a transformação dos reagentes em produtos é necessário quebrar ligações e interações existentes entre as moléculas e criar outras novas, passando-se por um estado de transição que está associado a uma energia livre superior à dos reagentes. Essa energia, denominada energia livre de ativação, ΔG^* , pode ser diminuída pela ação de enzimas, pois o centro ativo da enzima fornece uma superfície que complementa o estado de transição de uma reação. A variação de ΔG^* de um estado para outro prediz a taxa de reação, ou seja, o aumento da concentração de substrato ligado aos sítios ativos da enzima diminui a energia livre do sistema, ou ainda, a desnaturação da enzima diminui a disponibilidade de sítios reativos, portanto a energia livre de Gibbs é composta pela energia de ligação e energia de ativação (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011; NAIDU; PANDA, 2003).

Entalpia (ΔH^*) é uma forma de energia denominada de função de estado por depender basicamente do estado em que a variável se encontra e não pelo caminho percorrido até o estado atual. Por esse motivo a variação de entalpia de um processo é medida hipoteticamente tomando etapas da reação. Quando a etapa final recebe muito mais energia que

o estado inicial, o valor de ΔH^* será positivo, o que geralmente acontece em processos de desnaturação enzimática (ORTEGA et al., 2004).

A entropia (ΔS^*) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de número considerável de ligações consideradas fracas como pontes de hidrogênio. Os grupos polares vão perdendo a capacidade de ordenar as moléculas de água e a liberdade dos grupos apolares expostos pelo desdobramento da proteína aumenta o sentido da desordem (ORTEGA et al., 2004).

Além disso, quando se trabalha com enzimas utilizadas na indústria de alimentos, é comum expressar sua inativação utilizando os parâmetros D e z . O valor D ou valor de redução decimal (em minutos) é definido como o tempo que a enzima deve ser incubada em uma dada temperatura para que se mantenha 10% de atividade residual. O cálculo de z é a determinação do intervalo de temperatura requerido para que a curva de desnaturação térmica atravesse um ciclo logarítmico (KLIBANOV, 1983).

3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro do exposto na revisão da literatura e tendo em vista a importância de proteases em processos industriais, a investigação de métodos de estabilização desta biomolécula, como a imobilização, é necessária para obtenção de mais informações sobre essa enzima e a realização de estudos envolvendo suas diversas formas de aplicação.

A avaliação de diferentes métodos e suportes de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 vem contribuir no avanço do desenvolvimento de técnicas de estabilização enzimática, com o objetivo de melhorar seu desempenho catalítico e as propriedades cinéticas da enzima. Auxiliando na determinação das condições as quais a mesma possa ser utilizada sem causar a perda de eficiência, sem comprometer a viabilidade dos processos enzimáticos, com esse intuito o presente trabalho foi desenvolvido.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM DIFERENTES SUPORTES

RESUMO

As enzimas vêm sendo utilizadas como catalisadores em processos industriais e apresentam características que fazem seu uso vantajoso, tais como elevada eficiência catalítica e alto grau de especificidade. Embora o emprego de enzimas seja bastante utilizado, sua aplicação pode ser limitada por vários fatores como seu elevado custo, instabilidade catalítica e a dificuldade de recuperação. No entanto, muitas destas restrições de uso podem ser evitadas pela utilização de enzimas imobilizadas. A imobilização é uma ferramenta interessante para melhorar a atividade e a estabilidade de enzimas, permitindo sua reutilização. Desta forma, a seleção de métodos e suportes que permitam obter biocatalisadores ativos, com elevada seletividade e estabilidade térmica é uma etapa importante. Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, as proteases apresentam relevância biotecnológica, sendo aplicadas no processamento de alimentos, como carnes, pães e produtos lácteos, na produção de detergentes, na indústria farmacêutica, de couro, na síntese de hidrolisados proteicos e obtenção de peptídeos bioativos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização de protease parcialmente purificada obtida a partir do cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, avaliando diferentes métodos através dos suportes: Amberlite IR[®] 120, argila montmorilonita, quitosana, quitosana ativada com glutaraldeído, Eupergit[®] C, DEAE-Cellulose[®] e QAE-Sephadex[®], bem como determinar a estabilidade operacional do derivado. A enzima foi produzida por cultivo submerso utilizando de *Bacillus* sp. P45 e parcialmente purificada por sistema aquoso bifásico e ultrafiltração/diafiltração. A protease foi imobilizada através de diferentes metodologias utilizando adsorção física, ligação iônica e covalente, com a finalidade de avaliar o comportamento da enzima frente a capacidade de adsorção enzima-suporte. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os suportes quitosana ativada com glutaraldeído, Amberlite IR[®] 120 e argila montmorilonita, com capacidades de adsorção de 25,4, 6,2 e 2,3 U/g de suporte, respectivamente. Já em relação a estabilidade operacional do derivado quitosana ativada com glutaraldeído, foi verificado que a enzima manteve 53,48% de sua atividade enzimática residual ao final do quarto ciclo. Desta forma, pode-se verificar que o processo de imobilização foi realizado com êxito, indicando assim, que a protease imobilizada pode ser uma alternativa em aplicações industriais.

Palavras-chave: Enzima. Matriz. Capacidade de adsorção. Reuso.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas vêm sendo amplamente estudadas como catalisadores com sucesso na indústria de alimentos, em produtos farmacêuticos, agroquímicos e na síntese química de compostos orgânicos (KRAJEWSKA, 2004). Elas apresentam características que fazem seu uso vantajoso, em comparação com catalisadores químicos convencionais, como elevada eficiência catalítica e alto grau de especificidade. Estas moléculas aceleram reações termodinamicamente favorecidas, sendo extremamente versáteis, estereoespecíficas e de importância em processos biotecnológicos (BASÍLIO, 1994; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Sua especificidade garante que a reação catalisada não seja perturbada por reações secundárias, resultando na formação do produto final desejado, o que proporciona um maior rendimento da reação, reduzindo os custos de produção (KRAJEWSKA, 2004; ZENTGRAF; AHERN, 1991).

As enzimas geralmente atuam em condições moderadas de temperatura, pressão e pH, com velocidades de reação na mesma ordem dos catalisadores químicos em condições extremas (KRAJEWSKA, 2004; MENDES et al., 2011). Embora o emprego de enzimas em processos industriais seja bastante utilizado, sua aplicação pode ser limitada por fatores como seu elevado custo, instabilidade catalítica e a dificuldade de recuperação ao final dos processos industriais. Muitas destas restrições podem ser evitadas pela utilização de enzimas imobilizadas, o que as tornam mais vantajosa para a catálise do que a utilização de enzimas livres (SALEEM et al. 2005; SHIRIVAS et al., 2012).

A imobilização é uma ferramenta interessante para melhora da atividade e estabilidade de enzimas, permitindo sua reutilização. Assim, a seleção de métodos e suportes é uma etapa importante do processo para obtenção de biocatalisadores com elevada seletividade e estabilidade térmica (GUISAN, 2006; GUIAN, 2013; MENDES, 2009). Os componentes principais de um sistema de enzima imobilizada são a enzima, a matriz e o modo de ligação. As enzimas podem ser ligadas ao suporte por interações através de adsorção física, de ligações iônicas, covalentes ou de inclusão (GUISAN, 2006). As propriedades da enzima imobilizada são determinadas pelas características da enzima e do material do suporte. A interação específica entre a enzima e o suporte promove uma imobilização com distintas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Dentre as enzimas utilizadas industrialmente, as proteases apresentam uma expressiva importância econômica, uma vez que correspondem a 60-65% do mercado global (VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014). As proteases são utilizadas no

processamento de alimentos, como carnes, pães e produtos lácteos, na produção de detergentes, na indústria farmacêutica, de couro e na síntese de hidrolisados proteicos e obtenção de peptídeos bioativos (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; BASILIO, 1994; BRANDELLI, 2008; CORRÊA et al., 2011). No grupo das bactérias Gram-positivas, representantes do gênero *Bacillus* destacam-se como importantes produtores de proteases (CORRÊA; DAROIT; BRANDELLI, 2010; GIONGO et al., 2007; WERLANG; BRANDELLI, 2005).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização de protease parcialmente purificada obtida a partir do cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, avaliando-se diferentes métodos e suportes (Amberlite IR[®] 120, argila montmorilonita, quitosana, quitosana e glutaraldeído, Eupergit[®] C, DEAE- Cellulose[®] e QAE-Sephadex[®]), bem como a estabilidade operacional do derivado imobilizado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO, INÓCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA

O micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474) foi utilizado na produção da enzima. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadrava-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) em um meio mineral contendo (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43,0) como substrato, a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

A enzima foi parcialmente purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB)

integrado ao processo de diafiltração para remoção de polietilenoglicol (PEG). O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20% de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² e a 15°C. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

2.3 ELETROFORESE

A eletroforese da enzima bruta e parcialmente purificada foi realizada em gel de acrilamida (12%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com o método de Laemmli (1970). As amostras foram misturadas numa relação de 1:1 ao tampão de desnaturação contendo β-mercaptoetanol, aquecidas à 100°C por 5 min e aplicadas no gel. O procedimento ocorreu a 150 V e o gel foi submetido a coloração com nitrato de prata. O marcador de baixo peso molecular (GE Healthcare Life Science) foi utilizado no gel, com marcadores que variam desde 14,4 até 97,0 kDa.

2.4 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

A protease parcialmente purificada foi imobilizada através de 7 diferentes metodologias com a finalidade de avaliar a capacidade de adsorção da enzima ao suporte.

2.4.1 Imobilização em Amberlite IR® 120: 4 g da resina catiônica foram equilibradas em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0) e incubadas com 20 mL de extrato enzimático preparado no mesmo tampão a 10°C por 8 h. As enzimas não ligadas foram removidas através de lavagem com o mesmo tampão (adaptado de ABDEL-NABY et al., 1998).

2.4.2 Imobilização em argila montmorilonita: 2 g do suporte foram adicionados em 25 mL de extrato enzimático preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0. A solução foi mantida sobre agitação a 10°C por um tempo reacional de 2 h. Após o término do processo de adsorção, a solução foi filtrada a vácuo (adaptado de BRAGA et al., 2014).

2.4.3 Imobilização em quitosana: 2 g de suporte foram adicionados em 25 mL de extrato enzimático preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0 e mantido sob agitação à 10°C por 12 horas. As enzimas não ligadas foram removidas através de lavagem utilizando o mesmo tampão (adaptado de ABDEL-NABY et al., 1998).

2.4.4 Imobilização em esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído: Para o preparo das esferas de quitosana foram utilizados 2 g de quitosana dissolvida em 100 mL de ácido acético 1,5% (v/v), e aquecida a 60°C por 1 h a 150 rpm. A solução viscosa produzida foi sonicada durante 30 minutos para remoção de bolhas de ar e, em seguida, gotejadas com auxílio de uma seringa, a uma taxa constante, dentro de uma solução de neutralização contendo 1 mol/L de KOH. As esferas formadas foram lavadas com água Milli Q até a solução se tornar neutra. Posteriormente, a solução foi estocada a 4°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 até a ativação com glutaraldeído (GA). Para a ativação das esferas com GA, as mesmas foram incubadas a 30°C e 100 rpm com 50 mL de 40 g/L de GA durante 10 h. Depois da etapa de ativação, as esferas foram lavadas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 para remoção do excesso de GA e armazenadas a 4°C no mesmo tampão. Para a imobilização da enzima 1 g de esferas úmidas foram incubadas com 25 mL de extrato enzimático preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 por 12 h, à 10°C. Após a incubação, as esferas foram lavadas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 para remoção das enzimas não ligadas, e armazenadas a 4°C (adaptado de SILVEIRA et al., 2012).

2.4.5 Imobilização em Eupergit® C: 0,8 g de suporte foram adicionados a 20 mL de extrato enzimático preparado em tampão Tris HCl 2 M, pH 7,0. A solução foi mantida sob agitação à 10°C, por tempo reacional de 12 h. Após o término do processo, a solução foi filtrada a vácuo (adaptado de BRAGA et al., 2014).

2.4.6 Imobilização em DEAE-Cellulose®: 4 g de resina aniônica foram equilibradas em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) e adicionados a 20 mL de extrato enzimático preparado no mesmo tampão. A solução foi mantida sob agitação a 4°C, por tempo reacional de 12 h (adaptado de FARAG; HASSAN, 2004).

2.4.7 Imobilização em QAE-Sephadex®: 4 g de resina aniônica foram equilibradas com tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 8,0) e adicionados a 20 mL de extrato enzimático preparado no

mesmo tampão. A solução foi mantida sob agitação a 4°C, por tempo reacional de 12 h (adaptado de FARAG; HASSAN, 2004).

2.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional foi composta por tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), azocaseína e extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio. Ensaios controles, sem a adição dos suportes, foram realizados nas mesmas condições de tratamento para quantificar a atividade enzimática durante a reação.

A capacidade de adsorção da enzima imobilizada, definida pela enzima ativa (U) efetivamente ligada ao suporte, foi determinada através da medida da atividade enzimática em meio reacional composto por azocaseína em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e o derivado imobilizado (em g). A capacidade de adsorção foi expressa em quantidade de enzima imobilizada em U/g de suporte.

2.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL DA PROTEASE IMOBILIZADA

O reuso do derivado selecionado foi monitorado através do acompanhamento de alterações na atividade da protease imobilizada, o qual foi repetidamente usado na reação enzimática à 30°C, utilizando azocaseína como substrato. Depois de cada teste, o derivado imobilizado foi lavado no mesmo tampão e o processo de hidrólise reiniciado.

2.7 TRATAMENTO DE RESULTADOS

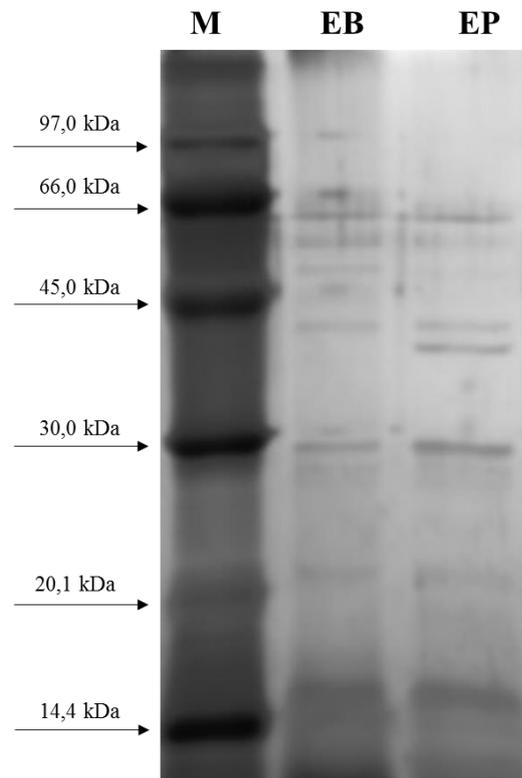
Os ensaios realizados em triplicatas foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste *Tukey* através do software Statistica (Statsoft, EUA). A análise estatística foi realizada considerando um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima protease foi purificada a partir de um protocolo composto de poucas operações unitárias, conforme estabelecido por Sala et al. (2014). Daroit et al., (2010) purificaram a protease de *Bacillus* sp. P45 por cromatografia de troca iônica e, através do perfil eletroforético da enzima, observaram uma massa molecular de aproximadamente 26 kDa. Sala et al. (2014) purificaram a mesma enzima utilizando uma estratégia que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrado ao processo de diafiltração e, através do perfil de eletroforese, verificaram a presença da enzima de massa molecular de aproximadamente 28 kDa.

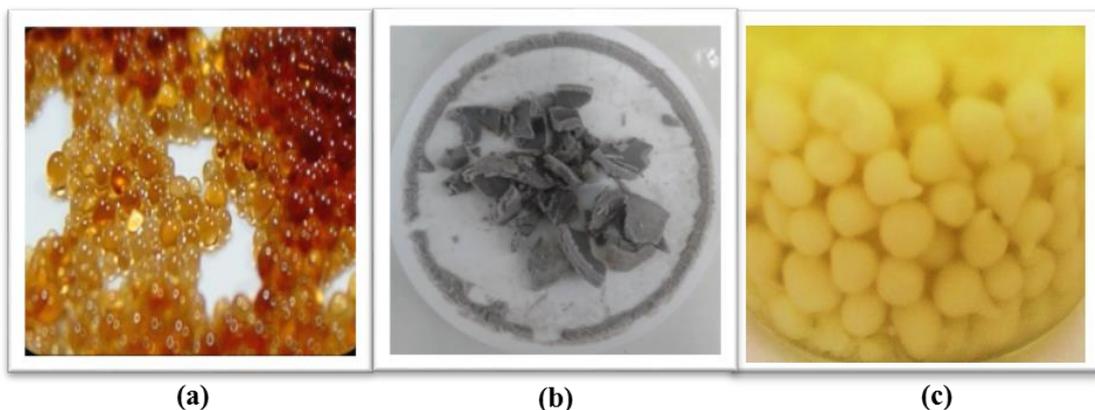
No perfil de eletroforese apresentado na Figura 1, pode-se observar que a enzima bruta (sem purificação) apresentou mais bandas quando comparada à enzima purificada, sendo que pelo menos cinco proteínas são comuns à enzima bruta e à purificada, com massa molecular de, aproximadamente, 62 kDa, 43 kDa, 29 kDa, 21 kDa e 16 kDa. As proteínas, com respectivas massas moleculares encontradas no presente trabalho mostram-se de acordo com o observado na literatura. Geralmente, as enzimas são produzidas em um conjunto com muitas outras proteínas semelhantes (algumas com atividade catalítica indesejada) que podem causar a diminuição da atividade, da especificidade e da enantio ou regioseletividade da catálise. Portanto, as estratégias de purificação podem melhorar a interação enzima-suporte nos processos de imobilização, evitando que a superfície do suporte não seja ocupada por outras proteínas (BARBOSA et al., 2015). Com base nisso, optou-se pelo emprego da enzima parcialmente purificada para o processo de imobilização.

