



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Estabilização, concentração, purificação e aplicação da transglutaminase
microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837**

Evandro Antônio de Lima
Biólogo

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas - SP, Julho de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L628e Lima, Evandro Antônio
 Estabilização, concentração, purificação e aplicação da
transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 /
Evandro Antônio Lima . -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

 Orientador: Hélia Harumi Sato
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

 1. Transglutaminase microbiana. 2. *Streptomyces*. 3.
Termoestabilidade. 4. Concentração. 5. Purificação I. Sato, Hélia
Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Stabilization, concentration, purification and application of microbial
transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Palavras-chave em inglês (Keywords): Microbial transglutaminase, *Streptomyces*,
Thermal stability, Concentration, Purification

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Luciana Francisco Fleuri

Juliana Alves Macedo

Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação defendida e aprovada em ____ de _____ de 2010, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

Orientadora – DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri

Membro Titular – UNESP/Botucatu

Dra. Juliana Alves Macedo

Membro Titular - DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos

Membro Suplente - UNIARARAS

Profa. Dra. Valéria Marta Gomes de Lima

Membro Suplente – UNESP/Assis

Aos meus pais Euflausino e Edna,
Meus irmãos Elaine e Everson e
Meus sobrinhos Maria Júlia e João Guilherme,
Com muito amor e carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar saúde, sabedoria e força para enfrentar os desafios da vida sem desanimar, pois sem ele não teria chegado até aqui.

À toda minha família pelo apoio, incentivo e amor todos os dias ao longo dessa caminhada.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pela oportunidade, paciência, confiança e por ser um exemplo de pessoa e de pesquisadora.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e correções que contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos amigos “republicanos” com quem tive o prazer de conviver ao longo destes dois anos, em especial, agradeço a Aline Vilar, Fabíola e Ewerton (amigos desde a época de graduação), Graciela e Gustavo pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos (Priscila Becker, Priscila Hoffmann, Beatriz, Valdeci, Fabiano, Patrícia, Márcio, Fran, Viviane, Carolina, Camilo, Joelise, Juliana e Érica) pela amizade, força e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável ao longo destes dois anos. Ao Haroldo, Patrícia Castro e Marcela pelas dicas e discussões sobre o trabalho. E, em especial, aos amigos e companheiros de bancada Ana Luiza, Danielle Branta, José Valdo (Júnior) e Paula pelos momentos de descontração, seriedade e cooperação.

À todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para minha formação.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

“O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”

Paulo Coelho

"Na ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; ela fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui para melhorar a própria sorte."

Ernest Renan (1823-1892)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxiii
RESUMO GERAL	xxv
GENERAL ABSTRACT	xxix
INTRODUÇÃO GERAL	1
I. CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica – Produção, purificação, caracterização e aplicações da transglutaminase	5
Resumo	5
Abstract	5
I.1. Introdução	6
I.2. Transglutaminases microbianas	10
I.3. Produção, purificação e características bioquímicas das transglutaminases microbianas	14
I.4. Estabilização da transglutaminase microbiana	23
I.5. Aplicações da transglutaminase microbiana	25
I.6. Conclusões	27
I.7. Referências Bibliográficas	27
II. CAPÍTULO 2: Estudo da estabilidade térmica da transglutaminase microbiana de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 e efeito de inibidores e ativadores da enzima	39
Resumo	39
Abstract	39
II.1. Introdução	40
II.2. Material e métodos	43
II.2.1. Micro-organismo utilizado e manutenção	43

II.2.2. Produção de MTGase por fermentação submersa em reator de bancada	44
II.2.2.1. Preparo do meio de cultivo e do pré-inóculo	44
II.2.2.2. Produção da enzima em reator de bancada utilizando 2 estágios de temperatura e agitação	45
II.2.3. Concentração da MTGase por adição de sulfato de amônio	45
II.2.4. Determinação da atividade de MTGase.....	45
II.2.5. Estudo da estabilidade da enzima.....	46
II.2.5.1. Estudo da termoestabilidade da MTGase	46
II.2.5.2. Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase	47
II.2.5.3. Estudo do efeito de diferentes compostos na termoestabilidade da MTGase	51
II.2.6. Efeito do etanol na atividade da MTGase	51
II.2.7. Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase	52
II.3. Resultados e discussão	52
II.3.1. Estudo da estabilidade da enzima.....	52
II.3.1.1. Estudo da termoestabilidade da MTGase	52
II.3.1.2. Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase	54
II.3.1.3. Estudo do efeito de diferentes compostos na termoestabilidade da MTGase	61
II.3.2. Efeito do etanol na atividade da MTGase	68
II.3.3. Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase	71
II.4. Conclusões	73
II.5. Referências Bibliográficas	74
III. CAPÍTULO 3: Concentração, aplicação e purificação parcial da transglutaminase microbiana de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	81
Resumo	81
Abstract.....	82

III.1. Introdução	82
III.2. Material e métodos.....	85
III.2.1. Determinações analíticas.....	85
III.2.1.1. Determinação da atividade de MTGase.....	85
III.2.1.2. Determinação da concentração de proteínas	85
III.2.2. Produção da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	86
III.2.3. Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase	86
III.2.3.1. Concentração da MTGase por liofilização	87
III.2.3.2. Concentração da MTGase por ultrafiltração	87
III.2.3.3. Concentração da MTGase por adição de sulfato de amônio	87
III.2.3.4. Concentração da MTGase com solventes orgânicos acetona e etanol	88
III.2.3.5. Concentração da MTGase em tubos de diálise utilizando adsorventes.....	88
III.2.4. Aplicação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em proteína texturizada de soja.....	88
III.2.5. Purificação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	89
III.2.5.1. Purificação parcial da MTGase em colunas de troca-iônica CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75.....	89
III.2.5.2. Purificação da MTGase em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B..	90
III.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	91
III.2.7. Determinação do pH ótimo de atividade da MTGase purificada em Blue Sepharose CL-6B.....	93
III.3. Resultados e discussão	93
III.3.1. Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase	93
III.3.2. Aplicação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em proteína texturizada de soja.....	97
III.3.3. Purificação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	99

III.3.3.1. Purificação parcial da MTGase em colunas de troca-iônica CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75	99
III.3.3.2. Purificação da MTGase em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B	105
III.3.4. Caracterização da MTGase purificada em Blue Sepharose CL-6B	110
III.4. Conclusões	113
III. 5. Referências Bibliográficas	114
CONCLUSÕES GERAIS	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura I. 1 - Reações catalisadas pela transglutaminase.....	7
Figura I. 2 - Mecanismo de ação da transglutaminase	8

Capítulo II

Figura II. 1 - Estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	53
Figura II. 2 - Cinética de desnaturação térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	55
Figura II. 3 - Linearização da redução decimal (D) para o cálculo do valor Z da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	58
Figura II. 4 - Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para o cálculo de E_{ad} da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837.....	59
Figura II. 5 - Efeito de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	62
Figura II. 6 - Efeito de alguns polióis e carboidratos na estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	65
Figura II. 7 - Efeito de diferentes concentrações de etanol na estabilidade da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 a 25°C	70

Capítulo III

Figura III. 1 - Aplicação da MTGase na reestruturação de proteína texturizada de soja	98
Figura III. 2 - Purificação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em coluna de CM-celulose	100
Figura III. 3 - Purificação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em coluna de Sephadex G-75	101

Figura III. 4 - Purificação da MTGase das frações TG-S1 e TG-S2 de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em coluna de Sephadex G-75	102
--	-----

Figura III. 5 - Purificação da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 em coluna de Blue Sepharose CL-6B	106
Figura III. 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	109
Figura III. 7 - Relação entre o Rf e o log da massa molecular dos padrões de proteínas para determinação da massa molecular das MTGases purificadas de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	110
Figura III. 8 - pH ótimo de atividade das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 obtidas após purificação em Blue Sepharose CL-6B ...	111

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

Tabela I. 1 - Desenvolvimentos na produção de transglutaminase microbiana	12
Tabela I. 2 - Métodos de purificação e características bioquímicas da transglutaminase microbiana de diferentes origens	16

Capítulo II

Tabela II. 1 - Perfil de K_d , da meia-vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal (D) da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	56
Tabela II. 2 - Parâmetros termodinâmicos da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 ..	60
Tabela II. 3 - Influência de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 durante incubação a 45°C por 30 minutos.....	63
Tabela II. 4 - Influência de alguns polióis e carboidratos na estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 durante incubação a 45°C por 30 minutos	66
Tabela II. 5 - Efeito da combinação de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	67
Tabela II. 6 - Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	71

Capítulo III

Tabela III. 1 - Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase de <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 por diferentes métodos	94
Tabela III. 2 - Purificação da MTGase <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 por precipitação com sulfato de amônio 80% e cromatografia em colunas de CM-celulose e Sephadex G-75 ...	103
Tabela III. 3 - Purificação da MTGase <i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837 por precipitação com sulfato de amônio 80% e cromatografia em coluna de Blue Sepharose CL-6B.....	107

RESUMO GERAL

A transglutaminase microbiana (MTGase; EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de catalisar a formação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias através da reação de acil transferência entre resíduos de glutamina e lisina. A incorporação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas por ação da transglutaminase vem sendo empregada pela indústria alimentícia para modificar principalmente a textura, a viscosidade e a capacidade de formação de gel de alimentos. Este trabalho teve como principal objetivo estudar a estabilidade térmica, o efeito de inibidores e ativadores, a concentração e a purificação da transglutaminase microbiana produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI 837. No estudo da estabilidade térmica da enzima verificou-se que a transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 é uma enzima termossensível, estável em temperaturas abaixo de 40°C e rapidamente inativada acima de 50°C. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da desnaturação térmica da enzima foram determinados para as seis temperaturas estudadas. Os tempos de meia-vida da enzima a 55 e 60°C foram estimados em 3,5 e 1,9 minutos, respectivamente. A influência de alguns compostos no aumento da estabilidade térmica da enzima foi investigada, sendo verificado que a adição de EDTA e KCl na concentração de 1% e de cisteína e glutatona na concentração de 0,1% aumentaram a estabilidade térmica da transglutaminase durante incubação a 45°C por 30 minutos. O efeito de compostos como etanol, ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi estudado. O etanol na concentração de 10% (v:v) apresentou pouco efeito na atividade enzimática, enquanto que concentrações acima de 40% (v:v) provocaram rápida inativação da enzima. A MTGase foi ativada na presença de EDTA e cisteína e inativada na presença de iodoacetamida e ácido cloromercuribenzóico, sugerindo que esta é uma enzima cálcio independente com um resíduo de cisteína no sítio ativo. No estudo da concentração da MTGase foram avaliados diferentes métodos, sendo verificado que a precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação foi o método mais efetivo, possibilitando a concentração do sobrenadante de cultivo cerca de 4,5 vezes com rendimento de 142%. A aplicação da

preparação enzimática bruta concentrada de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em proteína texturizada de soja apresentou efeito similar ao da enzima comercial Activa® TG-BP quando aplicada nas mesmas condições. Na purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B foram separadas 3 frações com atividade de transglutaminase (TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3), indicando a presença de isoenzimas. A massa molecular da MTGase presente nas frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 foi estimada em cerca de 35 KDa por SDS-PAGE. As três frações obtidas foram caracterizadas quanto ao pH ótimo de atividade enzimática. Foi observado que a fração parcialmente purificada TG-BS1 apresentou atividade ótima em pH 10,0 e um segundo pico de atividade em pH 6,0, enquanto as frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram pH ótimo de atividade em pH 6,5 e também um segundo pico de atividade em pH 10,0.

Palavras-chave: transglutaminase microbiana, *Streptomyces*, termoestabilidade, concentração, purificação

GENERAL ABSTRACT

The microbial transglutaminase (MTGase, EC 2.3.2.13) is an enzyme capable of catalyzing the formation of covalent cross-links among proteins, peptides and various primary amines by reaction of acyl transfer between glutamine and lysine residues. The incorporation of covalent cross-links between proteins by the action of transglutaminase has been used by the food industry to modify especially the texture, viscosity and gel forming ability of foods. This work aimed to study the thermal stability, effect of inhibitors and activators, concentration and purification of microbial transglutaminase produced by strain *Streptomyces* sp. CBMAI 837. It was observed in the study of thermal stability of the enzyme that the transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 is a thermosensitive enzyme, stable at temperatures below 40°C and rapidly inactivated above 50°C. Kinetic and thermodynamic parameters of thermal denaturation of the enzyme were determined for six temperatures. It was estimated that the half-life times of the enzyme at 55 and 60°C were 3.5 and 1.9 minutes, respectively. The influence of compounds to increase the thermal stability of the enzyme was investigated, and it was found that the addition of EDTA and KCl at a concentration of 1% and cysteine and glutathione at a concentration of 0.1% increased the thermal stability of transglutaminase during the incubation at 45°C for 30 minutes. The effect of compounds such as ethanol, activators and inhibitors on enzymatic activity of MTGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 was studied. The ethanol concentration 10% (v/v) had little effect on enzyme activity, while concentrations above 40% (v/v) resulted in rapid inactivation of the enzyme. The MTGase was activated in the presence of EDTA and cysteine and inactivated in the presence of iodoacetamide and chloromercuribenzoic acid, suggesting that this is a calcium independent enzyme with a cysteine residue at the active site. Different methods were evaluated in the study of the concentration of MTGase, confirming that the precipitation with ammonium sulfate at 80% saturation of the culture supernatant was the method more effective, being concentrated this enzyme about 4.5 fold with a yield of 142%. The application of crude enzyme preparation of MTGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 concentrated by

ammonium sulfate in texturized soy protein showed a similar effect to the one of commercial enzyme Activa[®] TG-BP when applied under the same conditions. Three fractions with transglutaminase activity (TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3) were separated in the purification of MTGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 in column affinity Blue Sepharose CL-6B, indicating the presence of isoenzymes. The molecular mass of MTGase present in the purified fractions TG-BS2 e TG-BS3 was estimated at about 35 KDa by SDS-PAGE. The three fractions were characterized by optimum pH of enzymatic activity. It was observed that the partially purified fraction TG-BS1 showed optimal activity at pH 10.0 and a second peak of activity at pH 6.0, while the purified fractions TG-BS2 e TG-BS3 showed optimum pH activity at pH 6.5 and also a second peak of activity at pH 10.0.

Keywords: microbial transglutaminase, *Streptomyces*, thermal stability, concentration, purification

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de alimentos está em constante pesquisa para melhorar as características das proteínas, que são importantes ingredientes alimentares devido à sua ação na solubilidade, viscosidade, ligação à água, gelificação, elasticidade, emulsificação, formação de espuma e fixação de lipídios e aroma, podendo causar modificação de textura, aparência e aroma em alimentos (SGARBIERI, 1996).

A demanda por produtos alimentares proteicos de alta qualidade tem apresentado crescimento nas duas últimas décadas. Particularmente, respeitando à aceitação e preferências dos consumidores, métodos para modificar as propriedades funcionais das proteínas tem aumentado o interesse para desenvolvimento de produtos alimentares com melhores propriedades sensoriais e nutricionais (DUBE *et al.*, 2006).

Muitos agentes de polimerização estão disponíveis, mas a utilização de enzimas para modificação das propriedades funcionais de alimentos via ligações cruzadas de proteínas pode ser mais adequada em comparação aos processos químicos. Isto porque as enzimas são requeridas somente em quantidades catalíticas, possuem alta especificidade e tem menor probabilidade de produção de compostos tóxicos, sendo percebidas pelos consumidores como mais naturais que os produtos químicos (WAKAMEDA *et al.*, 1990; SINGH, 1991; GAUCHE *et al.*, 2008).

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima que tem a habilidade de catalisar a formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares entre proteínas através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e aminas primárias.

A formação de ligações cruzadas entre proteínas usando transglutaminase leva a formação de agregados proteicos irreversíveis sendo desta forma adequada para a melhoria das propriedades funcionais de proteínas vegetais e animais, permitindo a formação de produtos com melhores propriedades reológicas e sensoriais. Estas ligações cruzadas possuem a capacidade de realizar diferentes alterações nas propriedades e nas características das proteínas, tais como: modificação da capacidade

de gelificação através da alteração da viscosidade e elasticidade do gel, melhoramento da estabilidade térmica e aumento da capacidade de retenção de água. As alterações estruturais de proteínas alimentares promovidas pela transglutaminase permitem o desenvolvimento de novos produtos e novas tecnologias de processamentos para a obtenção de alimentos de alta conveniência e com maior valor agregado e nutricional (ZHU *et al.*, 1995; MOTOKI e SEGURO, 1998; YOKOYAMA *et al.*, 2004).

Os estudos sobre transglutaminases intensificaram nos últimos 20 anos após o relato de ANDO *et al.* (1989) sobre a possibilidade de obtenção da enzima em larga escala através do cultivo de micro-organismos em biorreatores. Atualmente, preparações enzimáticas de transglutaminase microbiana são comercializadas com o nome de Activa[®] TG pela empresa japonesa Ajinomoto Co., Biobond[®] TG e Transglutaminase (TG) pelas empresas chinesas Kinry Food Ingredients Co. e Yiming Biological Products Co., respectivamente.

Recentemente, MACEDO *et al.* (2007) relataram o isolamento e a otimização das condições de produção da enzima a partir da linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 isolada de amostras de solo brasileiro.

Neste contexto, o presente trabalho visou como principais objetivos estudar a estabilidade térmica e parâmetros de inativação térmica, efeito de inibidores e ativadores e métodos de concentração e purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

O capítulo 1 trata de uma revisão bibliográfica sobre produção, purificação, caracterização e aplicações da transglutaminase.

O capítulo 2 descreve a caracterização da preparação enzimática bruta concentrada de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 quanto à estabilidade térmica, através da determinação de parâmetros termodinâmicos e da cinética de inativação térmica e o estudo do efeito de diferentes compostos na atividade enzimática.

No capítulo 3 são abordados aspectos do estudo da concentração do extrato enzimático bruto e purificação da transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por métodos cromatográficos para obtenção de preparações enzimáticas visando a aplicação na indústria de alimentos. Neste capítulo também é relatado o teste de aplicação da preparação enzimática bruta concentrada de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 na reestruturação de grânulos de proteína texturizada de soja.

I. CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica – Produção, purificação, caracterização e aplicações da transglutaminase

Resumo

As transglutaminases são uma família de enzimas que catalisam reações de acil transferência entre grupos γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e grupos ϵ -amino de lisina em proteínas, formando ligações covalentes cruzadas inter ou intramoleculares. Até o final da década de 1980 a transglutaminase era obtida somente de tecidos animais, principalmente de fígado de porquinhos da índia, e apresentava poucas aplicações. Entretanto, com a descoberta e produção da enzima por micro-organismos houve um aumento do interesse e aplicações da transglutaminase, principalmente no setor de alimentos. Atualmente, a transglutaminase microbiana é uma enzima importante para o processamento de alimentos devido ao fato de unir pedaços de carne e formar produtos reestruturados, melhorar a textura de produtos de panificação, aumentar a capacidade de formação de gel, diminuir a sinérese de produtos lácteos fermentados, formar filmes proteicos, entre outros. Em adição, a enzima é capaz de aumentar o tempo de vida de prateleira de certos alimentos e reduzir sua alergenicidade. Recentemente, esta enzima também tem sido descrita para aplicações em engenharia biomédica, ciência de materiais, indústria têxtil e farmacêutica, imobilização de enzimas e processamento de couro.

Abstract

The transglutaminases are a family of enzymes that catalyze an acyl transfer reactions between the γ -carboxyamide groups of glutamine residues and ϵ -amino groups of lysine in proteins, leading to the covalent inter or intramolecular crosslinking. Until late 1980s the transglutaminase had been obtained only from animal tissue, especially guinea-pig's liver, and had few applications. However, the discovery of the enzyme

produced by microorganisms led to an increase in interest and applications of transglutaminase, particularly in the food sector. Currently, microbial transglutaminase is an important enzyme for food processing due its ability of join pieces of meat making restructured products, improve the texture of bakery products, increase gel formation, decrease syneresis of fermented milk products, form protein films and others. In addition, the enzyme is able to increase the shelf life of some kinds of food and reduce its allergenicity. Recently, this enzyme has also been used in applications for biomedical engineering, materials science, textiles and pharmaceuticals, immobilization of enzymes and leather processing.

I.1. Introdução

A enzima transglutaminase (TGase; proteína-glutamina: amina γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) catalisa uma reação de acil transferência entre o grupo γ -carboxiamida de resíduos de glutamina de ligações peptídicas (acil doador) e uma variedade de aminas primárias (acil aceptores), incluindo o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina em certas proteínas. Na ausência de substratos amina, a TGase catalisa a reação de deamidação de resíduos de glutamina utilizando moléculas de água como acil aceptores (MOTOKI e SEGURO, 1998).

As reações catalisadas pela transglutaminase estão esquematizadas na Figura I.1.

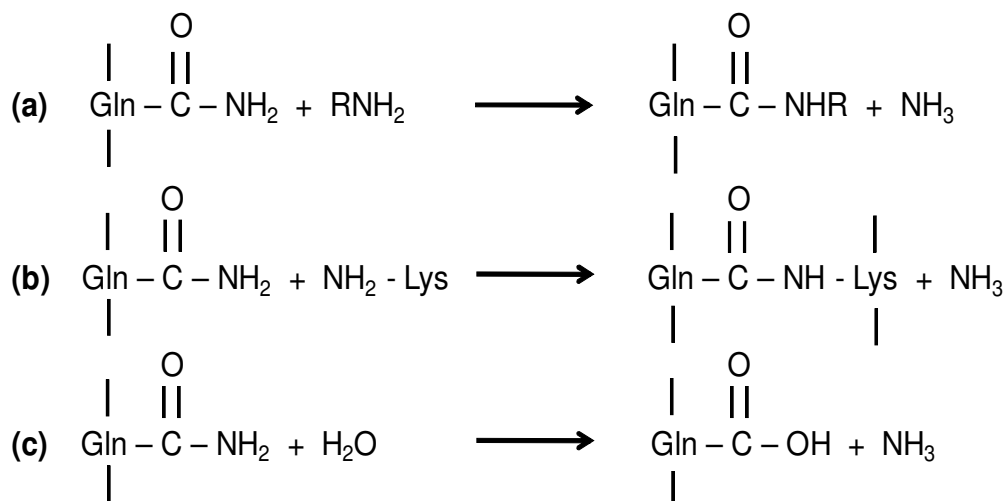


Figura I. 1 - Reações catalisadas pela transglutaminase: (a) reação de acil transferência; (b) reação de ligação cruzada entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas ou peptídeos; (c) reação de deamidação (MOTOKI e SEGURO, 1998)

Quando o aceptor acil é uma amina terminal de um resíduo de lisina de uma cadeia polipeptídica ocorre uma reação de polimerização, resultando na formação de ligações cruzadas entre cadeias polipeptídicas. A ligação formada é chamada de ϵ -(γ -glutamil)lisina e pode ocorrer tanto inter como intramolecularmente. As ligações formadas pela transglutaminase exibem alta resistência à degradação proteolítica e resultam na formação de agregados proteicos irreversíveis (GRIFFIN *et al.*, 2002; YOKOYAMA *et al.*, 2004). A formação destas ligações, consequentemente, pode alterar diversas propriedades das proteínas. Quando a reação ocorre com lisina livre ou outras aminas primárias o resultado é a incorporação de aminas na cadeia polipeptídica, com consequente alteração da hidrofobicidade da superfície. Quando o aceptor acil na reação é a água, ocorre a deamidação do grupo γ -carboxiamida do resíduo de glutamina gerando ácido glutâmico, neste caso há um aumento de resíduos carboxílicos resultando na alteração da carga da proteína (GERRARD, 2002).

O mecanismo de ação da transglutaminase apresenta semelhanças com o de proteases, consistindo basicamente de duas etapas (Figura I.2). Na primeira etapa o

grupo tiol da cisteína presente no sítio ativo ataca a cadeia lateral de um resíduo de glutamina disponível no substrato proteico, formando um complexo acil-enzima e liberando amônia. Posteriormente, uma amina primária substitui a enzima, gerando uma glutamina carboxiamida modificada (NEGUS, 2001).

Apesar das transglutaminases apresentarem semelhanças com as proteases quanto ao mecanismo de ação, estas diferem em relação ao tipo de reação catalisada. As transglutaminases catalisam a formação de ligações cruzadas entre proteínas enquanto as proteases promovem a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas.

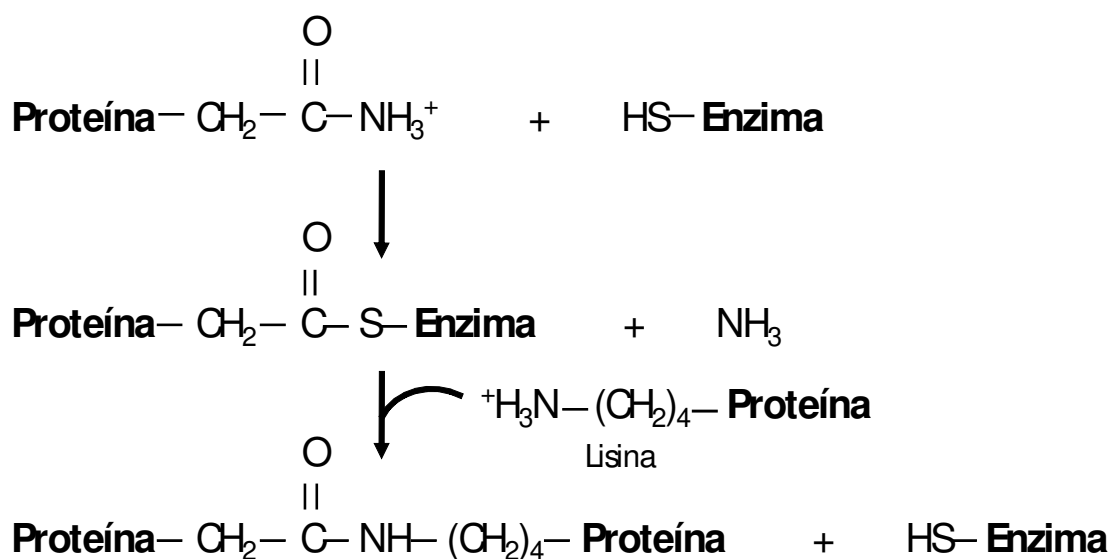


Figura I. 2 - Mecanismo de ação da transglutaminase (NEGUS, 2001)

As transglutaminases estão amplamente distribuídas em muitos tecidos e fluídos corporais de animais, onde estão envolvidas em vários mecanismos biológicos, tais como coagulação sanguínea, cicatrização de ferimentos e queratinização da epiderme. As TGases são relatadas como responsáveis pela regulação do crescimento, diferenciação e proliferação celular (FOLK, 1980). Em humanos a ação da enzima também tem sido relacionada com doenças degenerativas do sistema nervoso como as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (JEITNER *et al.*, 2009) e também com patologias autoimune como a doença celíaca (DEKKING *et al.*, 2007).

A enzima TGase também está presente em plantas, como girassol, milho e soja (FALCONE *et al.*, 1993; SERAFINI-FRACASSINI *et al.*, 2009); peixes, como escamudo do Alasca e tilápia (YASUEDA *et al.*, 1994; WORRATAO e YONGSAWATDIGUL, 2005), invertebrados, como nematóides e moluscos (CARIELLO *et al.*, 1997; NOZAWA *et al.*, 1997) e micro-organismos (ANDO *et al.*, 1989).

FOLK (1980) e ANDO *et al.* (1989) relataram que diversas TGases contém um ou mais resíduos de cisteína no centro ativo. Contudo, as TGases geralmente apresentam características moleculares diferentes dependendo da sua origem. Por exemplo, as enzimas de vertebrados apresentam uma estrutura multidomínios, enquanto a enzima de origem microbiana, apresenta apenas um único domínio. Elas também podem diferir quanto ao grupo de aminoácidos que está ao redor do aminoácido cisteína no sítio ativo. Estas diferenças estruturais proporcionam alterações na enzima, tais como: em vertebrados a enzima é cálcio dependente e apresenta alta massa molecular (aproximadamente 80 KDa), enquanto a enzima microbiana não necessita deste íon para sua ação e tem baixa massa molecular (aproximadamente 40 KDa) (KASHIWAGI *et al.*, 2002).

