



IMOBILIZAÇÃO DE ALCALASE EM DEAE SEPHAROSE E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE GELATINA

L.R.F. Faria¹, M.F.S.M. Mesquita², A.I.S. Brígida³

- 1- Instituto Brasileiro em Medicina de Reabilitação Janeiro - IBMR. CEP 22631-002 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3544-1137 – e-mail: (luizaramada11@gmail.com)
- 2- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. CEP 21941-909 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3938-7001 – e-mail: (mattos.mariafernanda@gmail.com)
- 3- Embrapa Agroindústria de Alimentos. CEP 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9622 – Fax: 55 (21) 3622-9713 – e-mail: (ana.iraiddy@embrapa.br)

RESUMO – O uso de sistemas imobilizados, além de buscar estabilizar e promover o reuso da enzima, no caso de proteases, visa, também, proteger os sítios ativos contra o processo de auto-degradação. No presente trabalho, os efeitos de pH, força iônica e concentração de enzima na imobilização de Alcalase[®] em DEAE sepharose foram avaliados visando desenvolver um protocolo de imobilização. Maior atividade e atividade recuperada foram obtidos em pH 7. Nos estudos de efeito da força iônica, apesar de ter-se observado maior adsorção de proteína em 5 mM, foi observada maior atividade específica utilizando-se tampão 50 mM. Além disso, maior atividade do derivado obtido foi observada quando se utilizou concentração inicial de Alcalase[®] de 9%. O imobilizado obtido nestas condições, quando aplicado na hidrólise de gelatina, apresentou uma cinética um pouco mais lenta frente à enzima livre. Apesar disto, estes resultados são promissores para aplicação do derivado se considerar a possibilidade de reuso da enzima.

ABSTRACT – The use of immobilized enzymes, besides seeking to stabilize and promote the reuse, in the case of proteases it also aims to prevent the active sites from the self-degradation process. In this work, the effect of pH, ionic strength and enzyme concentration in Alcalase[®] immobilization by adsorption on DEAE sepharose was evaluated. Higher immobilized activity and recovered activity at pH 7 were observed. In the ionic strength effect studies, although a higher proportion of adsorbed protein had been demonstrated at 5mM, the highest specific activity was obtained using 50 mM buffer. Moreover, when Alcalase[®] solution with initial concentration of 9% was utilized, higher enzymatic activity of the immobilized form was obtained. When applied in gelatin hydrolysis, the immobilized enzyme obtained in these conditions displayed a relatively slower kinetics compared to the free enzyme. Nevertheless, these results are promising for derivative application considering the possibility of enzyme reuse.

PALAVRAS-CHAVE: adsorção; protease; hidrolisado proteico; capacidade antioxidante; *Oreochromis niloticus*.

KEYWORDS: adsorption; protease; protein hydrolysate; antioxidant capacity; *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia é uma importante espécie na aquicultura de água doce do Brasil e sua crescente produção nos últimos anos causa preocupação quanto à geração de resíduos em entrepostos (FAO, 2012). Dentre os resíduos gerados no beneficiamento de tilápia tem-se a pele e o espinhaço do peixe,



os quais são ricos em gelatina. Além do uso direto da gelatina, como nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, e visando agregar valor aos resíduos gerados, vários estudos têm avaliado a obtenção e aplicação de hidrolisados de gelatina agregando funcionalidades tecnológicas e biológicas, como atividade antioxidante e atividade crioprotetora (Wang et al., 2009; Zhang et al., 2012). A obtenção de hidrolisados proteicos, embora possa ser realizada por rota química, tem na via enzimática, através do uso de proteases, uma alternativa para um processo mais limpo, com menor formação de subprodutos e reprodutibilidade no perfil peptídico do hidrolisado.

Em paralelo, a literatura reporta diversos procedimentos para a estabilidade das proteases, sendo que o processo de imobilização é apontado como mais eficiente e tido como um dos métodos mais favoráveis na aplicação de enzimas em reações de síntese, pois possuem benefícios em relação ao reuso e a estabilidade das enzimas, além de preservar os sítios ativos das proteases contra o processo de auto-degradação (Purcena et al., 2009). Alguns estudos têm utilizado matriz sol-gel, resinas, agarose bem como outros suportes para imobilização de proteases (Corici et al., 2011; Yust et al., 2010) e estudado o desempenho destes em reações, a exemplo da hidrólise de isolado proteico de grão de bico. No presente estudo, avaliou-se o efeito do pH, força iônica e concentração de enzima na imobilização de alcalase em DEAE sepharose por adsorção visando desenvolver um protocolo de imobilização e aplicou-se o imobilizado na hidrólise de gelatina de tilápia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A enzima Alcalase[®] 2.4L foi gentilmente cedida pela Novozymes. O suporte DEAE sepharose foi adquirido pela General Electric - GE. N-Boc-L-alanina p-nitrofenil ester (BANE), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e albumina de soro bovino foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA). A gelatina de tilápia foi fornecida pela Embrapa Agroindústria Tropical. Demais reagentes utilizados eram de grau analítico.

