

IMOBILIZAÇÃO DE UMA PROTEASE OBTIDA DE BACILLUS SP. P45

O. FADANNI¹, D. F. REIS¹, A. BRANDELLI² e S. J. KALIL¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: dqmsjk@furg.br

RESUMO – As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais, atuando como catalisadores na indústria de detergentes, no processamento de alimentos, na indústria de couro, dentro outras aplicações. Essas enzimas apresentam vantagens sobre o uso de catalisadores químicos convencionais, pois exibem alta atividade catalítica e alto grau de especificidade pelo substrato. As aplicações industriais das enzimas são limitadas por vários fatores, tais como elevado custo, instabilidade em pH e temperatura elevados e sua disponibilidade. Dentre muitas abordagens tecnológicas, a imobilização de enzimas apresenta vantagem sobre sistemas de enzimas livres convencionais, no que diz respeito à estabilidade operacional e maior eficiência de catálise. A protease parcialmente purificada obtida de *Bacillus* sp. P45 foi imobilizada através de diferentes métodos e utilizando diferentes suportes. Foram avaliadas 3 diferentes metodologias com a finalidade de avaliar a capacidade de adsorção dos suportes. Os resultados mais promissores para imobilização da enzima foram com o emprego de quitosana e glutaraldeído e Amberlite IR 120, com atividade enzimática de 12,69 e 6,25 U/g de suporte, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas apresentam uma série de características que fazem seu uso vantajoso, em comparação com produtos químicos convencionais. O primeiro deles é uma alta eficiência catalítica, frequentemente superior aos catalisadores químicos, além de apresentar um elevado grau de especificidade, não só pela reação entre os substratos, por partes semelhantes de moléculas (regioespecificidade) e também entre os isômeros ópticos (estereoespecificidade). Essas especificidades garantem que a reação catalisada não é perturbada por reações secundárias, resultando na formação do produto final desejado, enquanto que a produção de subprodutos indesejáveis é eliminada. Isto proporciona um maior rendimento da reação, reduzindo os custos de produção (Krajewska, 2004; Basílio, 1994; Zentgraf e Ahern, 1991).

Além disso, 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. Devido a esse conjunto de vantagens, desde 1960, as enzimas tem sido

empregadas na indústria, atuando em processos de catálise (Mendes *et al.*, 2011; Krajewska, 2004; Basílio, 1994).

Dentre as enzimas, as proteases apresentam uma expressiva importância econômica. A grande diversidade da ação proteolítica sobre as moléculas de proteínas tem tornado essas enzimas essenciais no processamento de alimentos, como carne, pão e produtos lácteos, à manufatura de detergentes, à indústria farmacêutica, de couro e na síntese de hidrolisados proteicos, transformando-os em cadeias menores que podem ser subsequentemente absorvidas pelas células (Brandelli, 2008; Anwar e Saleemuddin, 1998; Basilio, 1994). No grupo das bactérias Gram-positivas, representantes do gênero *Bacillus* destacam-se como importantes produtores de proteases (Corrêa *et al.*, 2010; Giongo *et al.*, 2007; Werlang e Brandelli, 2005).

Embora o emprego de enzimas em processos industriais seja bastante utilizado, sua aplicação pode ser limitada por vários fatores, tais como elevado custo, instabilidade catalítica e o difícil papel de sua recuperação ao final dos processos industriais. Dentre muitas abordagens tecnológicas, a imobilização de enzimas apresenta vantagem sobre sistemas de enzimas livres convencionais, no que diz respeito à estabilidade operacional, maior eficiência de catálise e sua reutilização (Shirivas *et al.*, 2012).

O processo de imobilização enzimática é uma ferramenta importante para melhorar tanto a atividade como a estabilidade de uma enzima, permitindo sua reutilização por longos períodos de tempo a escala industrial. Além disso, a imobilização, permite ultrapassar as desvantagens da solubilidade do meio reacional e da instabilidade operacional durante o uso industrial das mesmas, tornando os catalisadores ideais para o desenvolvimento de uma indústria química sustentável, capaz de sintetizar compostos complexos e úteis, sob condições suaves e economicamente mais rentáveis. Essas vantagens tornam as reações catalisadas por enzimas imobilizadas potencialmente competitivas, frente ao uso de catalisadores químicos (Guisan, 2013; Mendes, 2009; Guisan, 2006; Hernaiz e Crout, 2000).

Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi promover a imobilização de uma protease parcialmente purificada obtida a partir do cultivo submerso de *Bacillus* sp. P45, avaliando a utilização dos suportes: Amberlite IR 120, argila montmorilonita e quitosana e glutaraldeído.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo, preparo do inóculo e produção de protease

O micro-organismo *Bacillus* sp. P45, cedido pela coleção do Instituto de Tecnologia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) foi mantido a 4°C em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI). O inóculo e a produção de protease foi preparado de acordo com Daroit *et al.*, 2011

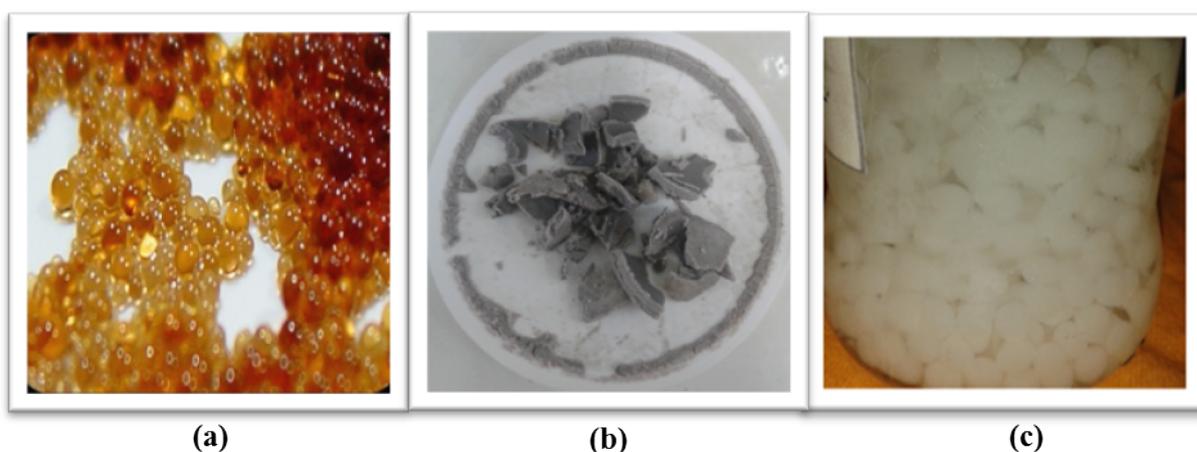
2.2. Purificação parcial da enzima bruta extracelular

A purificação parcial da protease bruta por sistema aquoso bifásico (SAB) seguido de ultrafiltração/diafiltração (UF/DF) foi realizada de acordo com Sala *et al.* (2014). A enzima parcialmente purificada foi liofilizada e utilizada para as imobilizações.

2.3. Imobilização da enzima

A protease parcialmente purificada obtida de *Bacillus* sp. P45 foi imobilizada através de diferentes métodos e utilizando diferentes suportes, conforme mostra a Figura 1. Foram avaliadas 3 diferentes metodologias com a finalidade de avaliar o comportamento da enzima frente ao rendimento de imobilização.

Figura 1 – Imobilização de protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P45 nos suportes (a) Amberlite IR 120, (b) argila montmorilonita e (c) quitosana e glutaraldeído



Imobilização com amberlite IR 120: 4 g da resina catiônica Amberlite IR-120 foi equilibrada com tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0) e incubadas com 20 mL de solução contendo extrato enzimático no mesmo tampão a 10°C por 8 h. As enzimas não ligadas foram removidas através de lavagem no mesmo tampão (adaptado de Abdel-Naby *et al.*, 1998).

Imobilização com argila montmorilonita: 2 g do suporte montmorilonita natural foram adicionados em 25 mL de uma solução contendo o extrato enzimático e o tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0. Esta 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, 2012).

Imobilização com quitosana e 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 por 30 minutos, para remoção de bolhas de ar, e em seguida foram pulverizadas 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, após essa etapa, 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 de GA, as mesmas foram incubadas a 30°C e 100 rpm com 50 mL de 40 g/L de GA por 10 h. Depois da ativação, as esferas foram lavadas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 para remover o excesso de GA, e armazenados a 4°C no mesmo tampão. Para a imobilização da enzima 1 g de esferas úmidas foram incubadas com 25

mL de extrato enzimático 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 remover as enzimas não ligadas, e armazenadas a 4°C (adaptado de Silveira *et al.*, 2009).

2.4. Atividade enzimática e determinação de proteínas

A atividade proteolítica foi determinada pelo método usando azocaseína como substrato (Daroit *et al.*, 2011; Daroit *et al.*, 2010). Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para provocar um aumento de 0,1 unidade de absorvância nas condições de ensaio definidas.