CLARKE *et al.* (1959) descreveram a presença de uma enzima ativada por cálcio na fração solúvel do fígado de porquinhos da índia que catalisava a incorporação de uma ampla variedade de amins em proteínas. Posteriormente, descobriu-se que esta enzima se tratava da transglutaminase (FOLK e COLE, 1966).

Durante a década de 1980 foi demonstrada a possibilidade de modificação das propriedades funcionais de proteínas através da formação de ligações cruzadas entre proteínas alimentares de diferentes origens, como caseínas do leite e globulinas de soja pelo uso da transglutaminase, derivada de fígado de porquinhos da índia e plasma bovino, para a incorporação de aminoácidos e peptídeos com objetivo de corrigir deficiências nutricionais (IKURA *et al.*, 1992; KURTH e ROGERS, 1984).

MOTOKI *et al.*, no início da década de 1980, realizaram vários estudos para verificar a viabilidade da modificação de proteínas alimentares para utilização industrial usando a TGase de porquinho da índia. Nestes estudos foi observado que soluções altamente concentradas de proteínas de soro do leite, actomiosinas de carne bovina, suína e de frango podiam formar géis na presença da enzima. Também foi demonstrado melhora na solubilidade, capacidade de retenção de água e estabilidade térmica destas proteínas. Estes resultados indicaram que a TGase possuía potencial para criar novas proteínas com características funcionais únicas. Entretanto, o estoque limitado e a não aceitabilidade de fígado de porquinhos da índia para uso alimentar desencorajaram a comercialização (MOTOKI e SEGURO, 1998).

O fator XIII da coagulação sanguínea, uma isoforma da TGase presente no plasma de animais responsável pela estabilização da fibrina durante sangramentos, foi extraído comercialmente na Europa a partir do sangue bovino e suíno. Entretanto, esta enzima apresentava limitações à sua aplicação em indústrias de alimentos devido à necessidade de ser ativada pela trombina e a sua pigmentação avermelhada, que prejudicava à aparência dos produtos (MOTOKI e SEGURO, 1998).

I.2. Transglutaminases microbianas

O interesse na aplicação de transglutaminases em escala industrial, especialmente em alimentos, aumentou após os estudos sobre modificação de proteínas por essas enzimas. Porém, a origem animal da enzima tornava inviável a sua produção, devido a problemas de aceitação pelos consumidores, ao alto custo de obtenção e as dificuldades de extração e purificação.

A atividade de transglutaminase microbiana é encontrada nos gêneros *Streptomyces* (ANDO *et al.*, 1989; GERBER *et al.*, 1994; LANGSTON *et al.*, 2007), *Bacillus* (KOBAYASHI *et al.*, 1998; SOAREZ *et al.*, 2003a), *Physarum* (KLEIN *et al.*, 1992), *Candida* (HERRERA *et al.*, 1995), *Actinomadura* (KIM *et al.*, 2000) e *Saccharomyces* (MÁZAN e FARKAS 2007). No entanto, os micro-organismos

pertencentes ao gênero *Streptomyces* são os mais relatados como produtores de transglutaminase pelo fato de secretarem grandes quantidades da enzima em relação aos demais (ZOTZEL *et al.*, 2003).

A função da transglutaminase em micro-organismos ainda não é totalmente conhecida, porém evidências sugerem que esta enzima está envolvida principalmente em reações de reticulação das proteínas dos esporos, uma vez que esta foi detectada durante a esporulação de *Bacillus subtilis*, entre 6 - 10 horas após o início da fase estacionária, mas não em células vegetativas durante a fase exponencial (RAGKOUSI e SETLOW, 2004). Também foi verificada a presença de uma grande quantidade de ligações isopeptídicas do tipo ϵ -(γ -glutamil)lisina presentes nas proteínas da capa dos esporos (KOBAYASHI *et al.*, 1998). Em micro-organismos do gênero *Streptomyces*, acredita-se que a enzima também está envolvida na formação de ligações covalentes entre diferentes proteínas da parede celular auxiliando desta forma no crescimento micelial característico destes micro-organismos (ZOTZEL *et al.*, 2003) e no sistema de defesa (SARAFEDDINOV *et al.*, 2009).

ANDO *et al.* (1989) foram os primeiros a relatar o isolamento e seleção de micro-organismos produtores de TGase. Dentre 5.000 micro-organismos investigados foi isolada uma linhagem do gênero *Streptoverticillium* (atualmente denominada *Streptomyces*) com alta capacidade de produzir a transglutaminase, a qual foi denominada MTGase (transglutaminase microbiana). A partir de então, diversos estudos envolvendo isolamento e seleção de novos micro-organismos e melhorias nos processos fermentativos para produção da enzima têm sido realizados.

A Tabela I.1 ilustra os estudos desenvolvidos sobre isolamento de micro-organismos e produção de MTGase por linhagens de *Streptomyces* spp. e outros micro-organismos.

Tabela I. 1 - Desenvolvimentos na produção de transglutaminase microbiana
(ZHANG *et al.*, 2009, adaptado)

Ano	Micro-organismo	Foco do desenvolvimento	Rendimento (U/mL)	Referências bibliográficas
1989	<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	Isolamento de micro-organismo	~ 2,0	ANDO <i>et al.</i> , 1989
1996	<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	Otimização do meio de cultura	~ 1,0	ZHU <i>et al.</i> , 1996
1997	<i>Streptoverticillium cinnaamoneum</i>	Otimização do meio de cultura	~ 0,3	JUNQUA <i>et al.</i> , 1997
2000	<i>Actinomadura</i> sp.	Isolamento de micro-organismo	~ 5,0	KIM <i>et al.</i> , 2000
2001	<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	Otimização das condições de cultivo	3,37	ZHENG <i>et al.</i> , 2001
2004	<i>Streptoverticillium ladakanum</i>	Isolamento de micro-organismo	0,348	TÉLLEZ-LUIS <i>et al.</i> , 2004
2005	<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	Otimização das condições de cultivo	3,32	YAN <i>et al.</i> , 2005
2006	<i>Bacillus circulans</i>	Isolamento de micro-organismo e otimização do meio de cultivo	0,306	SOUZA <i>et al.</i> , 2006
2007	<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	Isolamento de micro-organismo e otimização do meio de cultivo	1,4	MACEDO <i>et al.</i> , 2007
2007	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Isolamento de micro-organismo e otimização das condições de cultivo	5,04	CHENG <i>et al.</i> , 2007
2009	<i>Streptomyces platensis</i>	Isolamento de micro-organismo	2,26	YEO <i>et al.</i> , 2009
2009	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Estratégias de fermentação	5,79	XU <i>et al.</i> , 2009 <i>apud</i> ZHANG <i>et al.</i> , 2009
2009	<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	Estratégias de fermentação	2,05	BAGAGLI, 2009

Outra forma para obtenção de transglutaminases microbianas é através da modificação genética de micro-organismos. A manipulação de micro-organismos por engenharia genética para expressão das TGases de peixes, porquinhos da índia e seres humanos foi estudada para a obtenção da enzima em larga escala e com baixo custo.

IKURA *et al.* (1988) relataram a expressão do gene da transglutaminase de fígado de porquinho da índia em *Escherichia coli*. O fator XIIIa da coagulação humana foi expresso em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BISHOP *et al.*, 1990), assim como a transglutaminase de músculo de peixe em *Escherichia coli* (YASUEDA *et al.*, 1995). Contudo, não houve a comercialização destas enzimas devido às regulamentações alimentares e aceitabilidade dos consumidores (MOTOKI e SEGURO, 1998).

Atualmente, visando maior rendimento na produção de MTGase tem se utilizado a engenharia genética para a obtenção de linhagens microbianas modificadas que expressem o gene da transglutaminase de *Streptomyces* spp. (ZHANG *et al.*, 2009).

TAKEHANA *et al.* (1994) realizaram a síntese química do gene da transglutaminase de *Streptomyces mobaraense* e sua expressão em células de *Escherichia coli*. Entretanto, a atividade enzimática obtida foi muito baixa apesar do produto do gene induzido ter sido idêntico ao da TGase nativa.

LIN *et al.* (2006) relataram a clonagem do gene codificador da MTGase de *Streptomyces platensis* e sua expressão em *Streptomyces lividans* com a obtenção de atividade enzimática de 2,2 U/mL.

Apesar do sucesso na incorporação e expressão do gene da transglutaminase de *Streptomyces* spp. pelos micro-organismos geneticamente modificados a produção obtida de enzima ativa é baixa devido à necessidade de um mecanismo de ativação da enzima, que é secretada na forma de zimogênio (pró-transglutaminase), por proteases específicas (DATE *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2009).

Recentemente os estudos de produção da MTGase têm se baseado no entendimento do mecanismo biológico de síntese da enzima para auxiliar no aumento

da produtividade tanto por linhagens microbianas selvagens como por linhagens recombinantes (ZHANG *et al.*, 2009).

I.3. Produção, purificação e características bioquímicas das transglutaminases microbianas

A produção de MTGase pode ser realizada tanto por fermentação submersa como fermentação em meio semi-sólido.

No caso da fermentação submersa para produção da enzima o procedimento é basicamente o mesmo para os diversos micro-organismos. O meio de cultivo normalmente apresenta em sua composição como fonte de carbono glicose, sacarose, amido, glicerina ou dextrina. Como fonte de nitrogênio podem ser utilizadas fontes inorgânicas como fontes orgânicas. Os minerais necessários e microelementos utilizados são: fosfato, magnésio, potássio, ferro, cobre, zinco e vitaminas. Também podem ser adicionados, se necessário, surfactantes não iônicos e antiespumante. A fermentação é realizada com agitação e aeração utilizando temperaturas entre 25 e 35°C (ZHU *et al.*, 1995; MACEDO e SATO, 2005).

A fermentação em meio semi-sólido para produção de MTGase tem sido estudada como uma alternativa à fermentação submersa, visando elevar a produtividade e reduzir custos do processo fermentativo. Os micro-organismos do gênero *Streptomyces* são bactérias filamentosas, presentes em solos, capazes produzir metabólitos durante fermentação em meio semi-sólido devido ao tipo de desenvolvimento microbiano que facilita o seu espalhamento sobre o substrato, permitindo o consumo dos nutrientes disponíveis (ZOTZEL *et al.*, 2003; RAIMBAULT, 1998).

Os substratos utilizados na fermentação semi-sólida para produção da MTGase normalmente são resíduos agrícolas e agroindustriais como resíduo fibroso de soja e de arroz, casca de soja, bagaço de malte, palha de sorgo hidrolisada, farinha de amendoim

e de feijão umedecidos com solução salina (SOAREZ *et al.*, 2003a; TÉLLEZ-LUIS *et al.*; 2004; SOUZA *et al.*, 2008; BAGAGLI, 2009).

A MTGase de *Streptomyces* spp. é uma enzima extracelular, assim esta pode ser recuperada do sobrenadante do meio de cultivo da fermentação submersa após centrifugação e separação das células intactas e do material sólido e no caso da fermentação semi-sólida após a extração da enzima do meio de cultivo e filtração para separação do material sólido, não sendo necessária uma etapa de ruptura celular para obtenção da enzima (ZHU *et al.*, 1995).

Para a concentração da enzima pode ser utilizado precipitação com sulfato de amônio, etanol, acetona, álcool isopropílico, cloreto de sódio e ultrafiltração. Para a purificação da MTGase métodos comumente utilizados para outras enzimas podem ser aplicados, como cromatografia de troca-iônica, afinidade, filtração em gel e interação hidrofóbica (ZHU *et al.*, 1995).

Na Tabela I.2 estão apresentados alguns métodos de purificação da MTGase e as características bioquímicas das transglutaminases de alguns micro-organismos.

Tabela I. 2 - Métodos de purificação e características bioquímicas da transglutaminase microbiana de diferentes origens

Micro-organismo	Método de purificação	Massa molecular (KDa)	Características bioquímicas *	Referências bibliográficas
<i>Streptoverticillium mobaraense</i> S-8112	Ultrafiltração e colunas de Amberlite CG-50 e Blue Sepharose	40	a- 6,0 – 7,0 b- 50°C d- 5,0 – 9,0	ANDO <i>et al.</i> , 1989
<i>Bacillus subtilis</i>	Precipitação com sulfato de amônio e colunas de Fenil-Sepharose, Sephacryl S200 e Mono-Q Sepharose	29	a- 8,2 b- 60°C	SUZUKI <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces platensis</i>	Ultrafiltração e colunas de S-Sepharose, Mono-Q Sepharose e Superdex 75	-	a- 9,0 b- 45°C	BECH <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces libani</i>	Ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e colunas de Superdex G-25, CM-Sepharose, Q-Sepharose e Superdex G-75.	37,9	a- 5,0 b- 53°C c- 10 – 40°C d- 5,0 – 8,0	UMEZAWA <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus circulans</i>	Precipitação com sulfato de amônio e colunas de Q-Sepharose e Octil-Sepharose	45	a- 7,0 b- 47°C d- 6,0 – 8,0	SOAREZ <i>et al.</i> 2003b
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Precipitação com etanol e colunas de CM-celulose e Sephadex G-75	38	a- 6,0 – 7,0 b- 37 – 45°C c- 50°C d- 5,0 – 8,0	CUI <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces</i> sp. CBMAI 837	Coluna de Sephadex G-75	45	a- 6,0 – 6,5 b- 35 – 40°C c- 45°C d- 4,5 – 8,0	MACEDO <i>et al.</i> , 2010

* a- pH ótimo; b- temperatura ótima; c- estabilidade térmica; d- pH de estabilidade

ANDO *et al.* (1989) descreveram a produção de MTGase pela linhagem *Streptoverticillium mobaraense*. Os autores utilizaram um sistema de fermentação submersa em batelada, em reatores de 20 L com agitação de 250 rpm, aeração de 10 L/min e temperatura de 30°C para o crescimento do micro-organismo. Para a purificação o sobrenadante do meio de cultivo foi concentrado por ultrafiltração e aplicado em coluna de Amberlite CG-50. As frações ativas foram aplicadas novamente na mesma coluna sob condições idênticas e em seguida foram purificadas por coluna de Blue Sepharose. Através deste processo a enzima foi purificada 22,6 vezes com rendimento de 42%. A massa molecular da enzima foi estimada em 40 KDa por SDS-PAGE. A MTGase estudada apresentou ponto isoelétrico de 8,9 e mostrou-se estável na faixa de pH 5,0 – 9,0 após 10 minutos a 37°C e reteve 100% da atividade após 10 minutos de tratamento a 40°C em pH 7,0 e 74% da atividade em pH 7,0 a 50°C. Foi observado que a enzima era independente de íons cálcio para sua atividade e que era inibida na presença de ácido p-cloromercuribenzoato, monoiodoacetato e N-etilmaleimida.

KLEIN *et al.* (1992) estudaram a purificação da transglutaminase intracelular do fungo *Physarum polycephalum*. Para extração da enzima a massa celular do fungo foi tratada com acetona resfriada, homogeneizada em homogeneizador Waring Blender e filtrada em papel de filtro. A massa celular foi seca e estocada congelada a -50°C. Para extração da enzima, 5g de massa celular seca foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo CaCl₂, EDTA e β-mercaptoetanol. A suspensão foi homogeneizada, centrifugada e concentrada pela adição de 65 mL de solução 50% de polietilenoglicol (PEG 6.000 e 8.000), preparado com o tampão descrito acima, em 150 mL de solução de proteína. O precipitado foi recolhido por centrifugação, solubilizado em tampão e aplicado em coluna DEAE-celulose. A enzima eluída nas frações iniciais foi combinada e purificada por gradiente de isoeletrofocalização usando 1% de Ampholine pH 5 – 7. As frações contendo atividade de MTGase, próximas ao pH 6,1, foram reunidas. A transglutaminase foi purificada neste processo cerca de 818 vezes com 54% de rendimento. A massa molecular da enzima foi estimada em 77 KDa por

filtração em gel Sepharose 12. Verificou-se também que a enzima é um dímero composto de subunidades idênticas eletroforeticamente.

GERBER *et al.* (1994) relataram que a MTGase de *Streptoverticillium mobaraense* podia ser purificada por um método rápido e simples. Os pesquisadores realizaram uma comparação entre o método descrito por ANDO *et al.* (1989), utilizando cromatografias de troca iônica em Amberlite CG-50 e interação hidrofóbica em Fenil-Sepharose, e o método utilizando apenas cromatografia de troca-iônica em Fractogel EMD SO_3^- . Foi demonstrado que a purificação da MTGase por cromatografia em Amberlite CG-50 acompanhada com Fenil-Sepharose é muito demorada e que as preparações enzimáticas obtidas não eram totalmente livres de proteínas contaminantes. Com a utilização do novo método, Fractogel EMD SO_3^- , a separação foi mais efetiva e o rendimento maior, além disso, este podia ser reproduzido em larga escala sem grandes alterações.

TSAI *et al.* (1996) relataram a produção, purificação, caracterização e aplicação da MTGase de *Streptoverticillium ladakanum*. O micro-organismo foi cultivado em meio de cultivo composto de 1% de glicerol; 1,5% de extrato de levedura; 0,2% de K_2HPO_4 e 0,1% de MgSO_4 com pH ajustado para pH 7,0, por 4 dias a 100 rpm e 28°C. Após 96 horas de incubação o meio de cultivo foi filtrado, concentrado pela adição fracionada de sulfato de amônio a 55 e 75% de saturação e dialisado contra tampão fosfato 5 mM, pH 7,5. O extrato enzimático concentrado foi aplicado em coluna Blue Sepharose Fast Flow e eluído com gradiente linear de NaCl de 0 a 0,5 M. As frações com atividade de MTGase foram reunidas, dialisadas e concentradas por ultrafiltração. A enzima foi purificada 26,3 vezes com rendimento de 63%. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 37,5 KDa e 30,5 KDa por SDS-PAGE e filtração em gel Superdex 75, respectivamente. Foi observado que a enzima purificada apresentava pH e temperatura ótima de atividade de 6,0 e 50°C, respectivamente, estabilidade em pH entre 5,0 e 7,0 e ponto isoelétrico de 7,9. A enzima foi inibida por p-cloromercuribenzoato, fenilmetilsulfonil fluoreto, Pb^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , mas sua atividade não foi afetada por cálcio e ácido etilenodiaminotetracético.

HO *et al.* (2000) com o intuito de simplificar a purificação e aumentar o rendimento da MTGase purificada de *Streptoverticillium ladakanum* usando duas etapas cromatográficas em colunas de CM-Sepharose CL-6B e Blue Sepharose Fast Flow, compararam o método de eluição por gradiente linear de NaCl de 0 a 1,0 M nas duas etapas com o método não linear pela adição de tampão contendo 0,2 e 0,4 M de NaCl na primeira etapa e 0,2 e 0,7 M de NaCl na segunda etapa. A recuperação da MTGase através dos métodos de eluição por gradiente linear e não linear foram de 68,4% e 81%, respectivamente. A enzima purificada apresentou atividade ótima em pH 5,5 e 40°C e estabilidade em pH entre 5,0 e 7,0. Os íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , e os compostos ácido iodoacético, p-cloromercuribenzoato, N-etilmaleimida e fenilmetilsulfonil fluoreto atuaram como inibidores da enzima.

A transglutaminase de *Streptoverticillium mobaraense* foi purificada e caracterizada por LU *et al.* (2003). O micro-organismo foi cultivado em biorreator contendo meio de cultivo composto de 30 g/L de amido; 20 g/L de peptona; 2 g/L de MgSO_4 ; 2 g/L de K_2HPO_4 ; 2 g/L de KH_2PO_4 , pH 6,5 a 30°C, aeração de 1,33 vvm e agitação entre 400 e 500 rpm por 40 horas. Após a fermentação, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração e precipitação por etanol. O extrato enzimático concentrado foi purificado através de coluna CM-celulose seguida de uma etapa de filtração em gel em Sephadex G-75. A enzima purificada apresentou atividade ótima a 52°C e pH 6,0 e manteve-se estável na faixa de pH entre 5,0 e 7,0 e em temperaturas entre 20 e 40°C. Foi observado que a atividade enzimática foi fortemente inibida na presença de N-etilmaleimida e Zn^{2+} .

UMEZAWA *et al.* (2002) estudaram a produção e purificação da MTGase produzida por *Streptomyces libani* e também compararam as propriedades enzimáticas da enzima purificada com a MTGase obtida de *Streptoverticillium mobaraense*. O micro-organismo foi cultivado em meio de cultivo (0,2% de K_2HPO_4 ; 0,2% de extrato de levedura; 0,2% de MgCl_2 ; 2 % de peptona; 2% de amido solúvel, pH 6,0) a 30°C, 200 rpm por 7 dias. O sobrenadante de cultivo foi ultrafiltrado em membrana de exclusão de 10 KDa e precipitado pela adição fracionada de sulfato de amônio a 40 e

70% de saturação. O precipitado foi filtrado e aplicado nas colunas cromatográficas Superdex G-25, CM-Sepharose Fast Flow, Q-Sepharose High Performance e Superdex G-75. Ao final da etapa de purificação a enzima foi purificada 29,7 vezes com rendimento de 4,7%. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 37,95 KDa por SDS-PAGE e o ponto isoelétrico em 6,38. Foram observadas algumas diferenças nas propriedades enzimáticas das MTGases de *Streptomyces libani* e *Streptoverticillium mobaraense* quando as duas enzimas foram comparadas. A enzima de *Streptomyces libani* apresentou temperatura ótima e de estabilidade menor que a de *Streptoverticillium mobaraense*, assim como uma menor capacidade de promover a formação de géis em soluções proteicas.

SOAREZ *et al.* (2003b) descreveram a purificação e caracterização da MTGase produzida por *Bacillus circulans* isolado da região amazônica. A linhagem foi inoculada em biorreator de 5 L contendo 3 L de meio de cultivo basal composto de 20 g/L de amido solúvel; 20 g/L de peptona; 2 g/L de extrato de levedura; 2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 g/L de K_2HPO_4 e 2 g/L de KH_2PO_4 por 160 horas a 30°C e 150 rpm. O sobrenadante de cultivo foi precipitado pela adição fracionada de sulfato de amônio a 60 e 90% de saturação, seguido de centrifugação. O precipitado foi coletado, dialisado contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e aplicado em coluna Q-Sepharose Fast Flow e eluido com gradiente linear 0 – 1 M de NaCl. As frações contendo atividade de MTGase foram reunidas e, após diálise, aplicadas em coluna Octil-Sepharose 4 Fast Flow e eluidas com gradiente linear decrescente de sulfato de amônio iniciado com 3,5 M no mesmo tampão Tris-HCl. Neste processo, a MTGase foi purificada aproximadamente 150 vezes com rendimento de 32%. A massa molecular da enzima purificada foi estimada em 45 KDa por SDS-PAGE. A MTGase de *Bacillus circulans* apresentou atividade ótima a 47°C e pH 7,0 e não foi observada dependência de íons cálcio para a atividade enzimática.

A MTGase produzida por uma linhagem de *Streptomyces hygroscopicus*, isolada de amostras de solo, foi purificada a partir do meio de cultivo através da precipitação por adição de etanol 70% (v:v), seguida de sucessivas cromatografias em colunas de

CM-celulose e Sephadex G-75. Ao final do processo a enzima foi purificada 30 vezes com rendimento de 21%. A massa molecular da enzima foi estimada em 38 KDa por SDS-PAGE. A enzima purificada exibiu atividade ótima entre 37 e 45°C e em pH na faixa de 6,0 – 7,0. A enzima mostrou-se instável em temperaturas superiores a 50°C e estável na faixa de pH entre 5,0 – 8,0 em baixas temperaturas. A MTGase não foi inibida por cálcio e ácido etilenodiaminotetracético, porém na presença de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} foi verificada forte inibição (CUI *et al.*, 2007).

LANGSTON *et al.* (2007) realizaram através de um estudo comparativo a purificação das MTGases de 5 espécies de *Streptomyces* (*Streptomyces lydicus*, *Streptomyces platensis*, *Streptomyces nigrescens*, *Streptomyces cinnamoneus* e *Streptomyces hachijoensis*) e de *Phytophthora cactorum*. As MTGases dos micro-organismos do gênero *Streptomyces* foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose seguida de aplicação em coluna de interação hidrofóbica Fenil-Sepharose. Para a purificação da MTGase de *Phytophthora cactorum* foram utilizadas colunas de troca-iônica Q-Sepharose e SP-Sepharose. As enzimas purificadas de *Streptomyces* apresentaram massa molecular entre 35 e 40 KDa e a de *Phytophthora cactorum* 52 KDa em gel de eletroforese SDS-PAGE. Quanto à temperatura e ao pH ótimo de atividade, todas as enzimas apresentaram perfis similares, sendo a temperatura ótima em 37°C e pH ótimo na faixa entre 6,0 e 8,0.

LIN *et al.* (2008) clonaram o gene responsável pela produção da transglutaminase em *Streptomyces platensis* M5218 e o expressaram em *Streptomyces lividans*. Foi realizado o estudo da produção da MTGase recombinante em escala laboratorial e piloto, assim como a purificação e caracterização da enzima. Para a purificação da enzima, inicialmente, o sobrenadante do meio de cultivo foi centrifugado, concentrado por ultrafiltração e precipitado pela adição fracionada de sulfato de amônio a 20 e 50% de saturação, seguido de centrifugação e diálise em tampão acetato 50 mM, pH 5,5. A solução resultante foi filtrada em membrana de 45 μm e aplicada em coluna de CM-Sepharose CL-6B Fast Flow previamente

equilibrada com o mesmo tampão usado na diálise. As frações que apresentaram atividade de MTGase foram reunidas, dialisadas contra tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e aplicadas em coluna Blue Sepharose Fast Flow previamente equilibrada com o mesmo tampão da diálise. As frações com atividade de MTGase foram reunidas, dialisadas contra o mesmo tampão utilizado na corrida e concentradas por ultrafiltração. A enzima recombinante foi purificada 32 vezes com rendimento de 65%. A massa molecular da MTGase foi estimada em 40 KDa por SDS-PAGE. O pH e temperatura ótima para atividade da enzima foram de 6,0 e 55°C, respectivamente. A enzima mostrou-se estável em pH 5,0 - 6,0 e na faixa de temperatura entre 45 e 55°C. A atividade enzimática foi inibida por Fe^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , p-cloromercuribenzoato, N-etilmaleimida e fenilmetilsulfonil fluoreto.

MACEDO *et al.* (2010) relataram a purificação da MTGase de uma linhagem de *Streptomyces* sp. isolada de amostras de solo brasileiro e compararam as características bioquímicas da enzima bruta e purificada desta linhagem com a MTGase comercial. A purificação da enzima de *Streptomyces* sp. foi realizada através de 2 passagens consecutivas da enzima bruta em uma coluna de filtração em gel Sephadex G-75. A MTGase de *Streptomyces* sp., tanto na forma bruta quanto purificada, exibiram atividade ótima na faixa de pH 6,0 - 6,5 e em 35 - 40°C. Resultados semelhantes foram observados para a enzima comercial. Os autores relataram a presença de um segundo pico de atividade ótima em pH 10,0 para a enzima bruta de *Streptomyces* sp. e para a enzima comercial. Todas as preparações testadas mostraram-se estáveis na faixa de pH entre 4,5 - 8,0 e em temperaturas até 45°C por 30 minutos. Foi observado que a atividade enzimática de todas as amostras de MTGase foram independentes da concentração de cálcio, porém estas foram ativadas na presença de íons K^+ , Ba^{2+} , Co^{2+} e inibidas por Cu^{2+} e Hg^{2+} .