Figura 1 – Eletroforese da protease bruta e purificada produzida pelo *Bacillus* sp. P45. Marcador de massa molar (M); enzima bruta (EB) e enzima parcialmente purificada (EP)



As metodologias e os suportes foram selecionados baseados em trabalhos da literatura com imobilização de proteases e outras enzimas (ABDEL-NABY et al., 1998; ANWAR et al., 2009; BRAGA et al., 2014; FARAG; HASSAN, 2004; KHAN et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012). A Figura 2 apresenta os derivados imobilizados nos suportes Amberlite IR 120, argila montmorilonita e quitosana ativada com glutaraldeído.

Figura 2 – Imobilização de protease de *Bacillus* sp. P45 em (a) Amberlite IR[®] 120, (b) argila montmorilonita e (c) quitosana ativada com glutaraldeído



Os suportes quitosana, Eupergit® C, DEAE- Cellulose® e QAE-Sephadex® não apresentaram capacidade de adsorção à enzima. Os resultados obtidos nos demais suportes avaliados estão apresentados na Tabela 1, onde pode-se verificar que para a imobilização da protease, o resultado mais promissor foi obtido a partir da utilização do suporte quitosana ativado com glutaraldeído, com atividade enzimática de 25,4 U/g de suporte, sendo este valor quatro vezes superior ao segundo melhor resultado, Amberlite IR® 120.

Tabela 1- Imobilização de protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P45

Suporte	Capacidade de adsorção da enzima imobilizada (U/g suporte)
Amberlite IR® 120	6,2 ± 0,13 ^b
Argila montmorilonita	2,3 ± 0,29 ^c
Quitosana e glutaraldeído	25,4 ± 0,24 ^a

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ao nível de 95% de confiança

A técnica de imobilização por adsorção física é considerada uma técnica simples, que envolve interações iônicas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o suporte e a enzima (BASILIO, 1994; KRAJEWSKA, 2009; MIKKELSEN; CORTÓN, 2004). Porém, esta técnica não foi tão promissora, uma vez que a enzima imobilizada em quitosana não apresentou atividade enzimática. Além disso, quando utilizou-se argila montmorilonita, esta apresentou baixa atividade enzimática (2,3 U/g de suporte). Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que essas interações sejam reversíveis e superficiais, podendo levar a dessorção, ocasionando perdas significativas na atividade enzimática do derivado imobilizado (KRAJEWSKA, 2009).

A utilização da resina catiônica Amberlite IR® 120 apresentou uma imobilização com atividade enzimática de 6,2 U/g de suporte. Abdel-Naby et al. (1998) encontraram comportamentos semelhantes para imobilização de protease de *Bacillus mycoides* em resinas DEAE-Celulose, Dowex 1x4 e Eceola-Celulose (5,9, 8,7 e 8,8 U/g de suporte, respectivamente). A técnica de adsorção iônica envolve parâmetros que dependem da competição entre os íons do composto de interesse pelos grupos carregados do suporte utilizado. Analisando-se esses parâmetros pode-se favorecer ou não a imobilização enzimática. Além disso, é necessário observar o ponto isoelétrico da enzima, bem como o pH do tampão utilizado

na imobilização, que deve ser ajustado para favorecer a adsorção da enzima no suporte. O resultado encontrado nesta técnica de imobilização pode ser explicado devido ao fato de o pH do tampão do meio reacional (7,0) apresentar-se acima do pI estimado para a protease produzidas por *Bacillus* (6,3), ou seja, no decorrer da imobilização a enzima pode ter apresentado carga líquida negativa, e os melhores valores de adsorção ocorreriam com o uso de matrizes aniônicas (YANG et al., 2000). O uso de um suporte catiônico, possivelmente, acarretou no desprendimento da enzima no suporte durante o processo.

Por fim, a imobilização por ligação covalente através de um grupo espaçador (glutaraldeído e quitosana) apresentou a maior capacidade de adsorção da enzima (25,4 U/g). A introdução de um espaçador contribui para a hidrofilição do microambiente da enzima, proporcionando um aumento na estabilidade desse catalisador. Sabendo que a atividade enzimática é dependente da manutenção da conformação flexível da molécula, a introdução de um espaçador entre a enzima e a superfície do carregador é utilizada para reduzir a perda na atividade em função da imobilização (CAO, 2005; JESIONOWSKI ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

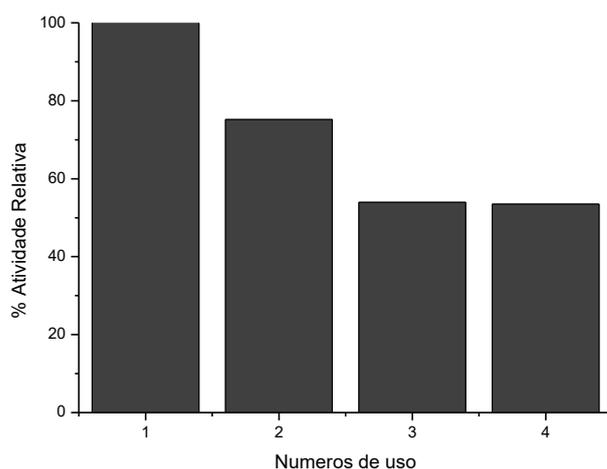
Diversos autores relatam que a utilização da ligação covalente com grupo espaçador em processos de imobilização de enzimas é uma técnica empregada com sucesso (BISSETT; DAVID, 1978; ÇETINUS; ÖZTOP, 2003). Porém, a maior parte dos dados encontrados na literatura referem-se apenas a imobilização de outras enzimas, sendo que o estudo em proteases ainda é escasso. BHANDARI; GUPTA e SINGH (2011) observaram uma melhor estabilidade enzimática de uma protease purificada imobilizada em quitosana e glutaraldeído, produzindo um biocatalisador com melhores características e com estabilidade operacional, comparado à enzima solúvel.

A partir dos resultados da capacidade de adsorção de enzimas ao suporte, avaliou-se a estabilidade operacional da melhor técnica de imobilização (quitosana ativada com glutaraldeído). O resultado do reuso pode ser observado através da Figura 3.

A possibilidade de reuso da protease imobilizada é uma característica importante para aplicação industrial. Assim, para demonstrar a estabilidade operacional da enzima imobilizada, foram realizados repetidos ciclos de hidrólise utilizando as mesmas esferas imobilizadas. O derivado imobilizado permaneceu com 53,48% de sua atividade residual após quatro ciclos de utilização. A diminuição de atividade enzimática a cada ciclo provavelmente ocorreu pela perda do suporte a cada lavagem e novo reciclo. Esse resultado pode confirmar que a enzima imobilizada possui estabilidade, podendo então ser utilizada consecutivamente em processos industriais, demonstrando que esta técnica de imobilização se mostra promissora,

indicando a necessidade de estudos futuros envolvendo parâmetros cinéticos, a fim de maximizar e melhorar o processo de imobilização.

Figura 3 – Estabilidade operacional da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada em esferas de quitosana ativada com glutaraldeído



Vieira (2009) encontrou comportamento distinto ao imobilizar a enzima β -galactosidase em quitosana ativado por glutaraldeído, observando a perda de 17% da atividade enzimática ao final do quarto ciclo. Singh et al. (2011), em seu estudo de imobilização em quitosana e glutaraldeído de uma cisteína protease (Procerain B), relataram estabilidade operacional de 10 ciclos, com perda de até 50% de atividade residual. Silveira et al. (2012) encontraram resultados semelhantes a este trabalho, através da imobilização de uma protease de *Chryseobacterium* sp. kr6 em quitosana e glutaraldeído, com uma estabilidade operacional de 5 ciclos, com perda de 63,4% de atividade inicial.

Os resultados apresentados neste trabalho, ainda que preliminares, demonstram a possibilidade de imobilizar a protease de *Bacillus* sp. P45. Apesar disso, são necessários mais estudos, buscando alternativas para melhorar a capacidade de adsorção e estabilidade da enzima imobilizada, como a utilização de matrizes e condições do meio mais adequadas.

5 CONCLUSÃO

Dentre as diferentes técnicas e suportes utilizados para promover a imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45, o melhor resultado foi obtido a partir da utilização do suporte quitosana ativado com glutaraldeído, o qual apresentou capacidade de adsorção de 25,4 U/g de

suporte e estabilidade operacional de 4 ciclos com manutenção de 53,48% de sua atividade enzimática residual, indicando que a protease imobilizada pode ser uma alternativa para aplicações industriais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M.A.; ISMAIL, A-M.; S., AHMED, S.A.; FATTAH, A.F.A. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 205- 210, 1998.

ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, 0. 175-183, 1998.

ANWAR, A.; QADER, A.U.; RAIZ, A.; IQBAL, S.; AZHAR, A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, n. 7, v.10, p. 1281-1286, 2009.

BASÍLIO, C.A. **Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro**. 1994. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BHANDARI, S.; GUPTA, V.K.; SINGH, H. Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 1, p. 71-77, 2009.

BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* beta-glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 750-755, 1978.

BON, E.P; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B., COELHO, R.R.R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 506p., 2008.

BRAGA, A.R.C.; SILVA, M.F.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; KALIL, S.J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on eupergit C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**. Holanda. Ed. Wiley-VCH, 580p., 2005.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Ed. Epub, Rio de Janeiro, 288p., 2008.

CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from a Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.

CORRÊA, A.P.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2247-2254, 2011.

ÇETINUS, Ş.-A.; ÖZTOP, H. N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p. 889-894, 2003.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonia bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 85-93, 2004.

GIONGO, J.L.; LUCAS, F.S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 375-382, 2007.

GUIBAN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**. 3rd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 375p., 2013.

GUIBAN, J.M. **Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells**. 2nd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 449 p. 2006.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, J. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v.20, p. 801-821., 2014.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E.N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28-38, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chiton-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRAJEWSKA, B. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilization: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 22-40, 2009.

MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIKKELSEN, S.R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical chemistry**. Ed. JohnWiley & Sons, Inc., New Jersey, 375p., 2004.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G.V.; YOUNAN, F.F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C.C., KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

SALEEM, M.; RASHID, M. H.; JABBAR, A.; PERVEEN R., KHALID, A. M.; RAJOKA, M. I. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 849-855, 2005.

SINGH, A.N.; SINGH, S.; SUTHAR, N.; DUBEY, V.K. Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, Procerain B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n. 11, p. 6256-6262., 2011.

SHRINIVAS, D.; KUMAR, R.; NAIK, G.R. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 93-98, 2012.

SILVEIRA, S.T.; GEMELLI, S.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. Strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 818-825, 2012.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized enzymes: methods and applications**. Biocatalysis from Discovery to Application. Topics in Current Chemistry, v. 200, p. 95-126, 1999.

VIEIRA, D.C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009, 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

WERLANG, P.O.; BRANDELLI, A. Characterization of novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, p. 71-80, 2005.

YANG, J.K.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 406-413, 2000.

ZENTGRAF, B.; AHERN, T.J. Practical importance of enzyme stability. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1527-1540, 1991.

ARTIGO 2

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA
DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM GLIOXIL-AGAROSE**

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM GLIOXIL-AGAROSE

RESUMO

Uma característica indesejada na utilização de enzimas na forma livre como catalisador é sua baixa estabilidade. Assim, nos últimos anos, diferentes suportes e tecnologias tem sido implementados para melhorar a aplicação industrial de enzimas, destacando-se a imobilização, onde as propriedades da enzima imobilizada são controladas pelas características da enzima e do material do suporte. No entanto, a enzima pode ter sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte, dificultando o acesso ao substrato, o que pode levar a redução da atividade. Uma abordagem que vem sendo utilizada para melhoria da estabilidade enzimática durante o processo de imobilização é o uso de ligações covalentes multipontuais entre os grupos funcionais da enzima e os respectivos grupos reativos do suporte. Neste contexto, a agarose destaca-se como um biopolímero bastante utilizado neste tipo de imobilização de enzimas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 através de ligações covalentes multipontuais utilizando o suporte glioxil-agarose. A enzima foi produzida por cultivo submerso utilizando *Bacillus* sp. P45 e parcialmente purificada por sistema aquoso bifásico e ultrafiltração/diafiltração. A protease foi imobilizada nos suportes glioxil-agarose e bromocianógeno (CNBr). A imobilização em glioxil-agarose resultou em rendimentos de 41,6% em 6 h e 42,1% em 24 h de ensaio, sendo que a capacidade de adsorção deste suporte foi de 16,2 U/g. A temperatura ótima e o pH foram de 30°C e 9,0, respectivamente. A enzima imobilizada em glioxil-agarose foi mais estável em todas as temperaturas (25, 30, 40 e 50°C) em termos de K_d e $\frac{1}{2}$ vida, quando comparada ao suporte de referência (CNBr). O valor de K_m encontrado para a protease imobilizada em glioxil-agarose foi de 1,15 mg.mL⁻¹.

Palavras-chave: Ligação covalente. Imobilização multipontual. Caracterização enzimática.

1 INTRODUÇÃO

As proteases apresentam grande importância no mercado global de enzimas, sendo utilizadas na indústria de alimentos, no setor farmacêutico, na indústria de detergentes e na indústria têxtil, atuando nos processos de depilação e transformação do couro (BON et al., 2008; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; VERMA et al., 2011; VIJAYARAGHAVAN; LAZARUS; VINCENT, 2014). Porém, uma característica indesejada na utilização de enzimas na forma solúvel como catalisador industrial é sua baixa estabilidade.

Nos últimos anos, diferentes suportes e tecnologias têm sido implementados para melhorar a aplicação industrial de enzimas, destacando-se a técnica de imobilização. Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras: podem ser imersas em gel ou microcápsulas; adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica, copolimerizadas com algum monômero; ligadas à uma matriz polimérica insolúvel e ainda por ligações covalentes (DALLA-VECHIA et al., 2004; GUISAN, 2006). As propriedades da enzima imobilizada são controladas pelas características da enzima e do material do suporte. A interação específica entre a enzima e o suporte promove uma imobilização com distintas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas. Desta forma, o processo de imobilização deve ser conduzido de modo que se permita que a enzima mantenha sua conformação ativa e necessária flexibilidade catalítica (TISCHER; WEDEKIND, 1999).

Todavia, a enzima pode ter sua mobilidade restringida pelo fato de estar ligada a um suporte, dificultando o acesso da mesma ao substrato, o que pode levar a redução da atividade por limitações de acessibilidade do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida. Além disso, pode ocorrer também acúmulo de produto na proximidade do sítio ativo, o que pode afetar a cinética da reação, pela redução da velocidade de reação ou alteração do pH do microambiente da enzima (PESSOLA et al., 2007).

Uma abordagem que vem sendo utilizada para melhorar a estabilidade enzimática durante o processo de imobilização é o uso de ligações covalentes multipontuais entre os grupos funcionais da enzima e os respectivos grupos reativos do suporte. Quando uma enzima se liga através de resíduos da superfície de um suporte rígido, com o auxílio de braços espaçadores curtos, a estabilidade da estrutura tridimensional da enzima imobilizada pode ser maior. Um aspecto importante refere-se às mudanças conformacionais que algumas enzimas apresentam durante a catálise, ou seja, quando imobilizadas podem apresentar distorções em seu sítio ativo, alterando sua atividade catalítica. Logo, as distâncias relativas entre os resíduos envolvidos na imobilização multipontual devem ser mantidos inalterados durante qualquer mudança

conformacional induzida por agentes de distorção (como calor, solventes orgânicos, valores extremos de pH, etc.). Desta forma, a intensidade das mudanças conformacionais envolvidas na inativação da enzima pode ser reduzida e o processo de imobilização pode torna-se fortemente estabilizado (GUISAN, 2013; MATEO et al., 2007).

A agarose é um biopolímero bastante utilizado na imobilização de enzimas. Diversos estudos são relatados na literatura mostrando a aplicação desse suporte para a imobilização multipontual de enzimas (BENASSI et al., 2013; BOLIVAR et al.; 2006; GUISAN, 1988; MATEO et al., 2006; MENDES, 2009; VIEIRA et al., 2011). Cabe salientar que ainda não há relatos na literatura em relação a imobilização multipontual de proteases, ressaltando a importância desse estudo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 através de ligações covalentes multipontuais utilizando o suporte glioxil-agarose, bem como determinar os parâmetros de estabilidade térmica e cinética enzimática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICRO-ORGANISMO, INOCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA

O micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474) foi utilizado na produção da enzima. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadrava-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) em um meio mineral contendo (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43,0) como substrato, a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

A enzima foi parcialmente purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrado ao processo de diafiltração para remoção de polietileno glicol (PEG). O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20% de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² e a 15°C. A enzima parcialmente purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

2.3.1 Imobilização enzimática em CNBr ativado

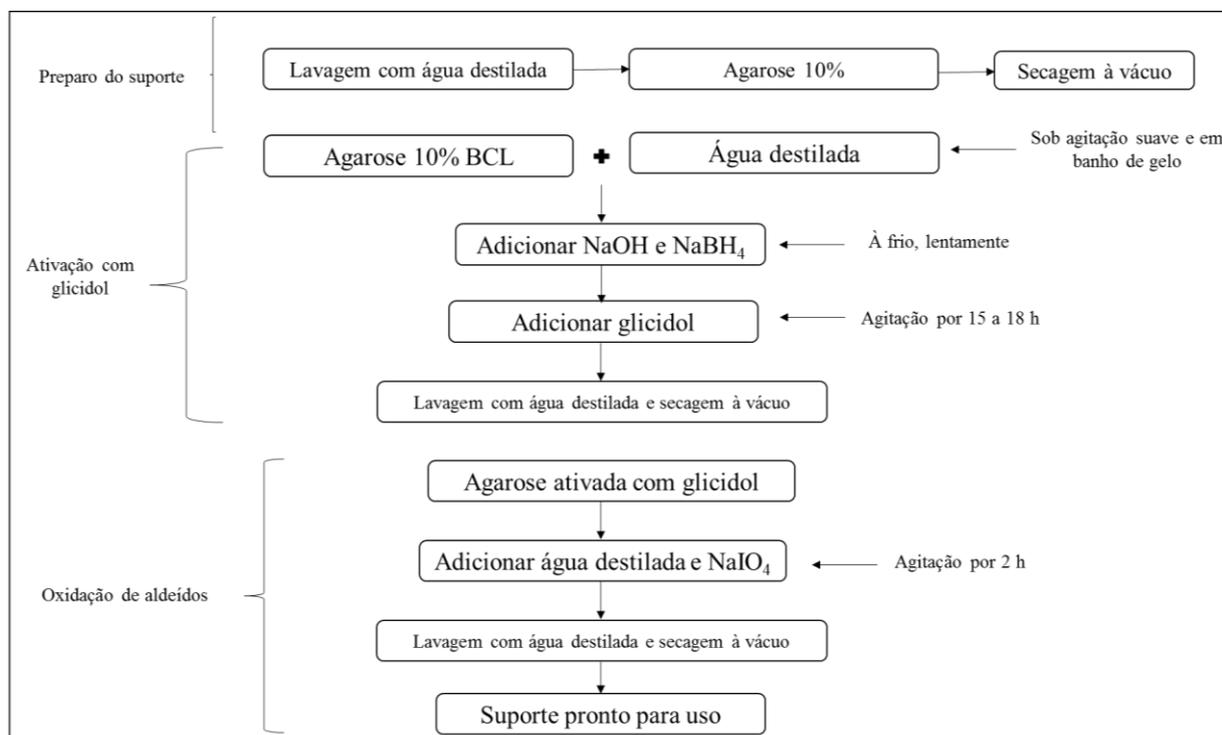
O suporte bromocianógeno (CNBr) foi preparado de acordo com o protocolo da GE Healthcare Life Science. Um grama do suporte CNBr – activated SepharoseTM 4B foi adicionado à solução de 10 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 por 10 minutos à 4°C sob agitação suave.