2.2 Imobilização de alcalase

Para os estudos de imobilização de Alcalase[®] em DEAE sepharose, solução estoque de Alcalase[®] foi diluída em tampão fosfato de sódio no pH e força iônica de estudo. A proporção suporte:enzima foi de 0,03 g de suporte para 1 ml de solução de enzima. A imobilização por adsorção ocorreu à 25°C, sob agitação branda (~10 rpm), utilizando a técnica de banho finito. Após 1 hora de contato, o sobrenadante foi separado do derivado por filtração e a atividade de ambos foi determinada. Durante os estudos de imobilização, além de acompanhar a atividade hidrolítica no derivado obtido e do sobrenadante, o cálculo de dois outros parâmetros (atividade recuperada e rendimento de imobilização) foi fundamental para avaliar o desempenho do processo de imobilização. O rendimento de imobilização (R) pode ser definido como a quantidade de enzima teoricamente imobilizada (Equação 1). Já a atividade recuperada ($At_{recuperada}$) é a relação de quanto das enzimas teoricamente imobilizadas se encontram ativas (Equação 2). A avaliação desses parâmetros indicaram as melhores condições de imobilização obtidas através deste estudo.

$$R(\%) = \left(1 - \frac{At_s}{At_b}\right) * 100 \quad (1)$$

$$At_{recuperada} = \frac{At_d}{\frac{At_0}{Ms} * R} * 100 \quad (2)$$

sendo,

Ats: atividade hidrolítica medida no sobrenadante após um dado período de imobilização (U);



At_b : atividade hidrolítica medida numa solução “branco” de mesma concentração inicial que a solução destinada a imobilização após o mesmo período destinado a At_s (U);

At_d : atividade hidrolítica medida no derivado (U/g);

At_0 : atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U);

Ms : massa do derivado (g).

O teor de proteína adsorvida (mg de proteína/g de suporte) também foi um parâmetro avaliado. Este foi calculado como sendo a diferença entre a massa de proteína inicial e a massa após um dado tempo de contato entre enzima e suporte no sobrenadante dividida pela massa do suporte. Para avaliar o teor de proteína no sobrenadante, utilizou-se a metodologia descrita por Bradford (1976).

2.3 Medida de atividade enzimática

A atividade proteolítica de alcalase livre ou imobilizada foi determinada através da hidrólise de BANE (Tardioli, 2003). Inicialmente, preparou-se uma solução mãe de BANE a 100 mM em acetonitrila. Posteriormente, 60 μ l desta solução foram diluídos em 5,94 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 contendo 20% (v/v) de etanol. A solução foi mantida sob agitação magnética, a 25°C. Para iniciar a reação de hidrólise, 10 μ l da solução de enzima livre ou uma massa definida de enzima imobilizada foram adicionados ao sistema. A formação de p-nitrofenol foi acompanhada durante 3,5 min de reação em espectrofotômetro a 405 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 7840 l/(mol.cm). Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de BANE por minuto. Os experimentos foram realizados em duplicata e os valores obtidos nos resultados expressam a média.

2.4 Hidrólise de gelatina

A gelatina de tilápia foi solubilizada em água (1%, p/p) e o pH e temperatura do meio reacional foram ajustados em 6,0 e 55°C, respectivamente (Faria et al., 2015). Desta solução foi coletado o branco de reação (Br). Em seguida, adicionou-se uma massa de enzima imobilizada equivalente a 48 U e esperou-se 1 min para a coleta do ponto 0 hora. As reações de hidrólise ocorreram sob agitação constante em reator encamisado, por 5 horas. A reação foi monitorada de acordo com o método pH-stat, mantendo o pH constante através da adição contínua de NaOH 1M. Também foi realizada amostragem do sistema reacional em tempos definidos para determinação da atividade antioxidante dos hidrolisados. A reação nas alíquotas de amostragem foi interrompida por aquecimento destas a 85 °C por 15 min.