BAGAGLI (2009) estudou o aumento da escala de produção da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 a partir de frascos agitados de 50 mL com 15 mL de meio de cultivo para reator de bancada de 6 litros contendo 3 litros de meio de cultivo através de delineamento fatorial. Foi observado uma elevação na atividade enzimática em 7,2

vezes com o aumento da escala de produção e a redução do tempo de fermentação de 120 horas para 42 horas, utilizando dois estágios de temperatura e agitação. Na caracterização bioquímica da MTGase bruta foi verificado que a temperatura e pH ótimo de atividade da enzima foram 35°C e 6,5, sendo encontrado também um segundo pico de atividade ótima em pH 9,0. A MTGase foi inibida na presença de Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} e ativada na presença de Mg^{2+} e de cisteína.

I.4. Estabilização da transglutaminase microbiana

São poucos os relatos na literatura sobre a estabilização da MTGase produzida por diferentes micro-organismos, apesar da perda da atividade enzimática quando exposta ao oxigênio e em valores pH e temperatura extremos (SOEDA *et al.*, 2000).

SAKAMOTO *et al.* (1992) desenvolveram uma preparação contendo diferentes compostos para estabilização da MTGase de *Streptovercillium mobaraense*. Os pesquisadores testaram a ação de diversos sais, açúcares, proteínas, lipídeos e surfactantes. Foi observado que a combinação de agentes antioxidantes como glutatona e cisteína e outros compostos como cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, ácido cítrico, sorbitol ou maltitol resultavam em manutenção de cerca de 97% da atividade enzimática após um ano armazenada a 24°C.

SOEDA *et al.* (2000) relataram a estabilização de soluções de transglutaminase através da adição de proteínas parcialmente hidrolisadas de trigo, soja, animais (albumina e gelatina) e proteínas do soro do leite. Foi observado que a adição de material proteico na razão de 0,5 a 100 partes da massa seca de enzima resultou na manutenção de 80 a 94% da atividade enzimática após o período de um ano a 24°C.

MATSUURA *et al.* (2001) testaram a modificação da MTGase com polietilenoglicol (PEG) para estabilizar a enzima e preservar a sua atividade, mantendo sua solubilidade em água. O tratamento da MTGase com PEG foi baseado nas modificações das ligações covalentes. A atividade relativa e a estabilidade térmica e de

armazenamento da MTGase com PEG foi superior a da enzima livre. Foi observado que a enzima tratada com PEG apresentou o mesmo pH ótimo da enzima livre, porém o perfil de pH foi ligeiramente maior.

KUTEMEYER *et al.* (2005) investigaram a influência de diferentes sais (KCl, NaCl, CaCl₂ e MgCl₂) em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20%; m:v) na atividade enzimática e estabilidade térmica da preparação comercial de transglutaminase. Os pesquisadores concluíram que a adição de 10, 15 e 20% de KCl e 15 e 20% de NaCl aumentaram a atividade enzimática e a estabilidade térmica. Também foi observado que o CaCl₂ em todas as concentrações testadas diminuiu a ação da enzima.

CUI *et al.* (2006) estudaram o efeito de alguns aditivos na estabilidade térmica e de armazenamento da transglutaminase de *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13, assim como o efeito do etanol na termoestabilidade. Foi observado que a enzima não mostrou-se estável a 50°C, perdendo cerca de 50% da atividade após 30 minutos de incubação. A enzima mostrou-se mais sensível ao calor na presença de etanol. A adição de 20% (m:v) de carboidratos, como maltodextrina, sacarose, manose, trealose e de 0,1% (m:v) de glutatona reduzida, aumentou a estabilidade térmica da MTGase.

Em continuidade ao trabalho anterior CUI *et al.* (2008) pesquisaram a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* investigando o efeito de alguns polióis e carboidratos (sorbitol, glicerol, sacarose, fucose, maltodextrina e polietilenoglicol) na cinética de inativação térmica da enzima. Os tempos de meia-vida da MTGase a 50 e 60°C foram de 20 e 8 minutos, respectivamente. Com a adição de 10% de glicerol foi observado um aumento destes valores para 40 e 20 minutos, respectivamente.

SOUZA *et al.* (2009) avaliaram a termoestabilidade da MTGase de *Bacillus circulans* e o efeito de sais na estabilidade da enzima. Foram adicionados os sais NaCl e CaCl₂ em diferentes concentrações (1, 3 e 5%; m:v) na solução enzimática e esta foi incubada a 50°C, sendo retiradas amostras em diferentes períodos de tempo. Foi verificado que a adição de CaCl₂ em concentrações entre 1 e 5% e NaCl nas

concentrações de 1 e 3% aumentaram a estabilidade térmica da enzima em relação ao controle.

I.5. Aplicações da transglutaminase microbiana

Devido às diferentes reações que as transglutaminases catalisam, elas podem ser utilizadas para modificar proteínas visando diferentes objetivos (ZHU *et al.*, 1995). Até o momento, a maior aplicação comercial das MTGases é na indústria de alimentos.

Uma das principais aplicações da MTGase na indústria de alimentos é em produtos cárneos para obtenção de produtos reestruturados. A partir da aplicação da enzima é possível elaborar uma variedade de produtos reestruturados, utilizando carnes de várias espécies assim como misturas de carnes com proteínas vegetais em suas formulações (RAMIREZ-SUAREZ e XIONG, 2003). Devido à polimerização das proteínas pela MTGase estes produtos têm sua estrutura melhorada quando a enzima é adicionada. Mesmo na ausência de fosfatos ou de sal, é possível obter produtos com texturas adequadas e mais homogêneos (YOKOYAMA *et al.*, 2004). Além disso, a enzima aumenta a capacidade de retenção de água de tais produtos, possibilitando aumento na suculência e redução na perda de água durante a vida de prateleira (AHHMED *et al.*, 2007).

Na fabricação de produtos lácteos, a enzima é capaz de formar géis de caseína firmes e resistentes à temperatura, com boa retenção de água, o que é atrativo para produção de iogurtes e flans. Em sorvetes e queijos a aplicação da MTGase possibilita a redução do teor de gorduras ou sólidos não gordurosos na composição destes produtos (YOKOYAMA *et al.*, 2004).

Novas perspectivas de aplicação da MTGase incluem a indústria de pães e massas alimentícias, pois a enzima também atua nas proteínas do trigo. No caso do glúten, a principal fração proteica do trigo, a enzima é capaz de induzir a formação de polímeros de alta massa molecular, apesar do baixo conteúdo de lisina no glúten. A

formação de ligações cruzadas entre as proteínas do glúten reforça a estrutura da rede e modifica a viscoelasticidade da massa (LARRÉ *et al.*, 1998). Também é sugerido que o volume de crescimento de muitos pães poderia ser aumentado com o uso da MTGase (YOKOYAMA *et al.*, 2004).

A MTGase também pode ser aplicada em macarrões instantâneos e outras massas proporcionando a preservação da textura da massa após o cozimento, mesmo quando a farinha de trigo utilizada é de baixa qualidade (YOKOYAMA *et al.*, 2004).

GUJRAL *et al.* (2004) avaliaram o efeito da aplicação de MTGase em farinha de arroz. A farinha de arroz apresenta uso limitado na fabricação de produtos de panificação fermentados, pois as proteínas do arroz não formam a rede de glúten e, conseqüentemente, são incapazes de reter o gás produzido durante a fermentação. Foi observado que a adição da enzima melhorou as propriedades reológicas da massa de farinha de arroz, resultando em aumento da viscosidade e elasticidade, permitindo a obtenção de pães.

Na fabricação de tofu, produto a base de soja muito consumido na Ásia, a MTGase pode ser utilizada para aumentar a vida útil do produto, tornando o gel mais resistente à ação da temperatura utilizada no processo de fabricação (YOKOYAMA *et al.*, 2004). A enzima também aumenta a capacidade de retenção de água e o produto obtido apresenta uma textura mais homogênea e firme (MOTOKI e SEGURO, 1998).

Além do processamento de alimentos, a transglutaminase pode ser aplicada em várias outras áreas, tais como farmacêutica (POLAINA e MACCABE, 2007), têxtil (CORTEZ *et al.*, 2004), curtimento de couros (TAYLOR *et al.*, 2006), imobilização de enzimas (WANG *et al.*, 2008), microencapsulação de células probióticas (HEIDEBACH *et al.*, 2009), formação de imunocombinados para testes de ELISA e de biossensores e na medicina em estudos de bioengenharia de tecidos humanos e em cirurgias como “cola de fibrina” (NEGUS, 2001; ZHU e TRAMPER, 2008).

I.6. Conclusões

A transglutaminase é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas intra e intermolecular entre proteínas permitindo desta forma a união de retalhos de carne bovina, suína, aves, peixes e também de proteína texturizada de soja para a elaboração de produtos proteicos reestruturados de tamanho e forma definidos, úteis em cozinhas industriais. A possibilidade de formação de gel a partir de proteínas que usualmente não formam gel, preparação de filmes proteicos, alteração das características sensoriais como textura, viscosidade e aumento do valor nutricional pela incorporação de peptídeos e aminoácidos em alimentos proteicos ampliam o potencial de aplicação das transglutaminases na indústria de produtos cárneos, panificação e laticínios.

Neste contexto, é fundamental os estudos para seleção de novos micro-organismos produtores da enzima, obtenção de linhagens altamente produtoras de MTGase por engenharia genética, otimização das condições para produção da enzima, caracterização bioquímica e cinética de reação da enzima e desenvolvimento de processos de purificação para reduzir os custos de produção da transglutaminase.

I.7. Referências Bibliográficas

AHHMED, A. M.; KAWAHARA, S.; OHTA, K.; NAKADE, K.; SOEDA, T.; MUGURUMA, M. Differentiation in improvements of gel strength in chicken and beef sausages induced by transglutaminase. **Meat Science**, v. 76, p. 455-462, 2007.

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

BAGAGLI, M. P. Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. **Dissertação (mestrado)** – Universidade

Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113 p, 2009.

BECH, L.; NORREVANG, I. A.; HALKIER, T.; RASMUSSEN, G.; SCHAFER, T.; ANDERSEN, J. T. Microbial transglutaminases, their production and use. **United States Patent US6100053**, 2000.

BISHOP, P. D.; TELLER, D. C.; SMITH, R. A.; LASSER, G. W. GILBERT, T. SEALE, R. L. Expression, purification and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 29, p. 1861-1869, 1990.

CARIELLO, L.; RISTORATORE, F.; ZANETTI, L. A new transglutaminase-like from the ascidian *Ciona intestinalis*. **Febs Letters**, v. 408, p. 171-176, 1997.

CHENG, L.; ZHANG, D. X.; DU, G. C.; CHEN, J. Improvement on the activity of microbial transglutaminase with *Streptomyces hygroscopicus* by the addition of surfactant CTAB. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 497-501.

CLARKE, D. D.; MYCEK, M. J.; NEIDLE, A.; WAELSCH, H. The incorporation of amines into protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 79, p. 338-354, 1959.

CORTEZ, J.; BONNER, P. L. R.; GRIFFIN, M. Application of transglutaminase in the modification of wool textiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 64-72, 2004.

CUI, L.; ZHANG, D.; HUANG, L.; LIU, H.; DU, G.; CHEN, J. Stabilization of a new microbial transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13 by spray drying. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1427-1431, 2006.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 612-618, 2007.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; CHEN, J. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3794-3800, 2008.

DATE, M.; YOKOYAMA, K.; UMEZAWA, Y.; MATSUI, H.; KIKUCHI, Y. Production of native-type *Streptovermillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3011-3014, 2003.

DEKKING, E. H.A., VAN VEELLEN, P. A., RU, A., KOOY-WINKELAAR, E. M. C., GRÖNEVELD, T., NIEUWENHUIZEN, W. F., KONING, F. Microbial transglutaminases generate T cell stimulatory epitopes involved in celiac disease. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p. 339-346, 2008.

DUBE, M.; SCHAFER, C.; NEIDHART, S. Texturization and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 287-299, 2007.

FALCONE, P.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p. 263-273, 1993.

FOLK, J. E. Transglutaminases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 517-521, 1980.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Mechanism of action of pig liver transglutaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 5518-5525, 1966.

GAUCHE, C.; TOMAZI, T.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Polimerização das proteínas do leite por transglutaminase: modificação das propriedades funcionais e aplicação em produtos lácteos. **Boletim Ceppa**, v. 26, n. 1, p. 111-122, 2008.

GERBER, U.; JUCKNISCHKE, U.; PUTZIEN, S.; FUCHSBAUER, H. L. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovermillium mobaraense*. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 825-829, 1994.

- GERRARD, J. A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 12, p. 391-399, 2002.
- GRIFFIN, M. CASADIO, R.; BERGAMINI, C. M. Transglutaminase: nature's biological glues. **Biochemical Journal**, v. 368, p. 377-396, 2002.
- GUJRAL, H. S.; ROSELL, C. M. Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 225-230, 2004.
- HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 77-84, 2009.
- HERRERA, J. H.; IRANZO, M. ELORZA, M. V.; SENTANDREU, R.; MORMENEO, S. Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-link in the cell wall of *Candida albicans*. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 186-193, 1995.
- HO, M. -L.; LEU, S. -Z.; HSIEH, J. -F.; JIANG, S. T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovercillium ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76-80, 2000.
- IKURA, K.; NASU, T.; YOKOTA, H.; TSUCHIVA, Y.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. **Biochemistry**, v. 27, p. 2898-2905, 1988.
- IKURA, K.; SASAKI, R.; MOTOKI, M. Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. **Comments on Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 389-407, 1992.
- JEITNER, T. M.; MUMA, N. A.; BATTAILE, K.; COOPER, A. J. L. Transglutaminase activation in neurodegenerative diseases. **Future Neurology**, v. 4, n. 4, p. 449-467, 2009.

JUNQUA, M.; DURAN, R.; GANCET, C.; GOULAS, P. Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 730-734.

KASHIWAGI, T.; YOKOYAMA, K.; ISHIKAWA, K.; ONO, K.; EJIMA, D. MATSUI, H.; SUZUKI, E. Cristal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44252-44260, 2002.

KIM, H.; JUNG, S.; LEE, I.; YU, T. Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 187-194, 2000.

KLEIN, J. D.; GUZMAN, E.; KUEHN, G. D. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 8, p. 2599-2605, 1992.

KOBAYASHI, K.; SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; YOKOZEKI, K.; MIWA, K.; YAMANAKA, S. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. **Journal of General Applied Microbiology**. v. 44, p. 85-91, 1998.

KURTH, L.; ROGERS, P. J. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. **Journal of Food Science**, v, 49, p. 573-576, 1984.

KUTEMEYER, C.; FROECK, M.; WERLEIN, H. D.; WATKINSON, B. M. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. **Food Control**, v. 16, p. 735-737, 2005.

LANGSTON, J.; BLINKOVSKY, A.; BYUN, T.; TERRIBILINI, M.; RANSBARGER, D.; XU, F. Substrate specificity of *Streptomyces* transglutaminases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 291-307, 2007.

LARRÉ, C.; DESHAYES, G.; LEFEBVRE, J.; POPINEAU, Y. Hydrated gluten modified by a transglutaminase. **Nahrung Food**, v. 42, p. 155-157, 1998.

- LIN, Y. -S.; CHAO, M. -L.; LIU, C. -H.; TSENG, M.; CHU, W. -S. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 519-524, 2006.
- LIN, S. -J.; HSIEH, Y. -F.; LAI, L. -A.; CHAO, M. -L.; CHU, W. -S. Characterization and large-scale production of recombinant *Streptovercillium platensis* transglutaminase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 981-990, 2008.
- LU, S. Y.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P.; LI, H. Z.; CHEN, J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 109-125, 2003.
- MACEDO, J. A.; SATO, H. H. Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 4, p. 413-419, 2005.
- MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces sp.* **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618-626, 2007.
- MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: comercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces sp.* **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 308-314, 2010.
- MATSUURA, A.; HAYASHI, T.; FURUTA, M. HAYASHI, T. Activity and stability of microbial transglutaminase modified with a water-soluble polymer. **Japanese Journal of Polymer Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 73-77, 2001.
- MÁZAN, M.; FARKAS, V. Transglutaminase-like activity participates in cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biologia**, v. 62, n. 2, p. 128-131, 2007.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

NEGUS, S. S. A novel microbial transglutaminase derived from *Streptoverticillium baldacci*. **Tese (doutorado)** – School of Biomolecular and Biomedical Science, Griffith University, Queensland, 164 p, 2001.

NOZAWA, H.; MAMEGOSHI, S.; SEKI, N. Partial purification and characterization of six transglutaminase from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, v. 118, n. 2, p. 313-317, 1997.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes – structure, function and applications**. Springer, 642 p, 2007.

RAMIREZ-SUÁREZ, J. C.; XIONG, Y. L. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. **Meat Science**, v. 65, p. 899-907, 2003.

RAGKOUSI, K.; SETLOW, P. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 5567-5575, 2004.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 1-15, 1998.

SAKAMOTO, H.; MOTOKI, M.; SOEDA, T.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSURA, A. Stabilizer composition for transglutaminase. **Japanese Kokai Kokkyo Koho JP 04207194**, 1992.

SARAFEDDINOV, A.; SCHMIDT, S.; ADOLF, F.; MAINUSCH, M.; BENDER, A.; FUCHSBAUER, H. L. A novel transglutaminase substrate from *Streptomyces mobarensis* triggers autolysis of neutral metalloproteases. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 5, p. 993-999, 2009.

SERAFINI-FRACASSINI, D.; MEA, M. B.; TASCO, G.; CASADIO, R.; DUCA, S. D. Plant and animal transglutaminases: do similar functions imply similar structures? **Amino Acids**, v. 36, p. 643-657, 2009.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. Varela, 517 p, 1996.

SINGH, H. Modification of food proteins by covalent crosslinking. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, p. 196-200, 1991.

SOAREZ, L. H. B.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 2029-2033, 2003a.

SOAREZ, L. H. B.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 295-299, 2003b.

SOEDA, T.; HONDO, K.; KUHARA, C. Stabilized transglutaminase and enzyme preparation containing the same. **United State Patent US6030821**, 2000.

SOUZA, C. F. V.; FLORES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1186-1192, 2006.

SOUZA, C. F. V.; RODRIGUES, R. C.; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Z. Optimization of transglutaminase extraction produced by *Bacillus circulans* BL32 on solid-state cultivation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1306-1313, 2008.

SOUZA, C. F. V.; FACCIN, D. J. L.; MERTINS, O.; HECK, J. X.; SILVEIRA, N. P.; SECCHI, A. R.; AYUB, M. A. Z. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 10, p. 1567-1575, 2009.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2344-2351, 2000.

TAKEHANA, S.; WASHIZU, K.; ANDO, K.; KOIKEDA, S.; TAKEUCHI, K.; MATSUI, H.; MOTOKI, M.; TAKAGI, H. Chemical synthesis of the gene for microbial transglutaminase from *Streptovercillium* and its expression in *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 88-92, 1994.

TAYLOR, M. M.; BUMANLAG, L.; MARMER, W. N.; BROWN, E. M. Use of enzymatically modified gelatin and casein as fillers in leather processing. **Journal of the American Leather Chemistry Association**, v. 101, n. 5, p. 169-178, 2006.

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁSQUEZ, M. Production of transglutaminase by *Streptovercillium ladakanum* NRRL-3191 grow on media made from hydrolysates of sorghum straw. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 1-4, 2004.

TSAI, G. -J.; LIN, S. -M.; JIANG, S. -T. Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1234-1238, 1996.

UMEZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; YOKOYAMA, K.; NIO, N. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces sp.* **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 2, p. 113-118, 2002.

WAKAMEDA, A.; YATSUKA, N.; SASAMOTO, Y. Process for the production of transglutaminase-containing food having improved texture. **United States Patent US4917904**, 1990.

WANG, H. -W.; KIM, I. H.; PARK, C. -S.; LEE, J. -H. Immobilization of α -amilase from *Bacillus licheniformis* on developed support using microbial transglutaminase. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 4, p. 801-803, 2008.

WARRATAO, A.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 93, p. 651-658, 2005.

YAN, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J.; ZHONG, J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptovercillium mobaraense*: application of a

two-stage agitation speed control strategy. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 963-968, 2005.

YASUEDA, H.; KUMAZAWA, Y.; MOTOKI, M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red-sea bream (*Pagrus major*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 11, p. 2041-2045, 1994.

YASUEDA, H.; NAKANISHE, K.; KUMAZAWA, Y.; NAGASE, K.; MOTOKI, M.; MATSUI, H. Tissue-type transglutaminase from red-sea bream (*Pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, v. 232, p. 411-419, 1995.

YEO, S. –H.; YOON, J. –H.; LEE, D. G.; KIM, H. S. Screening and identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 588-595, 2009.

YOKOYAMA, K. NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and application of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 447-454, 2004

ZHANG, D.; ZHU, Y.; CHEN, J. Microbial transglutaminase production: understanding the mechanism. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 26, p. 217-234, 2009.

ZHENG, M.; DU, G.; GUO, W.; CHEN, J. A temperature-shift strategy in batch microbial fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 525-530, 2001.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Medium design based on stoichiometric analysis of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 291-298, 1996.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559-565, 2008.

ZOTZEL, J.; KELLER, P.; FUCHSBAUER, H. L. Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 3214-3222, 2003.

II. CAPÍTULO 2: Estudo da estabilidade térmica da transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e efeito de inibidores e ativadores da enzima

Resumo

O principal objetivo deste trabalho foi a caracterização da preparação enzimática bruta de MTGase concentrada por sulfato de amônio obtida de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 quanto à estabilidade térmica, através do estudo da cinética de inativação térmica e efeito de alguns aditivos sobre este processo. Também foi investigada a influência do etanol e de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da enzima. A MTGase mostrou-se uma enzima termossensível, sendo estável somente em temperaturas abaixo de 40°C. Os tempos de meia-vida da enzima a 55 e 60°C foram estimados em 3,5 e 1,9 minutos, respectivamente. A adição de alguns compostos aumentou a estabilidade térmica da enzima. Entre os compostos testados, a cisteína 0,1% (m:v) apresentou melhor resultado, promovendo a manutenção de 60% da atividade residual após 30 minutos a 45°C. A presença de 10% (v:v) de etanol não afetou a atividade enzimática, enquanto altas concentrações de etanol (40 e 50%; v:v), promoveram a perda de 95% da atividade enzimática após 30 minutos a 25°C. Os compostos iodoacetamida e ácido cloromercuribenzóico inativaram a enzima, indicando a possível presença de resíduos de cisteína no sítio ativo. O aminoácido cisteína e o EDTA, nas concentrações de 1 e 5 mM exerceram um efeito ativador sobre a atividade enzimática, sendo observado um aumento de 120% na atividade enzimática.

Abstract

The main objective of this work was the thermal stability characterization of the crude enzymatic preparation of MTGase derived from *Streptomyces* sp. CBMAI 837, concentrated by ammonium sulfate, by studying the kinetics of thermal inactivation and

the effect of some additives on this process. It was also investigated the influence of ethanol and enzyme activators and inhibitors of enzyme activity. The MTGase showed a thermosensitive enzyme, being stable only at temperatures below 40°C. The half-life times of this enzyme at 55 and 60°C were estimated in 3.5 and 1.9 minutes, respectively. The addition of some compounds improved the enzyme thermal stability. Among the compounds tested, cysteine 0,1% (w/v) showed the best result, promoting the maintenance of 60% of residual activity after 30 minutes at 45°C. The presence of 10% (v/v) ethanol did not affect the enzyme activity while high concentrations of ethanol (40 and 50%; v/v) promoted 95% loss of enzyme activity after 30 minutes at 25°C. The compounds iodoacetamide and chloromercuribenzoic acid inactivated the enzyme, indicating that there may be residues of cysteine in the active site of the enzyme. The amino acid cysteine and EDTA had a positive effect on enzymatic activity and increased its activity in 120% at concentrations of 1 and 5 mM.

II.1. Introdução

A transglutaminase microbiana (MTGase, EC 2.3.2.13) é uma enzima capaz de catalisar a formação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas, peptídeos e várias aminas primárias através da reação de acil transferência entre resíduos de glutamina e lisina.

Devido à sua habilidade de modificar proteínas, a MTGase apresenta amplo potencial de aplicação na indústria de alimentos para o desenvolvimento de novos produtos e modificação das propriedades de produtos já existentes, como capacidade de emulsificação e formação de gel, viscosidade, textura e valor nutricional. Esta enzima também tem despertado a atenção para sua aplicação em outros segmentos industriais, como indústrias farmacêuticas, no tratamento de tecidos de lã e curtimento de couro, imobilização de enzimas e em estudos de bioengenharia de tecidos humanos (ZHU *et al.*, 1995; CARDAMONE e PHILLIPS, 2007; POLAINA e MACCABE, 2007; ZHU e TRAMPER, 2008).

No entanto, uma das principais desvantagens para aplicação industrial de MTGases é a relativa facilidade com que estas enzimas sofrem inativação quando submetidas a pH e temperatura extremos e a presença de oxigênio (SOEDA *et al.*, 2000).

As MTGases, como outras enzimas, são macromoléculas de proteína com uma configuração complexa, porém susceptíveis a desestabilização até mesmo por forças fracas. A inativação enzimática é definida como o processo onde as estruturas secundária, terciária e quaternária de uma proteína mudam sem quebrar as ligações covalentes entre os aminoácidos (DOGAN e TARI, 2008).

A estabilidade físico-química de uma enzima depende da integridade da estrutura tridimensional do sítio ativo, e assim, como no caso de outros agentes catalisadores, é uma das principais questões sobre o ponto de vista técnico e científico (WHITAKER, 1994).

Vários agentes são capazes de promover a desnaturação e inativação de uma enzima tais como temperatura e pH extremos, agentes químicos, ação de proteases, força iônica, presença de oxigênio, entre outros (LADERO *et al.*, 2005).

O uso de uma enzima em um processo industrial depende da sua estabilidade durante a preparação, estocagem e aplicação sobre algumas condições severas (CUI *et al.*, 2008). Geralmente, as preparações enzimáticas comerciais de origem microbiana consistem essencialmente do sobrenadante da fermentação concentrado por ultrafiltração ou por métodos de precipitação (adição de sais ou solventes), ao qual podem ser misturados aditivos para estabilizar a atividade enzimática (BON *et al.*, 2008).

A estrutura das proteínas pode ser estabilizada em soluções de força iônica composta de sais neutros, como sulfato de amônio e fosfato de potássio. Polióis de baixa massa molecular como glicerol, sorbitol e manitol também estabilizam as enzimas e impedem o crescimento microbiano. Várias enzimas podem ser mantidas na forma liofilizada por longos períodos de tempo na presença de estabilizadores, como sais,

carboidratos ou proteínas inertes. Outras substâncias que podem ser adicionadas às preparações enzimáticas para sua estabilização incluem: substratos tíois para manutenção do ambiente redutor, antibióticos, ésteres de ácidos benzóicos, inibidores de enzimas contaminantes e agentes quelantes. Estes aditivos devem ser compatíveis com o uso final da enzima (BON *et al.*, 2008).

Para uma eficiente aplicação de enzimas exógenas em processos industriais, o conhecimento sobre sua estabilidade de processamento é essencial para rápida desativação quando necessário e também para prevenir a sua inativação e obter maior transformação do substrato em produto (LADERO *et al.*, 2005). Assim, o conhecimento do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática é de extrema importância para a aplicação industrial de uma enzima.

O aumento da termoestabilidade das enzimas permite que reações bioquímicas sejam realizadas em altas temperaturas quando necessário, contribuindo para aumentar a taxa de conversão e solubilidade dos substratos, reduzindo a possibilidade de crescimento microbiano e a viscosidade do meio de reação. Diversas estratégias têm sido propostas para o aumento da termoestabilidade de enzimas, como o uso de aditivos solúveis, imobilização, engenharia de proteínas e modificação química (KLIBANOV, 1983; LONGO e COMBES, 1999).