2.3.2 Imobilização enzimática em glioxil-agarose

O suporte glioxil-agarose foi preparado de acordo com a metodologia de Guisán (1988), conforme ilustra a Figura 1. Agarose 10% foi lavada com água destilada e seca à vácuo, para remoção do etanol. Em seguida, adicionou-se 6 mL de água destilada em 21 g de agarose e manteve-se a suspensão sob suave agitação mecânica em banho de gelo. Em seguida, 10 mL de uma solução NaOH 1,7 N, previamente fria, contendo 0,285 g de borohidreto de sódio, em banho de gelo para evitar perda do agente redutor por liberação de hidrogênio, foi adicionado à suspensão de agarose sob agitação. Gotejou-se lentamente 7,2 mL de glicidol e manteve-se a suspensão sob suave agitação em recipiente aberto por 15 a 18 h. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi lavado com água destilada na razão $V_{\text{suporte}}/V_{\text{suspensão}}$ igual a 1/10. Para 21 g de suporte foram adicionados 1,6 g de periodato de sódio. Após 2 h de agitação a temperatura

ambiente, o suporte glioxil agarose foi finalmente lavado com água destilada, seco à vácuo e estocado à 4°C.

Figura 1 - Fluxograma do preparo do suporte glioxil-agarose



Para a imobilização foi adicionado 5 g de suporte à 50 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 à 15°C. Periodicamente, amostras da suspensão e do sobrenadante foram retiradas e suas atividades determinadas. Um ensaio controle, sem adição do suporte, foi realizado nas mesmas condições mencionadas anteriormente para avaliar possível perda de atividade por desnaturação da enzima durante o processo. Após o processo de imobilização, o derivado foi lavado utilizando o mesmo tampão, com a finalidade de eliminar moléculas de proteínas que não tenha se ligado ao suporte.

2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional foi composta por tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0),

azocaseína e extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio.

A capacidade de adsorção da enzima imobilizada, definida pela enzima ativa (U) efetivamente ligada ao suporte, foi determinada através da medida da atividade enzimática em meio reacional composto por azocaseína em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e o derivado imobilizado (em g). A capacidade de adsorção foi expressa em quantidade de enzima imobilizada em U/g de suporte.

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado de acordo com Filho et al. (2008) (Equação 1).

$$RI = 100 - 100x \left(\frac{\text{Atividade no sobrenadante da suspensão de imobilização}}{\text{Atividade na suspensão}} \right) \quad (1)$$

2.5 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

O efeito do pH na atividade da enzima imobilizada foi determinado através da atividade enzimática em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0 utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 4,0 – 6,0) e bicarbonato de sódio 50 mM (pH 7,0-10,0) à 15°C.

O efeito da temperatura foi verificado através da determinação da atividade enzimática nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C em pH 7,0. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), considerando-se 100% o ponto de maior atividade.

2.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi avaliada nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C e em pH 7,0 para cada condição. A atividade relativa foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo natural da atividade *versus* tempo, a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas ($t_{1/2}$) foram estimadas utilizando a Equação 2. A meia vida é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50% do valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{K_d} \quad (2)$$

2.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$, a atividade da enzima imobilizada foi avaliada em diferentes concentrações do substrato azocaseína (2-10 mg/mL). O efeito da concentração do substrato na atividade pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten (Equação 3).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3)$$

Linearizando-se a equação de Michaelis-Menten, obtêm-se a Equação 4:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

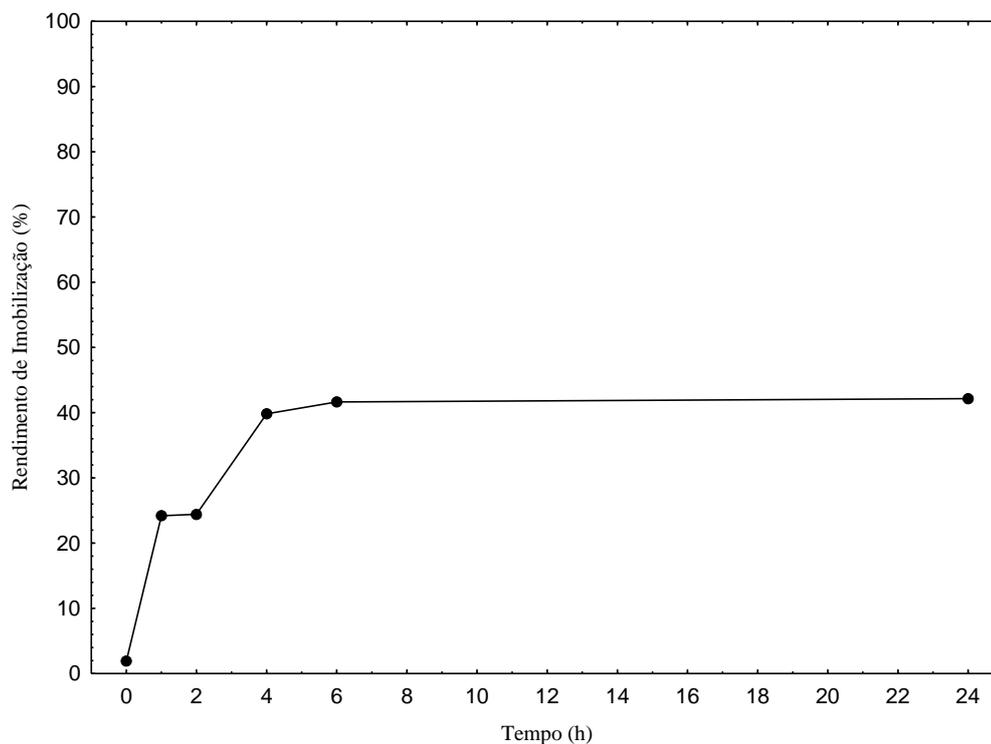
Através do coeficiente angular e linear da Equação 4, foram obtidos os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. O valor de K_m corresponde à concentração de substrato necessário para atingir a metade da velocidade máxima enzimática (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Na Figura 2, é possível observar os rendimentos da imobilização ao decorrer de 24 h. Os maiores rendimentos foram obtidos em 6 e 24 h horas de ensaio, com 41,6 e 42,1% de rendimento, respectivamente. A capacidade de adsorção deste suporte foi de 16,16 U/g e não houve desprendimento da enzima no suporte ao longo do processo de imobilização.

Figura 2 – Cinética de imobilização de protease de *Bacillus* sp. P 45 no suporte glioxil-agarose



Na literatura, não são encontrados estudos envolvendo a imobilização de proteases em glioxil-agarose. Porém, comparando com outras enzimas, foram observados comportamentos semelhantes ao presente trabalho, onde as enzimas imobilizadas através de ligações covalentes multipontuais apresentaram maior estabilidade. No estudo de Bolivar et al. (2006), a imobilização de dehidrogenase em glioxil-agarose ocorreu em apenas 1,5 h de ensaio. Os mesmos autores relataram que, quando a enzima foi deixada em contato com o suporte por mais tempo, foi possível observar novas ligações entre suporte e enzima, promovendo um aumento na estabilidade do derivado.

Mendes (2009) avaliou a imobilização de diversas lipases em glioxil-agarose e obteve rendimentos de imobilização de 26,8% e 43% para as enzimas obtidas de *Thermomyces lanuginosus* e de *Candida antarctica* B, respectivamente, em 24 h de experimento. Sousa (2015) relatou rendimento de 55,5% na imobilização de L-arabinose isomerase.

A enzima também foi imobilizada em CNBr, processo bastante utilizado para muitas enzimas, pois é um método que permite a imobilização covalente unipontual de enzimas em condições suaves. O derivado resultante permite o estudo das proteínas, sem fatores de agregação molecular que podem alterar a inativação enzimática, fato este recorrente na enzima solúvel. Além disso, este suporte permite o estudo dos mecanismos de inativação apenas das

propriedades da enzima (dissociação da estrutura quaternária, distorção da estrutura terciária, desorganização da estrutura secundária). A imobilização de uma enzima no interior de uma estrutura porosa como o CNBr ativado pode promover efeitos estabilizadores, impedindo interações entre moléculas ou proteínas. Com o uso desse derivado, é possível obter uma forma da enzima com as menores alterações possíveis de sua conformação nativa, provocadas pelo processo de imobilização ao mesmo tempo que, diferentemente do que ocorre na enzima solúvel, este derivado geralmente reproduz melhor as condições a serem testadas com imobilizações durante os ensaios da atividade (BOLIVAR et al., 2012; BOLIVAR et al., 2006; TAVANO, 2006). Baseados nestes fatores, optou-se por utilizar o CNBr ativado para comparação da estabilidade alcançada na imobilização utilizando glioxil- agarose, uma vez que o derivado CNBr tem sido utilizado frequentemente por vários autores como referência para os estudos de imobilização enzimática (DA SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; VIEIRA et al., 2011).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

3.3.1 Temperatura e pH ótimos

A temperatura exerce efeitos contrários sobre a atividade enzimática, aumentando, por um lado, a reatividade do complexo ativo Enzima:Substrato (ES) e, por outro lado, aumentando a velocidade da inativação enzimática como consequência da alteração da estrutura tridimensional da enzima (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A protease imobilizada em CNBr apresentou temperatura ótima de 25°C (Figura 3) e pH ótimo em 8,0 (Figura 4). Na Figura 5 é possível observar a temperatura ótima para o derivado (glioxil-agarose), com máxima atividade enzimática em 30°C, valor esse superior ao derivado de referência (CNBr).

Figura 3 – Perfil de temperatura da protease produzida por *Bacillus* sp. P45 imobilizada em CNBr

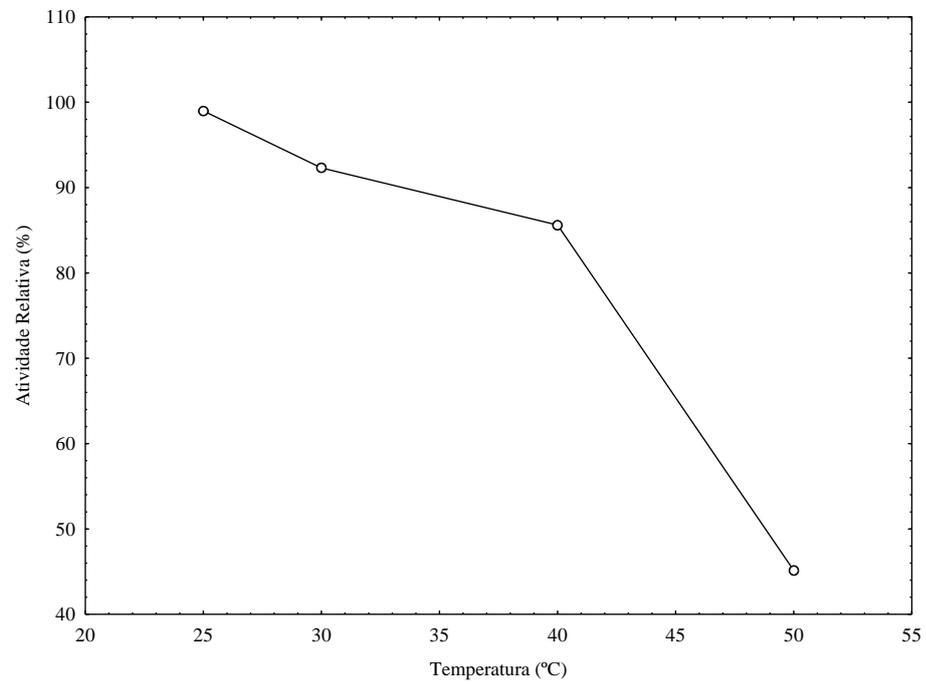


Figura 4 – Perfil de pH da protease produzida por *Bacillus* sp. P45 imobilizada em CNBr

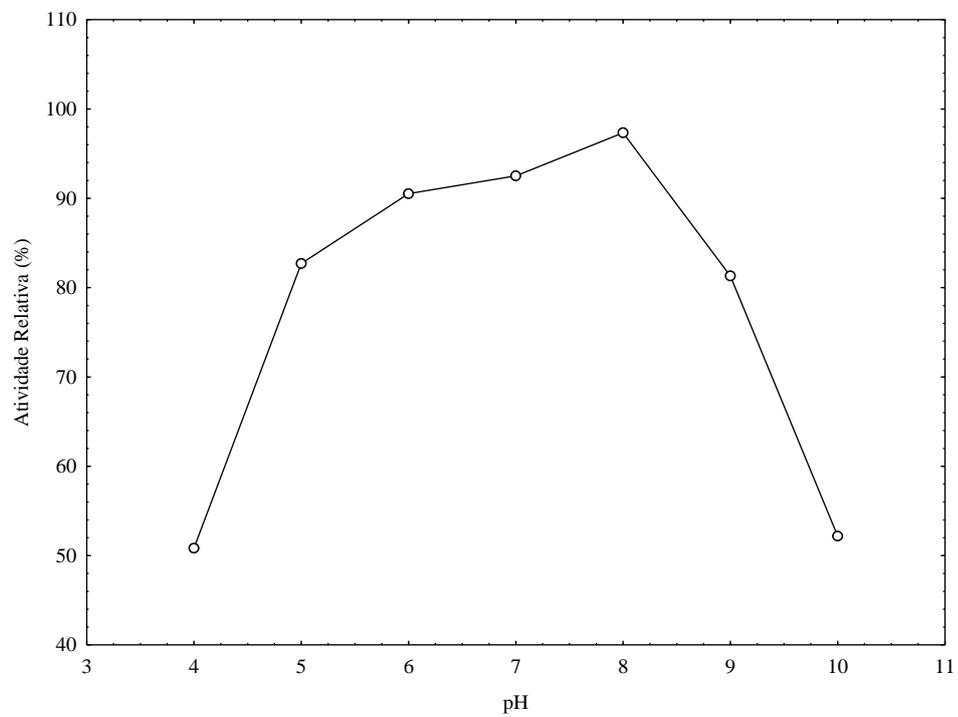
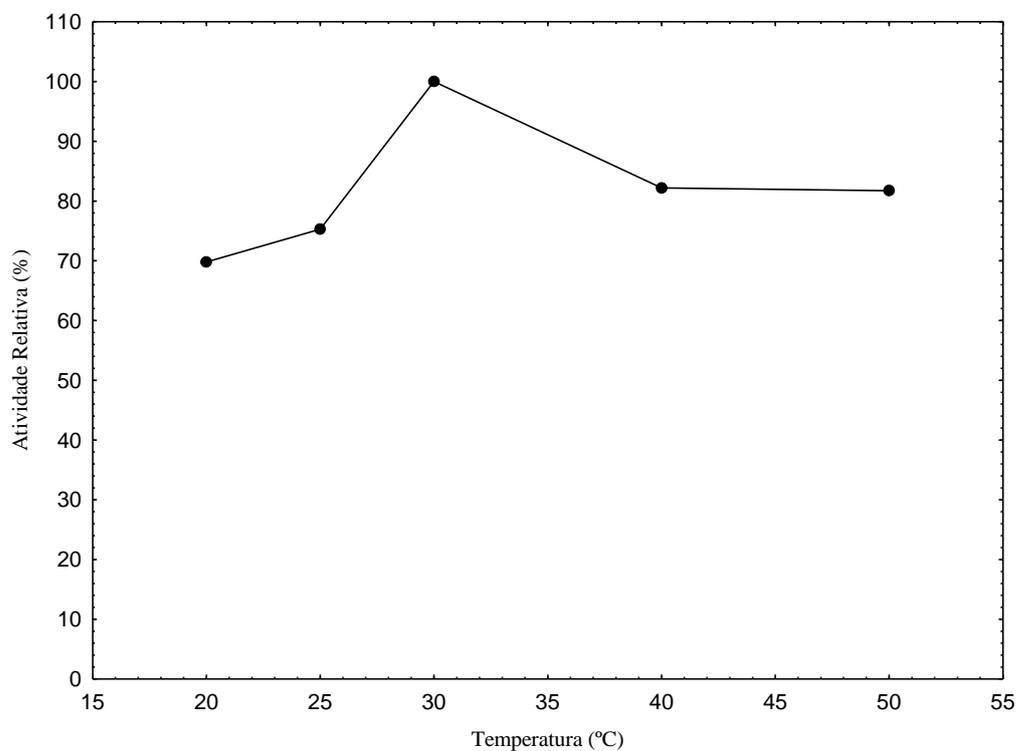
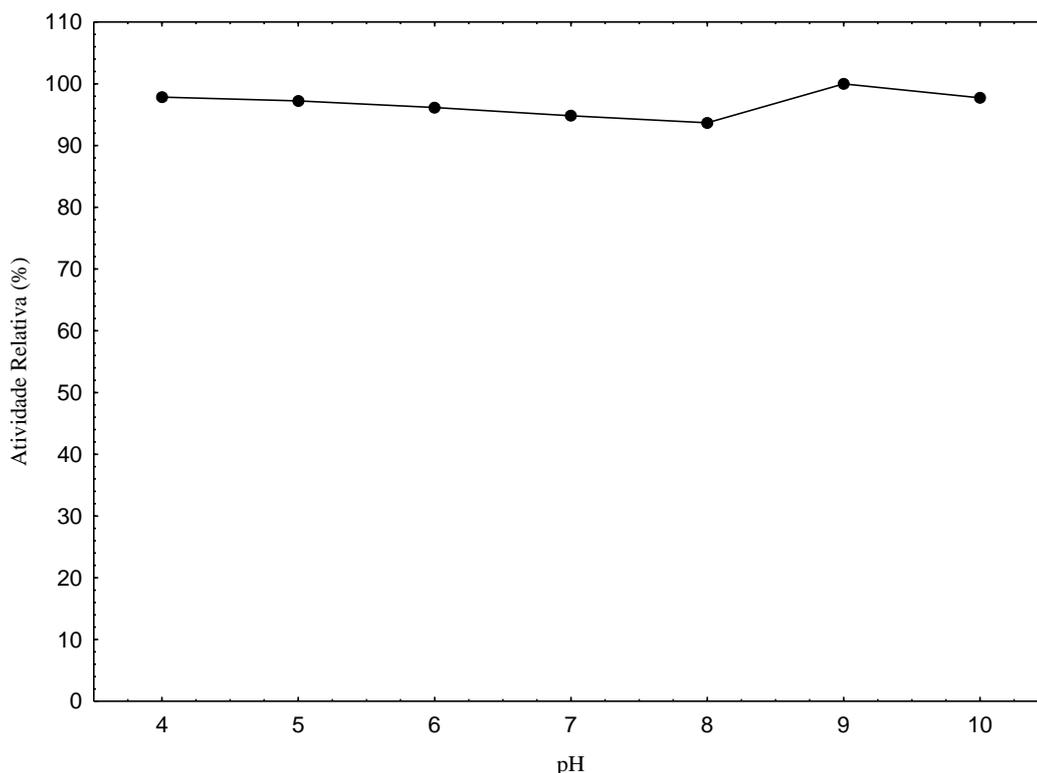