Os brancos foram preparados nas mesmas condições, para quantificar a enzima durante a reação. A atividade enzimática foi calculada para determinação da capacidade de adsorção dos suportes após a imobilização. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da atividade enzimática de protease de *Bacillus* sp. P45 nas diferentes técnicas e suportes. Pode-se verificar que para a imobilização desta enzima, os resultados mais promissores foram com a utilização dos suportes quitosana e glutaraldeído e Amberlite IR 120, com atividades enzimáticas de 12,69 e 6,25 U/g de suporte, respectivamente.

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

Suporte	Atividade enzimática (U/g suporte)
Amberlite IR 120	6,25 ± 0,13 ^b
Argila montmorilonita	2,35 ± 0,29 ^c
Quitosana e glutaraldeído	12,69 ± 0,33 ^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 (Krajewska, 2009; Mikkelsen e Cortón, 2004; Basilio, 1994). Porém, esta técnica não foi tão promissora, uma vez que a enzima imobilizada com o suporte argila montmorilonita apresentou baixa atividade enzimática (2,35 U/g de suporte).

A imobilização por ligação covalente através de um grupo espaçador (glutaraldeído e quitosana) apresentou a maior atividade da enzima por grama de suporte (12,69 U/g). A modificação das esferas de quitosana com glutaraldeído consiste em três objetivos: melhora da mobilidade de enzima imobilizada através da introdução de um grupo espaçador, redução das interações entre proteína e suporte, e introdução de grupos carbonil na superfície da

quitosana para reação de grupos amina da protease (Silveira *et al.*, 2012; Cao, 2005; Abdel-Naby *et al.*, 1998).

A utilização da resina de troca iônica Amberlite IR 120 apresentou uma boa imobilização com atividade enzimática de 6,25 U/g de suporte. Abdel-Naby *et al.*, 1998 encontraram comportamentos semelhantes para imobilização com resinas como DEAE-Celulose, Dowex 1x4 e Eceola-Celulose (5,93, 8,79 e 8,87 U/g de suporte, respectivamente). Este fato pode ser atribuído como resultado do limite de difusão da enzima, ou seja, inicialmente pode ter ocorrido um elevado carregamento da enzima sobre o suporte e as moléculas ocuparam apenas a camada exterior das partículas porosas da resina. Desta maneira, a difusão é menor se as moléculas da enzima estão ligadas apenas na superfície da resina, dificultando a difusão das moléculas de enzima no interior da estrutura porosa durante o processo de imobilização. Limites de difusão, como neste caso, podem conduzir a perda de 60-70% de atividade enzimática (Cao, 2005).

5. CONCLUSÃO

Dentre as diferentes técnicas e suportes utilizados para promover a imobilização da protease parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P45., os melhores resultados foram com a utilização dos suportes quitosana e glutaraldeído e Amberlite IR 120, os quais apresentaram atividades enzimáticas, de 12,69 e 6,25 U/g de suporte, respectivamente. Esses resultados são promissores, indicando a necessidade de estudos futuros a fim de maximizar a técnica de imobilização, avaliando dos parâmetros do processo.

Agradecimentos: CAPES e Programa de Educação Tutorial de Engenharia de Alimentos (PET-EA) da FURG.

6. REFERÊNCIAS

- 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.
- BASÍLIO, C.A. *Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro*. Tese de doutorado em Química, UNICAMP, 1994.
- CAO, L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes. Principles, Applications and Design*. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KHaA., 2005.
- 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.
- DAROIT, D.; 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. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus sp.* P45. *International Biodeterioration & 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 & Biotechnology*, New York, v. 23, p. 375-382, 2007.
- GUIBAN, J. M. *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and Cells*. 2nd edition, Ed. Human Press Inc., Totowa, NJ, 375p. 2006.
- GUIBAN, J. M. *Immobilization of enzymes and Cells*. 3rd edition, ed. Human Press Inc., Madri, Spain, 375p., 2013.
- HERNAIZ, M. J. e 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. 1-2, p. 26-32, 2000.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chiton-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139, 2004.
- MENDES, A. A. *Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel*. Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- 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
- SILVEIRA, S. T., GEMELLI, S., SEGALIN, J., BRANDELLI, A. Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium sp.* Strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. *J. Microbiol. Biotechnology*, v. 22, p. 818-825, 2012.
- 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 & Biotechnology*, v. 39, p. 93-98, 2012.
- WERLANG, P.O.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus sp.* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Totowa, v. 120, p. 71-79, 2005.
- ZENTGRAF, B., AHERN, T. J. Practical importance of enzyme stability. *Pure & Applied Chemistry*, vol. 63, n.º 10, p. 1527-1540, 1991.