Transglutaminases produzidas por diferentes micro-organismos têm sido purificadas e caracterizadas, no entanto, são poucos os trabalhos na literatura que relatam a estabilização da MTGase, assim como a cinética de inativação térmica e a influência de compostos e solventes na atividade enzimática. Dados sobre a atividade e estabilidade de MTGases podem ser úteis para melhorar processos biotecnológicos, fornecendo informações sobre a estrutura do catalisador e ajudar a otimizar a viabilidade econômica do processo industrial.

MACEDO *et al.* (2007) isolaram de amostras de solo brasileiro a linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e relataram o elevado potencial para produção de MTGase por este micro-organismo. BAGAGLI (2009) estudou o aumento da escala de

produção para obtenção de MTGase por esta linhagem em fermentação submersa e a produção da enzima em meio semi-sólido.

O entendimento das características da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 pode levar a uma melhor aplicação tecnológica desta enzima na área de alimentos e em outras áreas. Assim, o presente estudo visou caracterizar a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 quanto à estabilidade térmica, estudando a cinética de inativação térmica, assim como o efeito de aditivos sobre este processo e a influência do etanol e de compostos ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da enzima.

II.2. Material e métodos

II.2.1. Micro-organismo utilizado e manutenção

A linhagem de micro-organismo utilizada neste trabalho foi isolada por MACEDO *et al.* (2007) a partir de amostras de solos brasileiros e faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esta linhagem está depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

Para manutenção e reativação do micro-organismo foi realizada inicialmente a inoculação da linhagem em tubos de ensaio contendo 3 g de amostra de solo esterilizada. Após incubação dos tubos por 5 dias em estufa a 30°C foi adicionado assepticamente cerca de 10 mL de água destilada esterilizada. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado em agitador para tubos por 2 minutos e com auxílio de *swab* o micro-organismo foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar extrato de malte (4,0 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de extrato de malte; 4,0 g/L de glicose; 20 g/L de ágar-ágar, pH 7,0) e incubado por 5 dias a 30°C. Após este período, foi realizada uma nova repicagem do micro-organismo em placas de Petri contendo o

mesmo meio de cultivo e as placas foram incubadas por mais 5 dias a 30°C. Após crescimento satisfatório do micro-organismo, o ágar recoberto regularmente foi recortado em cilindros de 0,6 cm de diâmetro, os quais foram transferidos assepticamente para criotubos contendo solução de glicerol 10%, previamente esterilizados. Os criotubos foram armazenados a -80°C até a utilização.

II.2.2. Produção de MTGase por fermentação submersa em reator de bancada

II.2.2.1. Preparo do meio de cultivo e do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado por MACEDO *et al.* (2007) composto de 2,5% de farinha de soja; 1% de peptona; 0,1% de glicose; 2% de amido de batata; 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , pH 7,0. No preparo do meio de cultivo foi realizada a substituição do componente farinha de soja por extrato de farinha de soja, ou seja, a massa de farinha de soja necessária para a formulação do meio de cultivo foi dissolvida em 75% do volume de água e agitada vigorosamente por 30 minutos, conforme descrito por BAGAGLI (2009). Em seguida esta solução foi filtrada em gaze e adicionada aos demais componentes do meio. O volume foi completado com água destilada e o pH ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1 M. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C.

Os frascos Erlenmeyer foram inoculados com o conteúdo de 3 criotubos (2 discos de ágar de 6 mm de diâmetro, repletos de micélios de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 / criotubo) e incubados a 30°C, 150 rpm por 72 horas.

II.2.2.2. Produção da enzima em reator de bancada utilizando 2 estágios de temperatura e agitação

A produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi realizada em reator de bancada (New Brunswick Bioflow II) de capacidade de 6 L com volume de trabalho de 3 L, aeração de 1,1 vvm e dois estágios de temperatura e agitação, conforme proposto por BAGAGLI (2009). A temperatura utilizada nas primeiras 24 horas de fermentação foi de 34°C e a agitação de 350 rpm. Nas 18 horas seguintes de fermentação os parâmetros foram alterados para 26°C de temperatura e 150 rpm de agitação. Adicionou-se 300 mL de pré-inóculo preparado como descrito no item anterior na cuba de fermentação contendo 2.700 mL do mesmo meio de cultura esterilizado. Após a incubação por 42 horas, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante do meio de cultura foi utilizado como fonte de MTGase (preparação enzimática bruta de MTGase).

II.2.3. Concentração da MTGase por adição de sulfato de amônio

A preparação enzimática bruta de MTGase obtida por fermentação do micro-organismo em reator de bancada, como descrito no item acima, foi concentrada pela adição de sulfato de amônio até 80% de saturação. Trinta minutos após a adição de sulfato de amônio a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 e dialisado contra água destilada por 24 horas e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0, por mais 24 horas para a remoção do sal. A preparação enzimática obtida foi congelada, liofilizada e armazenada a -5°C até a utilização.

II.2.4. Determinação da atividade de MTGase

A atividade de transglutaminase foi determinada pela técnica colorimétrica de formação de ácido hidroxâmico utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-

glicina (CBZ-glutaminil-glicina), conforme descrito por GROSSOWICZ *et al.* (1950) e adaptado por FOLK e COLE (1966).

A mistura reacional composta de 200 µL de enzima; 75 µL de solução de CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154) 30 mM; 25 µL de solução de hidroxilamina 0,1 M e 200 µL de tampão citrato 0,2 M, pH 6,0, foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 500 µL de reagente paralisante, composto de 1/3 de ácido tricloroacético 15%; 1/3 de HCl 2,5 M e 1/3 de solução de cloreto férrico 5% em HCl 0,1 M (v:v). A mistura foi centrifugada em tubos tipo eppendorf por 2 minutos, em seguida foi realizada a leitura, em espectrofotômetro (DU® 640, Beckman Coulter™), da absorbância do sobrenadante a 525 nm contra o branco.

Uma unidade de atividade de transglutaminase (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 µMol de ácido hidroxâmico por minuto nas condições do ensaio. Para o cálculo da atividade enzimática os resultados obtidos foram relacionados com uma curva padrão preparada com o ácido L-glutâmico-γ-monohidroxâmico (Sigma G2253).

II.2.5. Estudo da estabilidade da enzima

II.2.5.1. Estudo da termoestabilidade da MTGase

Tubos de ensaio contendo 7 mL de solução de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (2 U/mL), obtida pela dissolução da preparação enzimática bruta concentrada por sulfato de amônio em tampão citrato 0,1 M, pH 6,0, foram incubados a 30, 40, 45, 50, 55 e 60°C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em períodos apropriados de tempo (5, 10, 20, 30, 60 e 120 minutos) e imediatamente resfriadas em banho de gelo por 3 minutos. Em seguida, foi determinada a atividade residual de MTGase usando o método descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Considerou-se a atividade da amostra sem incubação como 100% e a atividade residual relativa da enzima foi calculada como apresentado na Equação 1.

$$\text{Equação 1: } A = (U_t / U_0) * 100$$

Onde A é a atividade relativa de MTGase (%); U_t equivale à média das atividades de MTGase das triplicatas em cada tempo de acompanhamento e U_0 equivale à média das atividades de MTGase das triplicatas sem tratamento térmico ($t = 0$ min).

II.2.5.2. Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase

A partir dos valores de atividade residual obtidos no item II.2.5.1 foram determinados alguns parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

Inicialmente os dados do estudo da termoestabilidade enzimática foram ajustados graficamente em modelos de curvas teóricas para verificar o perfil da cinética de desnaturação enzimática seguido pela MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Em seguida foram determinados de acordo com MARANGONI (2003) os parâmetros cinéticos K_d , $t_{1/2}$, valor D, valor Z, e os parâmetros termodinâmicos E_{ad} , ΔH , ΔG e ΔS , conforme descrito abaixo:

Constante de desnaturação (K_d)

Considerando-se um modelo de cinética de desnaturação enzimática de primeira ordem para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837, pode-se escrever a Equação 2.

$$\text{Equação 2: } -r_d = -\frac{dU_t}{dt} = K_d \cdot U_t$$

Onde r_d corresponde a taxa de desnaturação (U/t), U_t é a atividade enzimática em um determinado momento, t é o tempo em minutos e K_d é a taxa constante de desnaturação ($1/t$).

Por integração da Equação 2 tem-se a Equação 3.

$$\textbf{Equação 3: } U_t = U_0 \cdot e^{-K_d \cdot t}$$

Onde U_t corresponde a atividade enzimática após um período de tempo t e U_0 é a atividade enzimática inicial sem tratamento térmico.

Assim, os logaritmos naturais de U_t/U_0 obtidos ao longo do acompanhamento do estudo da termoestabilidade da MTGase, de acordo com o item II.2.5.1, foram plotados em função do tempo em minutos para o cálculo de K_d (min^{-1}). O valor da inclinação da reta de regressão linear dos dados experimentais foi considerado como sendo a constante de desnaturação (K_d) na temperatura avaliada.

Meia-vida ($t_{1/2}$)

Corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial. Este parâmetro foi determinado a partir de K_d utilizando a Equação 4.

$$\textbf{Equação 4: } t_{1/2} = - \frac{\ln (0,5)}{K_d}$$

Valor de redução decimal (valor D)

O valor D corresponde ao tempo necessário em minutos para reduzir a velocidade de reação a 10% do valor inicial. Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 5.

$$\text{Equação 5: } D = \frac{2,3026}{K_d}$$

Valor Z

Este parâmetro indica a variação de temperatura requerida em um sistema para que ocorra redução decimal na velocidade de reação, ou seja, perda de 90% da atividade enzimática. O valor Z foi determinado graficamente através do inverso da inclinação da reta obtida a partir da relação gráfica de $\log(D)$ *versus* temperatura.

Energia de ativação da desnaturação (E_{ad})

Considerando-se que a perda de atividade enzimática devido a desnaturação ocorre segundo uma taxa constante (K_d) nas diferentes temperaturas, uma estimativa da energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) também pode ser determinada. A energia requerida para promover a ativação da desnaturação é conseguida através do ajuste dos dados experimentais ao modelo de Arrhenius (Equação 6).

$$\text{Equação 6: } \ln k = \frac{-E_a}{R \cdot T} + \ln K_d$$

Onde k corresponde a velocidade de reação, E_a a energia de ativação aparente, R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) e T a temperatura absoluta (K).

Assim, a energia requerida para promover a ativação da desnaturação foi determinada pela inclinação da reta ($-E_a/R$) obtida a partir da linearização proposta por Arrhenius na forma de $\ln(K_d)$ *versus* $1/T$.

Entalpia (ΔH)

A entalpia de desnaturação refere-se à quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima. Este parâmetro foi calculado para cada temperatura a partir da Equação 7.

$$\text{Equação 7: } \Delta H = E_{ad} - R \cdot T$$

Energia livre (ΔG)

Os valores de energia livre da inativação nas diferentes temperaturas foram calculados a partir da constante do processo de inativação, conforme a Equação 8.

$$\text{Equação 8: } \Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{K_d \cdot h}{K_B \cdot T} \right)$$

Onde h é a constante de Planck ($6,6262 \times 10^{-34}$ J.s), K_B é a constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹).

Entropia (ΔS)

A entropia de desnaturação é a quantidade de energia por grau de temperatura envolvida na transição do estado nativo para o estado desnaturado. Este parâmetro foi calculado a partir da Equação 9.

$$\text{Equação 9: } \Delta S = \frac{(\Delta H - \Delta G)}{T}$$

II.2.5.3. Estudo do efeito de diferentes compostos na termoestabilidade da MTGase

Na tentativa de aumentar a termoestabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837, foi estudada a influência dos compostos sacarose, trealose, maltodextrina, PEG 6.000, PEG 20.000 e glicerol nas concentrações de 1 e 10% (m:v); citrato de sódio, ácido cítrico, EDTA, MgSO₄, KCl, CaCl₂ e NaCl nas concentrações de 1 e 5% (m:v) e glutatona e L-cisteína nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1% (m:v). Também foram testadas combinações destes aditivos na preservação da atividade enzimática.

Em tubos de ensaio com 2 mL de solução de MTGase (3 U/mL), obtida pela dissolução da preparação enzimática bruta concentrada por sulfato de amônio em tampão citrato 50 mM, pH 6,0, foram adicionados os diferentes compostos nas concentrações testadas. Após 30 minutos de incubação a 45°C as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 3 minutos e em seguida foi realizada a determinação da atividade residual de MTGase. A atividade residual da enzima foi mensurada usando o método descrito anteriormente, considerando-se a atividade da amostra sem adição de compostos e sem incubação como 100%. A atividade residual relativa de MTGase foi calculada como na Equação 1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

II.2.6. Efeito do etanol na atividade da MTGase

Tubos de ensaio contendo um volume final de 7 mL de solução de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (0,5 U/mL), preparada pela dissolução da preparação enzimática bruta concentrada pela adição de sulfato de amônio 80% de saturação em tampão citrato 50 mM, pH 6,0, com diferentes concentrações de etanol (10, 20, 30, 40 e 50% (v:v)), foram incubados a 25°C com o intuito de avaliar a influência do etanol na atividade de MTGase. Em determinados períodos de tempo (30, 60, 120, 180 e 240 minutos) amostras foram retiradas e a atividade residual da enzima foi determinada usando o método descrito anteriormente. A atividade de MTGase da amostra sem etanol e sem incubação foi considerada como 100% e a atividade relativa das amostras foram

calculadas como apresentado na Equação 1. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

II.2.7. Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase

O efeito de alguns compostos relatados como ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi avaliado incubando-se tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de MTGase (1,5 U/mL) obtida pela dissolução da preparação enzimática bruta concentrada por sulfato de amônio em tampão citrato 50 mM, pH 6,0, na presença dos compostos L-cisteína, EDTA, iodoacetamida, ácido cloromercuribenzóico e dietilcarbamato de sódio nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 25°C e em seguida foi determinada a atividade residual de MTGase. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e a atividade residual da enzima foi mensurada usando o método descrito anteriormente, considerando-se a atividade da amostra sem adição de compostos como 100%.

II.3. Resultados e discussão

II.3.1. Estudo da estabilidade da enzima

II.3.1.1. Estudo da termoestabilidade da MTGase

A estabilidade térmica de uma enzima, como acontece com qualquer tipo de biocatalisador, é uma característica importante que deve ser considerada durante a sua aplicação. Deste modo, foi realizado o estudo da estabilidade térmica da MTGase conforme descrito no item II.2.5.1.

A Figura II.1 ilustra a termoestabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em função do tempo de incubação nas temperaturas de 30, 40, 45, 50, 55 e 60°C em pH 6,0.

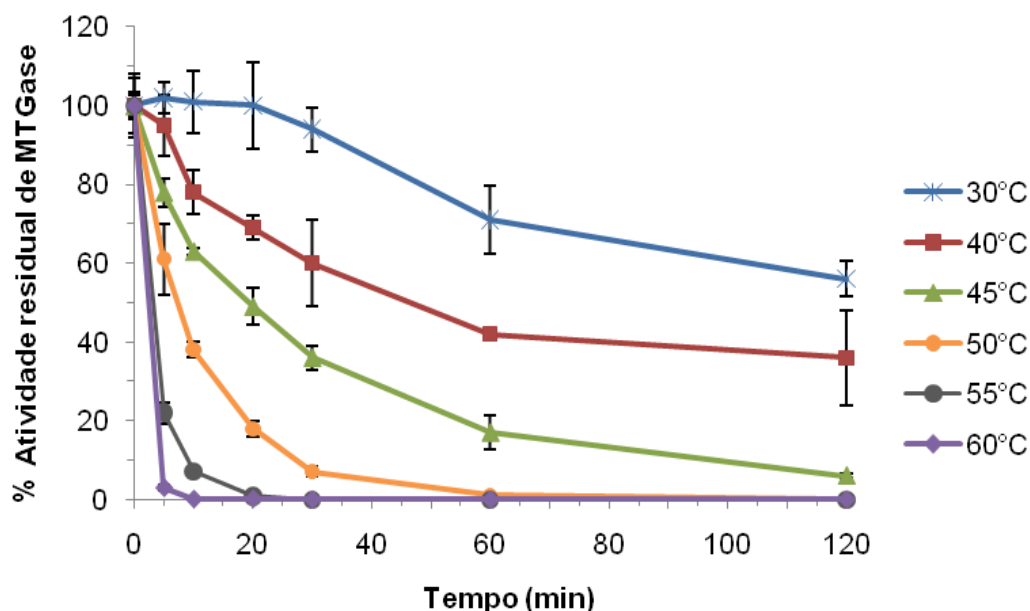


Figura II. 1 - Estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Observou-se que a atividade enzimática da MTGase presente na preparação enzimática bruta concentrada de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi fortemente influenciada pela temperatura ao longo do tempo de incubação. A enzima manteve 60 e 40% de atividade residual quando incubada por 120 minutos a 30 e 40°C, respectivamente. Foi observada a manutenção de cerca de 50 e 20% da atividade inicial após 20 minutos de incubação a 45 e 50°C, respectivamente. A enzima foi rapidamente inativada quando submetida às temperaturas de 55 e 60°C, sendo que não foi verificada atividade residual nestas condições após 20 minutos de incubação.

A termoestabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi semelhante a MTGase purificada de outros micro-organismos quanto ao rápido decréscimo da atividade quando exposta às temperaturas superiores a 50°C. LU *et al.* (2003) relataram que a MTGase de *Streptoverticillium mobaraense* WSH-Z2 foi rapidamente inativada

em temperaturas acima de 50°C, sendo observada apenas 6% de atividade residual após 10 minutos de incubação a 60°C. UMEZAWA *et al.* (2002) também observaram a inativação da MTGase de *Streptomyces libani* após 10 minutos de incubação a 60°C em pH 6,0.

Contudo, a enzima apresentou baixa termoestabilidade quando comparada com a MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* que manteve 80% de atividade residual após 30 minutos de incubação a 40°C em pH 6,0 e 7% da atividade quando exposta a 60°C nas mesmas condições (CUI *et al.*, 2007). LIN *et al.* (2008) relataram que a MTGase de *Streptomyces platensis* manteve cerca de 20% de atividade residual em temperaturas superiores a 65°C após 30 minutos de incubação em pH 7,0. Para a MTGase bruta de *Streptomyces platensis* IK-2 foi observada a manutenção de 40% da atividade inicial após incubação a 50°C por 50 minutos em pH 6,0 (YEO *et al.*, 2009).

II.3.1.2. Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase

A partir dos resultados obtidos no item anterior foram calculados, conforme descrito no item II.2.5.2, alguns parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 visando obter informações sobre o processo de desnaturação térmica da enzima.

Vários comportamentos podem ser encontrados para descrever a cinética de desnaturação de uma enzima (LONGO e COMBES, 1999). Foi verificado que a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 segue uma cinética de desnaturação térmica de 1ª ordem. Isto significa que a desnaturação pode ocorrer em uma única etapa através da mudança do estado nativo (E) para o estado totalmente desnaturado (E_d), a partir da ruptura de uma ligação importante para a enzima ou da deformação da estrutura tridimensional proteica (LONGO e COMBES, 1999; MARANGONI, 2003).

CUI *et al.* (2008) e MENÉNDEZ *et al.* (2006) relataram que as MTGases de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptoverticillium mobarense*, respectivamente,

apresentavam cinética de desnaturação térmica de 1ª ordem. SOUZA *et al.* (2009) verificaram que a MTGase de *Bacillus circulans* BL32 apresentava cinética de desnaturação térmica segundo o modelo proposto por Lumry-Eyring em 1954, onde a enzima é transformada em uma etapa reversível do estado nativo para o estado desnaturado e posteriormente em uma outra etapa irreversível para a forma inativa.

A Figura II.2 ilustra a cinética de desnaturação térmica da MTGase de *Streptomyces sp.* CBMAI 837 para as diferentes temperaturas estudadas. A desnaturação térmica da MTGase nas diferentes temperaturas pode ser distinguida pela diferenças nas inclinações das retas de regressão linear. Observou-se que a enzima mostrou-se estável em temperaturas abaixo de 45°C e que a atividade diminuiu rapidamente em temperaturas acima de 50°C. CUI *et al.* (2008) observaram que a MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* também foi estável em temperaturas abaixo de 40°C, mas em temperaturas superiores a 50°C a enzima foi rapidamente inibida.

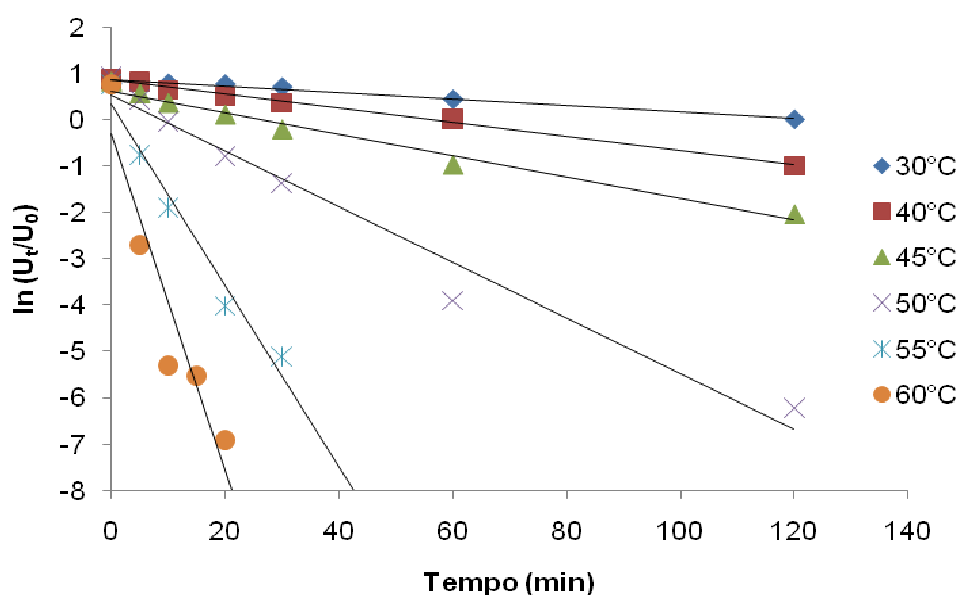


Figura II. 2 - Cinética de desnaturação térmica da MTGase de *Streptomyces sp.* CBMAI 837

Na Tabela II.1 estão apresentados os parâmetros cinéticos de K_d , $t_{1/2}$ e valor D do estudo da estabilidade térmica de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e o R^2 obtido nas regressões lineares para cada temperatura avaliada.

Foi verificado que o valor da constante de desnaturação (K_d) aumentou mais de 50% quando a enzima foi incubada a 60°C em comparação com o valor de K_d a 30°C, ou seja, o K_d passou de 0,0068 min⁻¹ a 30°C para 0,3630 min⁻¹ a 60°C. Resultados semelhantes foram observados por CUI *et al.* (2008) para a MTGase de *Streptomyces hygroscopicus*, onde o K_d de 0,0016 min⁻¹ a 30°C aumentou para 0,0828 min⁻¹ a 60°C.

Tabela II. 1 - Perfil de K_d , da meia-vida ($t_{1/2}$) e da redução decimal (D) da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Temperatura (°C)	K_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	R^2
30	0,0068	101,9	338,6	0,9734
40	0,0142	48,8	162,1	0,9723
45	0,0232	29,8	99,2	0,9802
50	0,0599	11,5	38,4	0,9671
55	0,1952	3,5	11,9	0,9716
60	0,3630	1,9	6,3	0,8963

A determinação do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de uma enzima em certa temperatura é considerado um parâmetro crucial para a aplicação industrial de biocatalisadores, uma vez que este fornece informações sobre a atividade residual da enzima (LONGO e COMBES, 1999). Quanto ao parâmetro tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi observado que a 30°C este era de 101,9 minutos enquanto que nas temperaturas de 55 e 60°C este valor foi reduzido para 3,5 e 1,9 minutos, respectivamente. Os resultados obtidos foram semelhantes aos da MTGase produzida por *Streptoverticillium ladakanum*, que apresentou valores de $t_{1/2}$ de 33,9, 18,6 e 5,5 minutos nas temperaturas de 45, 50 e 55°C, respectivamente (TSAI *et al.*, 1996). Contudo, a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 mostrou-se menos estável a temperatura de 50°C quando comparada as MTGases de *Streptomyces platensis* (LIN *et al.*, 2008) e *Bacillus*

circulans BL32 (SOUZA *et al.*, 2009), onde foram observados a 50°C valores de $t_{1/2}$ de 33,8 e 384 minutos, respectivamente.

Assim como foi verificado pelos parâmetro K_d e $t_{1/2}$, o valor D da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 também indicou uma maior estabilidade térmica da enzima em temperaturas de 30 e 40°C, pois foi estimado que a enzima tem sua atividade reduzida a 10% do valor inicial após 338,6, 99,2 e 6,3 minutos quando exposta as temperaturas de 30, 45 e 60°C, respectivamente.

Os resultados obtidos para os parâmetros cinéticos de meia-vida e valor D da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (Tabela II.1) indicam que esta enzima pode ser aplicada na maioria dos processos tecnológicos na área alimentícia como proposto por WAKAMEDA *et al.* (1990), MOTOKI *et al.* (1992), ZHU *et al.* (1995) e KURAISHI *et al.* (1997), para a fabricação de produtos lácteos, pães e massas alimentícias, surimi e kamaboko e produtos cárneos reestruturados, assim como no acabamento de couros como descrito por RASMUSSEN *et al.* (1996), devido a utilização de temperaturas entre 30 e 40°C por períodos de tempo inferiores a 3 horas ou temperaturas abaixo de 25°C por períodos mais longos de tempo.

Por outro lado, a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 pode não resultar nos efeitos desejados quando utilizada na fabricação de embutidos cárneos, produtos derivados de soja como o tofu, sobremessas lácteas e filmes proteicos comestíveis, devido as altas temperaturas utilizadas nestes processos tecnológicos (acima de 50°C por no mínimo 1 hora) como proposto por MOTOKI *et al.* (1992), ZHU *et al.* (1995) e MAMANI (2004).

Os parâmetros cinéticos calculados também fornecem informações úteis para inativação da enzima utilizando o tratamento térmico, pois a formação de ligações cruzadas pela MTGase acima de uma certa quantidade pode resultar em efeitos indesejáveis nos produtos, como alteração da viscosidade, firmeza, elasticidade e volume (KURAISHI *et al.*, 1997; DE JONG e KOPPELMAN, 2002).

A Figura II.3 ilustra a regressão do valor D obtido nas diferentes temperaturas para o cálculo do valor Z. O valor Z, calculado conforme o item II.2.5.2, reflete a variação de temperatura requerida para a redução de 90% da atividade enzimática. Foi

verificado que para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 este valor foi de 16,5°C. Resultados semelhantes foram verificados para as MTGases de *Streptoverticillium ladakanum* (TSAI *et al.*, 1996), *Streptomyces platensis* (LIN *et al.*, 2008) e *Streptomyces hygroscopicus* (CUI *et al.*, 2008), onde os valores Z foram de, respectivamente, 12,6, 28,3 e 18,9°C. Para a MTGase obtida de *Streptoverticillium ladakanum* foi observado um valor Z de 9,6°C (HO *et al.*, 2000).

