

**IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA POR PSEUDOMONAS
FLUORESCENS 07A USANDO SUPORTE ATIVADO COM
GLUTARALDEÍDO.
CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA**

Juliana Severo Miranda², Kimberly Freitas Cardoso³,
Jane Aparecida de Paula⁴, Monique Renon Eller⁵

Resumo: Neste trabalho, a protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* 07A foi imobilizada utilizando uma estratégia baseada em ligação covalente, empregando DEAE Sephacel como suporte e glutaraldeído como um agente intermediário. Verificou-se possíveis modificações no pH e temperatura ideais da enzima, assim como a possibilidade de reuso e armazenamento. O pH e temperatura ideais da enzima foram deslocados de 7,5 para 8,0 e de 37 °C para 50 °C, respectivamente. A enzima apresentou uma atividade crescente ao longo dos ciclos de reutilização e uma maior estabilidade de armazenamento em relação à enzima livre. Este estudo revelou que a imobilização da protease é vantajosa para sua aplicabilidade, uma vez que ampliou as faixas de condições para a utilização da enzima, permitiu a recuperação do catalisador e manteve a atividade catalítica por tempo prolongado.

Palavras-chave: Estabilização, imobilização de enzimas, ligação covalente, proteólise

Introdução

Proteases têm a função de hidrolisar as ligações peptídicas em proteínas, sendo amplamente utilizadas nas indústrias químicas e alimentícias. No

2Graduanda em Bioquímica – Universidade Federal de Viçosa. E-mail: jumiranda@outlook.com

3Graduanda em Bioquímica – Universidade Federal de Viçosa. E-mail: kimberlycardoso@hotmail.com

4Graduanda em Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa. E-mail: janepaula715@gmail.com

5Orientadora, Prof^a Dra do Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa. E-mail: monique.eller@gmail.com

entanto, a sua utilização é limitada, uma vez que possuem custo elevado, propriedades algumas vezes incompatíveis com as condições de processamento e difícil recuperação no final do processo. Nesse contexto, a imobilização é uma alternativa viável que proporciona a recuperação e reutilização da enzima, reduzindo os custos de sua utilização (SHRINIVAS et al., 2012). Por sua vez, o glutaraldeído tem se mostrado um agente eficaz para imobilizações e reage com resíduos de lisina, levando à formação de ligação covalente (KISHORE e KAYASTHA, 2012).

Assim, o presente trabalho objetivou a imobilização da protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* 07A em resina DEAE Sephacel, utilizando glutaraldeído como um intermediário, para verificar possíveis modificações nas características da enzima que pudessem ser vantajosas para sua aplicabilidade.

Material e Métodos

1. Produção, enriquecimento e imobilização da protease

A bactéria *P. fluorescens* 07A foi cultivada em meio LB (Luria-Bertani) por 48 h a 27 °C. O meio de cultivo foi centrifugado, o sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (60%) e dialisado em membrana de celulose de 14 kDa (Sigma-Aldrich). A imobilização foi feita utilizando como suporte 3 g de DEAE Sephacel, que foi ativado com 2 mL de solução de glutaraldeído 5% (v/v). Posteriormente o suporte ativado foi misturado em 10 mL de solução de protease e a mistura foi mantida a 4 °C por 24 h. As atividades proteolíticas foram mensuradas utilizando caseína como substrato (2% m/v) durante 8 h, a 37 °C. A quantidade de produto formado foi determinada usando o reagente Folin-Ciocateau (50% v/v) com leitura a 660 nm em espectrofotômetro.

2. Efeito do pH e da temperatura

O efeito da imobilização sobre o pH ideal foi mensurado na faixa de valores de pH de 6,72 a 8, à temperatura constante (37 °C). Já a influência da imobilização sobre a temperatura ideal de atividade foi determinada na faixa de 30 a 60 °C, mantendo-se o pH constante (7,5). Ambos os testes foram realizados a partir da determinação de atividade enzimática nos valores testados.