Figura 5 – Temperatura ótima da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada em glioxil-agarose

Os efeitos do pH na atividade enzimática devem-se à necessidade de manter os grupamentos do sítio ativo no estado de ionização correto para que a reação ocorra, ou seja, neste pH a reação é conduzida em velocidade máxima (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A faixa de pH da imobilização em glioxil-agarose está apresentado na Figura 6, com atividade enzimática máxima em pH 9,0. Observou-se ainda que a atividade relativa do derivado em glioxil-agarose foi superior a 90% para a ampla faixa de pH estudada (4,0-10,0),

Figura 6 – pH ótimo da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada em glioxil-agarose



Bolivar et al. (2006), observaram que o perfil do pH durante a imobilização de desidrogenase em glioxil-agarose se manteve praticamente inalterado, com atividade máxima em pH 7,0. Os mesmos autores relataram menor estabilidade no perfil de temperatura, com uma diferença de apenas 3°C entre os suportes glioxil-agarose e CNBr.

A imobilização em glioxil-agarose conferiu estabilidade em temperaturas superiores do que o suporte de referência (CNBr), evidenciando que este processo melhora as propriedades da protease de *Bacillus* sp. P45.

3.3 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA

A estabilidade térmica da enzima pode ser refletida na eficiência do método de imobilização (ZHANG; PRABHU; LEE, 2009). Portanto, avaliou-se a estabilidade térmica do derivado de glioxil-agarose, conforme apresentado na Tabela 1. A protease imobilizada em glioxil-agarose foi mais estável em todas as temperaturas estudadas (25, 30, 40 e 50°C), quando comparada ao suporte CNBr. Na temperatura de 30°C, o derivado glioxil-agarose apresentou $t_{1/2}$ de 16,9 h, aproximadamente 2,6 vezes maior do que o derivado CNBr.

O suporte glioxil-agarose possui propriedades que favorecem uma forte ligação covalente multipontual, tal como alta reatividade dos grupos glioxil (aldeídos) com grupos amino não ionizáveis da enzima (MATEO et al., 2007). Portanto, a imobilização em glioxil-agarose resultou em um biocatalisador mais estável.

Tabela 1 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr e glioxil-agarose em pH 7 nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C

Suporte	pH	Temperatura (°C)	K_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)
CNBr	7,0	25	0,0287	> 24
		30	0,1074	6,45
		40	0,5465	1,26
		50	1,8522	0,37
Glioxil-agarose	7,0	25	0,0229	> 24
		30	0,0041	16,90
		40	0,1808	3,83
		50	0,3760	1,84

Conforme a equação de Michaelis-Menten, o K_m corresponde à concentração de substrato necessária para obter a metade da velocidade máxima, podendo também ser utilizado como medida da afinidade de determinada enzima pelo substrato (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Os valores de K_m obtidos para a protease imobilizada em CNBr e glioxil-agarose foram de 1,43 e 1,15 mg.mL⁻¹, respectivamente, sendo que o suporte glioxil-agarose apresentou maior afinidade pelo substrato.

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados na literatura, indicando que a protease apresenta maior afinidade pelo substrato. Kumar et al. (2014) obtiveram K_m de 17,44 mg.mL⁻¹ para uma protease parcialmente purificada de *Bacillus megaterium* EN-2 imobilizada em alginato de sódio. Sharma e Tripathi (2013) relataram em

seu estudo, K_m de 5 mg.mL⁻¹ quando imobilizaram uma protease de *Aspergillus* sp. em alginato de sódio.

4 CONCLUSÃO

A imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 em glioxil-agarose resultou em rendimentos de 41,6 e 42,1%, em 6 e 24 h de ensaio, respectivamente. A capacidade de adsorção deste suporte foi de 16,16 U/g. A temperatura ótima do derivado imobilizado foi de 30°C e o pH 9,0. Observou-se ainda que a atividade relativa do derivado em glioxil-agarose foi superior a 90% para uma ampla faixa de pH (4,0-10,0), demonstrando que o processo de imobilização estabilizou a atividade da protease em condições extremas de pH.

A protease imobilizada foi mais estável em todas as temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C, quando comparada ao suporte de referência (CNBr). Os valores de K_m obtidos para a protease imobilizada em CNBr e glioxil-agarose foram de 1,43 e 1,15 mg.mL⁻¹. Portanto, a imobilização em glioxil-agarose resultou em um biocatalisador mais estável.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENASSI, V.M.; DA SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; GUISAN, J.M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; MARIA DE LOURDES, T.M. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.89, p. 93-101, 2013.

BOLIVAR, J.M.; ROCHA-MARTÍN, J.; MATEO, C.; GUISAN, J. M. Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 679-686, 2012.

BOLIVAR, J.M.; WILSON, L.; FERRAROTTI, S.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.; MATEO, C. Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 669-673, 2006.

BON, E.P; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B., COELHO, R.R.R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 506p., 2008.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Ed. Epub, Rio de Janeiro, 288p., 2008.

DA SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; DA SILVA, J.C.R.; LIMA, M.S.; JORGE, J.A.; GUISAN, J.M.; MARIA DE LOURDES, T.M. Immobilization and high stability of an

extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.104, p. 95-100, 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonia bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

FILHO, M.; PESSELA, B.C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A.V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. (2008). Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p.1142-1146, 2008.

GUISAN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

GUISAN, J.M. **Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells**. 2nd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 449 p. 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p.15–32, 2002.

KUMAR, D.; KUMAR, V.; VERMA, A.K.; SINGH, P.; DUBEY, A. Characterization and immobilization of partially purified alkaline protease extracted from rhizospheric soil bacterium, *Bacillus megaterium* strain EN-2 and *Bacillus subtilis* strain EN-3. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 1, p. 33-39, 2014.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274-280, 2006.

MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, Porto Alegre, v. 6, 2011.

PEREIRA, M.G.; FACCHINI, F.D.A.; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VICI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J.M.; DE MORAES, M.D.L.T. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561-570, 2015.

PESSELA, B.C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUIBÁN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 310-315, 2007.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G.V.; YOUNAN, F.F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C.C., KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

SHARMA, N.; TRIPATHI, S. Kinetics study of free and immobilized protease from *Aspergillus* sp. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 7, p. 86-96, 2013.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.

SOUSA, M. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase**. 2015, 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

TAVANO, O.L. **Imobilização de amilase de Neurospora crassa (mutante exo-1) e produção de derivados ativos estabilizados**. 2006, 101 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized enzymes: methods and applications**. Biocatalysis from Discovery to Application. Topics in Current Chemistry, v. 200, p. 95-126, 1999.

VERMA, J.; MODI, D.R.; SHARMA, R.; SAXENA, S. Vital role of alkaline protease in bio-industries: a review. **Plant Archives**, v. 11, n. 11, p. 1083-1092, 2011.

VIEIRA, M.F.; ZANIN, A.M.S.; TARDIOLI, P.W.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2011.

VIEIRA, M.F.; ZANIN, A.M.S.; TARDIOLI, P.W.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

ZHANG, Y.W.; PRABHU, P.; LEE, J.K. Immobilization of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 10, p. 2234-2239, 2009.

ARTIGO 3
IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM
RESINAS DE TROCA IÔNICA

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM RESINAS DE TROCA IÔNICA

RESUMO

Uma das características biotecnológicas mais importantes das enzimas é a sua estabilidade, sendo, portanto, um desafio estabilizar estas biomoléculas para aplicação em processos industriais. O processo de imobilização enzimática é uma ferramenta importante para melhorar a estabilidade e capacidade catalítica. As matrizes de troca iônica vêm sendo utilizadas para imobilização de enzimas por serem consideradas umas das técnicas mais simples. As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais e são aplicadas em diversos processos biotecnológicos na indústria de alimentos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da protease obtida de *Bacillus* sp. P45 utilizando diferentes resinas de troca iônica, bem como determinar os parâmetros de estabilidade térmica e cinética da enzima. A enzima foi produzida por cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, parcialmente purificada por sistema aquoso bifásico e ultrafiltração/diafiltração. A protease foi imobilizada nos suportes catiônicos CM Sepharose Fast Flow e SP Sepharose Fast Flow e aniônicos DEAE Sepharose Fast Flow e Q Sepharose Fast Flow. Para a imobilização foram adicionados 5 g de cada suporte à 50 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 à 15°C durante 6 h. Os maiores rendimentos de imobilização foram encontrados para os derivados imobilizados nas matrizes SP Sepharose e CM Sepharose, com 80 e 77%, respectivamente. Os derivados imobilizados apresentaram temperaturas ótimas de 25°C para os suportes Q Sepharose e CM Sepharose, e 30°C para DEAE Sepharose e SP Sepharose. Nas faixas de pH estudadas, os derivados apresentaram atividade ótima em pH 8,0 para Q Sepharose, pH 5,0 para CM Sepharose, pH 7,0 para SP Sepharose e pH 6,0 para DEAE Sepharose. Na temperatura de 30°C, a enzima imobilizada foi mais estável, sendo que o derivado imobilizado em SP Sepharose apresentou o maior valor de meia vida (3,09 h) na temperatura de 40°C e o derivado DEAE Sepharose apresentou valor de meia vida de 0,59 h na temperatura de 50°C. Os valores de K_m encontrados na imobilização com SP Sepharose e DEAE Sepharose foram de 0,83 e 1,94 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: Estabilidade térmica. Cinética enzimática. Rendimento. SP Sepharose. DEAE Sepharose.

1 INTRODUÇÃO

Uma das características biotecnológicas mais importantes das enzimas é a sua estabilidade, uma vez que muitas dessas biomoléculas não são estáveis em condições operacionais, destacando-se assim a necessidade de estabilização de enzimas (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). No caso de proteases, a maior causa de inativação é a auto-degradação proteolítica (autólise). A ligação de proteases à suportes sólidos pode acarretar a perda da capacidade intermolecular de autodigestão e, portanto, promover a estabilização contra a autólise (KLIBANOV, 1983).

Além de melhorar a estabilidade das enzimas, o processo de imobilização enzimática é uma ferramenta importante para aumentar a capacidade catalítica. Nesses processos as enzimas podem interagir com um suporte através de diferentes mecanismos: ligações iônicas, adsorção física, ligações covalentes ou de inclusão (GUISAN, 2006; HERNAIZ; CROUT, 2000).

A maioria das proteínas são adsorvidas rapidamente por trocadores iônicos e, portanto, resinas de troca iônica vem sendo utilizadas para sua imobilização por serem consideradas técnicas simples. Neste contexto, suportes aniônicos (como DEAE Sepharose) e catiônicos (como CM Sepharose) são usados industrialmente na adsorção de enzimas (KLIBANOV, 1983) em diversos processos tecnológicos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008; DE CASTRO et al., 2004).

O conhecimento sobre as características da enzima imobilizada são aspectos importantes quando se considera a sua aplicação em processos biotecnológicos, uma vez que pode fornecer informações sobre sua estrutura e promover o desenvolvimento de processos economicamente viáveis (JURADO et al., 2004). No entanto, poucos são os trabalhos apresentados na literatura com relação as enzimas proteolíticas imobilizadas, estudando suas propriedades térmicas e cinéticas.

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais, responsáveis por 60% do mercado de enzimas e são aplicadas em diversos processos biotecnológicos na indústria de alimentos: na síntese de peptídeos, no processo de amaciamento de carnes, nas indústrias de panificação e de bebidas. Além disso, elas são utilizadas em produtos farmacêuticos, como aditivos na indústria de detergentes e na indústria têxtil (BRANDELLI, 2008; JABALIA; MISHRA; CHAUDHARY, 2014; RAO et al., 1998).

As enzimas produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus* apresentam propriedades proteolíticas e distinguem-se das demais porque podem agir sobre proteínas

complexas, como as de soro de leite e da caseína, gerando peptídeos biologicamente ativos (BON et al., 2008; DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). Sala et al. (2014) relataram que a protease produzida pelo *Bacillus* sp. P45 apresenta capacidade de hidrólise de diversos substratos, como caseína, albumina de soro bovino e farinha de penas.

A protease de *Bacillus* sp. P45 já vem sendo estudada há alguns anos, na aplicação da degradação de resíduos agroindustriais, como a farinha de penas de frango (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011), na purificação da enzima através do uso de membranas filtrantes (SEVERO; OLIVEIRA; MACHADO, 2011), no desenvolvimento de uma estratégia de purificação, utilizando a integração de sistema aquoso bifásico e ultrafiltração (SALA et al., 2014). Mais recentemente foi estudada a aplicação da enzima como agente coagulante do leite bovino (LEMES et al., 2016).

Baseado no exposto acima e, considerando que a imobilização de proteases oriundas de micro-organismos ainda é uma grande lacuna a ser estudada, o objetivo desse trabalho foi avaliar a imobilização da protease obtida de *Bacillus* sp. P45 utilizando diferentes resinas de troca iônica, bem como determinar os parâmetros de estabilidade térmica e cinética da enzima.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO, INOCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA

O micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474), foi utilizado na produção da enzima. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadrarse no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) em um meio mineral contendo (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43,0) como substrato, a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por

centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

A enzima foi parcialmente purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrado ao processo de diafiltração para remoção de polietileno glicol (PEG). O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20% de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² e a 15°C. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

2.3.1 Imobilização em bromocianógeno ativado

O suporte bromocianógeno (CNBr) foi preparado de acordo com o protocolo da GE Healthcare Life Science. Um grama do suporte CNBr – activated Sepharose™ 4B foi adicionado à solução de 10 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 por 10 minutos à 4°C sob agitação suave.

2.3.2 Imobilização em resinas de troca iônica

Foram utilizados os suportes catiônicos CM Sepharose Fast Flow e SP Sepharose Fast Flow, e os aniônicos DEAE Sepharose Fast Flow e Q Sepharose Fast Flow, todos adquiridos da GE Health Care Life Science. Para a imobilização foram adicionados 5 g de cada suporte à 50 mL de extrato enzimático preparado em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 à 15°C. Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras da suspensão e do sobrenadante foram retiradas e suas atividades determinadas. Ensaios controles, sem adição da resina, foram conduzidos nas mesmas condições da imobilização para avaliar alterações na atividade

enzimática ao longo do processo. Depois da imobilização, os derivados foram lavados no mesmo tampão para eliminar moléculas de proteínas não ligadas ao suporte.

2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional foi composta por tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), azocaseína e extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio.

A capacidade de adsorção da enzima imobilizada, definida pela enzima ativa (U) efetivamente ligada ao suporte, foi determinada através da medida da atividade enzimática em meio reacional composto por azocaseína em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e o derivado imobilizado (em g). A capacidade de adsorção foi expressa em quantidade de enzima imobilizada em U/g de suporte.

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado de acordo com Filho et al. (2008) (Equação 1).

$$RI = 100 - 100 \times \left(\frac{\text{Atividade no sobrenadante da suspensão de imobilização}}{\text{Atividade na suspensão}} \right) \quad (1)$$

2.5 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

O efeito do pH na atividade da enzima imobilizada foi determinado em uma faixa de pH de 4,0 a 10,0 utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 4,0 – 6,0) e bicarbonato de sódio 50 mM (pH 7,0-10,0) à 15°C.

O efeito da temperatura foi determinado através da atividade da enzima para as temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C à pH 7,0. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa (%), considerando-se 100% o ponto de maior atividade.