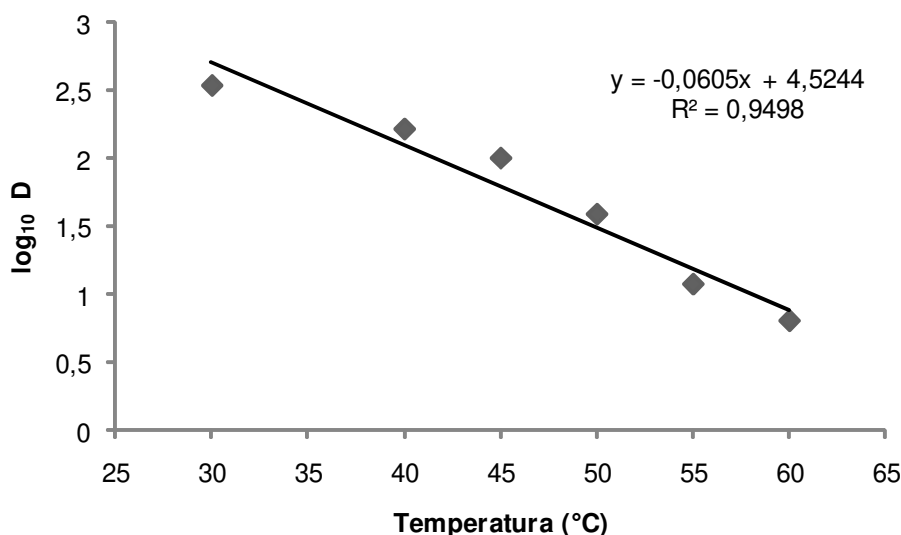


Figura II. 3 - Linearização da redução decimal (D) para o cálculo do valor Z da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação fornecem informações sobre a termoestabilidade da enzima para cada etapa do processo de desnaturação induzido pelo calor. Estes podem ajudar a detectar alguma estabilização secundária ou efeitos da desestabilização que não são verificados se apenas o tempo de meia-vida for considerado (LONGO e COMBES, 1999; SOUZA *et al.*, 2009).

A Figura II.4 ilustra a regressão linear proposta por Arrhenius para o cálculo da energia de ativação da desnaturação (E_{ad}) da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

O valor de E_{ad} corresponde a energia necessária para a mudança da conformação da enzima, assim quanto maior o seu valor, maior é a energia necessária para que ocorra

a desnaturação da enzima e, portanto, maior é sua resistência térmica (COBOS e ESTRADA, 2003; SILVA, 2009).

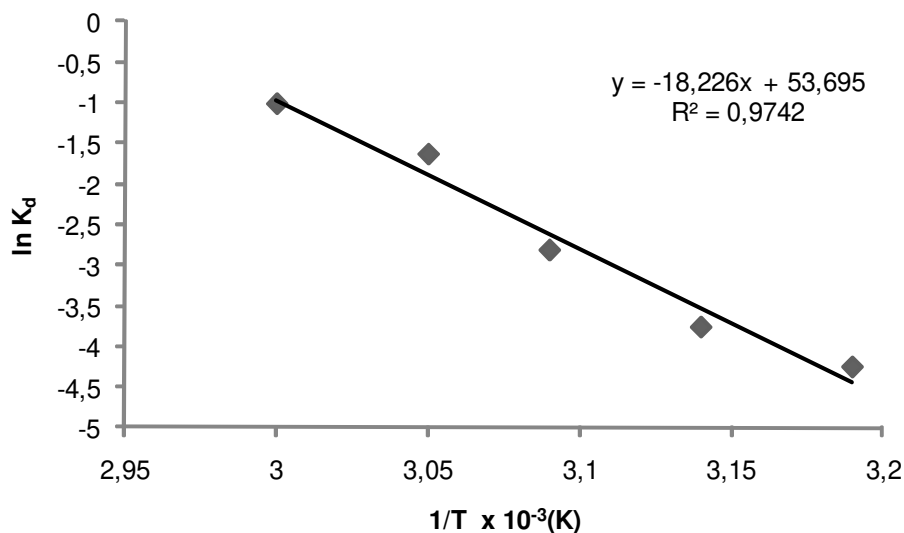


Figura II. 4 - Formalização dos dados experimentais por Arrhenius, para o cálculo de E_{ad} da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

A energia de ativação da desnaturação obtida para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi de 151,53 KJ mol⁻¹. Este valor de E_{ad} foi superior ao relatado para MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* (98,22 KJ mol⁻¹) por CUI *et al.* (2008) e semelhante ao descrito na literatura para MTGases de outros micro-organismos (TSAI *et al.*, 1996; HO *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2008).

A Tabela II.2 apresenta os valores calculados para os parâmetros de entalpia (ΔH), energia livre (ΔG) e entropia (ΔS) da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

Os resultados para entalpia (ΔH) foram praticamente independentes da temperatura avaliada, indicando que não há variação na capacidade térmica da MTGase estudada. Segundo MARANGONI (2003) valores positivos e elevados de entalpia podem ser associados a uma enzima mais termoestável, uma vez que uma maior quantidade de energia é necessária para a ocorrência do processo de desnaturação. De

acordo com ORTEGA *et al.* (2004), o valor de ΔH pode ser correlacionado com o número de ligações não covalentes rompidas durante o processo de desnaturação. Para a MTGase de *Streptovercillium ladakanum* também foi observada pequena variação neste parâmetro nas temperaturas avaliadas, sendo calculado o valor de 140,78 KJ mol⁻¹ nas temperaturas de 50 e 55°C (TSAI *et al.*, 1996).

Tabela II. 2 - Parâmetros termodinâmicos da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Temperatura (°C)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
30	149,00	86,84	205,0
40	148,92	87,76	195,3
45	148,88	87,86	191,7
50	148,84	86,96	189,3
55	148,80	84,81	195,0
60	148,76	84,39	193,2

O parâmetro de entropia (ΔS) indica que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem no sistema. De acordo com KLIBANOV (1983), a causa mais comum da inativação térmica de uma enzima é a perda da conformação nativa, isto é, o desdobramento da estrutura terciária ativa para a forma polipeptídica desordenada, devido ao aumento da mobilidade molecular em temperaturas elevadas. Todos os resultados de ΔS obtidos para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foram positivos. Conforme proposto por MARANGONI (2003), estes resultados indicam o aumento da desordem, ou aleatoriedade, do sistema submetido a desnaturação. Os valores de ΔS obtidos para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foram semelhantes aos descritos LIN *et al.* (2008) para a MTGase de *Streptomyces platensis* e maiores que aqueles descritos para as MTGases de *Streptovercillium ladakanum* (TSAI *et al.*, 1996) e *Streptomyces hygroscopicus* (CUI *et al.*, 2008) .

Segundo MARANGONI (2003) e LONGO e COBES (1999), o valor de energia livre (ΔG) é o indicador mais preciso e confiável da estabilidade de uma enzima, pois

em seu cálculo é levado em consideração as contribuições da entalpia e entropia. O valor está diretamente relacionado com a estabilidade proteica, uma vez que valores baixos ou negativos indicam que o processo de desnaturação ocorre mais rapidamente, podendo desta forma ser utilizado como um parâmetro para comparação de enzimas quanto a sua termoestabilidade. Observou-se que a elevação da temperatura de incubação da MTGase de 30 para 60°C promoveu uma diminuição nos valores de ΔG indicando a desestabilização progressiva da proteína. Os valores de energia livre calculados foram semelhantes aos apresentados pelas MTGases de *Streptomyces hygroscopicus* (CUI *et al.*, 2008) e *Streptoverticillium ladakanum* (TSAI *et al.*, 1996). Contudo, quando os valores são comparados com os da MTGase de *Streptoverticillium ladakanum* relatados por HO *et al.* (2000), em torno de 214 KJ mol⁻¹, nota-se que a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 apresenta uma menor termoestabilidade.

II.3.1.3. Estudo do efeito de diferentes compostos na termoestabilidade da MTGase

Visando aumentar a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi avaliada, como descrito no item II.2.5.3, a influência de alguns compostos descritos na literatura como estabilizadores de proteínas.

A Figura II.5 ilustra o efeito de alguns dos compostos testados em diferentes concentrações sobre a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Verificou-se após incubação a 45°C por 30 minutos que cerca de 75% da atividade enzimática foi perdida no tubo controle enquanto que na presença dos compostos KCl, EDTA, cisteína e glutatona houve uma redução desta perda de atividade enzimática. A adição de cisteína na concentração de 0,1% resultou na manutenção de 60% da atividade enzimática inicial. A adição dos compostos glutatona na concentração de 0,1%, EDTA e KCl na concentração de 1% resultaram na manutenção de cerca de 45% da atividade residual após incubação a 45°C por 30 minutos. Também foi observado que na presença de alguns compostos (CaCl₂ e cisteína nas concentrações de 5% e 1%,

respectivamente, e ácido cítrico nas duas concentrações testadas) houve inativação da MTGase em relação ao controle.

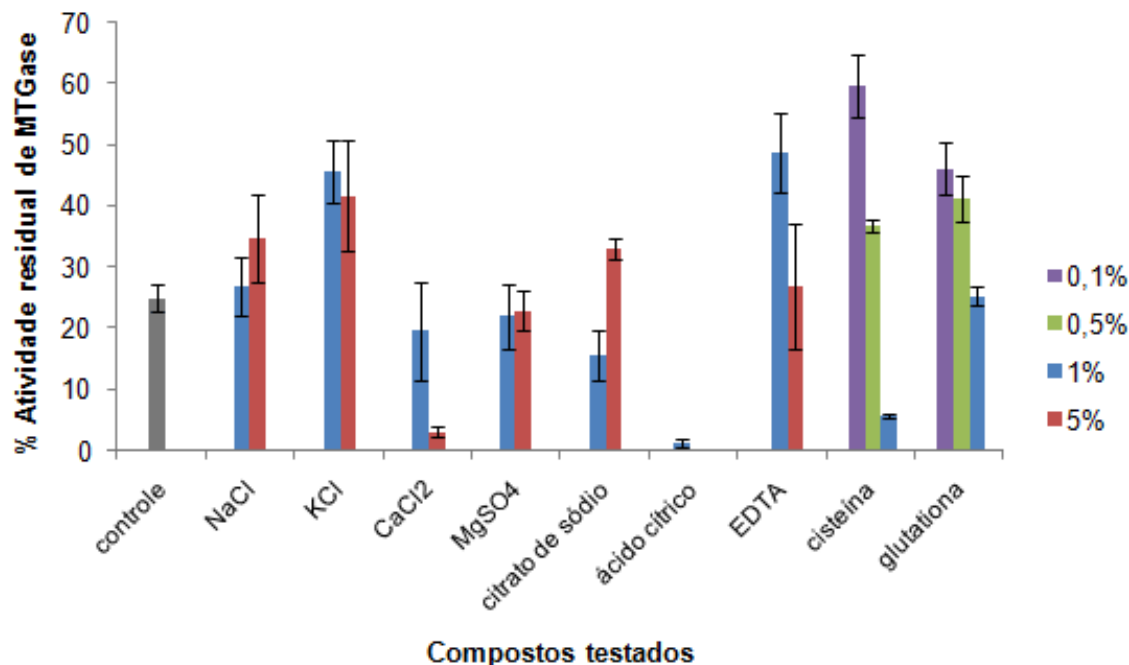


Figura II. 5 - Efeito de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

A Tabela II.3 apresenta as médias das atividades relativas residuais da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e seus desvios padrão após tratamento a 45°C por 30 minutos na presença dos diferentes aditivos. A comparação estatística das médias pelo teste de Tukey apontou que não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com NaCl, MgSO₄ e citrato de sódio nas duas concentrações testadas, CaCl₂ e glutatona na concentração de 1%, cisteína na concentração de 0,5% e EDTA na concentração de 5%. Os compostos KCl e EDTA na concentração de 1% e cisteína e glutatona na concentração 0,1% apresentaram efeito significativo sobre a atividade residual da MTGase, podendo desta forma serem utilizados como aditivos para a estabilização térmica da enzima. Constatou-se que o aminoácido cisteína na

concentração 0,1% aumentou a atividade residual em 35% em relação a atividade residual observada para o controle.

Tabela II. 3 - Influência de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 durante incubação a 45°C por 30 minutos

% Atividade residual de MTGase		
Compostos	Média *	Desvio padrão
NaCl 1%	26,8 ^{defg}	4,8
NaCl 5%	34,6 ^{bcd}	7,2
KCl 1%	45,7 ^{abc}	5,0
KCl 5%	41,6 ^{bcd}	9,0
CaCl ₂ 1%	19,6 ^{fgh}	8,0
CaCl ₂ 5%	3,0 ⁱ	0,8
MgSO ₄ 1%	21,9 ^{efg}	5,1
MgSO ₄ 5%	22,7 ^{efg}	3,2
Citrato de sódio 1%	15,6 ^{ghi}	4,0
Citrato de sódio 5%	32,9 ^{cdef}	1,7
Ácido cítrico 1%	1,3 ⁱ	0,6
Ácido cítrico 5%	0,2 ⁱ	0,1
EDTA 1%	48,8 ^{ab}	6,4
EDTA 5%	26,7 ^{defg}	10,2
Cisteína 0,1%	59,6 ^a	5,2
Cisteína 0,5%	36,6 ^{bcde}	1,0
Cisteína 1%	5,5 ^{hi}	0,3
Glutathione 0,1%	46,0 ^{abc}	4,2
Glutathione 0,5%	41,1 ^{bcd}	3,8
Glutathione 1%	25,1 ^{efg}	1,5
Controle	24,9 ^{efg}	2,1

* Os valores são as médias de triplicatas e aqueles seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$

O efeito protetor e estabilizante verificado para os antioxidantes glutathione e cisteína sobre a atividade da MTGase ocorreu, possivelmente, devido a capacidade destes de manter em estado reduzido o sítio ativo da enzima. De acordo com CUI *et al.*

(2006) a glutatona promove a redução de alguns grupos que tornam-se oxidados durante as mudanças conformacionais da estrutura proteica no processo de termodesnaturação, como o resíduo de cisteína localizado no sítio ativo das MTGases, e desta forma possibilita a estabilização térmica da enzima.

Segundo KLIBANOV (1983) o efeito de sais na estabilização térmica de enzimas pode ser por causa de interações específicas de cátions divalentes com a proteína ou devido a adição de altas concentrações de sais neutros (*salting out*) que reduzem a solubilidade de grupos hidrofóbicos da proteína pelo aumento da força iônica da solução.

O efeito dos sais testados na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 diferiram um pouco daqueles observados para a MTGase de *Bacillus circulans* BL32. SOUZA (2008) observou que o aumento da concentração de KCl de 0,25 para 3% diminuiu a estabilidade térmica da MTGase de *Bacillus circulans* BL32, porém, na presença de $MgCl_2$ (1%) foi observado um efeito positivo sobre a manutenção da atividade enzimática.

Em continuidade ao trabalho anterior, SOUZA *et al.* (2009) verificaram que altas concentrações de NaCl (5%) resultaram na rápida inativação da MTGase de *Bacillus circulans* BL32 quando incubada a 50°C, enquanto que nas concentrações entre 1 e 3% foi observado o aumento da estabilidade. Os pesquisadores também constataram o aumento da termoestabilidade da enzima na presença de $CaCl_2$ nas concentrações de 1, 3 e 5%.

Os resultados obtidos para os sais testados (NaCl, KCl, $CaCl_2$ e $MgSO_4$) na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 indicam que a adição de íons monovalentes promove o aumento da estabilidade térmica da enzima enquanto que íons divalentes apresentam pouca influência ou diminuem a estabilidade térmica da MTGase.

KUTEMEYER *et al.* (2005) estudaram a influência dos sais KCl, NaCl, $CaCl_2$ e $MgCl_2$ sobre a termoestabilidade da transglutaminase microbiana comercial Activa[®] WM (Ajinomoto Co.) incubada por 10 minutos a 50, 55, 60 e 65°C. Foi constatado que

a adição de NaCl e KCl em altas concentrações (15 e 20%) promoveu o aumento da estabilidade térmica em comparação a amostra controle. Para os sais CaCl_2 e MgCl_2 , em todas as concentrações testadas, foi observado pouca influência sobre a atividade da enzima.

Polióis e carboidratos de baixa massa molecular são descritos na literatura como compostos que também podem exercer efeito estabilizante sobre a estrutura de proteínas (Ó'FÁGÁIN, 2003). A Figura II.6 apresenta o efeito protetor destes compostos na manutenção da estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

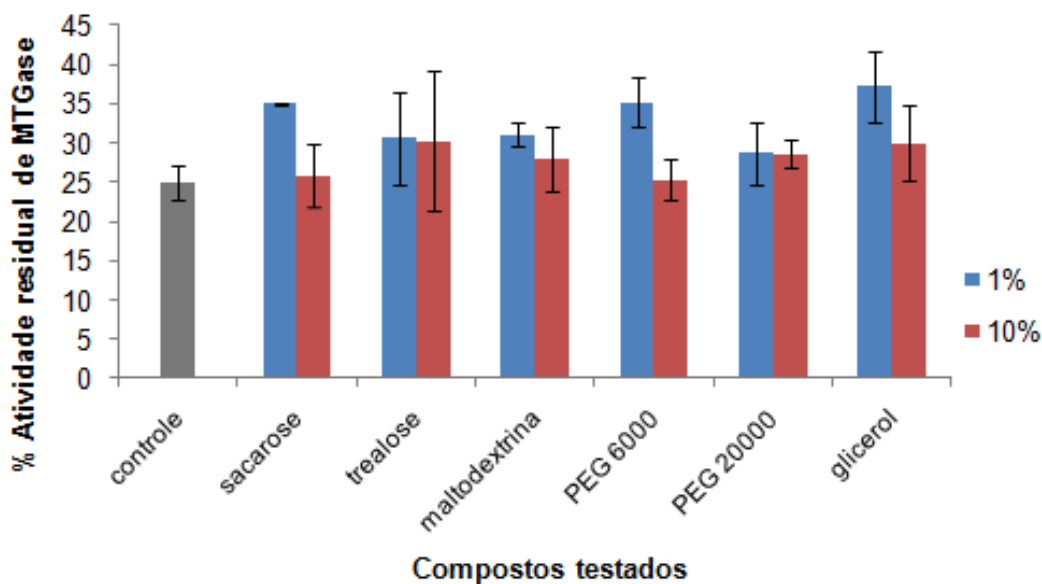


Figura II. 6 - Efeito de alguns polióis e carboidratos na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Foi observado que a adição de polióis e carboidratos, nas concentrações de 1 e 10%, não foi tão eficiente como alguns dos compostos testados anteriormente no aumento da estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837, pois foi constatada a manutenção de apenas cerca de 30% da atividade residual após 30 minutos de incubação a 45°C. Para os compostos sacarose, PEG 6.000 e glicerol na

concentração de 1% foi verificado o aumento de 10% da atividade residual em relação ao valor obtido para o controle após a incubação.

A Tabela II.4 apresenta as médias de atividades relativas residuais obtidas após o tratamento da MTGase com polióis e açúcares e seus desvios padrão. Através da comparação dos resultados obtidos pelo teste de Tukey, foi verificado que não houve diferença estatística, com 95% de significância, entre os resultados obtidos de atividade enzimática para o controle e a enzima incubada com os diferentes aditivos.

Tabela II. 4 - Influência de alguns polióis e carboidratos na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 durante incubação a 45°C por 30 minutos

% Atividade residual de MTGase		
Compostos	Média *	Desvio padrão
Sacarose 1%	35,0 ^a	0,1
Sacarose 10%	25,9 ^a	3,9
PEG 6.000 1%	35,2 ^a	3,1
PEG 6.000 10%	25,3 ^a	2,5
PEG 20.000 1%	28,7 ^a	4,0
PEG 20.000 10%	28,6 ^a	1,7
Trealose 1%	30,6 ^a	5,9
Trealose 10%	30,2 ^a	8,8
Maltodextrina 1%	31,1 ^a	1,4
Maltodextrina 10%	27,9 ^a	4,1
Glicerol 1%	37,2 ^a	4,6
Glicerol 10%	30,0 ^a	4,7
Controle	24,9 ^a	2,1

* Os valores são as médias de triplicatas e aqueles seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$

De acordo com Ó'FÁGÁIN (2003) e LOZANO *et al.* (1994), carboidratos e polióis possuem a habilidade de estabilizar enzimas pelo fato de diminuir a facilidade com que ocorre o desdobramento proteico em altas temperaturas. Este efeito estabilizante pode ser devido à alteração da camada de hidratação ao redor da proteína, pois estes compostos aumentam a viscosidade da solução e consequentemente

diminuem as mudanças químicas e biológicas que podem resultar na inativação de enzimas. Estes compostos também melhoram a estabilidade térmica de enzimas, pois reforçam interações hidrofóbicas entre aminoácidos não polares presentes na proteína (BACK *et al.*, 1979).

CUI *et al.* (2008) analisaram a influência da adição dos compostos sorbitol, glicerol, sacarose, fucose e maltodextrina na concentração de 10% e PEG 6.000 na concentração de 0,8 M na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* durante exposição a 50°C por 30 minutos. Foi verificado que todos os compostos testados apresentaram efeito protetor sobre a estabilidade térmica da enzima, sendo 75% da atividade enzimática preservada na presença de sorbitol e glicerol. Os compostos PEG 6.000 e glicerol aumentaram o tempo de meia-vida da MTGase a 50°C para 38 e 44 minutos, respectivamente, enquanto no controle este valor foi de 20 minutos.

A Tabela II.5 apresenta os resultados obtidos para o efeito da combinação da cisteína na concentração de 0,1% com EDTA a 1% e glicerol, sacarose, maltodextrina e PEG 6.000 a 10%, visando a proteção da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 durante o tratamento térmico a 45°C por 30 minutos.

Tabela II. 5 - Efeito da combinação de diferentes compostos na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

% Atividade residual de MTGase		
Compostos	Média *	Desvio padrão
Cisteína 0,1% + Glicerol 10%	56,1 ^a	2,1
Cisteína 0,1% + Sacarose 10%	61,4 ^a	5,9
Cisteína 0,1% + Maltodextrina 10%	52,5 ^a	3,3
Cisteína 0,1% + PEG 6.000 10%	58,6 ^a	3,1
Cisteína 0,1% + EDTA 1%	37,0 ^b	3,7
Controle	24,9 ^c	2,1

* Os valores são as médias de triplicatas e aqueles seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$

Observou-se que todas as combinações testadas aumentaram a estabilidade térmica da enzima, diferindo estatisticamente em relação ao controle. A combinação de cisteína com o complexante EDTA apresentou um efeito menor do que o observado quando estes dois compostos foram testados isoladamente. Possivelmente, os resultados obtidos para as combinações de cisteína com polióis e carboidratos foram principalmente devido à cisteína, uma vez que esta apresentou manutenção de 60% da atividade residual quando testada isoladamente na concentração de 0,1%. Contudo, a combinação cisteína 0,1% e sacarose 10% apresenta um custo relativamente baixo e pode ser utilizada para aumentar a estabilidade térmica da enzima durante a aplicação desta no processamento produtos de panificação e também para aumentar a estabilidade enzimática durante o armazenamento devido a redução da atividade de água.

CUI *et al.* (2006) relataram que a MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* na presença de 20% de maltodextrina apresentou redução na perda de atividade enzimática, menos de 30%, quando incubada a 50°C por 30 minutos. A adição de 20% de manose, trealose e sacarose a solução de MTGase também aumentou a atividade enzimática residual em comparação ao controle. Também foi observado que a combinação de maltodextrina e glutathione nas concentrações de 20 e 0,1%, respectivamente, resultou na preservação de 95% da atividade enzimática residual. Os pesquisadores também avaliaram o efeito da adição de maltodextrina, na concentração de 20%, sozinha e em combinação com a glutathione, na concentração de 0,1%, em soluções enzimáticas contendo 1 e 10% (v:v) de etanol sob as mesmas condições. Neste caso, foram observadas perdas de cerca de 70 e 94% da atividade enzimática para as amostras controle, enquanto para a combinação maltodextrina e glutathione estes valores foram de 8 e 73% quando incubadas em soluções contendo 1 e 10% de etanol, respectivamente.

II.3.2. Efeito do etanol na atividade da MTGase

Reações enzimáticas na presença de solventes orgânicos, como o etanol, promovem várias vantagens industriais, tais como o aumento da solubilidade e maior

taxa de reação de substratos não polares e eliminação da contaminação microbiana. Entretanto, a aplicação de enzimas em meio orgânico é restrita, pois muitas enzimas apresentam menor atividade e estabilidade na presença de solventes orgânicos (DOUKYU e OGINO, 2010).

Segundo CUI *et al.* (2008) a adição de baixas concentrações de etanol a MTGase pode ser útil para aumentar as aplicações desta enzima em alimentos, pois várias proteínas vegetais insolúveis em água mas solúveis em meio contendo etanol, como as gliadinas do trigo, podem então ser utilizadas como substratos para reação de ligação cruzada catalisada pela transglutaminase.

Proteínas em soluções aquosas estão cercadas por uma camada de hidratação, a qual é composta de moléculas de água que se ligam a superfície da proteína. Caso um solvente orgânico esteja presente, as moléculas do solvente tendem a substituir as moléculas de água na camada de hidratação e no interior da proteína, promovendo a deformação das interações (eletrostáticas, hidrofóbicas, Van der Waals e pontes de hidrogênio) responsáveis pela manutenção da conformação nativa e flexibilidade das proteínas (KITA *et al.*, 1994; TIMASHEFF, 1998; DOUKYU e OGINO, 2010).

O efeito de diferentes concentrações de etanol sobre a estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em solução tampão pH 6,0 a 25°C é apresentado na Figura II.7.

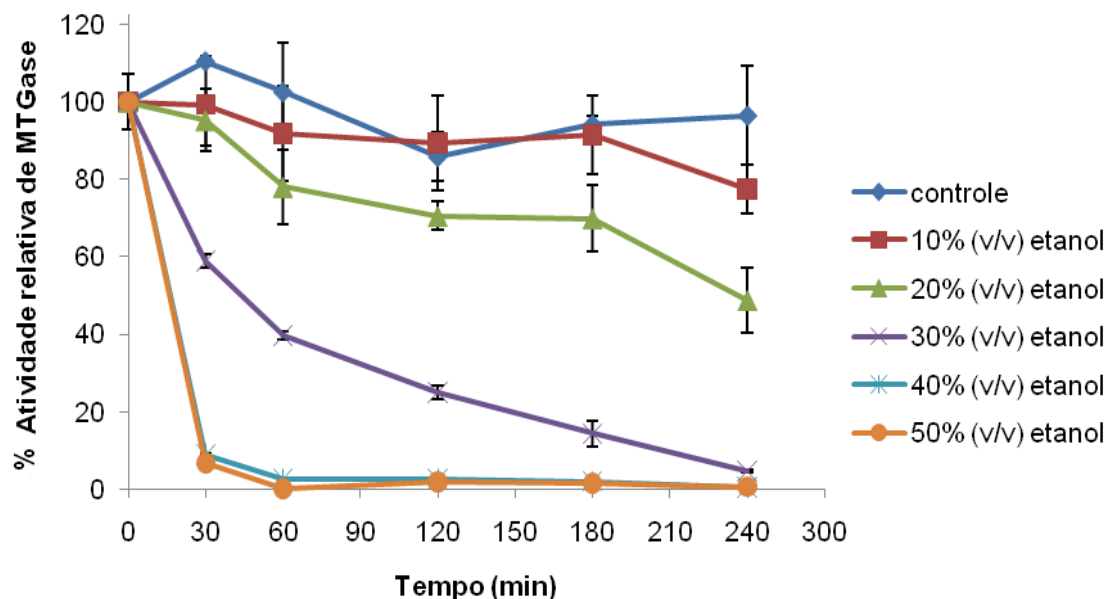


Figura II. 7 - Efeito de diferentes concentrações de etanol na estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 a 25°C

Observou-se que a MTGase em solução tampão sem a adição de etanol (controle) foi estável e manteve cerca de 100% da atividade enzimática após 4 horas de incubação a 25°C. Na presença de etanol a 10 e 20% constatou-se a manutenção de 92 e 70% da atividade residual, respectivamente, após 3 horas de tratamento a 25°C, sendo que ao final de 4 horas de tratamento a 25°C estes valores de atividade residual foram de 77% e 49%, respectivamente. Foi verificada para as concentrações acima de 30% de etanol a diminuição da atividade enzimática residual, sendo esta quase totalmente perdida após 30 minutos de tratamento a 25°C na presença de 40 e 50% de etanol.

CUI *et al.* (2006 e 2007) relataram o aumento da atividade enzimática da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* em torno de 20% e a manutenção de cerca de 100% da atividade enzimática residual após 4 horas de tratamento a 25°C na presença de etanol nas concentrações de 10 e 20% (v:v). Foi também verificada a inibição da atividade da MTGase na presença de altas concentrações de etanol (40 e 50%; v:v) e uma menor estabilidade térmica quando na presença de etanol.