3. Ensaio de reutilização

A reutilização foi feita por 6 ciclos contínuos. Ao final de cada ciclo, a enzima foi recuperada por centrifugação e o sobrenadante coletado para determinação da atividade residual. A cada uso, era feita a lavagem com tampão (Tris-HCl 10 mM, 0,1% CaCl₂, pH 7,5) e um novo substrato era adicionado para um novo ciclo.

4. Estabilidade de armazenamento

Para verificar a estabilidade das enzimas livre e imobilizada ao armazenamento, as colunas foram armazenadas durante 20 dias a 10 °C e a atividade residual foi mensurada.

5. Análise estatística

Os dados foram avaliados, por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para múltiplas comparações, com nível de significância de 0,05. Para a análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism®.

Resultados e Discussão

1. Efeito da imobilização no pH e temperatura ideais

Segundo ALVES et al., (2016), o pH ideal da protease utilizada neste estudo é de 7,5 e a temperatura de maior atividade é 37 °C. A imobilização levou a um acréscimo de 0,5 unidade no pH ideal (Figura 1A) e um acréscimo de 13 °C na temperatura ideal (Figura 1B).

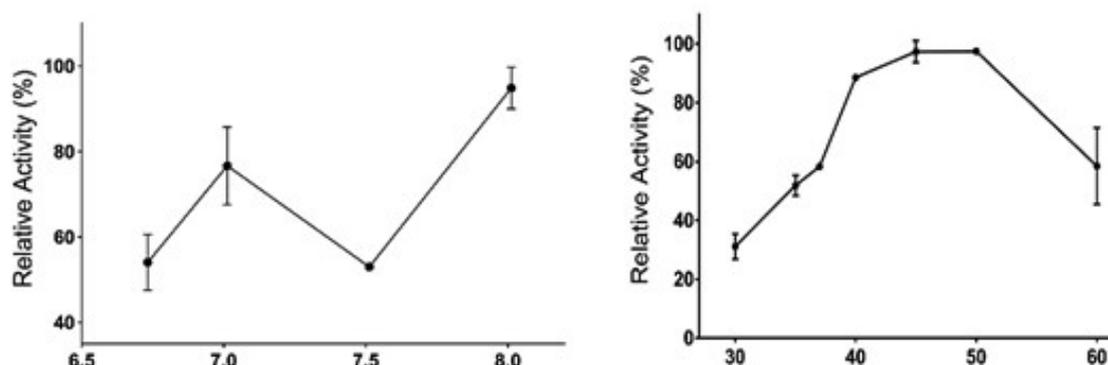


Figura 1 – Influência de diferentes valores de pH e temperaturas na atividade proteolítica da enzima imobilizada. As barras de erro representam a média das triplicatas \pm DP.

A distribuição de cargas é um fator determinante para a conformação tridimensional das proteínas, pois influencia como os resíduos de aminoácidos interagem. A matriz atrai íons OH^- em virtude de sua natureza catiônica, e essa atração pode afetar o microambiente do sítio catalítico da enzima e, conseqüentemente, a estrutura tridimensional enzimática. Assim, uma possível explicação para as alterações observadas no pH ideal é a modificação na distribuição de cargas do suporte e da enzima. Na imobilização realizada, há a formação de braços espaçadores devido ao tratamento prévio da matriz com glutaraldeído, gerando um menor impedimento estérico que permite o maior acesso das hidroxilas ao sistema suporte-enzima, influenciando a distribuição de cargas do sistema e tornando o microambiente catalítico da enzima mais básico e, conseqüentemente, há o aumento do pH ideal.

Com relação à temperatura, a protease imobilizada apresentou uma maior resistência à desnaturação em comparação com a enzima livre, uma vez que a ligação ao suporte pode proporcionar rigidez e reduzir a flexibilidade enzimática, restringindo possíveis mudanças conformacionais (SINGH e KAYASTHA, 2014).

2. Ensaio de reutilização e estabilidade de armazenamento

A utilização de enzimas como catalisadores em escala industrial é um processo dispendioso, e para que este processo seja economicamente viável, é necessário que a enzima possa ser recuperada e que possua alta estabilidade (SINGH e KAYASTHA, 2014). De forma geral, após seis ciclos de reutilização, a atividade da protease aumentou (Figura 2A) e o efeito do armazenamento na atividade proteolítica das enzimas livre e imobilizada é mostrado na figura 2B.