2.6 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi avaliada nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C e em pH 7,0 para cada condição. A atividade relativa foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo natural da atividade *versus* tempo, a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas ($t_{1/2}$) estimadas utilizando a Equação 2. A meia vida é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50% do valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{K_d} \quad (2)$$

2.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima imobilizada foram calculados a partir da atividade diferentes concentrações do substrato azocaseína (2-10 mg/mL). O efeito da concentração do substrato na atividade pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten (Equação 3).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3)$$

Linearizando-se a equação de Michaelis-Menten, obtêm-se a Equação 4:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Através dos coeficientes angular e linear da Equação 4, foram obtidos os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. O valor de K_m corresponde à concentração de substrato necessário para atingir a metade da velocidade máxima enzimática (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

2.8 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

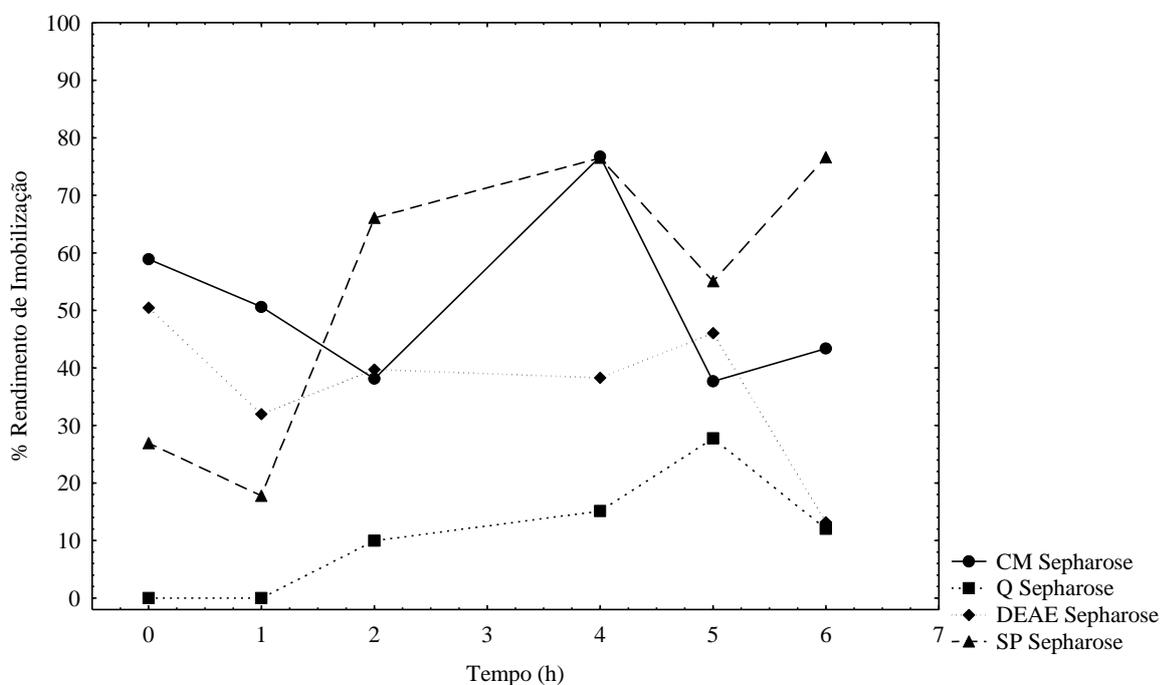
A estabilidade de estocagem da enzima imobilizada foi realizada à 4°C durante 15 dias. A cada 24 horas, amostras foram retiradas e as atividades dos derivados foram medidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Diferentes suportes foram avaliados para a imobilização da protease parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus* sp. P45. Para as condições de imobilização estudadas, utilizaram-se os tempos representados na Figura 1, onde observa-se o acompanhamento do rendimento de imobilização sobre o tempo.

Figura 1 – Cinética de imobilização da enzima parcialmente purificada produzida pelo *Bacillus* sp. P45 utilizando os suportes iônicos CM Sepharose, Q Sepharose, DEAE Sepharose e SP Sepharose



Os resultados das imobilizações máximas da protease produzida por *Bacillus* sp. P45 estão apresentados na Tabela 1. A enzima também foi imobilizada em CNBr para a comparação da estabilidade alcançada por meio de outros métodos de imobilização, uma vez

este suporte é utilizado como referência por diversos autores para os estudos de imobilização enzimática (PEREIRA et al., 2015; DA SILVA et al., 2014; VIEIRA et al., 2011).

É possível observar ainda na Figura 1, as variações dos rendimentos de imobilização no decorrer do tempo para todas as resinas de troca iônica estudadas. Primeiramente, sabe-se que o princípio básico da adsorção por troca iônica baseia-se na competição entre os íons do composto de interesse pelos grupos carregados do suporte. As moléculas de proteína possuem em sua superfície grupamentos com cargas líquidas negativas e positivas e essas cargas variam de acordo com o pH. O pH no qual o número de cargas positivas é igual ao de cargas negativas é denominado de ponto isoelétrico (pI). Acima do pI as proteínas possuem carga negativa, enquanto que abaixo a carga é positiva.

O pH do tampão pode ser ajustado para favorecer a adsorção da amostra, pois tem a capacidade de alterar a carga superficial da proteína e do trocador iônico. Portanto, as condições do meio afetarão as interações entre suporte e enzima e, em consequência, a eficiência do processo (PESSOA Jr.; KILIKIAN, 2005).

A protease de *Bacillus* sp. P45 é considerada uma serino protease, por apresentar um resíduo de serina em seu sítio catalítico. O ponto isoelétrico deste tipo de enzima está na faixa entre 4 e 6 (RAO et al., 1998). Macedo, Beys da Silva e Termignoni (2008) relataram em seu trabalho que o pI para a protease oriunda de *B. subtilis* S14 é de 6,5. No trabalho de autoria de Yang et al. (2000), o pI encontrado foi de 6,3 para a protease produzida por *B. subtilis* Y-108.

Logo, as variações observadas na Figura 2 podem ser explicadas pelo fato de o pH do tampão do meio reacional (7,0) estar muito próximo do pI estimado para proteases produzidas por *Bacillus*. No decorrer da imobilização a enzima pode ter apresentado uma carga líquida próxima de zero, acarretando o possível desprendimento da mesma do suporte.

Além disso, é possível observar, através da Tabela 1, que os resultados mais promissores para a imobilização enzimática foram obtidos com os suportes catiônicos CM Sepharose e SP Sepharose, com 77 e 80% de rendimento de imobilização e capacidade de adsorção de 36,45 e 34,63 U/g, respectivamente. Um efeito oposto era esperado, uma vez que durante o processo de imobilização, teoricamente, a enzima estaria carregada com carga líquida negativa e o pH do meio reacional apresentava-se acima do pI, logo os maiores valores de adsorção ocorreriam com o uso de suportes aniônicos

No entanto, é possível que o microambiente do trocador iônico não seja o mesmo da solução tampão, devido ao efeito *Donnan*, que pode atrair ou repelir prótons na matriz adsorvente. Geralmente, o pH na matriz é uma unidade maior do que o pH do tampão em trocadores aniônicos e uma unidade menor em trocadores catiônicos, podendo causar inclusive

a desnaturação de proteínas (SCOPE, 1988). Logo, o efeito *Donnan* pode ter provocado um microambiente ácido ao redor da resina catiônica, o que ocasionou uma melhor adsorção da enzima ao suporte.

Tabela 1 - Imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 em diferentes suportes

Suporte	Tempo de imobilização (h)	%RI	Capacidade de adsorção (U/g)
CM Sepharose	4	77	36,45
Q Sepharose	5	28	18,36
DEAE Sepharose	5	46	13,77
SP Sepharose	6	80	34,63

%RI: rendimento de imobilização em porcentagem

Industrialmente, a maioria das proteases são utilizadas na sua forma solúvel, uma vez que os dados em relação à sua estabilidade frente aos suportes ainda são escassos (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). São encontrados poucos estudos a respeito da imobilização de proteases na literatura. Os rendimentos de imobilização obtidos no presente trabalho, para a protease obtida de *Bacillus* sp. P45, foram superiores aos alcançados por Abdel-Naby et al. (1998). Os autores imobilizaram uma protease de *Bacillus mycooides* em matrizes de adsorção iônica por 12 horas, relatando pouca interação entre suporte e enzima, com resultados de rendimento de imobilização que variaram de 7,34% para DEAE Sephadex A25; 6,23% para DEAE Celulose e 15,02% para Amberlite IR 120. Neste mesmo estudo, as maiores capacidades de adsorção foram encontradas nos suportes catiônicos Amberlite IR-120 e Dowex-50W, com capacidade de adsorção de 28,09 e 14,13 U/g de suporte, respectivamente.

Altos rendimentos de imobilização, utilizando resinas iônicas, também foram obtidos por Farag e Hassan (2004). Os autores avaliaram a imobilização de uma queratinase de *Aspergillus oryzae* em vários suportes, dentre eles as resinas iônicas DEAE Celulose e Dowex 50W. O ensaio ocorreu por 12 horas e o rendimento de imobilização alcançado foi de 56,30% para o suporte aniônico (DEAE) e de 54,18% para o suporte catiônico (Dowex). É importante ressaltar que a porcentagem de rendimento calculada pela maioria dos autores relaciona a quantidade de enzima ligada no suporte. Neste trabalho, essa porcentagem é definida pela diferença entre as atividades do sobrenadante e da suspensão.

O uso desse tipo de suporte apresenta vantagens como baixo custo, simplicidade do método, disponibilidade de suportes, pouca mudança conformacional na enzima, devido ao

caráter iônico da ligação o que conduz à obtenção de derivados imobilizados com altas atividades enzimáticas (SANTANA; GUIDINI; RIBEIRO, 2012; WEETALL; DETAR, 1975). Logo, os rendimentos de imobilização obtidos neste trabalho são superiores aos dos estudos que envolvem a imobilização de proteases utilizando resinas de troca iônica. É importante também salientar que até o presente momento, não foi estudado nenhum método de imobilização especificamente para a protease de *Bacillus* sp. P45.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

A atividade da protease produzida por *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr, Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose foi determinada em diferentes valores de temperatura e pH. Geralmente, proteases provenientes de microorganismos, como as bactérias, apresentam uma temperatura ótima entre 40 e 70°C e valores de pH ótimo entre 7,0 – 10,0 (BRANDELLI, 2010). Porém, esses valores são encontrados para a enzima livre e os dados de proteases na forma imobilizada são escassos. Farag e Hassan (2004) imobilizaram uma protease obtida a partir de *Aspergillus oryzae* utilizando diferentes protocolos e relataram que a temperatura e pH ótimos foram de 60°C e 7,4, respectivamente.

Cabe salientar que neste trabalho, a protease imobilizada em CNBr é utilizada como referência para a comparação de estabilidade com as enzimas imobilizadas. A máxima atividade enzimática utilizando o suporte CNBr foi observada em temperatura de 25°C. Em relação ao pH, para o mesmo suporte, a enzima apresentou atividade ótima em pH 8,0.

Na Figura 2 está apresentada a temperatura ótima para cada matriz iônica empregada no processo de imobilização, com máximas atividades na temperatura de 25°C para os suportes Q Sepharose e CM Sepharose, e a temperatura de 30°C para SP Sepharose e DEAE Sepharose. A enzima imobilizada apresentou valores iguais ou superiores em relação à temperatura ótima, quando comparada à imobilização em CNBr.

Nas faixas de pH estudadas neste trabalho (Figura 3), a enzima imobilizada apresentou uma atividade ótima em pH 8,0 para Q Sepharose, pH 5,0 para CM Sepharose, pH 7,0 para SP Sepharose e pH 6,0 para DEAE Sepharose. No entanto, quando comparamos estes resultados àqueles com CNBr, observa-se que a atividade relativa para todos os suportes iônicos utilizados foi superior a 90% para ampla faixa de pH estudada (4,0-10,0), demonstrando assim que o processo de imobilização permitiu que a enzima atuasse em condições extremas de pH.

Cabe salientar que os gráficos de pH ótimo estudados não apresentam curva típica de sino, no entanto isso não representa que estas condições não sejam ótimas para catálise e sim que não existe um único valor para estes parâmetros.

Figura 2 – Temperatura ótima da protease de *Bacillus* sp. P45 immobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose

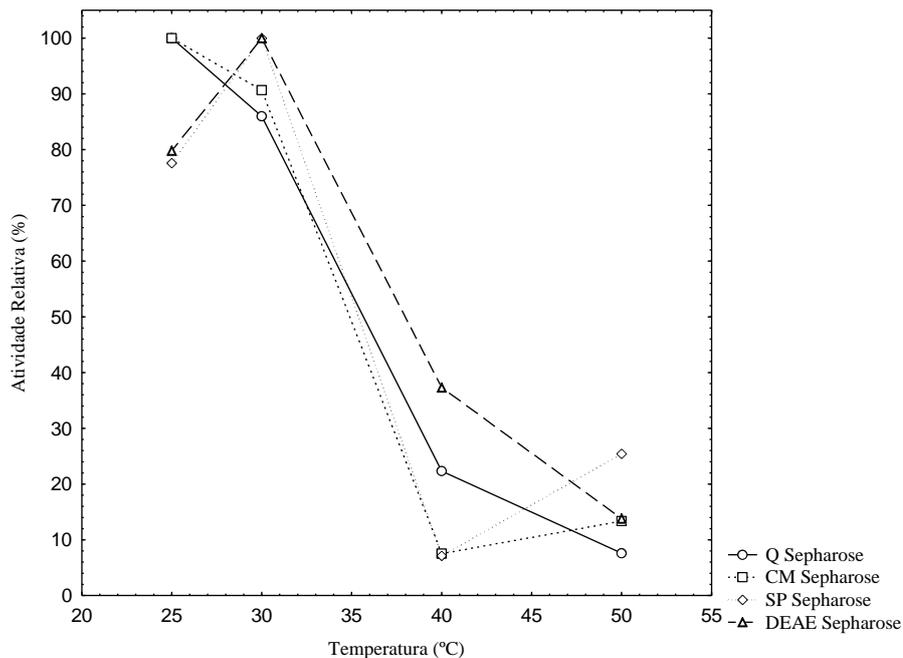
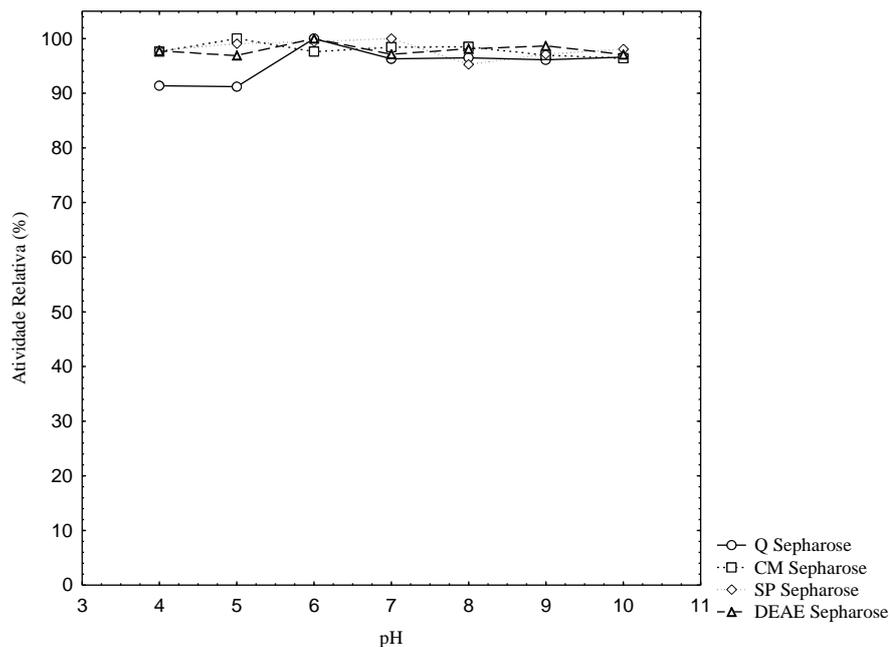


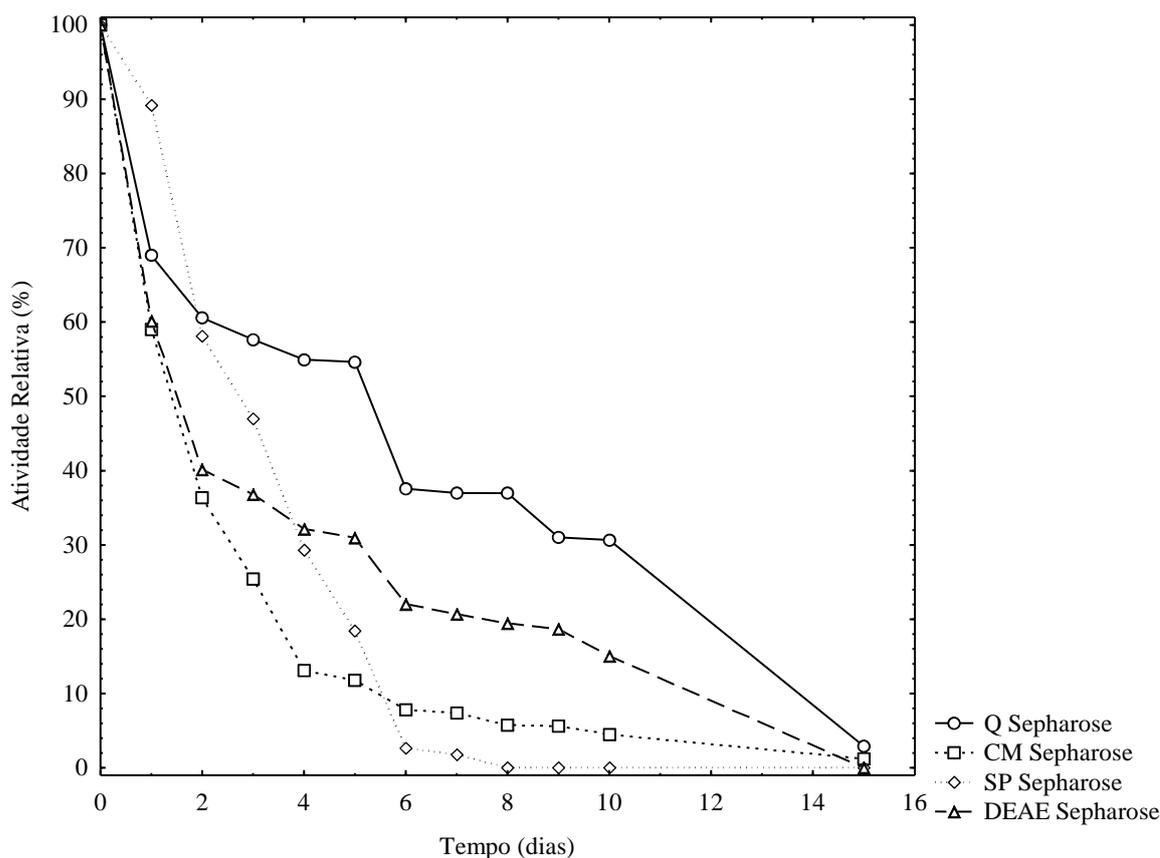
Figura 3 – pH ótimo da protease de *Bacillus* sp. P45 immobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose



3.3 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM DA ENZIMA IMOBILIZADA

O conhecimento sobre a estabilidade de armazenamento de uma enzima é importante para avaliar sua aplicação industrial e não são encontrados dados de estocagem de protease immobilizada na literatura. Os resultados da estabilidade de estocagem à 4°C dos derivados obtidos utilizando diferentes suportes estão apresentados na Figura 4, onde se observa um rápido declínio na atividade enzimática para os suportes CM Sepharose e DEAE Sepharose em apenas 1 dia de armazenamento, e em 2 dias para a enzima immobilizada em SP Sepharose. Em contraste, quando foi utilizada a matriz Q Sepharose, a enzima apresentou maior estabilidade (5 dias), e após 10 dias, a enzima immobilizada manteve cerca de 30% de sua atividade inicial.