II.3.3. Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase

A Tabela II.6 apresenta o efeito dos compostos iodoacetamida, ácido cloromercuribenzóico, dietilcarbamato de sódio, EDTA e cisteína nas concentrações finais 1, 5 e 10 mM na atividade enzimática da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 após 30 minutos a 25°C.

Tabela II. 6 - Efeito de ativadores e inibidores enzimáticos na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Composto	Concentração	Atividade relativa (%) *	Desvio padrão
Iodoacetamida	1 mM	4,48 ^b	0,6
	5 mM	1,39 ^b	0,2
	10 mM	0,75 ^b	0,2
Ácido cloromercuribenzóico	1 mM	0,02 ^b	0
	5 mM	0,02 ^b	0
	10 mM	0,05 ^b	0
Dietilcarbamato de sódio	1 mM	63,15 ^{ac}	20,9
	5 mM	36,09 ^{bc}	6,6
	10 mM	28,86 ^{bc}	3,3
EDTA	1 mM	185,39 ^d	20,8
	5 mM	233,65 ^{de}	6,1
	10 mM	182,67 ^{df}	33,7
Cisteína	1 mM	221,2d ^{efg}	17,6
	5 mM	244,6 ^{eg}	22,4
	10 mM	160,72 ^{df}	30,9
Controle		100 ^a	15,3

* Os valores são as médias de triplicatas e aqueles seguidos de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a $p < 0,05$

A atividade de MTGase foi fortemente inibida na presença dos compostos iodoacetamida e ácido cloromercuribenzóico em todas as concentrações testadas. Também foi observada a diminuição da atividade enzimática na presença do quelante de íons cobre dietilcarbamato de sódio. Os compostos EDTA e cisteína demonstraram

um efeito ativador sobre a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 quando comparados com os valores de atividade residual do controle. Observou-se o aumento de mais de 120% da atividade enzimática quando foram adicionados os compostos EDTA na concentração de 5 mM e cisteína nas concentrações de 1 e 5 mM.

De acordo com os resultados obtidos pode-se constatar que a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 é uma enzima cálcio independente que contém um resíduo de cisteína no sítio ativo, pois esta não foi inibida pela adição de EDTA, um conhecido complexante de íons cálcio, e também pelo fato da enzima ter sido fortemente inibida por iodoacetamida e ácido cloromercuribenzóico, compostos conhecidos por reagirem com grupos tióis livres, e ativada na presença de cisteína, composto com características antioxidantes.

Resultados semelhantes aos obtidos foram observados para as MTGases de *Streptoverticillium ladakanum* (TSAI *et al.*, 1996; HO *et al.*, 2000), *Streptoverticillium mobaraense* S-8112 (ANDO *et al.*, 1989) e *Streptomyces platensis* (LIN *et al.*, 2008).

BAGAGLI (2009) e MACEDO *et al.* (2010) ao realizarem o estudo da influência de diferentes sais na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 relataram que a enzima foi inibida quando na presença de HgCl₂, CuSO₄ e ZnSO₄, indicando também a possível presença de grupos tióis no centro ativo da enzima.

BAGAGLI (2009) também observou que a adição de EDTA e cisteína nas concentrações de 1 e 10 mM promoveu o aumento da atividade enzimática da MTGase bruta de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Entretanto, esta MTGase na forma purificada apresentou 30% de perda da atividade enzimática quando adicionado EDTA na concentração de 5 mM (MACEDO *et al.*, 2010).

Segundo YOKOYAMA *et al.* (2004) o fato da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 ser uma enzima cálcio independente, permite a sua aplicação na modificação de proteínas que são sensíveis ao cálcio e que precipitam facilmente na presença deste, como as caseínas do leite, globulinas da soja e miosina da carne.

II.4. Conclusões

A MTGase presente na preparação enzimática bruta concentrada de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 mostrou-se uma enzima termossensível, assim como outras MTGases de *Streptomyces* spp. descritas na literatura.

Foi observada a manutenção de cerca de 60 e 40% da atividade inicial após incubação a 30 e 40°C, respectivamente, por 2 horas. Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 revelaram que a enzima apresenta uma cinética de desnaturação térmica de 1ª ordem, sendo mais estável em temperaturas abaixo de 40°C, onde o valor de redução decimal foi de 338 minutos a 30°C. A enzima foi rapidamente inativada quando incubada em temperaturas acima de 50°C, apresentando tempos de meia-vida a 55 e 60°C de 3,5 e 1,9 minutos, respectivamente.

A adição de EDTA e KCl na concentração de 1% e de cisteína e glutatona na concentração de 0,1% apresentaram efeito positivo sobre a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 após incubação a 45°C por 30 minutos. A adição de cisteína na concentração 0,1% promoveu o aumento de 35% da atividade residual em relação a MTGase sem adição de compostos sob as mesmas condições. Os carboidratos e polióis nas concentrações testadas não promoveram o aumento da estabilidade térmica da MTGase. A combinação de cisteína na concentração de 0,1% com carboidratos ou polióis na concentração de 10% promoveu a manutenção de mais de 50% da atividade inicial da MTGase após 30 minutos de incubação a 45°C, podendo desta forma também ser utilizada para estabilização térmica da enzima durante a aplicação.

O etanol na concentração de 10% (v:v) apresentou pouco efeito na atividade enzimática da MTGase, sendo observado valores de atividade residual próximos ao do controle após incubação a 25°C por 4 horas. Contudo, na presença de altas concentrações de etanol (40 e 50%; v:v) a MTGase foi rapidamente inibida.

A MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi inibida na presença de iodoacetamida e ácido cloromercuribenzóico e ativada na presença de EDTA e cisteína em todas as concentrações testadas, sugerindo que esta é uma enzima cálcio independente com um resíduo de cisteína no sítio ativo.

II.5. Referências Bibliográficas

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

BACK, J. F.; OAKENFULL, D.; SMITH, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. **Biochemistry**, v. 18, n. 23, p. 5191-5196, 1979.

BAGAGLI, M. P. Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113 p, 2009.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. 1^a ed., Editora Interciência, 506 p, 2008.

CARDAMONE, J. M.; PHILLIPS, J. G. Enzyme-mediated crosslinking of wool. Part II: keratin and transglutaminase. **Textile Research Journal**, v. 77, n. 5, p. 277-283, 2007.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 810-818, 2003.

CUI, L.; ZHANG, D.; HUANG, L.; LIU, H.; DU, G.; CHEN, J. Stabilization of a new microbial transglutaminase from *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13 by spray drying. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1427-1431, 2006.

- CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 612-618, 2007.
- CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; CHEN, J. Thermal stability and conformational changes of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3794-3800, 2008.
- DE JONG, G. A. H.; KOPPELMAN, S. J. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2798-2805, 2002.
- DOGAN, N.; TARI, C. Characterization of three-phase partitioned exopolysaccharidase from *Aspergillus sojae* with unique properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 43-50, 2008.
- DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 270-282, 2010.
- FOLK, J. E.; COLE, P. W. Mechanism of action of pig liver transglutaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 5518-5525, 1966.
- GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WAELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids glutamine and asparagines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 111-125, 1950.
- HO, M. -L.; LEU, S. -Z.; HSIEH, J. -F.; JIANG, S. T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptomyces ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76-80, 2000.
- KITA, Y.; ARAKAWA, T.; LIN, T. Y.; TIMASHEFF, S. N. Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. **Biochemistry**, v. 33, p. 15178-15189, 1994.
- KLIBANOV, A. M. Thermostabilisation of enzymes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 29, p. 1-29, 1983.

KURAISHI, C.; SAKAMOTO, J.; SOEDA, T. Process for producing cheese using transglutaminase. **United States Patent US5681598**, 1997.

KUTEMEYER, C.; FROECK, M.; WERLEIN, H. D.; WATKINSON, B. M. The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. **Food Control**, v. 16, p. 735-737, 2005.

LADERO, M.; FERRERO, R.; VIAN, A.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Kinetic modelling of the thermal and pH inactivation of a thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 505–513, 2005.

LIN, S. -J.; HSIEH, Y. -F.; LAI, L. -A.; CHAO, M. -L.; CHU, W. -S. Characterization and large-scale production of recombinant *Streptoverticillium platensis* transglutaminase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 981-990, 2008.

LONGO, M. A.; COMBES, D. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 25-32, 1999.

LOZANO, P.; COMBES, D.; IBORRA, J. L. Effect of polyols on α -chymotrypsin thermostability: A mechanistic analysis of the enzyme stabilization. **Journal of Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 9-18, 1994.

LU, S. Y.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P.; LI, H. Z.; CHEN, J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 109-125, 2003.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618-626, 2007.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technologies**, v. 3, n. 2, p. 308-314, 2010.

MAMANI, H. N. C. Desenvolvimento de filmes a partir de caseína e gelatina modificadas enzimaticamente com tripsina e transglutaminase. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 100 p, 2004.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. 1^a ed., John Wiley & Sons, 229 p, 2003.

MENÉNDEZ, O.; RAWEL, H.; SCHWARZENBOLZ, U.; HENLE, T. Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1716-1721, 2006.

MOTOKI, M.; OKIYAMA, A.; NONAKA, M.; TANAKA, H.; UCHIO, R.; MATSUURA, A.; ANDO, H.; UMEDA, K. Transglutaminase. **United States Patent US5156956**, 1992.

Ó'FÁGÁIN, C. Enzyme stabilization – recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-149, 2003.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; RODRIGUEZ-NOGALEZ, J. M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetics behavior and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 631-639, 2004.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes – structure, function and applications**. 1^a ed, Springer, 642 p, 2007.

RASMUSSEN, L.; MOLLGAARD, A.; PETERSEN, B. R.; SORENSEN, N. H. Method for casein finishing of leather. **United States Patent US5531795**, 1996.

SILVA, J. C. Seleção de micro-organismos produtores de frutossiltransferase e estudo das propriedades bioquímicas da frutossiltransferase de *Penicillium* sp. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 58 p, 2009.

SOEDA, T.; HONDO, K.; KUHARA, C. Stabilized transglutaminase and enzyme preparation containing the same. **United State Patent US6030821**, 2000.

SOUZA, C. F. V. Produção em cultivo submerso e no estado sólido e caracterização da transglutaminase (EC 2.3.2.13) do isolado amazônico *Bacillus circulans*. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 256 p, 2008.

SOUZA, C. F. V.; FACCIN, D. J. L.; MERTINS, O.; HECK, J. X.; SILVEIRA, N. P.; SECCHI, A. R.; AYUB, M. A. Z. Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 10, p. 1567-1575, 2009.

TIMASHEFF, S. N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v. 54, p. 355-431, 1998.

TSAI, G. -J.; LIN, S. -M.; JIANG, S. -T. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1234-1238, 1996.

UMEZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; YOKOYAMA, K.; NIO, N. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces sp.* **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 2, p. 113-118, 2002.

YEO, S. -H.; YOON, J. -H.; LEE, D. G.; KIM, H. S. Screening and identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 588-595, 2009.

YOKOYAMA, K. NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and application of microbial transglutaminase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 447-454, 2004.

WAKAMEDA, A.; YATSUKA, N.; SASAMOTO, Y. Process for the production of transglutaminase-containing food having improved texture. **United States Patent US4917904**, 1990.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food science**. 2^a ed., Marcel Dekker, 625 p, 1994.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559-565, 2008.

III. CAPÍTULO 3: Concentração, aplicação e purificação parcial da transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Resumo

O presente trabalho visou a concentração da preparação enzimática bruta de MTGase produzida por *Streptomyces* sp. CBMAI 837, a aplicação e a purificação da enzima. Entre os métodos testados para concentração da preparação enzimática bruta foi verificado que a precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação promoveu a concentração da enzima em 4,5 vezes com rendimento de 142%. A enzima foi concentrada 3,5 e 1,7 vezes, respectivamente, pela precipitação por adição de etanol na proporção 1:2 (v:v) e acetona na mesma proporção. A aplicação da preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. concentrada por sulfato de amônio em proteína texturizada de soja, na concentração de 0,5 U/g de amostra, foi capaz de promover a união dos grânulos de proteína texturizada de soja de forma similar à enzima comercial. A purificação da enzima em coluna de CM-celulose (cromatografia de troca iônica) seguido da aplicação em coluna de Sephadex G-75 (cromatografia de filtração em gel) não apresentou bons resultados, sendo observados baixos valores de purificação e rendimento. Na purificação da MTGase em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B foram obtidas três frações com atividade de MTGase, denominadas TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3. Os fatores de purificação e rendimento destas frações foram, respectivamente, 1,7 e 37%; 11,4 e 9,2% e 17,3 e 18,4%. A massa molecular da MTGase presente nas frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 foi estimada em 35 KDa por SDS-PAGE. A fração parcialmente purificada TG-BS1 exibiu atividade ótima em pH 10,0 e um segundo pico de atividade em pH 6,0. As frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram atividade ótima em pH 6,5 e também um segundo pico de atividade em pH 10,0.

Abstract

The main objective of this work was the concentration of crude enzyme extract MTGase produced by *Streptomyces* sp. CBMAI 837, the application and the purification of this extract. Among the methods tested to concentrate the crude enzyme preparation, it was found that precipitation with ammonium sulfate at 80% saturation promoted the concentration of the enzyme 4.5 fold with 142% yield. The enzyme was concentrated 3.5 and 1.7 fold, respectively, by precipitation with ethanol in 1:2 (v/v) and acetone in same proportion. The application of crude enzyme preparation of MTGase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 concentrated by ammonium sulfate in texturized soy protein was able to join texturized soy protein grains at a concentration of 0.5 U/g of sample likewise the commercial enzyme. The enzyme purification on column of CM-cellulose (ion exchange chromatography) followed by the application on column of Sephadex G-75 (gel filtration chromatography) did not produce good results and low levels of purification and yield were observed. Three fractions with MTGase activity, named TG-BS1, TS-BS2 and TG-BS3, were obtained with the purification of MTGase in affinity column Blue Sepharose CL-6B. The purification factors and yield of these fractions were, respectively, 1.7 and 37%, 11.4 and 9.2% and 17.3 and 18.4%. The molecular mass of MTGase present in purified fractions TG-BS2 e TG-BS3 was estimated at 35 KDa by SDS-PAGE. The partially purified fraction TG-BS1 exhibited optimal activity at pH 10.0 and a second peak of activity at pH 6.0. The purified fractions TG-BS2 and TG- BS3 showed optimal activity at pH 6.5 and also a second peak of activity at pH 10.0.

III.1. Introdução

A transglutaminase (TGase; EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa a formação de ligações covalentes cruzadas entre proteínas por meio da ligação de resíduos de glutamina e lisina. Esta enzima está amplamente distribuída em animais, plantas,

humanos e micro-organismos, onde participa de vários mecanismos biológicos (MOTOKI e SEGURO, 1998; FOLK, 1980).

Atualmente a transglutaminase tem sido largamente empregada na indústria de alimentos para melhorar as características físicas e texturais de muitos produtos. Outras aplicações da enzima são relatadas nas áreas farmacêutica, têxtil, curtimento de couros, médica e na imobilização de enzimas (ZHU *et al.*, 1995; POLAINA E MACCABE, 2007; ZHU e TRAMPER, 2008).

ANDO *et al.* (1989) relataram a seleção de um micro-organismo isolado de solo com alta capacidade produtora da enzima transglutaminase por métodos fermentativos tradicionais. A partir de então, diversos estudos envolvendo rastreamento de micro-organismos e melhorias dos processos fermentativos têm sido relatadas.

A atividade de transglutaminase microbiana (MTGase) foi encontrada nos gêneros *Streptomyces* (GERBER *et al.*, 1994; CUI *et al.*, 2007; LANGSTON *et al.*, 2007), *Bacillus* (SOAREZ *et al.*, 2003), *Physarum* (KLEIN *et al.*, 1992), *Candida* (HERRERA *et al.*, 1995), *Actinomadura* (KIM *et al.*, 2000) e *Saccharomyces* (MÁZAN e FARKAS 2007).

As MTGases de micro-organismos do gênero *Streptomyces* são, normalmente, enzimas extracelulares encontradas na forma de misturas complexas com inúmeras proteínas sem função catalítica e outros produtos celulares liberados a partir da fragmentação de células mortas no meio de cultivo (ZHU *et al.*, 1995).

Enzimas em estado impuro podem ser aplicadas para finalidades específicas e em muitos casos são requeridas por serem de fácil obtenção e de baixo custo. As enzimas purificadas apresentam a vantagem de estarem livres de outras enzimas e substâncias que interferem nos substratos desviando as reações específicas. Além disso, são muito mais valorizadas comercialmente (PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005; FLEURI, 2006; BON *et al.*, 2008).

De acordo com PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN (2005) e FLEURI (2006) os procedimentos utilizados para a concentração e purificação são onerosos e podem ocasionar a perda da molécula-alvo, por isso, para que se justifique a sua utilização devem ser obtidos bons resultados.

A purificação de enzimas microbianas extracelulares presentes no meio de cultivo fermentado é normalmente realizada empregando-se inicialmente uma etapa de separação das proteínas por centrifugação ou filtração dos fragmentos celulares presentes no meio de cultivo, seguido dos passos de concentração do sobrenadante de cultivo e purificação propriamente dita utilizando técnicas cromatográficas (BON *et al.*, 2008; PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005).

A etapa de concentração do sobrenadante de cultivo é realizada com intuito de reduzir o volume a ser trabalhado e eliminar impurezas ainda presentes no sobrenadante de cultivo. Esta pode ser realizada principalmente através de liofilização, ultrafiltração e precipitação por adição de sais, solventes orgânicos e polímeros ou por alteração do pH (YADA, 2004; BON *et al.*, 2008).

Os métodos cromatográficos ocupam uma posição fundamental na purificação de enzimas, pois promovem a separação de substâncias interferentes de acordo com suas propriedades físicas (tamanho, forma, carga, hidrofobicidade), químicas (ligações covalentes) e biológicas (afinidade bioespecífica). Assim, para a separação cromatográfica de enzimas podem ser utilizadas colunas de troca iônica, filtração em gel, interação hidrofóbica, afinidade e imunoafinidade (BON *et al.*, 2008; PESSOA JÚNIOR e KILIKIAN, 2005).

MACEDO *et al.* (2007) isolaram de amostras de solo brasileiro a linhagem de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e relataram o elevado potencial para produção de MTGase por este micro-organismo. BAGAGLI (2009) e MACEDO *et al.* (2010) relataram a possível presença de isoenzimas no sobrenadante de cultivo da fermentação deste micro-organismo ao realizarem a caracterização bioquímica da enzima bruta.

MACEDO (2009) purificou a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 utilizando coluna de filtração em gel Sephadex G-75, porém foi observada uma baixa taxa de recuperação da atividade enzimática sem a separação das possíveis isoenzimas.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos estudar a concentração do sobrenadante do meio de cultivo de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por meio de liofilização, ultrafiltração, precipitação por adição de sulfato de amônio e de solventes orgânicos (etanol e acetona) e em tubos de diálise utilizando carboximetilcelulose (CM-celulose), a aplicação da preparação enzimática bruta concentrada na reestruturação de proteína texturizada de soja e a purificação da enzima por cromatografia de troca iônica, filtração em gel e afinidade.

III.2. Material e métodos

III.2.1. Determinações analíticas

III.2.1.1. Determinação da atividade de MTGase

A atividade de transglutaminase foi determinada pela técnica colorimétrica de formação de ácido hidroxâmico (GROSSOWICZ *et al.*; 1950; FOLK e COLE; 1966) utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-glutaminil-glicina), conforme descrito no item II.2.4 do capítulo anterior. Uma unidade de atividade de transglutaminase (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μ Mol de ácido hidroxâmico por minuto nas condições do ensaio.

III.2.1.2. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas solúveis foi realizada pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972) e foi utilizada para os cálculos de atividade específica.

Tubos de ensaio contendo 2 mL de amostra e 1,8 mL de reagente A foram incubados a 50°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e foi adicionado 0,2 mL de reagente B. Após 10 minutos de repouso adicionou-se 6 mL de solução diluída de Folin-Ciocalteu [1:15 (v:v)], os tubos foram incubados a 50°C por 10 minutos e após resfriamento em banho de gelo a absorbância foi mensurada a 660 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão preparada utilizando albumina sérica bovina.

O reagente A foi preparado pela dissolução de 2 g de tartarato de sódio e potássio e 100 g de Na₂CO₃ em 500 mL de NaOH 0,1 N, em seguida o volume foi completado para 1 L com água destilada.

O reagente B foi preparado pela dissolução de 5 g de CuSO₄.5H₂O e 10 g de tartarato de sódio e potássio em 50 mL de NaOH 1 N, em seguida o volume foi completado para 500 mL com água destilada.

III.2.2. Produção da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

A produção de MTGase foi realizada por fermentação submersa do micro-organismo *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em reator de bancada (New Brunswick Bioflow II), conforme as condições descritas no item II.2.2 do capítulo anterior. Após 42 horas de fermentação o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado como fonte de MTGase (preparação enzimática bruta de MTGase).

III.2.3. Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase

A preparação enzimática bruta de MTGase obtida por fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em reator em bancada foi utilizada para os ensaios de concentração da enzima através de liofilização, ultrafiltração, precipitação por adição de

sulfato de amônio, etanol e acetona e em tubos de diálise utilizando o adsorvente CM-celulose.

III.2.3.1. Concentração da MTGase por liofilização

Um volume de 100 mL da preparação enzimática bruta de MTGase foi congelada e concentrada em liofilizador (Liotop L101) durante 48 horas. A enzima liofilizada foi ressuspensa na concentração de 10 mg/mL em tampão citrato 0,2 M, pH 6,0 para a determinação da atividade enzimática e de proteínas totais.

III.2.3.2. Concentração da MTGase por ultrafiltração

Um volume de 100 mL da preparação enzimática bruta de MTGase foi submetida ao processo de ultrafiltração em tubos Centriplus YM-10, com membrana de retenção de 10 KDa. Neste processo, a preparação enzimática bruta foi fracionada em duas porções. A primeira foi definida como preparação enzimática concentrada por ultrafiltração (porção retida pela membrana) e a segunda, como preparação enzimática ultrafiltrada. Ambas as preparações enzimáticas foram congeladas, liofilizadas e ressuspensas, como descrito no item III.2.3.1, para a determinação da atividade enzimática e de proteínas totais.

III.2.3.3. Concentração da MTGase por adição de sulfato de amônio

Foi testada a concentração de 100 mL da preparação enzimática bruta de MTGase por adição de sulfato de amônio na concentração de 80% de saturação. Após 60 minutos da adição de sulfato de amônio a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 10.000 x g. O precipitado foi ressuspenso em quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 e dialisado contra água destilada por 24 horas e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 por mais 24 horas para a remoção do sal. Ao término da diálise, o extrato enzimático obtido foi congelado, liofilizado e ressuspensado, como

descrito no item III.2.3.1, para determinação da atividade enzimática e de proteínas totais.

III.2.3.4. Concentração da MTGase com solventes orgânicos acetona e etanol

Amostras de 100 mL da preparação enzimática bruta de MTGase foram adicionadas em volumes dos solventes orgânicos acetona e etanol resfriados a -10°C na proporção 1:2 (v:v). Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Os precipitados foram recolhidos e mantidos a 7°C por 12 horas para a evaporação dos solventes residuais. Os precipitados foram então congelados, liofilizados e ressuspensos, como descrito no item III.2.3.1, para determinação da atividade enzimática e de proteínas totais.

III.2.3.5. Concentração da MTGase em tubos de diálise utilizando adsorventes

Para a concentração da MTGase em tubos de diálise foi testado o polímero CM-celulose para adsorção de água, sais e compostos menores que 12 KDa. Um volume de 100 mL da preparação enzimática bruta de MTGase foi transferido para tubos de celulose para diálise, e estes últimos foram colocados em frascos béquer contendo o polímero por 14 horas a 4°C. Os conteúdos dos tubos de diálise foram posteriormente congelados, liofilizados e ressuspensos, como descrito no item III.2.3.1, para determinação da atividade enzimática e de proteínas totais.

III.2.4. Aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em proteína texturizada de soja

A preparação enzimática bruta de MTGase concentrada por adição de sulfato de amônio (80%), obtida através da fermentação da linhagem microbiana *Streptomyces* sp. CBMAI 837 conforme descrito por MACEDO *et al.* (2007), foi aplicada em proteína texturizada de soja, a fim de avaliar sua capacidade de reestruturar os grânulos de

proteína. Os resultados da reestruturação foram comparados com efeito da enzima comercial Activa[®] TG-BP (Ajinomoto Co) e com o controle, no qual houve a substituição da solução enzimática por água destilada.

Inicialmente, a proteína texturizada de soja foi hidratada na proporção proteína de soja:água destilada de 2:1 (m:v). Em amostras de 20 g de proteína de soja umedecida foram adicionadas alíquotas de 6 mL de solução de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 ou MTGase comercial, para obtenção de 0,5 U/g de amostra.

Em seguida, as amostras de proteína de soja foram homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro por 3 minutos, moldadas em cilindros (5 x 2 cm) e embaladas a vácuo em sacos plásticos. As amostras foram incubadas a 37°C por 90 minutos e em seguida armazenadas a 7°C por 15 horas. Após este período as embalagens foram abertas e a união dos grânulos de proteína de soja foi observada visualmente.

III.2.5. Purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

Foi testada a purificação da MTGase por precipitação com sulfato de amônio 80% de saturação, cromatografia de troca-iônica CM-celulose, filtração em gel Sephadex G-75 e de afinidade Blue Sepharose CL-6B.

III.2.5.1. Purificação parcial da MTGase em colunas de troca-iônica CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75

Uma alíquota de 500 mL da preparação enzimática bruta foi concentrada por precipitação com sulfato de amônio 80%, como descrito no item III.2.3.3.

Em seguida 19 mL de solução de MTGase concentrada (50 mg/mL) contendo 30,7 U/mL foi aplicada em coluna de CM-celulose (2,5 cm x 50 cm), contendo 200 cm³ de resina previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0. Após a lavagem da coluna com 300 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, foi realizada a

aplicação de gradiente linear salino (0 a 1 M de NaCl) no mesmo tampão. Frações de 3,5 mL foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações (Foxy 200, ISCO). O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade de MTGase foi determinada como descrito anteriormente. As frações eluídas contendo atividade de MTGase foram reunidas e armazenadas a -10°C.

Um volume de 5 mL da amostra parcialmente purificada na cromatografia de troca-iônica CM-celulose (6,5 U/mL) foi aplicado em coluna cromatográfica de filtração em gel Sephadex G-75 (1,1 cm x 95 cm), contendo 80 cm³ de resina previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0. As proteínas foram eluídas pela aplicação de 150 mL do mesmo tampão. Frações de 3 mL foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade de MTGase foi determinada como descrito anteriormente. As frações coletadas de n° 13 a 16 e de n° 18 a 26, contendo atividade de MTGase foram reunidas e denominadas TG-S1 e TG-S2, respectivamente. Em seguida, essas duas frações foram liofilizadas e armazenadas a -10°C.

As frações TG-S1 e TG-S2 foram novamente purificadas por filtração em coluna de Sephadex G-75. Amostras de 3,5 mL das soluções de TG-S1 e TG-S2 (32 mg/mL) foram aplicadas separadamente na coluna sob as mesmas condições descritas anteriormente. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade de MTGase foi determinada como descrito anteriormente. As frações coletadas contendo atividade de MTGase foram reunidas e armazenadas a -10°C.