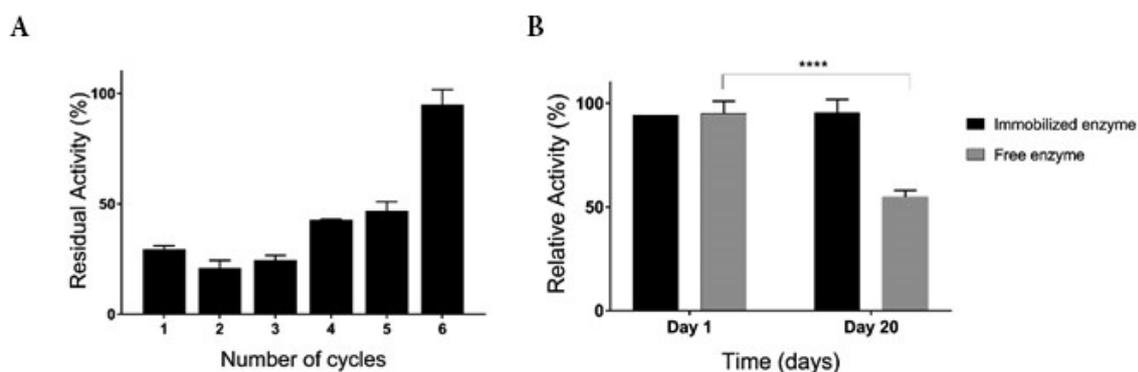


Figura 2 – Efeitos da reutilização na atividade proteolítica e estabilidade da enzima imobilizada. Fig 2A – Atividade residual da enzima imobilizada após 6 ciclos contínuos de reutilização. Fig 2B - Estabilidade da enzima antes e após 20 dias da imobilização. As barras de erro representam a média das triplicatas \pm DP.

O aumento na atividade proteolítica sugere que a enzima não sofre dissociação do suporte com os sucessivos ciclos de reutilização. As lavagens feitas entre os ciclos podem ter promovido a eluição de inibidores que prejudicavam a capacidade catalítica total da enzima. Também pode ter havido o acúmulo de produto residual, que interferiu na absorbância, e de cofatores como o cálcio presente na formulação do tampão utilizado, que influenciaram no aumento da atividade. A imobilização permitiu a recuperação e reutilização do catalisador com facilidade, o que implica na redução dos custos para a aplicação enzimática em processos industriais.

Após 20 dias de armazenamento, a enzima livre perdeu aproximadamente 45% de atividade relativa. Ao contrário, a imobilização não alterou estatisticamente a atividade proteolítica da enzima. Uma possível explicação é que a imobilização por ligação covalente confere à enzima maior resistência e dificulta alterações conformacionais que podem levar à perda de atividade catalítica. De maneira geral, a imobilização contribuiu para o aumento da vida útil do catalisador, permitindo que a enzima possa ser utilizada por mais tempo com a mesma eficiência.

Considerações Finais

A imobilização foi eficiente para melhorar a utilização da protease em relação à enzima livre, permitindo uma maior aplicabilidade para escalas industriais, uma vez que a utilização de enzimas livres não se apresenta como uma opção vantajosa por possuir custo elevado e não ser reutilizável. Porém, estudos ainda são necessários para a otimização do processo, buscando aperfeiçoar o rendimento de imobilização para evitar perdas enzimáticas.

Referências Bibliográficas

ALVES, Maura P. et al. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *Journal of Dairy Science*, p. 1–10, 2016.

KISHORE, Devesh; KAYASTHA, Arvind M. Optimisation of immobilisation conditions for chick pea β -galactosidase (Cp GAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. *Food Chemistry*, v. 134, n. 3, p. 1650–1657, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.055>>.

SHRINIVAS, Dengeti; KUMAR, Raghwendra K.; 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, n. 1, p. 93–98, 2012.

SINGH, Kritika; KAYASTHA, Arvind M. Optimal immobilization of α -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 104, p. 75–81, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117714000794>>.