Figura 4 – Estabilidade da protease de *Bacillus* sp. P45 immobilizada nos suportes iônicos Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose à 4°C



Paula et al. (2008) estudaram a influência do tempo de estocagem de uma lipase de *Candida rugosa* immobilizada empregando diferentes métodos de imobilização, sendo que o sistema imobilizado obtido por ligação covalente foi o mais estável em condições de estocagem. Comportamento semelhante foi encontrado por Sousa (2015), onde L-arabinose immobilizada

em quitosana e glutaraldeído manteve sua atividade enzimática em 53% após 45 dias de estocagem à 4°C. Segundo Zanin e Morais (2004), a estabilidade de estocagem das enzimas imobilizadas em solução, ou secas, depende do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada. Protocolos de imobilização através de interações iônicas (desenvolvidos neste trabalho), geralmente envolvem interações mais fracas que a ligação covalente, o que pode permitir a dessorção da enzima imobilizada durante sua utilização e armazenagem (BON et al., 2008).

3.4 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA

A estimativa dos parâmetros cinéticos ajuda a compreender o provável mecanismo de desnaturação, o que é muito importante para aplicação da enzima em processos que envolvam a utilização de temperaturas mais elevadas (BRAGA et al., 2014). As constantes de desnaturação térmica (K_d) e valores de meia vida ($t_{1/2}$) estão apresentadas na Tabela 2.

É possível verificar que a constante cinética de desnaturação térmica (K_d) para a protease imobilizada em diferentes resinas é inversamente proporcional à meia vida da enzima. Além disso, observa-se que a enzima é mais estável em temperaturas mais baixas, próximas a 30°C, uma vez que os valores de K_d aumentaram e os de meia vida ($t_{1/2}$) diminuíram com o aumento da temperatura, indicando uma maior inativação nas temperaturas mais altas. Na temperatura de 40°C o suporte SP Sepharose apresentou maior valor de meia vida (3,09 h) e na temperatura de 50°C o maior valor foi obtido para o suporte DEAE Sepharose (0,59 h), sendo estes valores superiores quando comparados aos valores de referência (CNBr).

Daroit, Sant'Anna e Brandelli (2011) obtiveram valores de meia vida inferiores aos obtidos neste trabalho para a protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45. A meia vida ($t_{1/2}$) verificada para a temperatura de 40°C foi de aproximadamente 26 min, e a mesma foi reduzida para 1,06 min com o aumento da temperatura para 50°C em pH 8,0.

A influência da concentração de substrato foi investigada utilizando azocaseína (2-10 mg.mL⁻¹). O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada nas diferentes matrizes está apresentado na Tabela 3, com destaque para a resina SP Sepharose, que apresentou menor K_m (0,83 mg.mL⁻¹), mostrando que a enzima imobilizada neste suporte tem maior especificidade pelo substrato.

Tabela 2 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr, Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose à pH 7 nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C

Suporte	pH	Temperatura (°C)	K_d (h⁻¹)	($t_{1/2}$) (h)
CNBr	7,0	25	0,0287	> 24
		30	0,1074	6,45
		40	0,5465	1,26
		50	1,8522	0,37
Q Sepharose	7,0	25	0,0211	> 24
		30	0,0248	> 24
		40	1,7285	0,40
		50	4,2059	0,16
CM Sepharose	7,0	25	0,0234	> 24
		30	0,0267	> 24
		40	3,4127	0,20
		50	4,8012	0,14
SP Sepharose	7,0	25	0,0329	21,06
		30	0,0305	22,72
		40	0,2241	3,09
		50	3,2390	0,21
DEAE Sepharose	7,0	25	0,0301	23,02
		30	0,0223	> 24
		40	1,1562	0,59
		50	1,1562	0,59

Com relação aos outros suportes iônicos utilizados, os valores de K_m maiores podem ser explicados pelo fato de que algumas imobilizações tornam o acesso ao substrato mais difícil quando comparado as enzimas livres. Portanto, uma maior concentração de substrato é necessária para aumentar sua interação com a enzima imobilizada, quando comparada com a livre. Além disso, geralmente o K_m resultante de uma imobilização enzimática é mais elevado quando comparado com a enzima livre, devido à força iônica, efeitos estéricos e limitações difusionais (BRAGA et al., 2014; DA SILVA et al., 2014).

A influência da concentração de substrato foi investigada utilizando azocaseína (2-10 mg.mL⁻¹). O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada nas diferentes matrizes está apresentado na Tabela 3, com destaque para a resina SP Sepharose, que apresentou menor K_m (0,83 mg.mL⁻¹), mostrando que a enzima imobilizada neste suporte tem maior especificidade pelo substrato. Com relação aos outros suportes iônicos utilizados, os valores de K_m maiores podem ser explicados pelo fato de que algumas imobilizações tornam o acesso ao substrato mais difícil quando comparado as enzimas livres. Portanto, uma maior concentração de substrato é necessária para aumentar sua interação com a enzima imobilizada, quando comparada com a livre. Além disso, geralmente o K_m resultante de uma imobilização enzimática é mais elevado quando comparado com a enzima livre, devido à força iônica, efeitos estéricos e limitações difusionais (BRAGA et al., 2014; DA SILVA et al., 2014).

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com o estudo de Daroit et al. (2010), que relataram que para a protease oriunda de *Bacillus* sp. P45 o parâmetro cinéticos K_m , utilizando azocaseína, foi de 2,85 mg.mL⁻¹.

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes CNBr, Q Sepharose, CM Sepharose, SP Sepharose e DEAE Sepharose

Suporte	K_m (mg.mL ⁻¹)	$V_{máx}$
CNBr	1,43	3,69
Q Sepharose	*	17,69
CM Sepharose	*	30,86
SP Sepharose	0,83	1,43
DEAE	1,94	7,94

* Não foi possível determinar

Os dados obtidos neste trabalho juntamente com os observados na literatura indicam a relevância do estudo das propriedades cinéticas de proteases de interesse industrial

em diferentes condições, uma vez que dependendo da enzima, e do tipo de suporte utilizado, suas propriedades podem ser bastante distintas.

4 CONCLUSÃO

O processo de imobilização da protease obtida de *Bacillus* sp. P45 utilizando diferentes resinas de troca iônica obteve elevados rendimentos, com valores de 80 e 77% para as resinas SP Sepharose e CM Sepharose.

Os derivados imobilizados apresentaram temperaturas ótimas de 25°C para os suportes Q Sepharose e CM Sepharose, e 30°C para DEAE Sepharose e SP Sepharose. Os derivados apresentaram atividade ótima em pH 8,0 para Q Sepharose, pH 5,0 para CM Sepharose, pH 7,0 para SP Sepharose e pH 6,0 para DEAE Sepharose.

A enzima imobilizada apresentou-se mais estável em temperaturas próximas a 30°C. Sendo que na temperatura de 40°C o derivado imobilizado na matriz SP Sepharose apresentou o maior valor de meia vida (3,09 h) e na temperatura de 50°C o derivado imobilizado em DEAE Sepharose apresentou o maior valor (0,59 h), comparados ao derivado CNBr.

O parâmetro cinético K_m da enzima imobilizada destacou-se com a utilização das resinas SP Sepharose e DEAE Sepharose, apresentando valores de K_m de 0,83 e 1,94 mg.mL⁻¹, respectivamente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-NABY, M.A.; ISMAIL, A-M.; S., AHMED, S.A.; FATTAH, A.F.A. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycooides*. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 205- 210, 1998.

ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R. RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology advances**, v.33, n. 5, p. 435-456, 2015.

BON, E.P; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B., COELHO, R.R.R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 506p., 2008.

BRAGA, A.R.C.; SILVA, M.F.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; KALIL, S.J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on eupergit C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735-1750, 2010.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Ed. Epub, Rio de Janeiro, 288p., 2008.

DA SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; DA SILVA, J.C.R.; LIMA, M.S.; JORGE, J.A.; GUISAN, J.M.; MARIA DE LOURDES, T.M. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 104, p. 95-100, 2014.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonia bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DE CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; DOS SANTOS, J.C.; DE AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n. 1, p. 146-156, 2004.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 85-93, 2004.

FILHO, M.; PESSELA, B.C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A.V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. (2008). Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p.1142-1146, 2008.

GUISAN, J.M. **Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and Cells**. 2nd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 449 p. 2006.

HERNAIZ, M.J.; CROUT, D.H.G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 26-32, 2000.

JABALIA, N.; MISHRA, P.C.; CHAUDHARY, N. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. **Journal of Agroecology and Natural Resource Management**, p. 179-183, 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2004.

KLIBANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 722-727, 1983.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEMES, A.C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S.J. (2016). A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016.

MACEDO, A.J.; BEYS DA SILVA, W.O.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 3, p. 180-188, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, Porto Alegre, v. 6, 2011.

PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B.R.; BRAGA, L.P.; CASTRO, H.F.; BRUNO, L.M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PEREIRA, M.G.; FACCHINI, F.D.A.; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VICI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J.M.; DE MORAES, M.D.L.T. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561-570, 2015.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n. 3, p.597-635, 1998.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G.V.; YOUNAN, F.F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C.C., KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

SANTANA, L.N.S.; GUIDINI, C.Z.; RIBEIRO, E.J.. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. **Horizonte Científico**, v. 6, n. 1, 2012.

SCOPES, R.K. **Protein purification**. Ed. Springer-Verlag, New York, 1988.

SEVERO, E. E.; OLIVEIRA, J. G.; MACHADO, J. R. **Separação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp.P45 utilizando ultrafiltração**. Projeto de Graduação (Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.

SOUSA, M. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase**. 2015, 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VIEIRA, M.F.; ZANIN, A.M.S.; TARDIOLI, P.W.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2011.

WEETALL, H.H.; DETAR, C.C. Covalent attachment of proteins to inorganic supports directly by activation with cyanogen bromide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 295-297, 1975.

YANG, J.K.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 406-413, 2000.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto, p. 35-85, 2004.

ARTIGO 4

**IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM SP SEPHAROSE E DEAE
SEPHAROSE**

IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE DE *Bacillus* sp. P45 EM SP SEPHAROSE E DEAE SEPHAROSE

RESUMO

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. A atividade e a estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores que podem afetar sua estrutura tridimensional ou conformação espacial. O conhecimento da estabilidade enzimática pode auxiliar na otimização da viabilidade do processo enzimático. Além disso, é importante estimar e analisar os parâmetros termodinâmicos para auxiliar no entendimento dos prováveis mecanismos de desnaturação, que são extremamente importantes nos processos enzimáticos. Entre os diversos protocolos de imobilização, a adsorção apresenta potencial comercial mais elevado do que os outros processos. Neste contexto, a imobilização de enzimas em resinas de troca iônica é um procedimento simples, que envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas, porém é importante que as forças eletrostáticas sejam maximizadas a fim de obter um protocolo de imobilização eficiente. O objetivo desse trabalho foi maximizar a imobilização de protease de *Bacillus* sp. P45 em trocadores iônicos SP Sepharose e DEAE Sepharose, bem como determinar parâmetros cinéticos, termodinâmicos e de estabilidade térmica. A enzima foi produzida por cultivo submerso do *Bacillus* sp. P45 e parcialmente purificada por sistema aquoso bifásico e ultrafiltração/diafiltração. A protease foi imobilizada nos suportes catiônico SP Sepharose Fast Flow e o aniônico DEAE Sepharose Fast Flow. Para a matriz catiônica foram utilizados os tampões em pH 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5 e para a matriz aniônica foram utilizados os tampões 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. O derivado em SP Sepharose foi mais estável em pH 6,0, com capacidade de adsorção de 33,83 U/g, e para DEAE Sepharose a estabilidade ocorreu em pH 8,0, com capacidade de adsorção de 22,23 U/g. Os maiores rendimentos encontrados foram de 62,0% em pH 6,0 e de 64,2% em pH 7,0 para a matriz catiônica SP Sepharose e de 62,5% em pH 8,0 e 62,3% em pH 7,0 para a matriz aniônica DEAE Sepharose. A enzima imobilizada em SP Sepharose foi mais estável em temperaturas próximas a 25°C e em DEAE Sepharose em temperaturas de 30°C. Na temperatura de 50°C, o suporte SP Sepharose apresentou valor de meia vida de 1,09 h e o suporte DEAE Sepharose de 1,74 h. Os derivados em DEAE Sepharose (pH 8,0) e SP Sepharose (pH 6,0) apresentaram K_m de 0,89 e 4,83 mg.mL⁻¹, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos ΔG^* , ΔH^* e ΔS^* apresentaram valores de acordo com o esperado para a desnaturação térmica de enzimas. Os valores obtidos para z foram 17,77 e 17,87°C para os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose, respectivamente. Os valores de D , em horas, variaram de 92,47 (25°C) a 1,57 (50°C) para SP Sepharose e, 144,81 (25°C) a 5,80 (50°C) para DEAE Sepharose.

Palavras-chave: Resinas. Adsorção. Troca iônica. Cinética enzimática. Parâmetros termodinâmicos.

1 INTRODUÇÃO

A terminologia imobilização de enzimas refere-se a enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região do espaço, com a contenção de suas atividades catalíticas. Enzimas imobilizadas requerem a preparação de derivados estáveis com propriedades funcionais adequadas para as reações. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; GUIBAN, 2013).

A atividade e a estabilidade térmica das enzimas são influenciadas por diversos fatores como temperatura, pH, meio de reação, entre outras, que podem afetar sua estrutura tridimensional ou conformação espacial. O conhecimento da estabilidade enzimática pode auxiliar na otimização da viabilidade do processo enzimático. Ademais, é importante estimar e analisar os parâmetros termodinâmicos, para auxiliar no entendimento dos prováveis mecanismos de desnaturação, que são extremamente importantes nos processos enzimáticos (JURADO et al., 2004; MARTINS; BURKERT, 2009).

Durante a imobilização, a principal tarefa é selecionar o suporte adequado, as condições (pH, temperatura e natureza do meio) e a enzima (fonte, natureza e pureza) para a obtenção do biocatalisador imobilizado mais adequado ao processo (BORNSCHEURER, 2003). Entre os diversos protocolos de imobilização, a adsorção apresenta potencial comercial mais elevado do que os outros processos, uma vez que a técnica é mais simples, menos onerosa, mantém uma alta atividade catalítica e o suporte pode ser reutilizado várias vezes após a inativação da enzima imobilizada. Neste contexto, a imobilização de enzimas em resinas de troca iônica é um procedimento simples, que envolve basicamente interações iônicas e eletrostáticas (BASILIO, 1994; SANTANA; GUINIDI; RIBEIRO, 2012).

As resinas de troca iônica são compostas por grupos trocadores iônicos, sais quaternários de amônia, para o caso das resinas aniônicas, e grupamentos sulfônicos ($-SO_3^-$) e carboxílicos ($-COO^-$), para as resinas catiônicas. As matrizes de troca iônica que contém grupos positivamente carregados são denominadas trocadores aniônicos e adsorvem proteínas com carga líquida negativa. As matrizes denominadas trocadores catiônicos são negativamente

carregadas e adsorvem proteínas com carga líquida positiva (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2003).

A adsorção é o resultado das interações iônicas entre os grupamentos na superfície da proteína e dos grupamentos com cargas opostas do trocador iônico (CHASE; SKIDMORE, 1990). Na adsorção de enzimas em matrizes de troca iônica é importante que as forças eletrostáticas sejam maximizadas a fim de obter um protocolo de imobilização eficiente.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo maximizar a imobilização de protease de *Bacillus* sp. P45 em trocadores iônicos SP Sepharose e DEAE Sepharose, bem como determinar parâmetros cinéticos, termodinâmicos e de estabilidade térmica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO, INÓCULO E PRODUÇÃO DA ENZIMA

O micro-organismo *Bacillus* sp. P45 (Número de acesso no GenBank: AY962474), foi utilizado na produção da enzima. Uma caracterização parcial mostrou que a cepa enquadrava-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS (SIRTORI et al., 2006). A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011) em um meio mineral contendo (g/L): NaCl (0,5), KH₂PO₄ (0,4), K₂HPO₄ (0,3), NH₄Cl (1,9) e farinha de penas (43,0) como substrato, a 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático foi clarificado por centrifugação (4°C, 5000 x g por 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

2.2 PURIFICAÇÃO PARCIAL DA ENZIMA

A enzima foi purificada a partir de uma estratégia determinada por Sala et al. (2014) que consistiu de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos (SAB) integrado ao processo de diafiltração para remoção de polietileno glicol (PEG). O primeiro SAB foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0, 8% de cloreto de sódio (NaCl), 20%

de extrato enzimático e 46% de água deionizada. O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição (m/m) da fase de topo proveniente do primeiro SAB (36%), tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 (36,0%) e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄). A remoção do PEG foi realizada por diafiltração utilizando membrana de 10 kDa de celulose regenerada, 5 ciclos de diafiltração, pressão de 1,5 kgf/cm² e a 15°C. A enzima purificada foi liofilizada e armazenada a 4°C para utilização nas etapas posteriores.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

2.3.1 Imobilização enzimática em bromocianógeno (CNBr) ativado

O suporte bromocianógeno (CNBr) foi preparado de acordo com o protocolo da GE Healthcare Life Science. Um grama do suporte CNBr – activated Sepharose™ 4B foi adicionado na solução de 10 mL de extrato enzimático preparado em tampão fostato de sódio 5 mM, pH 7,0 por 10 minutos à 4°C sob agitação suave.