III.2.5.2. Purificação da MTGase em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B

Aplicou-se 5 mL de solução 16 mg/mL da preparação enzimática concentrada com sulfato de amônio (9,1 U/mL), como descrito no item III.2.3.3, em coluna de Blue Sepharose CL-6B (1,5 cm x 28 cm), contendo 40 cm³ de resina previamente equilibrada

com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0. Após a lavagem da coluna com 120 mL de tampão foi realizada a aplicação de gradiente linear salino (0 a 1 M de NaCl) no mesmo tampão. Frações de 2 mL foram coletadas a cada 25 minutos. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade de MTGase foi determinada como descrito anteriormente. As frações coletadas de n° 18 a 28, n° 86 a 96 e n° 99 a 108 contendo atividade de MTGase foram reunidas e denominadas TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3, respectivamente. As frações TG-BS2 e TG-BS3 foram dialisadas e, posteriormente, todas as três frações foram armazenadas a -10°C.

III.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

A massa molecular das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 purificadas em coluna de Blue Sepharose foi avaliada por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida de 12%, de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

O gel de separação foi preparado em um béquer de 10 mL, misturando-se 3,4 mL de água destilada; 4 mL de solução Acrilamida/Bis (composta por 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida em 100 mL de água destilada); 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 0,1 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS); 10 µL de solução TEMED (tetra-metil-etileno-diamino) e 50 µL de solução 10% de persulfato de amônio (m:v).

O gel de empacotamento foi preparado em um béquer de 10 mL, misturando-se 6,1 mL de água destilada; 1,3 mL de solução Acrilamida/Bis (composta por 29,2 g de acrilamida e 0,8 g de N,N'-metileno-bis-acrilamida em 100 mL de água destilada); 2,5 mL de solução tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 0,1 mL de solução 10% de SDS, 10 µL de solução TEMED e 50 µL de solução 10% de persulfato de amônio.

O tampão da amostra foi preparado em um béquer de 10 mL, misturando-se 3,4 mL de água destilada; 1,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,6 mL de

glicerol; 1,6 mL de solução 10% de SDS; 0,4 mL de β -mercaptoetanol e uma pequena quantidade de azul de bromofenol.

O tampão de corrida foi preparado, em um béquer de 1.000 mL, misturando-se 15 g de Tris-base, 72 g de glicina e 5 g de SDS em 900 mL de água destilada. O volume foi completado para 1.000 mL com água destilada. Para o desenvolvimento da eletroforese o tampão foi diluído na proporção de 1:4 (tampão e água destilada, v:v).

O gel em placas foi preparado adicionando-se a solução do gel de separação com auxílio de seringa em placas de vidro previamente montadas com espaçadores. Em seguida, foi adicionado um pequeno volume de água destilada para nivelar o gel nas placas. Após a polimerização do gel, cerca de 30 minutos, foi feita a retirada da água com auxílio de papel filtro, a aplicação da solução do gel de empacotamento sobre o gel de polimerização e a inserção do pente para a formação de canaletas. Depois da polimerização do gel, as placas foram acopladas ao eletrodo e em seguida adicionado o tampão de corrida.

As amostras foram aplicadas nas canaletas na parte superior do gel em quantidades aproximadas de 15 μ L com auxílio de uma microseringa de 50 μ L. A cuba para eletroforese vertical foi então conectada a fonte e a corrida realizada com correntes de 120V durante aproximadamente 2 horas.

Após o desenvolvimento da corrida o gel foi mantido durante 12 horas em solução corante de Coomassie Blue, composto de 0,1 g de Coomassie Brilhante G-250; 10 mL de ácido acético; 40 mL de metanol e 50 mL de água destilada. O gel, posteriormente, foi descorado por meio de lavagens sucessivas em solução preparada com ácido acético, metanol e água destilada na proporção 1:4:5 (v:v:v).

A massa molecular das frações de MTGase foi estimada pela utilização de mistura de padrões de baixa massa molecular (Bio-Rad 161-0304), contendo fosforilase B (97,4 KDa), albumina sérica (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa) e lisozima (14,4 KDa).

III.2.7. Determinação do pH ótimo de atividade da MTGase purificada em Blue Sepharose CL-6B

As três frações contendo atividade de MTGase obtidas na purificação da preparação enzimática bruta concentrada em coluna de Blue Sepharose CL-6B (TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3), foram caracterizadas quanto ao pH ótimo de atividade. O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado como descrito no item II.2.4, em valores de pH entre 3,0 e 10,0. Para os valores de pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 6,5 foi utilizado tampão citrato 50 mM, para os valores de pH entre 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0 utilizou-se tampão Tris-HCl 50 mM e para o pH 10,0 foi utilizado o tampão Borax-NaOH 50 mM. A atividade relativa da enzima em diferentes valores de pH foi calculada considerando-se a atividade máxima como 100%.

III.3. Resultados e discussão

III.3.1. Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase

A Tabela III.1 ilustra os resultados obtidos nos ensaios de concentração da preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 através dos métodos de liofilização, ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e com solventes orgânicos (etanol e acetona) e em tubos de diálise utilizando CM-celulose.

Tabela III. 1 - Concentração da preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por diferentes métodos

Preparações enzimáticas	Massa após liofilização (g)	U total de MTGase	Proteínas totais (mg)	Atividade específica (U/mg)	Concentração (n° de vezes)	Rendimento (%)
Bruta (100 mL)	-	63	320	0,19	1	100
Bruta liofilizada	1,342	55,5	316	0,17	0,9	88
Precipitada por sulfato de amônio	0,377	89,5	102,3	0,87	4,5	142
Precipitada por acetona	0,624	45,6	139,4	0,32	1,7	72
Precipitada por etanol	0,380	54,8	81,1	0,67	3,5	87
Concentrada em tubos de diálise com CM-celulose	0,992	36,7	246,3	0,15	0,8	58
Concentrada por ultrafiltração	1,208	50	284,4	0,17	0,9	79
Ultrafiltrada	0,127	0	73,6	0	0	0

Foi observado para a preparação enzimática bruta de MTGase liofilizada uma atividade enzimática total de 55,5 U, correspondendo a uma atividade específica de 0,17 U/mg de proteína, com recuperação de 88% da atividade inicial de MTGase.

MACEDO (2009) testou a concentração do sobrenadante da fermentação de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 através da precipitação fracionada por sulfato de amônio a 40, 60 e 80% de saturação. Foi observado que todas as frações proteicas precipitadas apresentaram atividade de transglutaminase e que a precipitação fracionada das proteínas não se mostrou um bom método para concentração da MTGase.

A preparação enzimática concentrada por precipitação com sulfato de amônio 80% de saturação apresentou valores de atividade enzimática total e específica de 89,5 U e 0,87 U/mg de proteína, respectivamente. Neste caso, observou-se um fator de concentração de 4,5 vezes e rendimento de 142% em relação ao valor inicial de atividade de MTGase. O aumento da atividade de transglutaminase e do rendimento pode ser devido a remoção de compostos inibidores da atividade da enzima.

As preparações enzimáticas concentradas por precipitação com acetona e etanol também apresentaram aumento da atividade enzimática e específica de MTGase. Foi constatada a concentração em 1,7 e 3,5 vezes com 72 e 87% de recuperação da atividade enzimática inicial para os métodos de precipitação por adição de acetona e etanol, respectivamente.

O método de concentração utilizando tubos de diálise e CM-celulose para a remoção de água e compostos de baixa massa molecular apresentou atividade específica de 0,15 U/mg e recuperação de apenas 58% do valor inicial de atividade de MTGase.

No processo de concentração da MTGase por ultrafiltração a preparação enzimática bruta foi fracionada em duas porções (ultrafiltrada e concentrada por ultrafiltração). Não foi observada atividade de MTGase na fração ultrafiltrada. A preparação enzimática concentrada por ultrafiltração apresentou atividade total de MTGase de 50 U, correspondendo a uma atividade específica de 0,17 U/mg de proteína. Para esta preparação enzimática houve a recuperação de 79% da atividade de MTGase inicial.

No estudo da purificação da MTGase de *Streptovercillium ladakanum*, TSAI *et al.* (1996) concentraram o sobrenadante do meio de cultivo cerca de 1,8 vezes por precipitação fracionada com 55 e 75% de sulfato de amônio com rendimento de 74,2%.

SOAREZ *et al.* (2003) concentraram o sobrenadante do meio de cultivo de *Bacillus circulans* contendo atividade de MTGase cerca de 14 vezes através da adição fracionada de sulfato de amônio (60 e 90% de saturação) seguido de diálise em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, com recuperação de 88% da atividade inicial.

UMEZAWA *et al.* (2002) relataram que o sobrenadante de cultivo da fermentação de *Streptomyces libani* com atividade específica de 0,36 U/mg de proteína para MTGase foi concentrado pela adição fracionada de sulfato de amônio a 40 e 70% de saturação. A preparação enzimática concentrada obtida teve a atividade específica aumentada para 0,49 U/mg de proteína, representando um fator de concentração de 1,3 vezes, com rendimento de 96%.

LIN *et al.* (2008) ao estudarem a purificação da MTGase de *Streptomyces platensis* realizaram a concentração do sobrenadante de cultivo por ultrafiltração em membrana de 10 KDa seguido de precipitação pela adição fracionada de sulfato de amônio a 20 e 50% de saturação antes das etapas cromatográficas. Verificou-se que a MTGase foi concentrada 1,8 vezes com rendimento de 95% pelo método de ultrafiltração e 2,5 vezes com rendimento de 88% na etapa de concentração por precipitação com sulfato de amônio.

ANDO *et al.* (1989) estudaram a produção e purificação da MTGase de *Streptoverticillium* S-8112. Durante a etapa de concentração do sobrenadante de cultivo foi utilizado o método de ultrafiltração em membrana AIL 1010. Os autores observaram que a enzima foi concentrada 4,7 vezes com recuperação de 92% da atividade inicial.

CUI *et al.* (2007) concentraram a preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* através da precipitação por adição de etanol na concentração de 70% (v:v). A preparação enzimática obtida apresentou atividade específica de 0,58 U/mg de proteína, correspondendo a um fator de purificação de 2 vezes, com recuperação de 85% da atividade inicial.

Os resultados obtidos nos ensaios de concentração da preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (Tabela III.1) indicam que o melhor método para a concentração da enzima foi a precipitação por adição direta de sulfato de amônio a 80% de saturação. Além do fato de fornecer os melhores resultados de concentração e rendimento, este método também permite a obtenção de uma preparação enzimática bruta concentrada com baixo custo, sem a geração de resíduos de solventes

orgânicos e que pode ser aplicada em processos industriais que não exijam a utilização da enzima purificada.

III.3.2. Aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em proteína texturizada de soja

De acordo com MOTOKI e SEGURO (1998) as proteínas presentes na soja são excelentes substratos para reação da MTGase. As MTGases podem ser aplicadas em produtos a base de soja, como o tofu, para melhorar a textura, resistência, estabilidade térmica e a capacidade de gelatinização (KURAISHI *et al.* , 2001). Outras aplicações da MTGase em proteínas de soja incluem a formação de biopolímeros utilizados na fabricação de salsichas visando a redução do teor de fosfato e melhora da textura (MUGURUMA *et al.*, 2003) e a elaboração de filmes comestíveis (SU *et al.*, 2007).

A Figura III.1 ilustra a aplicação das MTGases comercial e de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 na reestruturação dos grânulos de proteína texturizada de soja, como descrito no item III.2.4.

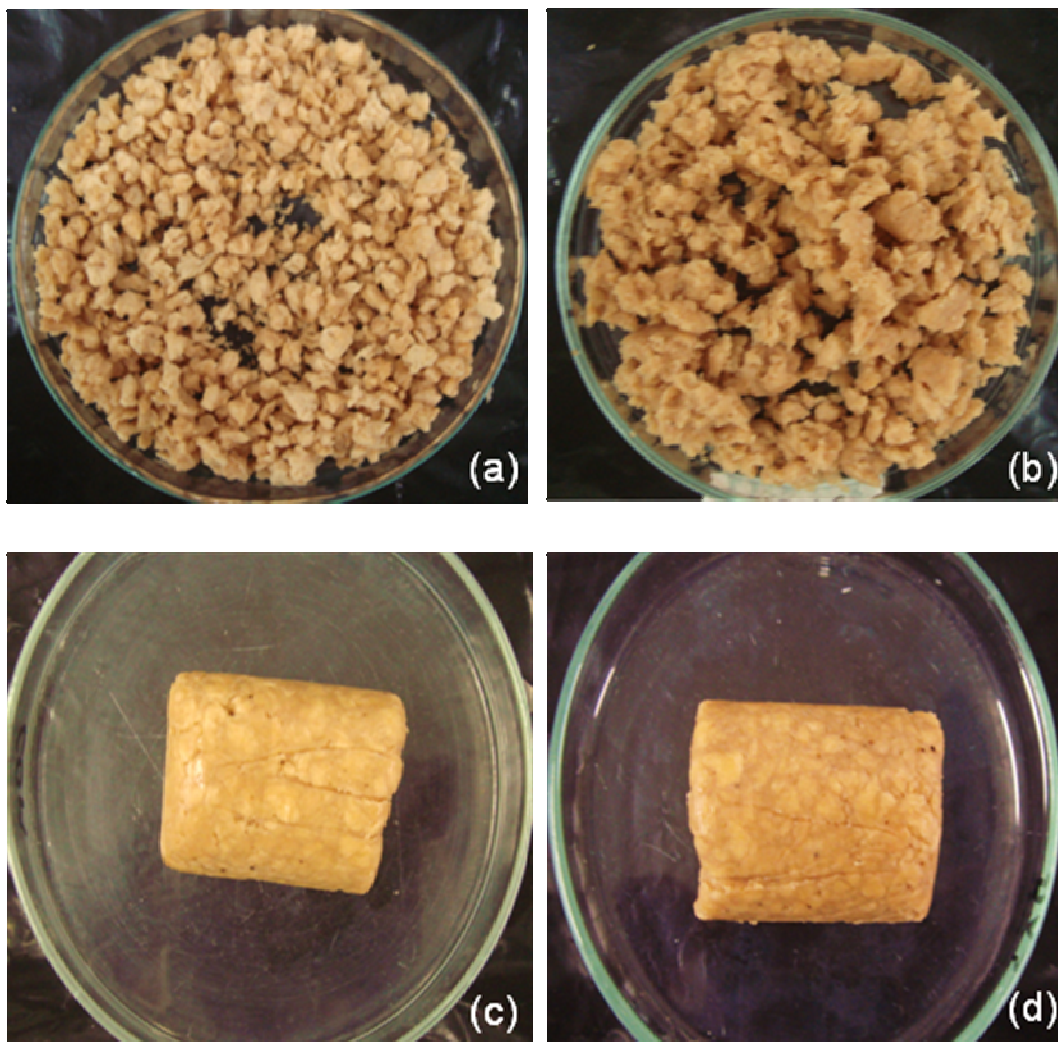


Figura III. 1 - Aplicação da MTGase na reestruturação de proteína texturizada de soja
(a) proteína texturizada de soja hidratada (b) Controle; (c) Tratamento com enzima comercial Activa[®] TG-BP (0,5 U/g); (d) Tratamento com MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 (0,5 U/g)

Foi observado que o controle (sem adição de enzima) se desfez facilmente após a abertura da embalagem plástica demonstrando que não ocorreu a formação da ligação cruzada entre os resíduos de glutamina e lisina dos grânulos de proteína de soja. Para as amostras tratadas tanto com MTGase comercial como a de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi observada a união dos grânulos de proteína de soja de modo a formar uma

estrutura compacta e que se desfez somente quando pressionada fortemente com bastão de vidro.

NONAKA *et al.* (1989) e DE JONG *et al.* (2001) também avaliaram visualmente a ação da transglutaminase microbiana em proteínas de soja. Foi observado que a adição da enzima possibilitava a rápida formação de um gel firme a partir de soluções proteicas contendo globulinas de soja, indicando especificidade da enzima para este tipo de substrato.

III.3.3. Purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

III.3.3.1. Purificação parcial da MTGase em colunas de troca-iônica CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75

A Figura III.2 ilustra a purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de CM-celulose previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0. Foi detectado através da absorbância a 280 nm apenas um pico de proteínas, sendo este eluído da coluna com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, antes do início do gradiente salino de NaCl. As frações coletadas contendo atividade de MTGase foram observadas apenas na região deste pico de proteína, indicando que não houve interação da enzima com a resina.

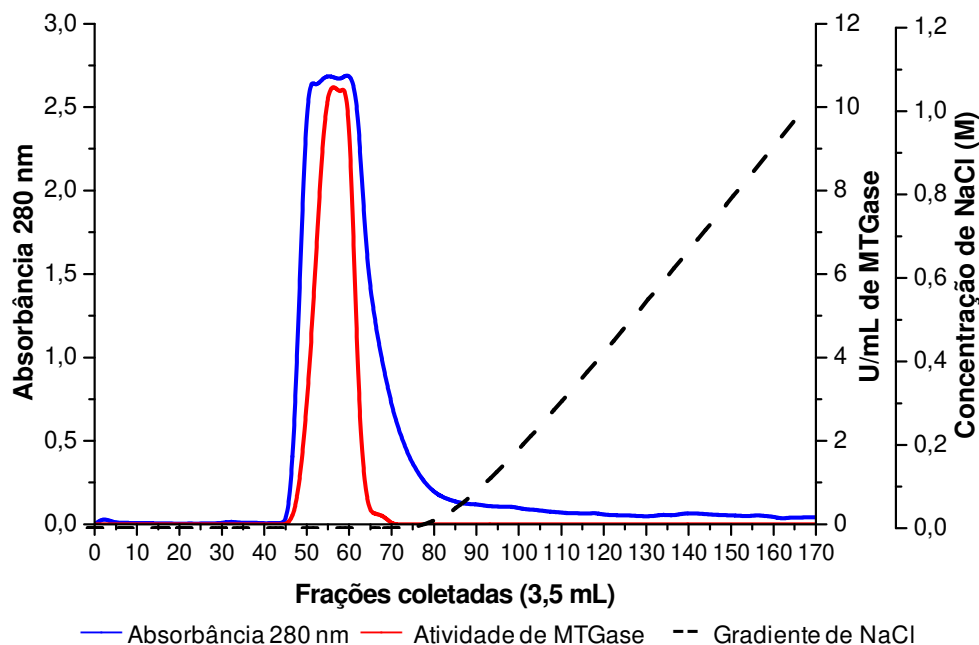


Figura III. 2 - Purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de CM-celulose

Também foi testada a purificação da MTGase em coluna de CM-Sepharose CL-6B equilibrada com tampão citrato 50 mM, pH 6,5. Os resultados obtidos (dados não apresentados) não diferiram dos observados para a purificação em coluna de CM-celulose equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0.

As frações coletadas contendo atividade de MTGase na etapa de purificação em CM-celulose foram reunidas e aplicadas em coluna de filtração em gel Sephadex G-75 previamente equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, conforme descrito no item III.2.5.1.

A Figura III.3 ilustra a purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0.

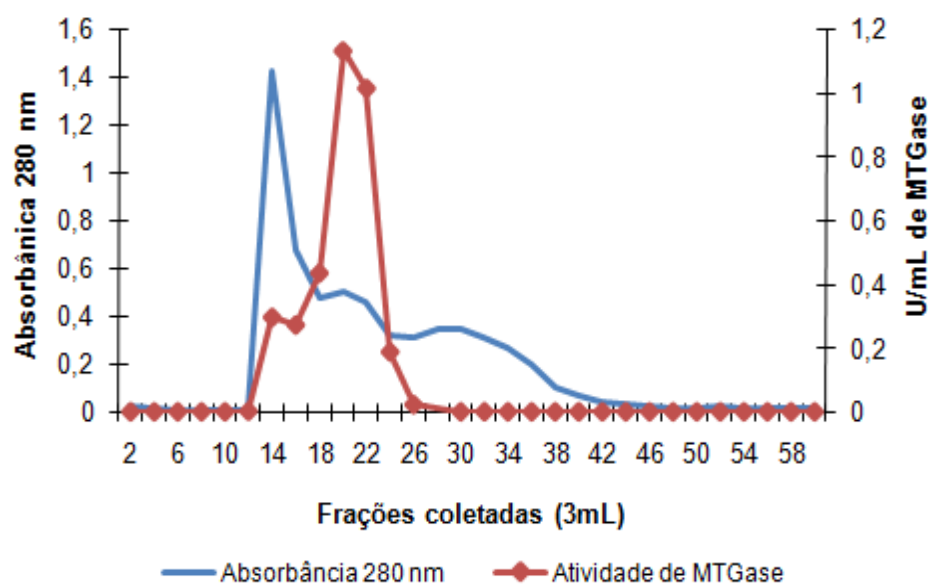


Figura III. 3 - Purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de Sephadex G-75

Verificou-se uma separação parcial da MTGase de outras proteínas e impurezas existentes na amostra aplicada na coluna. Observou-se também através do perfil assimétrico do pico de eluição da MTGase a possível presença de isoformas da enzima.

MACEDO *et al.* (2010) e BAGAGLI (2009) ao realizarem a caracterização bioquímica da MTGase bruta (sobrenadante de cultivo) de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 relataram a possível presença de isoformas da enzima.

As frações n° 13 a 16 e n° 18 a 26 reunidas e denominadas TG-S1 e TG-S2 apresentaram ao final desta etapa atividade específica de 0,3 e 0,59 U/mg de proteína, respectivamente.

As Figuras III.4a e III.4b ilustram, respectivamente, o perfil de eluição das proteínas e da MTGase das frações TG-S1 e TG-S2 em coluna Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0. Observou-se que o perfil de eluição da MTGase das frações TG-S1 e TG-S2 foram diferentes indicando a possível presença de duas isoenzimas.

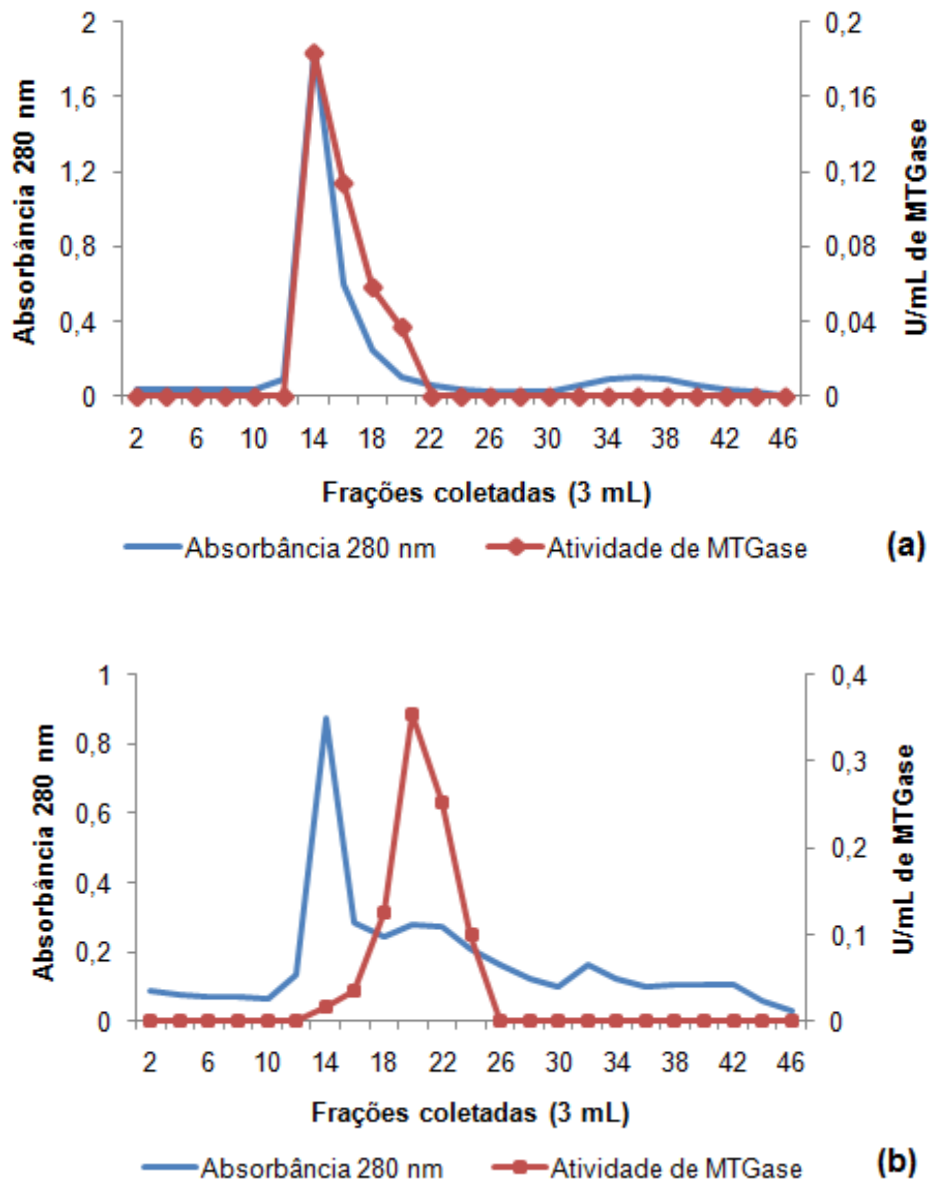


Figura III. 4 - Purificação da MTGase das frações TG-S1 e TG-S2 de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de Sephadex G-75
(a) amostra TG-S1; (b) amostra TG-S2

A Tabela III.2 descreve os resultados obtidos na purificação da MTGase por precipitação com sulfato de amônio 80% e colunas de CM-celulose e Sephadex G-75 equilibradas com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0.

Observou-se que a MTGase do sobrenadante do meio de cultivo de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi concentrada 3,4 vezes com recuperação de 184% da atividade inicial através da precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação, diferindo um pouco dos valores obtidos anteriormente na Tabela III.1. Verificou-se também que a MTGase foi purificada 4,7 vezes em coluna de CM-celulose com recuperação de 93% da atividade inicial.

Tabela III. 2 - Purificação da MTGase *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por precipitação com sulfato de amônio 80% e cromatografia em colunas de CM-celulose e Sephadex G-75

Etapas da purificação	Volume total (mL)	U total de MTGase	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Preparação enzimática bruta	500	317	1600	0,19	1	100
Preparação enzimática concentrada por sulfato de amônio (50 mg/mL)	19	583,87	897,1	0,65	3,4	184
CM-celulose	45	296	324	0,91	4,7	93
TG-S1 (1ª corrida em Sephadex G-75)	24,5	19,50	64,3	0,30	1,5	6,1
TG-S2 (1ª corrida em Sephadex G-75)	36,4	52,78	89,9	0,59	3,1	16,6
TG-S1 (2ª corrida em Sephadex G-75)	126	13,86	69,3	0,20	1	4,3
TG-S2 (2ª corrida em Sephadex G-75)	300	48	72	0,66	3,4	15

Ao final da segunda corrida cromatográfica das frações TG-S1 e TG-S2 em coluna Sephadex G-75, as amostras apresentaram atividade específica iguais a 0,2 e 0,66 U/mg de proteína, respectivamente. Apesar da possível separação de duas isoformas da MTGase, através da estratégia de purificação em colunas de CM-celulose

e Sephadex G-75, não foi dada continuidade ao estudo das amostras TG-S1 e TG-S2, pois os resultados obtidos não foram satisfatórios devido a elevada perda de atividade enzimática durante o processo e os baixos fatores de purificação.

Outros estudos de purificação de MTGase microbiana utilizando-se colunas de CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75 apresentaram melhores resultados do que os obtidos neste trabalho.

CUI *et al.* (2007) relataram a purificação da MTGase produzida por *Streptomyces hygroscopicus* através da concentração por precipitação por etanol e purificação em colunas de troca iônica CM-celulose equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 6,0, e de filtração em gel em Sephadex G-75 equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 6,5. Foi relatado que muitas das impurezas foram removidas durante a etapa em coluna de troca-iônica contribuindo para o aumento da atividade específica em 25 vezes em relação a atividade do sobrenadante de cultivo. A MTGase obtida ao final da cromatografia em filtração em gel apresentou um fator de purificação de 30 vezes com rendimento de cerca de 21%.