2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por meio da capacidade dos hidrolisados proteicos em sequestrar o radical estável DPPH• (Yang et al., 2009). Foi preparada uma solução etanólica de DPPH• a 0,1 mM. As determinações foram realizadas misturando-se 1,5 mL da amostra (ABSA), ou de água (ABS Branco), com 1,5 mL da solução de DPPH•. Após a mistura, o tubo foi agitado em vortex por 10 segundos e, após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Ácido ascórbico a 1000 ppm foi utilizado como controle positivo. A atividade em DPPH (AtivDPPH) foi calculada conforme Equação 3.

$$AtivDPPH(\%) = \frac{ABS_{Branco} - ABSA}{ABS_{Branco}} * 100 \quad (3)$$



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do protocolo de imobilização

Visando desenvolver um protocolo de imobilização de Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção, estudou-se o efeito do pH (Tabela 1), concentração de enzima (Tabela 2) e força iônica (Tabela 3) no processo de imobilização. O efeito do pH no processo de imobilização por adsorção foi avaliado na faixa de pH de 5 a 8. Maior atividade hidrolítica foi observada para pH 7 e 8, embora maiores teores de proteína adsorvida tenham sido observados em pH 5 e 6, o que indica uma maior interação física enzima:suporte nestes últimos valores de pH. Baixos valores de atividade, rendimento e atividade recuperada em pH 5 e 6 mostram que, apesar destes valores de pH proporcionarem uma maior interação física, a orientação da enzima durante o processo de imobilização não favorece a exposição dos sítios ativos. Entre pH 7 e 8, maior atividade recuperada foi observada em pH 7, sendo portanto este valor selecionado para os estudos seguintes.

Tabela 1 – Parâmetros de processo de imobilização de Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção a temperatura ambiente, tampão fosfato de sódio 100 mM, concentração inicial de enzima de 20 U/ml e tempo de contato de 1 hora, em diferentes valores de pH.

pH	Atividade do Imobilizado (U/g)	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)	Proteína Adsorvida (mg/g)
5	21,1	19	10	1,4
6	14	0	*	1,3
7	33,3	2	241,3	0,5
8	34,3	31,7	13,6	*

* Não foi possível determinar o valor.

Após a definição do pH de adsorção, avaliou-se o efeito da força iônica no processo de imobilização (Tabela 2). Três concentrações de tampão fosfato de sódio foram utilizadas visando obter imobilização em baixa, média e alta força iônica. Baixa força iônica, embora tenha apresentado maior proteína adsorvida, resultou em apenas 20 U/g a mais que os demais derivados. Já a diferença entre força iônica média e alta foi praticamente nula quanto à atividade. Calculando a atividade específica (U/mg de proteína adsorvida) para os três casos, tem-se 38, 242 e 52 U/mg para Alcalase[®] imobilizada em 5, 50 e 100 mM, respectivamente. Como os valores de atividade do derivado para os três estão próximos, selecionou-se 50 mM por apresentar maior atividade específica.

Tabela 2 – Parâmetros de processo de imobilização de Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção a temperatura ambiente, tampão fosfato de sódio pH 7, concentração inicial de enzima de utilizando concentração inicial de enzima de 20 U/ml e tempo de contato de 1 hora, variando a força iônica do meio.

Concentração do Tampão (mM)	Atividade do Imobilizado (U/g)	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)	Proteína Adsorvida (mg/g)
5	57,6	4,9	118,4	1,5
50	38,7	15,5	20,7	0,16
100	36,7	1,8	175	0,7

Após a definição do pH de adsorção (pH 7) e da força iônica de imobilização (50 mM), avaliou-se o efeito da concentração inicial de enzima no processo de imobilização (Tabela 3). Para tanto, soluções de Alcalase[®] partindo da solução comercial foram preparadas em tampão fosfato de



sódio 50 mM pH 7 de forma a ter concentrações de 1 a 9 %. Tanto a atividade de Alcalase[®] imobilizada quanto o teor de proteína adsorvida aumentaram com o aumento da concentração de enzima oferecida para o processo de imobilização. É possível que o suporte ainda não esteja saturado na condição de 9%, contudo, nesta concentração já não foi possível calcular os parâmetros de atividade recuperada e rendimento de imobilização por não ter sido possível detectar diferença entre a atividade da solução oferecida e do sobrenadante após 1 hora de contato. Corici et al. (2011) ao estudar o encapsulamento de Alcalase[®] em matriz sol-gel obtiveram 80% de rendimento de imobilização e a imobilização de até 163 mg de proteína / g de gel. Nas condições de atividade máxima para o presente trabalho, este valor foi de 1,63 mg/g de suporte, valor este bem inferior aos reportados por Corici et al. (2011).

Tabela 3 – Efeito da concentração de enzima oferecida nos parâmetros de processo de imobilização de Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção a temperatura ambiente, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7, tempo de contato de 1 hora.