2.3.2 Imobilização enzimática por adsorção iônica

Foram utilizados o suporte catiônico SP Sepharose Fast Flow e o aniônico DEAE Sepharose Fast Flow, todos adquiridos da GE Health Care Life Science. Para a imobilização foram adicionados 5 g de cada suporte à 50 mL de extrato enzimático à 15°C durante 6 horas. Para a matriz catiônica foram utilizados os tampões fostato de sódio 25 mM em pH 6,0 e 6,5 e bicarbonato de sódio 25 mM em pH 7,0 e 7,5. Para a matriz aniônica foram utilizados os tampões bicarbonato de sódio 25 mM em pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. Os suportes foram previamente lavados e equilibrados em cada tampão utilizado, conforme protocolo da GE Healthcare Life Science. Em intervalos de tempo pré-determinados, amostras da suspensão e do sobrenadante foram retiradas e suas atividades determinadas. Ensaios controles, sem adição da resina, foram conduzidos nas mesmas condições da imobilização para avaliar alterações na atividade enzimática ao longo do processo. Depois da imobilização, os derivados foram lavados no mesmo tampão, com a finalidade de eliminar moléculas de proteínas não ligadas ao suporte.

2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA, CAPACIDADE DE ADSORÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA E RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). O substrato utilizado foi a azocaseína 1% (m/v) em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional foi composta por tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), azocaseína e extrato enzimático. A reação foi incubada em banho com agitação a 40°C durante 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g por 20 min) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio.

A capacidade de adsorção da enzima imobilizada, definida pela enzima ativa (U) efetivamente ligada ao suporte, foi determinada através da medida da atividade enzimática em meio reacional composto por azocaseína em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) e o derivado imobilizado (em g). A capacidade de adsorção foi expressa em quantidade de enzima imobilizada em U/g de suporte.

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado de acordo com Filho et al. (2008) (Equação 1).

$$RI = 100 - 100 \times \left(\frac{\text{Atividade no sobrenadante da suspensão de imobilização}}{\text{Atividade na suspensão}} \right) \quad (1)$$

2.5 ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da enzima imobilizada foi avaliada nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C para cada condição. A atividade relativa foi expressa em percentual em relação à atividade inicial. A partir de um gráfico de logaritmo natural da atividade *versus* tempo, a constante de desnaturação (K_d) foi calculada e as meia-vidas foram estimadas utilizando a Equação 2. A meia vida é definida como o tempo no qual a atividade residual atinge 50% do valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{K_d} \quad (2)$$

2.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$, a atividade da enzima imobilizada foi avaliada em diferentes concentrações do substrato azocaseína (2-10 mg/mL). O efeito da concentração do substrato na atividade pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten (Equação 3).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3)$$

Linearizando-se a equação de Michaelis-Menten, obtêm-se a Equação 4:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Através dos coeficientes angular e linear da Equação 4, foram obtidos os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, respectivamente. O valor de K_m corresponde à concentração de substrato necessário para atingir a metade da velocidade máxima enzimática (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

Com a finalidade de conhecer o comportamento da enzima imobilizada na utilização de processos industriais, determinou-se os parâmetros termodinâmicos. A dependência da temperatura com a constante de desnaturação é expressa nas Equações 5 e 6.

$$K_d = \frac{kT}{h} \exp\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^*}{RT}\right) \quad (5)$$

$$\ln\left(\frac{K_d}{T}\right) = \ln\left(\frac{k}{h}\right) + \frac{\Delta S^*}{R} - \left(\frac{\Delta H^*}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (6)$$

Onde R é a constante universal dos gases (8,31 J/mol. K), T é a temperatura absoluta em Kelvin, h é a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J.s) e k é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J.K).

Os valores de ΔH^* e ΔS^* foram calculados a partir da inclinação e da intersecção do gráfico de $\ln(K_d/T)$ versus $1/T$. ΔG^* foi estimado através da Equação 7.

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (7)$$

Em que ΔG^* é a variação da energia livre de Gibbs, ΔH^* é a variação da entalpia e ΔS^* é a variação da entropia do sistema.

Também foram calculados os parâmetros D e z para expressar a desnaturação enzimática, conforme Equação 8 e 9, respectivamente. O valor D , ou valor de redução decimal, em minutos, é definido como o tempo que a enzima deve ser pré-incubada em uma determinada temperatura para manter 10% de atividade residual. O valor z é o intervalo de temperatura de um ciclo logarítmico na curva de desnaturação.

$$D = \frac{2,3026}{K_d} \quad (8)$$

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{z} \quad (9)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As moléculas de proteína possuem em sua superfície grupamentos com cargas líquidas negativas e positivas e essas cargas variam de acordo com o pH do meio (PESSOA-Jr.; KILIKIAN, 2005). Com a finalidade de alterar a carga superficial da proteína e do trocador iônico e aumentar a eficiência do processo de imobilização, utilizou-se diferentes valores de pH para cada suporte neste trabalho.

É possível observar nas Figuras 1 e 2 a cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 nos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose, respectivamente. O comportamento de ambas resinas é semelhante, ou seja, há uma adsorção máxima seguida de uma dessorção em todas condições estudadas. Sendo que para SP Sepharose, a imobilização foi mais estável em pH 6,0, com capacidade de adsorção de 33,83 U/g, e para a matriz DEAE Sepharose, a estabilidade ocorreu em pH 8,0, com capacidade de adsorção de 22,23 U/g.

Na imobilização desta enzima com a matriz catiônica SP Sepharose, os maiores rendimentos encontrados foram de 62,0% em pH 6,0 e de 64,2% em pH 7,0. Esse resultado

pode sugerir que há mais de uma proteína presente no extrato enzimático e pode estar ocorrendo uma adsorção competitiva. Skidmore e Chase (1990) relataram a adsorção competitiva entre duas proteínas no suporte S Sepharose FF e constataram que as moléculas de proteínas estudadas possuem muitos grupamentos, levando a múltiplas interações iônicas no adsorvente, uma vez que a distribuição tridimensional na superfície do trocador iônico é aleatória e o local real da adsorção não é único. Além disso, observou-se que os resultados de rendimento foram inferiores para esse suporte, quando comparado ao artigo anterior (Artigo 3). Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que a resina utilizada neste estudo foi previamente equilibrada para cada condição estudada, o que não ocorreu no estudo anterior.

Com o emprego da matriz aniônica DEAE Sepharose, os maiores rendimentos de imobilização foram de 62,5% em pH 8,0 e 62,3% em pH 7,0. Mais uma vez pode-se sugerir que há uma competição entre as proteínas presentes na enzima no momento da adsorção. Ainda sobre a imobilização em DEAE Sepharose, obteve-se maior rendimento em menor tempo, quando comparado com o Artigo 3, que resultou em 46% de imobilização em 5 h de ensaio.

Figura 1 – Cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 por adsorção iônica com SP Sepharose

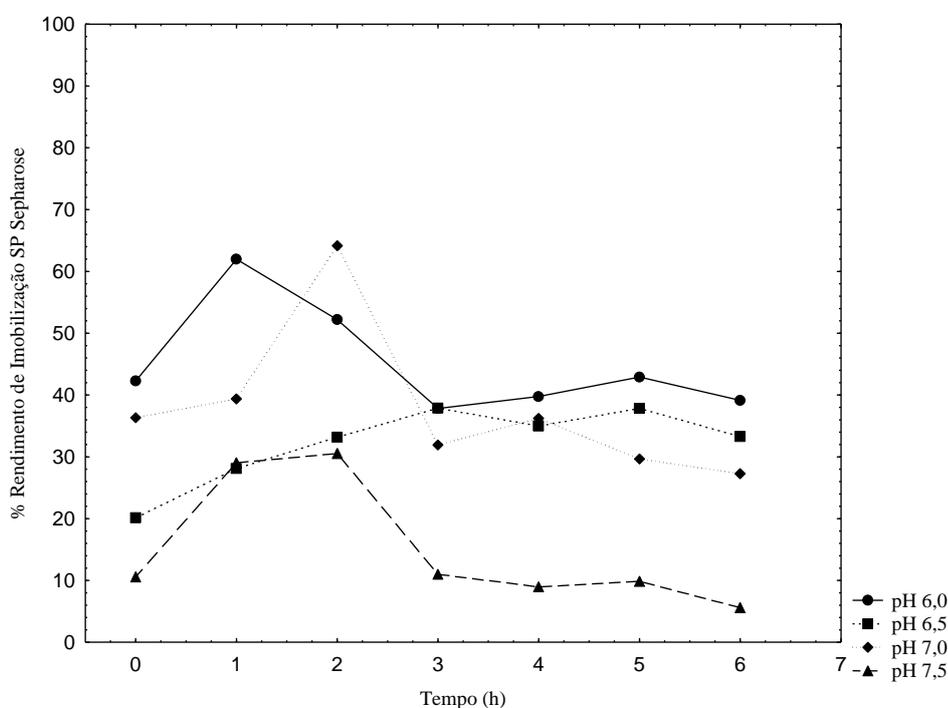
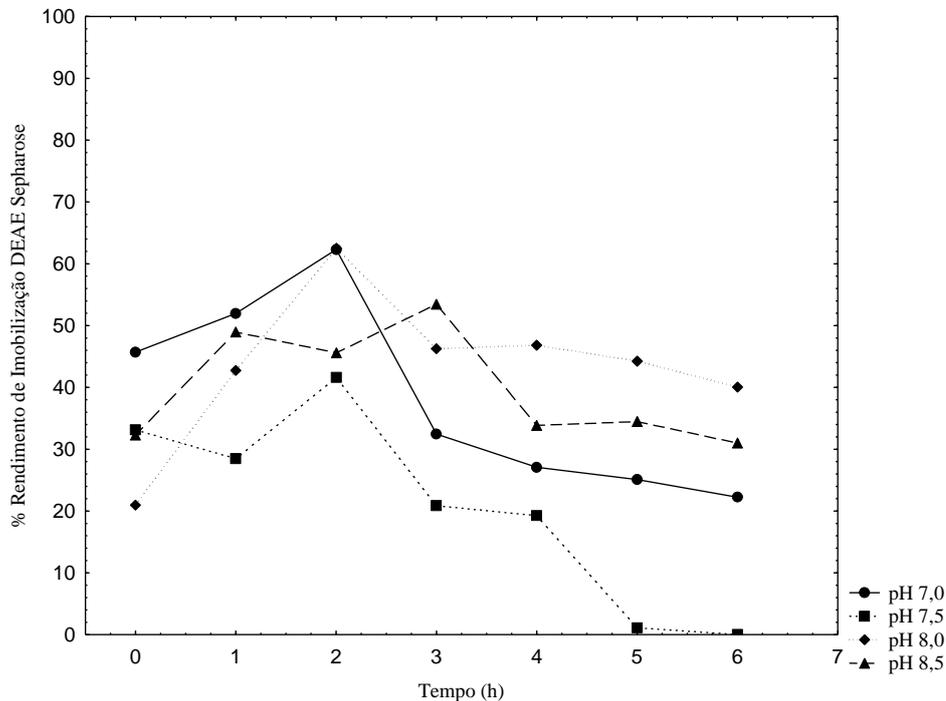


Figura 2 – Cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 por adsorção iônica com DEAE Sepharose



De acordo com a GE Healthcare (2005), a resina DEAE Sepharose Fast Flow é um trocador aniônico fraco, em que o grau de ionização é fortemente influenciado pelo pH, exibindo capacidades de adsorção em pH mais alcalinos. Os melhores valores de rendimento e capacidade de adsorção para esta matriz provavelmente se devem ao fato de que a resina apresentou equilíbrio adequado para que ocorresse uma melhor adsorção durante o processo de imobilização.

Diferentemente da DEAE Sepharose, a resina SP Sepharose Fast Flow atua em uma ampla faixa de pH, sendo um trocador catiônico forte, apresentando uma boa capacidade de adsorção. Em termos de rendimento para essa matriz, foi possível observar valores inferiores àqueles encontrados no Artigo 3, o que provavelmente deve ter ocorrido pela influência do pH, favorecendo a adsorção de proteínas competitivas, que não apresentam atividade proteolítica.

3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA E CINÉTICA ENZIMÁTICA

A Tabela 1 apresenta os resultados de K_d e $\frac{1}{2}$ vida para os derivados imobilizados. Vale ressaltar que esses parâmetros foram calculados baseados nos melhores rendimentos de imobilização: SP Sepharose em pH 6,0 e 1 h de ensaio e DEAE Sepharose em pH 8,0 em 2 horas de ensaio.

É possível observar que o derivado SP Sepharose é mais estável em temperaturas próximas a 25°C. Já o derivado imobilizado DEAE Sepharose é mais estável em temperaturas próximas à 30°C. Sendo que, na temperatura de 50°C a enzima imobilizada no suporte SP Sepharose apresentou valor de meia vida de 1,09 h e em suporte DEAE Sepharose 1,74 h, ambos os valores superiores quando comparados aos valores de referência (CNBr), que foi de 0,37 h.

Tabela 1 – Valores de K_d e meia vida ($t_{1/2}$) obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C

Suporte	pH	Temperatura (°C)	K_d (h^{-1})	$\frac{1}{2}$ vida (h)
SP Sepharose	6,0	25	0,0249	>24
		30	0,0527	13,15
		40	0,3322	2,08
		50	0,6359	1,09
DEAE Sepharose	8,0	25	0,0159	>24
		30	0,0610	>24
		40	0,2721	2,54
		50	0,3965	1,74

A influência da concentração de substrato foi investigada utilizando azocaseína (2-10 mg.mL⁻¹). Os derivados DEAE Sepharose (pH 8,0) e SP Sepharose (pH 6,0) apresentaram K_m de 0,89 e 4,83 mg. mL⁻¹, respectivamente. Na literatura, são encontrados poucos estudos com relação a cinética enzimática de derivados imobilizados de proteases (ANWAR et al., 2009; LI et al., 2010). No presente trabalho, elevados rendimentos de imobilização e valores de meia vida foram alcançados para protease imobilizada em DEAE Sepharose, demonstrando o potencial desta enzima e do processo de imobilização em trocadores iônicos para aplicação em escala industrial.

A determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda na compreensão do provável mecanismo de desnaturação que é de grande importância nos processos enzimáticos (BRAGA et al., 2014). A Tabela 2 apresenta os valores de ΔG^* , ΔH^* , ΔS^* , D e z da enzima imobilizada na

faixa de temperatura de 25 a 50°C. Para ambos os suportes utilizados no processo de imobilização, é possível observar que com o aumento da temperatura ocorre pouca variação nos valores de energia livre de Gibbs (ΔG^*). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com o estudo de Silveira (2009), com valores de ΔG^* de 87,2 kJ/mol e ΔH^* de 131,9 kJ/mol, para uma protease purificada de *Chryseobacterium* sp. kr6.

Os valores de entropia ΔS^* dos derivados estavam de acordo com o esperado para a desnaturação térmica de enzimas. Valores de ΔS^* próximos de zero, demonstram que a desnaturação térmica não necessariamente implica em variações na estrutura terciária da enzima (NAIDU; PANDA, 2003). Braga, Silveira e Kalil (2013) encontraram comportamentos semelhantes para a enzima β -galactosidase imobilizada em Eupergit C, com ΔS^* de 0,525 kJ/mol.K.

Tabela 2 – Valores ΔG^* , ΔH^* , ΔS^* , D e z obtidos a partir da desnaturação térmica da protease de *Bacillus* sp. P45 imobilizada nos suportes SP Sepharose e DEAE Sepharose nas temperaturas de 25, 30, 40 e 50°C

Derivado	Temperatura (°C)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/mol.K)	D (h)	z (°C)
SP Sepharose (pH 6,0)	25	88,07			92,47	
	30	87,73	108,10	0,067	43,69	17,85
	40	87,06			6,93	
	50	86,38			1,57	
DEAE Sepharose (pH 8,0)	25	88,43			144,81	
	30	88,22	101,66	0,044	37,74	17,98
	40	87,78			8,46	
	50	87,33			5,80	

É comum, quando se trabalha com enzimas, principalmente na indústria de alimentos expressar sua inativação utilizando os parâmetros D e z . O valor de redução decimal D representa a resistência a uma determinada temperatura, enquanto que o valor z é expresso em °C e equivale à dependência do fator termodegradável à mudança de temperatura (BRAGA et al., 2014). Os valores calculados para z foram 17,85 e 17,98°C para os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose, respectivamente, considerando a faixa de temperatura de 25 a 50°C. Lemes (2015) encontrou valor semelhante (15,3°C) a partir da desnaturação térmica de queratinase de *Bacillus* sp. P45 em pH de 7,0

Conforme observado na Tabela 2, o parâmetro D diminui drasticamente com o aumento da temperatura, indicando uma rápida inativação enzimática em temperaturas mais elevadas. Os valores de D , em horas, variaram de 92,47 (25°C) a 1,57 (50°C) em SP Sepharose 80e, 144,81 (25°C) a 5,7 (50°C) em DEAE Sepharose. Esses valores indicam que a enzima imobilizada apresenta estabilidade em temperaturas mais baixas, corroborando com os resultados obtidos de meia-vida.

Os dados obtidos neste trabalho e os verificados na literatura demonstram a importância do estudo das propriedades cinéticas da enzima imobilizada em diferentes condições, uma vez que dependendo da enzima, e do suporte utilizado, suas propriedades podem ser bastante distintas. Além disso, este estudo demonstrou que as informações obtidas através do estudo cinético de desativação do derivado imobilizado podem ajudar na determinação das temperaturas as quais a mesma pode ser submetida sem causar a perda de sua eficiência, não comprometendo a viabilidade do processo.