LU *et al.* (2003) estudaram a purificação da MTGase de *Streptoverticillium mobaraense* através de cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 6,5, seguida de uma etapa de filtração em gel em coluna de Sephadex G-75 equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH6,0. Na etapa de purificação em CM-celulose foi observado um fator de purificação de 4,4 vezes com rendimento de 82,3%. Para a etapa de purificação em Sephadex G-75 foi constatada a recuperação de 60% da atividade enzimática e o aumento da atividade específica em 1,3 vezes em relação à etapa anterior em CM-celulose.

MACEDO (2009) relatou a purificação em cinco vezes da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 após duas etapas cromatográficas consecutivas em coluna de filtração em gel Sephadex G-75 com rendimento de 17,7% e atividade específica de 4,18 U/mg de proteína.

III.3.3.2. Purificação da MTGase em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B

Devido à aparente falta de interação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 com resina de troca-iônica e os baixos valores de purificação e rendimento obtidos em resina de filtração em gel, foi testada a purificação da preparação enzimática concentrada por sulfato de amônio (80% de saturação) através de cromatografia em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B.

O mecanismo de separação envolvido na cromatografia de afinidade é a afinidade biológica. Esta técnica tem como característica a alta especificidade permitindo a purificação de proteínas em apenas uma etapa, sendo o seu uso recomendado após a remoção ou redução dos contaminantes por métodos mais baratos (PESSOA JUNIOR e KILIKIAN, 2005).

A Figura III.5 ilustra a purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B. Nesta resina o ligante é o corante Cibacron Blue e a separação pode ocorrer devido à combinação bioespecífica da proteína com o corante, devido à similaridade estrutural com um cofator enzimático, ou de forma menos específica devido às interações eletrostáticas ou hidrofóbicas com o ligante.

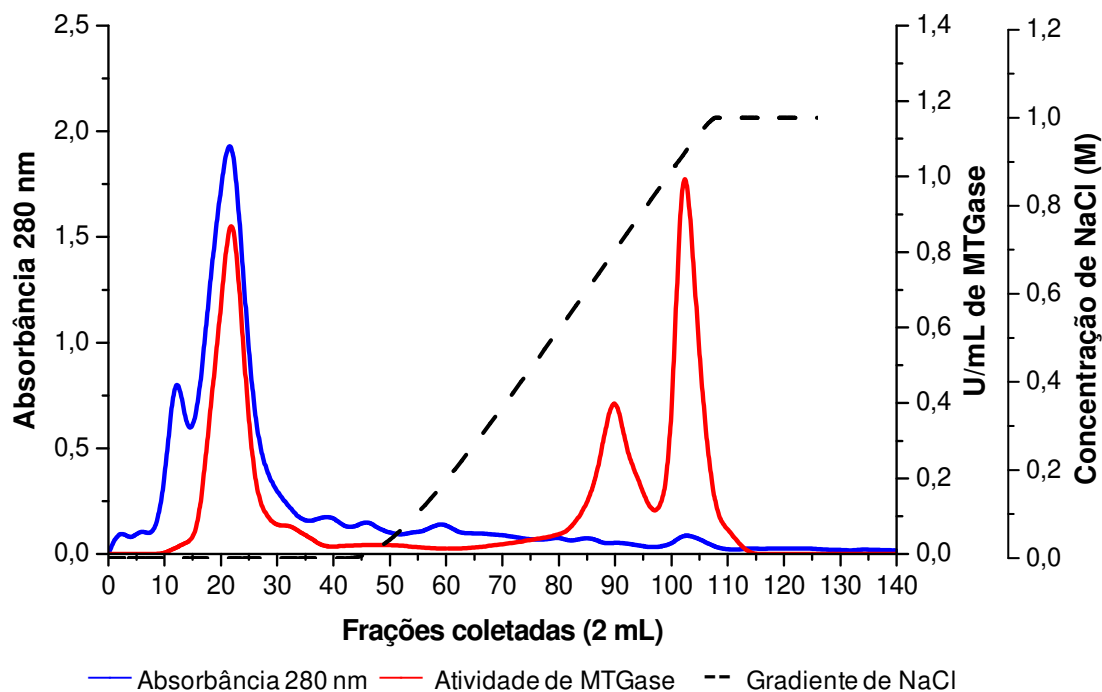


Figura III. 5 - Purificação da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de Blue Sepharose CL-6B

Foram detectados três frações com atividade de MTGase indicando a presença de 3 isoformas da enzima. A primeira fração (TG-BS1) foi eluída junto com o pico majoritário de proteínas durante a lavagem da coluna com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0 enquanto as outras duas frações (TG-BS2 e TG-BS3) foram eluídas da coluna durante a aplicação do gradiente linear salino de NaCl em tampão.

A Tabela III.3 descreve os resultados obtidos na purificação da MTGase por precipitação com sulfato de amônio 80% e coluna de Blue Sepharose CL-6B equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 8,0.

Verificou-se na etapa de concentração da preparação enzimática bruta por adição de sulfato de amônio que a MTGase foi concentrada cerca de 5,9 vezes com rendimento de 240%, sendo estes valores superiores aqueles obtidos anteriormente na Tabela III.1.

Estas diferenças obtidas nos fatores de concentração e rendimento são conseqüências da variação do método de precipitação por sulfato de amônio.

Foi observado para a fração TG-BS1 baixa atividade específica (0,34 U/mg de proteína) com rendimento de 37% em relação a atividade inicial de MTGase. Após diálise durante 24 horas em tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, as frações TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram valores de atividade específica e rendimentos de 2,17 U/mg de proteína e 9,2% e 3,3 U/mg de proteína e 18,4%, respectivamente.

Tabela III. 3 - Purificação da MTGase *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por precipitação com sulfato de amônio 80% e cromatografia em coluna de Blue Sepharose CL-6B

Etapas da purificação	Volume total (mL)	U total de MTGase	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Preparação enzimática bruta	30	19,02	96	0,19	1	100
Preparação enzimática concentrada por sulfato de amônio (16 mg/mL)	5	45,80	40,5	1,13	5,9	240
TG-BS1	22	7,04	20,46	0,34	1,7	37
TG-BS2	22	1,76	0,81	2,17	11,4	9,2
TG-BS3	20	3,50	1,06	3,30	17,3	18,4

Na literatura são apresentados vários trabalhos utilizando a resina de afinidade Blue Sepharose para a purificação da transglutaminase, principalmente após uma etapa de purificação em resinas de troca iônica.

TSAI *et al.* (1996) também purificaram a MTGase de *Streptomyces ladakanum* utilizando a concentração do sobrenadante de cultivo por precipitação com sulfato de amônio e uma etapa em coluna cromatográfica de Blue Sepharose Fast Flow. Foi observado que a MTGase apresentou forte interação com a resina sendo eluída da

coluna com 1 M de NaCl em tampão fosfato 5 mM, pH 7,5. A MTGase foi purificada por este processo cerca de 26 vezes com recuperação de 63% da atividade inicial do sobrenadante de cultivo.

HO *et al.* (2000) estudaram a purificação da MTGase de *Streptoverticillium ladakanum* utilizando colunas cromatográficas de CM-Sepharose CL-6B equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,5, e Blue Sepharose Fast Flow equilibrada com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 e compararam os métodos de eluição por gradiente linear e por gradiente não linear de NaCl em tampão. Foi verificado que a etapa de purificação em Blue Sepharose foi eficiente na separação da MTGase, promovendo o aumento da atividade específica. A MTGase de *Streptoverticillium ladakanum* foi purificada cerca de 14 vezes tanto pelo método de eluição por gradiente linear como pelo método de gradiente não linear. A taxa de recuperação da enzima através dos métodos de eluição por gradiente linear e não linear foram de 68,4% e 81%, respectivamente.

LIN *et al.* (2008) purificaram a MTGase recombinante de *Streptomyces platensis* produzida por *Streptomyces lividans* utilizando colunas cromatográficas de CM-Sepharose CL-6B Fast Flow e Blue Sepharose Fast Flow e obtiveram um fator de purificação de 32 vezes com rendimento de 65%.

ANDO *et al.* (1989) relataram a purificação da MTGase de *Streptoverticillium* S-8112 através de cromatografia de troca iônica Amberlite CG-50 e de afinidade em Blue Sepharose. A enzima foi purificada 174 vezes com recuperação de 42% da atividade inicial.

A Figura III.6 ilustra a eletroforese em SDS-PAGE das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 obtidas após purificação em coluna de Blue Sepharose CL-6B.

Foi observado para a fração TG-BS1 (linha 2) a presença de uma banda de proteína mais intensa além de outras mais fracas, indicando que a MTGase deste pico ainda não estava purificada. Para as frações TG-BS2 (linha 3) e TG-BS3 (linha 4) foram

observados apenas uma única banda de proteína, indicando que estas MTGases foram purificadas até a homogeneidade eletroforética. Verificou-se ainda que as frações TG-BS2 e TG-BS3 de MTGase apresentaram o mesmo padrão de migração eletroforética, indicando que as isoformas apresentam mesma massa molecular.

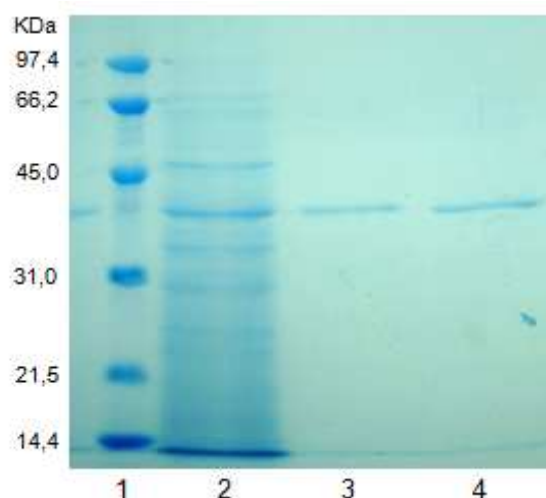


Figura III. 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837
(1) padrões de baixa massa molecular; (2) TG-BS1; (3) TG-BS2; (4) TG-BS3

A massa molecular da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 presente nas frações TG-BS2 e TG-BS3 obtidas durante esta etapa de purificação foram estimadas em 35 KDa através da relação gráfica R_f (fator de retenção) x log da massa molecular dos padrões de proteínas utilizados na eletroforese, conforme ilustrado na Figura III.7. No entanto MACEDO (2009) em estudo anterior estimou a massa molecular da MTGase purificada de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 em coluna de filtração em gel Sephadex G-75 em torno de 45 KDa por SDS-PAGE.

Muitas transglutaminases de origem microbiana descritas na literatura apresentaram massa molecular próximas ao estimado para a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. As massas moleculares das MTGases purificadas de

Streptoverticillium S-8112 (ANDO *et al.*; 1989), *Streptomyces hygroscopicus* (CUI *et al.*; 2007), *Streptoverticillium ladakanum* (TSAI *et al.*, 1996), *Streptomyces libani* (UMEZAWA *et al.*, 2002) e *Streptomyces platensis* (LIN *et al.*, 2008) foram estimadas por SDS-PAGE entre 35 e 40 KDa. As transglutaminases de origem animal apresentam maior valor de massa molecular tal como a enzima do fígado de porquinhos da índia que apresenta massa molecular estimada em 90 KDa (FOLK e COLE, 1966).

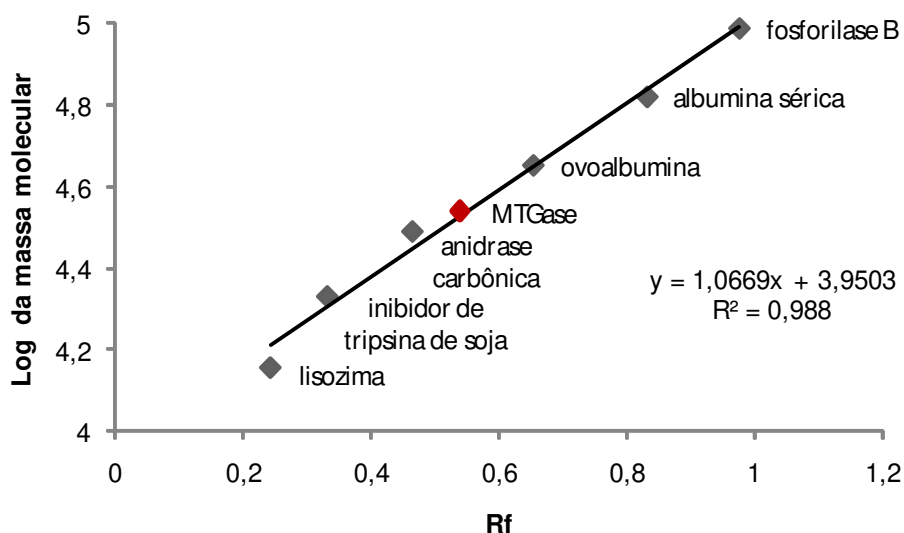


Figura III. 7 - Relação entre o Rf e o log da massa molecular dos padrões de proteínas para determinação da massa molecular das MTGases purificadas de *Streptomyces* sp. CBMAI 837

III.3.4. Caracterização da MTGase purificada em Blue Sepharose CL-6B

A Figura III.8 ilustra o pH ótimo de atividade das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 obtidas após purificação em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B.

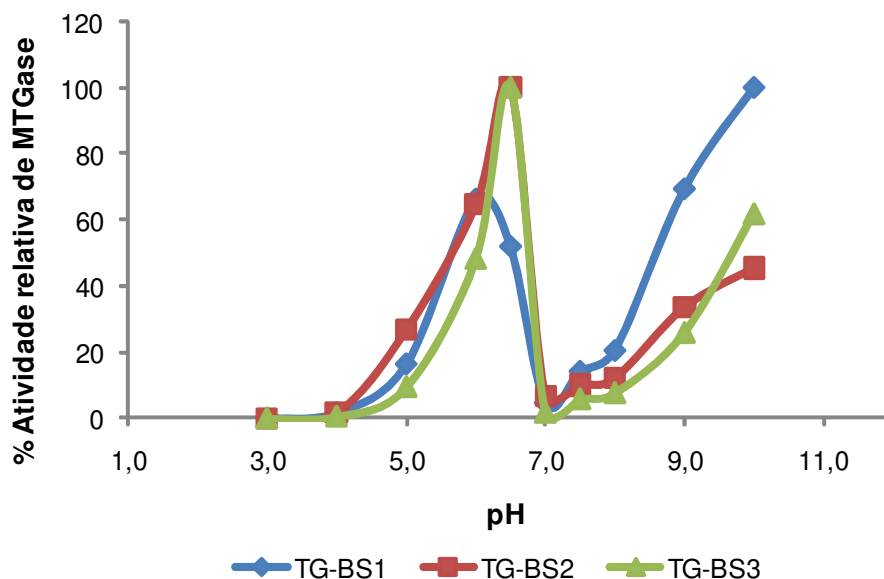


Figura III. 8 - pH ótimo de atividade das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 obtidas após purificação em Blue Sepharose CL-6B

Observou-se diferença quanto ao perfil de pH ótimo de atividade da fração TG-BS1 em relação às frações TG-BS2 e TG-BS3. A fração TG-BS1 apresentou atividade ótima (100% de atividade relativa) em pH 10,0 e um segundo pico de atividade (66%) em pH 6,0. As frações TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram atividade ótima (100% de atividade relativa) em pH 6,5 e também atividade em pH 10,0 (cerca de 45 e 61% de atividade relativa, respectivamente).

MACEDO *et al.* (2010) ao realizarem a caracterização bioquímica da preparação enzimática bruta de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 e da transglutaminase comercial Activa® TG-BP (Ajinomoto Co.) observaram que as duas preparações enzimáticas apresentaram atividade ótima em pH entre 6,0 – 6,5 e um segundo máximo de atividade em pH 10,0. BAGAGLI (2009) também verificou que a MTGase bruta (sobrenadante de cultivo) de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 apresentou atividade ótima em pH 6,5 e também um segundo pico de atividade em pH 9,0.

Este teste foi repetido três vezes para avaliar possíveis erros de análise e também foi verificado o possível desenvolvimento de coloração devido a degradação do substrato em pH alcalino, porém não foram observadas alterações quanto ao perfil de atividade enzimática. Assim, são necessários estudos posteriores para avaliar melhor este comportamento da atividade enzimática destas frações de MTGase.

Na maioria dos relatos existentes na literatura a atividade ótima é apresentada na faixa de pH entre 6,0 a 6,5, como observado para as MTGases de *Streptoverticillium* S-8112 (ANDO *et al.*, 1989), *Streptomyces hygroscopicus* (CUI *et al.*, 2007) e *Streptomyces platensis* (LIN *et al.*, 2008). As MTGases de alguns micro-organismos apresentam atividade ótima em pH 8,0, como *Actinomadura* sp. T-2 (KIM *et al.*, 2000), *Bacillus circulans* (SOAREZ *et al.*, 2003) e *Streptomyces platensis* YK-2 (YEO *et al.*, 2009), enquanto que a MTGase de *Streptomyces platensis* (BECH *et al.*, 2000) apresenta atividade ótima em pH 9,0.

Os resultados obtidos para pH ótimo de atividade indicam que a fração TG-BS1 pode ser uma isoforma da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 que apresenta atividade ótima em pH mais alcalino. Porém mais experimentos são necessários, pois as impurezas ainda existentes nesta fração, conforme verificado pela eletroforese (Figura III.6), podem ter influenciado os resultados.

Não foram encontrados na literatura relatos sobre a presença de isoenzimas nas preparações de transglutaminases produzidas por diferentes micro-organismos durante as etapas de purificação.

SUZUKI *et al.* (2000) realizaram a purificação e caracterização da MTGase extraída de esporos de *Bacillus subtilis*. A purificação da enzima foi realizada através das colunas cromatográficas de interação hidrofóbica Fenil Sepharose, filtração em gel Sephacril S200 e troca iônica Mono-Q. A preparação enzimática de MTGase foi separada durante a cromatografia em Fenil Sepharose em duas amostras (dois picos). Foi observado nas cromatografias em Sephacril S200 e Mono-Q, na caracterização bioquímica, na determinação da sequência N-terminal e na eletroforese as mesmas

características para as duas amostras. Os autores concluíram que a MTGase presente nas duas amostras se tratavam da mesma enzima e que a diferença no tempo de eluição na resina de Fenil Sepharose pode ter ocorrido devido a problemas na realização do gradiente linear salino e não devido a diferenças na hidrofobicidade das duas amostras.

Assim, é necessário estudar outras características bioquímicas e moleculares das frações TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3, otimizar as condições de purificação em coluna de Blue Sepharose CL-6B para aumentar a recuperação da enzima e em outras colunas cromatográficas para aumentar a eficiência de purificação.

III.4. Conclusões

Dentre os métodos testados para a concentração da MTGase de *Streptomyces sp.* CBMAI 837 a precipitação por adição de sulfato de amônio a 80% de saturação foi o método mais eficiente, no qual a enzima foi concentrada 4,5 vezes com rendimento superior a 140%. A precipitação por adição de etanol e acetona na proporção de 1:2 (v:v) também permitiram a remoção de proteínas com função não catalítica e outras impurezas do meio de cultivo, sendo verificados fatores de purificação e rendimentos de 3,5 e 87% e 1,7 e 72%, respectivamente.

No estudo da aplicação da MTGase, a preparação enzimática bruta concentrada de MTGase de *Streptomyces sp.* CBMAI 837, obtida por precipitação do sobrenadante de cultivo com sulfato de amônio a 80% de saturação, na concentração 0,5 U/g promoveu a reestruturação dos grânulos de proteína texturizada de soja de forma similar a enzima comercial.

A purificação da MTGase utilizando precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e colunas de troca iônica CM-celulose e de filtração em gel Sephadex G-75 não possibilitou a purificação da enzima, sendo observado fatores de purificação de 1 e 3,4 para as frações TG-S1 e TG-S2, respectivamente, e baixa recuperação da atividade enzimática.

Na purificação da MTGase por precipitação com sulfato de amônio 80% de saturação e cromatografia em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B foram obtidas 3 frações com atividade de MTGase, indicando a presença de 3 isoenzimas. As frações separadas, denominadas de TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram os seguintes fatores de purificação e rendimentos 1,7 e 37%; 11,4 e 9,2% e 17,3 e 18,4%, respectivamente.

As frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 de MTGase apresentaram massa molecular estimada em cerca de 35 KDa por SDS-PAGE.

A fração parcialmente purificada TG-BS1 apresentou atividade ótima (100% de atividade relativa) em pH 10,0 e também um segundo pico com 66% de atividade relativa em pH 6,0. As frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 apresentaram atividade ótima (100% de atividade relativa) em pH 6,5 e também um segundo pico de atividade (respectivamente, 45 e 61% de atividade relativa) em pH 10,0.

III. 5. Referências Bibliográficas

ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2613-2617, 1989.

BAGAGLI, M. P. Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, caracterização e aplicação da enzima bruta. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 113 p, 2009.

BECH, L.; NORREVANG, I. A.; HALKIER, T.; RASMUSSEN, G.; SCHAFER, T.; ANDERSEN, J. T. Microbial transglutaminases, their production and use. **United States Patent US6100053**, 2000.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. 1^a ed., Editora Interciência, 506 p, 2008.

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D.; LIU, H.; CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 612-618, 2007.

DE JONG, G. A. H.; WIJNGAARDS, G.; BOUMANS, H.; KOPPELMAN, S. J.; HESSING, M. Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 3389-3393, 2001.

FLEURI, L. F. β -1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 213 p, 2006.

FOLK, J. E. Transglutaminases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 517-521, 1980.

FOLK, J. E.; COLE, P. W. Mechanism of action of pig liver transglutaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 5518-5525, 1966.

GERBER, U.; JUCKNISCHKE, U.; PUTZIEN, S.; FUCHSBAUER, H. L. A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 825-829, 1994.

GROSSOWICZ, N.; WAINFAN, E.; BOREK, E.; WAELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids glutamine and asparagines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 187, p. 111-125, 1950.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry methods that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HERRERA, J. H.; IRANZO, M. ELORZA, M. V.; SENTANDREU, R.; MORMENEO, S. Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-link in the cell wall of *Candida albicans*. **Archives of Microbiology**, v. 164, p. 186-193, 1995.

HO, M. -L.; LEU, S. -Z.; HSIEH, J. -F.; JIANG, S. T. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptoverticillium ladakanum*. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 76-80, 2000.

KIM, H.; JUNG, S.; LEE, I.; YU, T. Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 187-194, 2000.

KLEIN, J. D.; GUZMAN, E.; KUEHN, G. D. Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 8, p. 2599-2605, 1992

KURAISHI, C.; YAMAZAKI, K.; SUSAKI, Y. Transglutaminase: its utilization in the food industry. **Food Reviews International**, v. 17, p. 221-246, 2001.

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

LANGSTON, J.; BLINKOVSKY, A.; BYUN, T.; TERRIBILINI, M.; RANSBARGER, D.; XU, F. Substrate specificity of *Streptomyces* transglutaminases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 291-307, 2007.

LIN, S. -J.; HSIEH, Y. -F.; LAI, L. -A.; CHAO, M. -L.; CHU, W. -S. Characterization and large-scale production of recombinant *Streptoverticillium platensis* transglutaminase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 981-990, 2008.

LU, S. Y.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P.; LI, H. Z.; CHEN, J. Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 109-125, 2003.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 618-626, 2007.

MACEDO, J. A. Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. **Tese (Doutorado)** – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 141 p, 2009.

MACEDO, J. A.; SETTE, L. D.; SATO, H. H. A comparative biochemical characterization of microbial transglutaminases: commercial vs. a newly isolated enzyme from *Streptomyces* sp. **Food and Bioprocess Technologies**, v. 3, n. 2, p. 308-314, 2010.

MÁZAN, M.; FARKAS, V. Transglutaminase-like activity participates in cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biologia**, v. 62, n. 2, p. 128-131, 2007.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 204-210, 1998.

MURUGUMA, M.; TSURUOKA, K.; KATAYAMA, K.; ERWANTO, Y.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; SATHE, S. K.; SOEDA, T. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduce levels of phosphate. **Meat Science**, v. 43, p. 191-197, 2003.

NAGY, V.; SZAKACS, G. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 122-127, 2008.

NONAKA, M.; TANAKA, H.; OKIYAMA, A.; MOTOKI, M.; ANDO, H.; UMEDA, K.; MATSUURA, A. Polymerization of several proteins by Ca^{2+} independent transglutaminase derived from microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2619-2623, 1989.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1ª ed, Manole, 444 p, 2005.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes – structure, function and applications**. 1ª ed, Springer, 642 p, 2007.

SOAREZ, L. H. B.; ASSMANN, F.; AYUB, M. A. Z. Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, p. 295-299, 2003.

SU, G.; CAI, H.; ZHOU, C.; WANG, Z. Formation of edible soybean and soybean-complex protein films by a cross-linking treatment with a new *Streptomyces* transglutaminase. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 381-388, 2007.

SUZUKI, S.; IZAWA, Y.; KOBAYASHI, K.; ETO, Y.; YAMANAKA, S.; KUBOTA, K.; YOKOZEKI, K. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, n. 11, p. 2344-2351, 2000.

TSAI, G. -J.; LIN, S. -M.; JIANG, S. -T. Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 6, p. 1234-1238, 1996.

UMEZAWA, Y.; OHTSUKA, T.; YOKOYAMA, K.; NIO, N. Comparison of enzymatic properties of microbial transglutaminase from *Streptomyces* sp. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 2, p. 113-118, 2002.

YADA, R. Y. **Proteins in food processing**. 1^a ed, Woodhead Publishing Limited, 686 p, 2004.

YEO, S. -H.; YOON, J. -H.; LEE, D. G.; KIM, H. S. Screening and identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 588-595, 2009.

ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOL, J. Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 277-282, 1995.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559-565, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

A MTGase presente na preparação enzimática bruta concentrada de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 é uma enzima termossensível, sendo rapidamente inativada em temperaturas acima de 50°C, mas que pode ser aplicada na maioria dos processos tecnológicos na área de alimentos. Foi estimado que os tempos de meia-vida da enzima a 55 e 60°C foram de 3,5 e 1,9 minutos, respectivamente.

A adição dos compostos EDTA e KCl na concentração de 1% e de cisteína e glutatona na concentração de 0,1% aumentaram a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 após incubação a 45°C por 30 minutos. A combinação de cisteína na concentração de 0,1% com carboidratos ou polióis na concentração de 10% promoveu a manutenção de mais de 50% da atividade inicial da MTGase após incubação a 45°C durante 30 minutos, podendo desta forma também ser utilizada para estabilização térmica da enzima durante a aplicação.

O etanol na concentração de 10% (v:v) apresentou pouco efeito sobre a atividade enzimática da MTGase, podendo desta forma ser aplicado em reações de polimerização de proteínas insolúveis em água. Contudo, na presença de altas concentrações de etanol (40 e 50%; v:v) verificou-se que a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 foi rapidamente inibida.

O estudo com ativadores e inibidores enzimáticos sugere que a MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 é uma enzima cálcio independente com um resíduo de cisteína no sítio ativo.

Nos estudos de concentração da enzima observou-se que o método de concentração por adição de sulfato de amônio a 80% de saturação foi o mais eficiente promovendo a concentração da enzima mais de 4 vezes com rendimento de 142%.

A preparação enzimática bruta concentrada de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 na concentração de 0,5 U/g de amostra foi capaz de unir os grânulos de

proteína texturizada de soja de forma similar à enzima comercial Activa® TG-BP nas mesmas condições, podendo ser uma fonte alternativa de obtenção da enzima.

Na purificação da preparação enzimática bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837 por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e cromatografia em coluna de afinidade Blue Sepharose CL-6B foram obtidas três frações com atividade de MTGase (TG-BS1, TG-BS2 e TG-BS3), indicando a presença de isoenzimas. A massa molecular das frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 de MTGase foi estimada em cerca de 35 KDa por SDS-PAGE.

A fração parcialmente purificada TG-BS1 apresentou atividade ótima em pH 10,0 e um segundo pico de atividade em pH 6,0, enquanto que as frações purificadas TG-BS2 e TG-BS3 mostraram atividade ótima em pH 6,5 e um segundo pico de atividade ótima em pH 10,0.