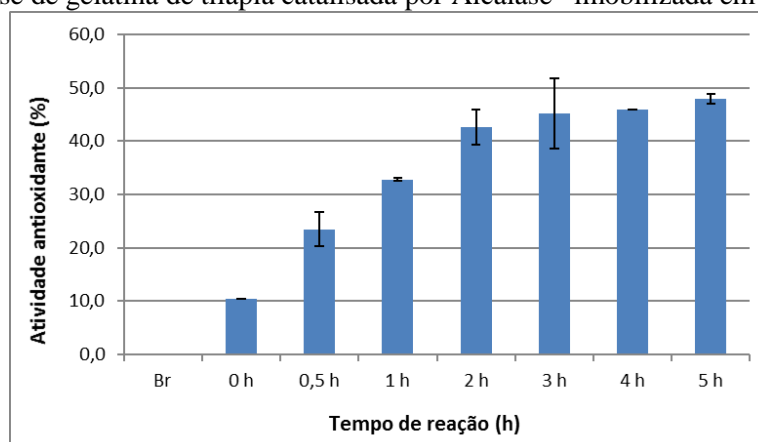
Concentração de Enzima (%)	Atividade do Imobilizado (U/g)	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)	Proteína Adsorvida (mg/g)
1	16	34,6	6,8	*
3	38,7	15,5	20,7	0,16
5	63,7	53,5	10,2	0,67
9	116,5	*	*	1,63

* Não foi possível determinar o valor porque a concentração mais elevada de enzima utilizada impede de observar-se diferença de atividade entre a solução de enzima inicial e a obtida após 1 hora de contato com o suporte.

3.2 Aplicação do imobilizado na hidrólise de gelatina

Definido um protocolo de imobilização para Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção, preparou-se um derivado utilizando 9% de concentração inicial de enzima preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH7. Posteriormente, este derivado foi utilizado na catálise da hidrólise de gelatina de tilápia (Figura 1), nas condições reacionais descritas no item 2.4.

Figura 1 – Hidrólise de gelatina de tilápia catalisada por Alcalase[®] imobilizada em DEAE-sepharose



A reação foi acompanhada medindo-se a atividade antioxidante do hidrolisado de gelatina obtido. Observou-se que a partir de 2 horas de reação, a produção de peptídeos tende



a estabilizar num valor médio de 45% de atividade antioxidante. Faria et al. (2015) estudaram o uso de Alcalase[®] livre nas mesmas condições reacionais e observou-se uma estabilização na produção de peptídeos com atividade antioxidante de 35% após 1 hora de reação. A interferência do aumento da transferência de massa ao se aplicar Alcalase[®] imobilizada também foi observada por Corici et al. (2011) quando utilizaram matriz sol-gel para encapsulamento.

4. CONCLUSÕES

O processo de imobilização de Alcalase[®] em DEAE-sepharose por adsorção é influenciado por variações no pH, concentração de enzima e força iônica. Dentre as condições estudadas, maior atividade no derivado foi obtida quando a imobilização ocorreu em tampão fosfato de sódio, pH 7, 50 mM. O imobilizado obtido nestas condições, quando aplicado na hidrólise gelatina, apresentou uma cinética um pouco mais lenta frente à enzima livre. Apesar disto, estes resultados são promissores para aplicação do derivado se considerar a possibilidade de reuso.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 476978/2013-0) pelo apoio financeiro e bolsa de iniciação científica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Corici, L. N.; Frissen, A. E.; Zoelen, D.-J.; Egeen, I. F.; Peter, F.; Davidescu, C. M.; Boeriu, C. G. (2011). Sol-gel immobilization of alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73, 90-97.
- FAO. (2012). World review of fisheries and aquaculture. Rome. 147.
- Faria, L. R. F.; Fonseca, T. F. DA; Brigida, A. I. S.; Silva, C. M.; Santos, A. A. dos; Azevedo, T. de L. (2015). Efeito das condições de reação na obtenção de hidrolisado de gelatina de tilápia com atividade antioxidante. In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS*, 20.; *SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA*, 11, Fortaleza, Brasil.
- Purcena, L. L. A.; Caramori, S. S.; Mitidieri, S.; Fernandes, K. F. (2009). The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 1077-1081.
- Tardioli, P. W. (2003). *Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose*. (Tese de Doutorado). Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Wang, S.; Agyare, K.; Damodaran, S. (2009). Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 115, 620-630.
- Yang, J.-I., Liang, W.-S., Chow, C.-J., Siebert, K.J. (2009). Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochemistry*, 44, 1152-1157.
- Yust, M. M.; Pedroche, J.; Millán-Linares, M. C.; Alcaide-Hidalgo, J. M.; Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilized Alcalase. *Food Chemistry*, 122, 1212-1217.
- Zhang, Y.; Duan, X.; Zhuang, Y. (2012) Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38, 13-21.