4 CONCLUSÃO

Durante a cinética de imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45, o derivado em SP Sepharose foi mais estável em pH 6,0, com capacidade de adsorção de 33,83 U/g e para DEAE Sepharose, a estabilidade ocorreu em pH 8,0, com capacidade de adsorção de 22,23 U/g.

Os maiores rendimentos encontrados foram de 62,0% em pH 6,0 e de 64,2% em pH 7,0 para a matriz catiônica SP Sepharose, e de 62,5% em pH 8,0 e 62,3% em pH 7,0 para a matriz aniônica DEAE Sepharose.

O derivado em SP Sepharose foi mais estável em temperaturas próximas a 25°C. Já o derivado em DEAE Sepharose foi mais estável em temperaturas próximas à 30°C. Na temperatura de 50°C o suporte SP Sepharose apresentou valor de meia vida de 1,09 h e o suporte DEAE Sepharose, 1,74 h.

Os derivados DEAE Sepharose (pH 8,0) e SP Sepharose (pH 6,0) apresentaram K_m de 0,89 e 4,83 mg. mL⁻¹, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos ΔG^* , ΔH^* e ΔS^* estavam de acordo com o esperado para a desnaturação térmica de enzimas.

Os valores calculados para z foram 17,85 e 17,98°C para os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose, respectivamente, considerando a faixa de temperatura de 25 a 50°C. Os valores de D , em horas, variaram de 92,47 (25°C) a 1,57 (50°C) em SP Sepharose, 144,81 (25°C) a 5,80 (50°C) em DEAE Sepharose.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAR, A.; QADER, A.U.; RAIZ, A.; IQBAL, S.; AZHAR, A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, n. 7, v.10, p. 1281-1286, 2009.

BASÍLIO, C.A. **Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro**. 1994. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BORNSCHEUER, U.T. Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336-3337, 2003.

BRAGA, A.R.C.; SILVA, M.F.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; KALIL, S.J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on eupergit C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

BRAGA, A.R.C.; SILVEIRA, J.T.; KALIL, S.J. Propriedades Termodinâmicas da Enzima Beta-Galactosidase Imobilizada em Eupergit® C. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 54-57, 2013.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. In: **Fundamentos de cromatografia**. Unicamp, Campinas, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonia bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

GUISAN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**. 3rd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 375p., 2013.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2004.

KLIBANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 722-727, 1983.

LEMES, A.C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus* sp. p45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa.** 2015, 209 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

LI, D.; TEOH, W.Y.; GOODING, J.J.; SELOMULYA, C.; AMAL, R. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 11, p. 1767-1777, 2010.

MACEDO, A.J.; BEYS DA SILVA, W.O.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 180-188, 2008.

MARTINS, A.B.; BURKERT, C.A.V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prébióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

NAIDU, G. S.N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, Porto Alegre, v. 6, 2011.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 209-217, 2004

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G.V.; YOUNAN, F.F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C.C., KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

SANTANA, L.N.S.; GUIDINI, C.Z.; RIBEIRO, E.J. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. **Horizonte Científico**, v. 6, n. 1, 2012.

SILVEIRA, S.T. **Purificação e imobilização de uma protease queratinolítica produzida por *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6.** 2009, 126 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.

SKIDMORE, G.L.; HORTSMANN, B.J.; CHASE, H.A. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. **Journal of Chromatography A**, v. 498, p. 113-128, 1990.

YANG, J.K.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 406-413, 2000.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, em que se avaliou a imobilização das diferentes técnicas de imobilização da protease obtida a partir do cultivo de *Bacillus* sp. P45, bem como suas propriedades, conclui-se que ao investigar os diferentes métodos (ligação covalente, adsorção física e ligação iônica) e suportes, o melhor resultado foi obtido a partir da utilização do suporte quitosana ativado com glutaraldeído, o qual apresentou capacidade de adsorção e estabilidade operacional de 4 ciclos com manutenção de 53,48% de sua atividade enzimática residual.

Ao avaliarmos a imobilização da protease de *Bacillus* sp. P45 em glioxil-agarose (ligação covalente multipontual), os rendimentos encontrados foram de 41,6 e 42,1%, em 6 e 24 h de ensaio, respectivamente. Os valores de K_m obtidos para a protease imobilizada em CNBr e glioxil-agarose foram de 1,43 e 1,15 mg.mL⁻¹, respectivamente. Portanto, a imobilização em glioxil-agarose resultou em um biocatalisador mais estável.

No que diz respeito ao uso de resinas de troca iônica para imobilização da enzima em estudo, a partir dos resultados apresentados obteve-se elevados rendimentos, com valores de 80 e 77% para as resinas SP Sepharose e CM Sepharose, respectivamente. Os derivados imobilizados condições ótimas iguais ou superiores ao suporte de referência (CNBr). Os derivados SP Sepharose e DEAE Sepharose também apresentaram os valores mais baixos de K_m , indicando uma maior afinidade pelo substrato.

Com o objetivo de maximizar a imobilização das resinas SP Sepharose e DEAE Sepharose, a fim de obter maior estabilidade enzimática, o presente trabalho demonstrou a importância da avaliação de diferentes condições de pH na imobilização, quando envolve interações iônicas. Foi possível realizar a caracterização dos derivados, que abrangeu os parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Tais resultados são de grande interesse industrial, visto que existe uma lacuna de conhecimentos no que tange a imobilização e estabilização da enzima em estudo.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-NABY, M.A.; ISMAIL, A-M.; S., AHMED, S.A.; FATTAH, A.F.A. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 205- 210, 1998.
- ANWAR, A., SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.
- ANWAR, A.; QADER, A.U.; RAIZ, A.; IQBAL, S.; AZHAR, A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, n. 7, v.10, p. 1281-1286, 2009.
- BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R. RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology advances**, v.33, n. 5, p. 435-456, 2015.
- BASÍLIO, C.A. **Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro**. 1994. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BEG, Q.K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n° 2, p.294-304, 2003.
- BENASSI, V.M.; DA SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; MARIA DE LOURDES, T.M. Immobilization and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93-101, 2013.
- BHANDARI, S.; GUPTA, V.K.; SINGH, H. Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 1, p. 71-77, 2009.
- BISSETT, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* beta-glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 750-755, 1978.
- BOLIVAR, J.M.; ROCHA-MARTÍN, J.; MATEO, C.; GUIBAN, J. M. Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 679-686, 2012.
- BOLIVAR, J.M.; WILSON, L.; FERRAROTTI, S.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M.; MATEO, C. Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 669-673, 2006.
- BON, E.P; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A.B.; PAIVA, C.L.A.; ALENCASTRO, R.B., COELHO, R.R.R. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 506p., 2008.

BORNSCHEUER, U.T. Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336-3337, 2003.

BRAGA, A.R.C. **Obtenção e caracterização da enzima β -galactosidase submetida a diferentes processos: purificação, imobilização e altas pressões**. 2012, 154 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

BRAGA, A.R.C.; SILVA, M.F.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; KALIL, S.J. A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on eupergit C: structural, kinetic, and thermal characterization. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 796-803, 2014.

BRAGA, A.R.C.; SILVEIRA, J.T.; KALIL, S.J. Propriedades Termodinâmicas da Enzima Beta-Galactosidase Imobilizada em Eupergit® C. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 54-57, 2013.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1735-1750, 2010.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design**. Holanda. Ed. Wiley-VCH, 580p., 2005.

CASTRO, R. J. S., SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

ÇETINUS, Ş.-A.; ÖZTOP, H. N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p. 889-894, 2003.

CHANG, J. J.; HO, F. J.; HO, C. Y.; WU, Y. C.; HOU, Y. H.; HUANG, C. C.; SHIH, M. C.; LI, W. H. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

CLARK, D.S.; BLANCH, H. W. **Biochemical engineering**. Ed. CRC Press, 1997.
COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Ed. Epub, Rio de Janeiro, 288p., 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. In: **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, 2006.

COLLINS, H.C.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da Unicamp. Campinas, 2003.

CORRÊA, A.P.F.; DAROIT, D.J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus* sp. P7 isolated from a Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 1-6, 2010.

CORRÊA, A.P.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; LOPES, F.C.; SEGALIN, J.; RISSO, P.H.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2247-2254, 2011.

COSTA, S.A.; TZANOV, T.; PAAR, A.; GUDELJ, M.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Immobilization of catalases from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, n. 9, p. 815-819, 2001.

DA SILVA, T.M.; PESSELA, B.C.; DA SILVA, J.C.R.; LIMA, M.S.; JORGE, J.A.; GUIBAN, J.M.; MARIA DE LOURDES, T.M. Immobilization and high stability of an extracellular β -glucosidase from *Aspergillus japonicus* by ionic interactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.104, p. 95-100, 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358–363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonia bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, n. 5-6, p. 370-379, 2010.

DE CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; DOS SANTOS, J.C.; DE AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, nº1, p. 146-156, 2004.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 85-93, 2004.

FILHO, M.; PESSELA, B.C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A.V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBÁN, J.M. (2008). Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p.1142-1146, 2008.

FREITAS, K. R. Estabilização enzimática para aplicação em biopurga de tecidos malhas de algodão. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GIONGO, J.L.; LUCAS, F.S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 375-382, 2007.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**. 3rd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 375p., 2013.

GUISÁN, J.M. **Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and Cells**. 2nd edition, Ed. Human Press Inc., Madrid, Spain, 449 p. 2006.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p.15–32, 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.

HARKKI, A.; MÄNTYLÄ, A.; PENTTILÄ, M.; MUTTILAINEN, S.; BÜHLER, R.; SUOMINEN, P.; NEVALAINEN, H. (1991). Genetic engineering of *Trichoderma* to produce strains with novel cellulase profiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 3, p. 227-233, 1991.

HERNAIZ, M.J.; CROUT, D.H.G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 26-32, 2000.

ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis: principles and applications**. Ed Springer Science and Business Media, Chile, 398 p., 2008.

JABALIA, N.; MISHRA, P.C.; CHAUDHARY, N. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. **Journal of Agroecology and Natural Resource Management**, p. 179-183, 2014.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, J. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801-821., 2014.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZON, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for β -galactosidases: Influence of pH, ionic concentration and temperature. **Enzyme Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 33–40, 2004.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D.M. Eupergit C[®], a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157-176, 2000.

KENNEDY, J.F.; REHM, H.J. **Enzyme technology**. V. 7. Ed. John Wiley & Sons, 1987.

KHAN, S.; LINDAHL, S.; TURNER, C.; KARLSSON, E.N. Immobilization of thermostable β -glucosidase variants on acrylic supports for biocatalytic processes in hot water. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 80, p. 28-38, 2012.

KIM, S.Y.; PARK, P.S.W.; RHEE, K.C. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 651-656, 1990.

KLIBANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 722-727, 1983.

KONWARH, R.; KARAK, N.; RAI, S.K.; MUKHERJEE, A.K. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. **Nanotechnology**, v. 20, p. 1-10, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chiton-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRAJEWSKA, B. Ureasas. II. Properties and their customizing by enzyme immobilization: a review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 22-40, 2009.

KUMAR, D.; KUMAR, V.; VERMA, A.K.; SINGH, P.; DUBEY, A. Characterization and immobilization of partially purified alkaline protease extracted from rhizospheric soil bacterium, *Bacillus megaterium* strain EN-2 and *Bacillus subtilis* strain EN-3. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 1, p. 33-39, 2014.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEITE-JÚNIOR, B. R. C.; TRIBST, A. A. N.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, n. 1, p. 44-49, 2014.

LEMES, A.C. **Obtenção e caracterização de queratinase de *Bacillus* sp. p45 a partir de coprodutos e aplicação na produção de queijos cremosos enriquecidos com chia e quinoa**. 2015, 209 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

LEMES, A.C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S.J. (2016). A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 217-224, 2016.

LI, D.; TEOH, W.Y.; GOODING, J.J.; SELOMULYA, C.; AMAL, R. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 11, p. 1767-1777, 2010.

LIN, X.; SHIH, J.C.H.; SWAISGOOD, H.E. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4273-4275, 1996.

MACEDO, A.J.; BEYS DA SILVA, W.O.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. **Canadian journal of microbiology**, v. 54, n. 3, p. 180-188, 2008.

MAGHSOODI, V.; KAZEMI, A.; NAHID, P.; YAGHMAEI, S.; SABZEVARI, M.A. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 607-610, 2013.

MARTINS, A.B.; BURKERT, C.A.V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prébióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230-240, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; GUIBÁN, J. M. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274-280, 2006.

MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009, 225 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 859–865, 2012.

MEUNIER, S.M; LEGGE, R.L. Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol–gel immobilized lipase for transesterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 53-57, 2010.

MIKKELSEN, S.R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical chemistry**. Ed. JohnWiley and Sons, Inc., New Jersey, 375p., 2004.

NAIDU, G. S.N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 1, p. 57-67, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Ed. Artmed, Porto Alegre, v. 6, 2011.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v. 70, n. 4, p. 571-578., 2005.

OKOROMA, E.A.; GARELICK, H.; ABIOLA, O.O.; PURCHASE, D. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 74, p. 54-60, 2012.

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 209-217, 2004

PAULA, A.V.; MOREIRA, A.B.R.; BRAGA, L.P.; CASTRO, H.F.; BRUNO, L.M. Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PEREIRA, M.G.; FACCHINI, F.D.A.; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VICI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUISÁN, J.M.; DE MORAES, M.D.L.T. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 4, p. 561-570, 2015.

PESSELA, B.C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 310-315, 2007.

PESSELA, B.C.C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J.M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 3, p. 369-374, 2003.

PESSELA, B.C.C. **Ingeniería de biocatalizadores y bioprocesos: B-Galactosidasa de *Thermus sp.*, cepa T2**. 2002, 139p. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) – Universidad Politecnica de Madrid, Madrid, 2002.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 643-650, 2008.

RAO, M.B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 597-635, 1998.

SALA, L.; GAUTÉRIO, G.V.; YOUNAN, F.F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C.C., KALIL, S.J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.

- SALEEM, M.; RASHID, M. H.; JABBAR, A.; PERVEEN R., KHALID, A. M.; RAJOKA, M. I. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 849-855, 2005.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organix Process and Development**, v. 15, p. 224- 230, 2011.
- SANTANA, L.N.S.; GUIDINI, C.Z.; RIBEIRO, E.J.. Imobilização da enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em resinas de troca iônica. **Horizonte Científico**, v. 6, n. 1, 2012.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n. 1, p.1-17, 2004.
- SCOPES, R.K. **Protein purification**. Ed. Springer-Verlag, New York, 1988.
- SEVERO, E. E.; OLIVEIRA, J. G.; MACHADO, J. R. **Separação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 utilizando ultrafiltração**. Projeto de Graduação (Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, S. Kinetics study of free and immobilized protease from *Aspergillus* sp. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 7, p. 86-96, 2013.
- SHRINIVAS, D.; KUMAR, R.; NAIK, G.R. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 93-98, 2012.
- SILVEIRA, S.T. **Purificação e imobilização de uma protease queratinolítica produzida por *Chryseobacterium* sp. linhagem kr6**. 2009, 126 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SILVEIRA, S.T.; GEMELLI, S.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. Strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 818-825, 2012.
- SINGH, A.N.; SINGH, S.; SUTHAR, N.; DUBEY, V.K. Glutaraldehyde-activated chitosan matrix for immobilization of a novel cysteine protease, Procerain B. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n. 11, p. 6256-6262., 2011.
- SIRTORI, L. R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D. M.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n. 6, p.357-363, 2006.
- SKIDMORE, G.L.; HORTSMANN, B.J.; CHASE, H.A. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose® FF. **Journal of Chromatography A**, v. 498, p. 113-128, 1990.

SOUSA, M. **Obtenção de um catalisador insolúvel para a produção de D-tagatose por L-arabinose isomerase**. 2015, 138 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SPINELLI, D.; FATARELLA, E.; DI MICHELE, A.; POGNI, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v.48, n. 2, p. 218-223, 2013.

TARDIOLI, P. **Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando arboxipeptidase A e Alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. 2003, 173 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TAVANO, O.L. **Imobilização de amilase de *Neurospora crassa* (mutante *exo-1*) e produção de derivados ativos estabilizados**. 2006, 101 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. **Immobilized enzymes: methods and applications**. Biocatalysis from Discovery to Application. Topics in Current Chemistry, v. 200, p. 95-126, 1999.

TORRES, P.; REYES-DUARTE, D.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F.J. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers. **Process Biochemistry**, v.43, n. 2, p. 145-153, 2008.

VERMA, J.; MODI, D.R.; SHARMA, R.; SAXENA, S. Vital role of alkaline protease in bio-industries: a review. **Plant Archives**, v. 11, n. 11, p. 1083-1092, 2011.

VIEIRA, D.C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009, 115 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

VIEIRA, M.F.; ZANIN, A.M.S.; TARDIOLI, P.W.; MATEO, C.; GUIBAN, J.M. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 27–34, 2014.

WALT, D.R.; AGAYN, V.I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 13, n. 10, 1994.

WANG, J. J.; SWAISGOOD, H.E.; SHIH, J.C.H. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 4, p.421-429, 2003.

WEETALL, H.H. **Immobilized enzymes, antigens, antibodies, and peptides**. Ed. M. Dekker, New York, 661 p., 1975.

WEETALL, H.H.; DETAR, C.C. Covalent attachment of proteins to inorganic supports directly by activation with cyanogen bromide. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p. 295-297, 1975.

WERLANG, P.O.; BRANDELLI, A. Characterization of novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 120, p. 71-80, 2005.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. Ed. CRC Press, 1993.

YANG, J.K.; SHIH, I.L.; TZENG, Y.M.; WANG, S.L. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 406-413, 2000.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Ribeirão Preto, p. 35-85, 2004.

ZENTGRAF, B.; AHERN, T.J. Practical importance of enzyme stability. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 10, p. 1527-1540, 1991.

ZHANG, Y.W.; PRABHU, P.; LEE, J.K. Immobilization of *Bacillus licheniformis* L-arabinose isomerase for semi-continuous L-ribulose production. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 73, n. 10, p. 2234-2239, 2009.