

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

**PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* sp. P20,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA ENZIMA BRUTA**

MARCELA PAVAN BAGAGLI
Engenheira de Alimentos

Prof. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora

Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos

Campinas
2009

MARCELA PAVAN BAGAGLI

**PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE DE *Streptomyces* sp. P20, CARACTERIZAÇÃO
E APLICAÇÃO DA ENZIMA BRUTA**

Prof. 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

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B146p Bagagli, Marcela Pavan
Produção de transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20,
caracterização e aplicação da enzima bruta / Marcela
Pavan Bagagli. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Transglutaminase. 2. *Streptomyces*. 3. Enzimas.
4. Fermentação. 5. Caracterização. I. Sato, Hélia
Harumi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Título em inglês: Production of transglutaminase by *Streptomyces* sp. P20,
characterization and application of crude enzyme

Palavras-chave em inglês (Keywords): Transglutaminase, *Streptomyces*, Enzyme,
Fermentation, Characterization

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Hélia Harumi Sato

Luciana Ferracini dos Santos

Luciana Francisco Fleury

Data da defesa:

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Orientadora – DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Ferracini dos Santos
Membro Titular – UNIARARAS

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleury
Membro Titular – UNIMEP

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Membro Suplente – DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Membro Suplente – DCA/FEA/UNICAMP

*Dedico este trabalho ao meu
marido Flávio Y. Satomi, por me mostrar
que é possível ser feliz todos os dias
quando nos dedicamos às coisas e às
pessoas que mais amamos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e dedicação à minha formação pessoal e profissional. Aos meus irmãos pelo apoio e carinho.

Agradeço a meu marido pelo incentivo à realização deste trabalho, pela paciência e por todo amor em todos os momentos.

Em especial, agradeço à professora Hélia Harumi Sato, pessoa de imensa generosidade e bondade e uma orientadora impecável.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial ao Haroldo, pelos ensinamentos e discussões sobre o trabalho, à Joelise pelo companheirismo, ao Márcio pelas dúvidas cruéis que sempre nos ajudaram a evoluir em nossa pesquisa. Ao Geraldo, do LEB, pelas dicas infalíveis.

Aos demais amigos que sempre estiveram presentes e a Vanderlei Toledo e Fábio Misawa pela formação profissional que me propuseram como meus chefes.

A FEA e a UNICAMP por minha formação acadêmica de qualidade e à empresa Ajinomoto pelo incentivo à pesquisa nacional.

“Você deve ser a mudança que deseja ver no
mundo”

(Mahatma Gandhi)

"Tudo neste mundo tem uma resposta. O que leva
é tempo para se formular as perguntas."

(José Saramago)

Índice

ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
RESUMO.....	XV
SUMMARY	XVII
INTRODUÇÃO	1
I. CAPÍTULO I – PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE POR <i>STREPTOMYCES</i> SP.	
P20.....	3
RESUMO.....	3
SUMMARY	4
I.1. INTRODUÇÃO	5
I.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
<i>I.2.1. Transglutaminases.....</i>	6
<i>I.2.2. Transglutaminase microbiana</i>	10
<i>I.2.3. Produção de transglutaminase por Streptomyces sp. e aumento da escala do processo fermentativo.....</i>	13
I.2.3.1. Inóculo	15
I.2.3.2. Meio de cultura	15
I.2.3.3. Temperatura, pH, Agitação e Aeração	20
I.2.3.4. Formação de espuma	22
<i>I.2.4. Produção de MTGase por fermentação em meio semi-sólido</i>	23
I.3. MATERIAL E MÉTODOS	26
<i>I.3.1. Divisão de atividades por capítulo.....</i>	26
<i>I.3.2. Metodologias analíticas</i>	27

I.3.2.1. Determinação da atividade de MTGase	27
I.3.2.2. Determinação de proteínas.....	27
I.3.2.3. Determinação de açúcares totais.....	28
I.3.2.4. Determinação de massa seca	29
I.3.3. <i>Produção de MTGase por fermentação microbiana</i>	29
I.3.3.1. Microrganismo	29
I.3.3.2. Produção de MTGase por fermentação submersa em frascos agitados.....	30
I.3.3.3. Preparação do meio de cultivo para fermentação da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. P20 em reator de bancada	31
I.3.4. <i>Produção de MTGase pela linhagem Streptomyces</i> sp. P20 por <i>fermentação submersa em reator de bancada</i>	34
I.3.4.1. Ensaios prévios	35
I.3.4.2. Delineamento experimental para produção de MTGase em reator de bancada.....	35
I.3.4.2.1. Pré-Inóculo	37
I.3.4.3. Produção da enzima em reator de bancada utilizando dois estágios de temperatura e agitação	38
I.3.5. <i>Produção de MTGase pela linhagem Streptomyces</i> sp. P20 em <i>fermentação em meio semi-sólido em frascos Erlenmeyer</i>	38
I.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
I.4.1. <i>Produção de MTGase por fermentação submersa da linhagem de</i> <i>Streptomyces</i> sp. P20 em frascos agitados	39
I.4.2. <i>Produção de MTGase por fermentação submersa da linhagem de</i> <i>Streptomyces</i> sp. P20 em reator de bancada.....	42
I.4.2.1. Testes preliminares	42
I.4.2.2. Delineamento experimental para produção de MTGase pela linhagem <i>Streptomyces</i> sp. P20 em reator de bancada	44
I.4.2.2.1. <i>Análise da atividade de MTGase</i>	44

I.4.2.2.2. <i>Análise da produtividade da MTGase</i>	50
I.4.2.3. Produção de MTGase pela linhagem de <i>Streptomyces</i> sp. P20 em reator de bancada utilizando dois estágios de temperatura e agitação	54
I.4.3. <i>Avaliação do crescimento celular no pré-inóculo</i>	60
I.4.4. <i>Produção de MTGase pela linhagem Streptomyces sp. P20 por fermentação em meio semi-sólido em frascos Erlenmeyer</i>	61
I.4.5. <i>Avaliação dos custos dos meios de cultivos utilizados na fermentação submersa e em meio semi-sólido</i>	63
I.5. CONCLUSÕES	64
I.6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	65
I.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
 II. CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MTGASE BRUTA DE STREPTOMYCES SP. P20	74
RESUMO	74
SUMMARY	75
II.1. INTRODUÇÃO	76
II.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	77
II.2.1. <i>Características bioquímicas da transglutaminase</i>	77
II.2.2. <i>Aplicações industriais da TGase</i>	82
II.3. MATERIAL E MÉTODOS	85
II.3.1. <i>Caracterização bioquímica da MTGase bruta de Streptomyces sp. P20</i>	85
II.3.1.1. Preparo do extrato enzimático	85
II.3.1.2. Temperatura ótima de atividade da MTGase	85
II.3.1.3. pH ótimo de atividade da MTGase	86
II.3.1.4. Delineamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimo de atividade da MTGase	87
II.3.1.5. Temperatura de estabilidade da MTGase	88

II.3.1.6. pH de estabilidade da MTGase.....	89
II.3.1.7. Inibidores e ativadores da MTGase.....	89
<i>II.3.2. Aplicação da enzima MTGase de Streptomyces sp. P20</i>	<i>90</i>
II.3.2.1. Aplicação da MTGase na reestruturação de pedaços de carne bovina.....	90
II.3.2.2. Aplicação da MTGase em proteína de soja texturizada	91
II.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	92
<i>II.4.1. Caracterização da MTGase bruta de Streptomyces sp. P20.....</i>	<i>92</i>
II.4.1.1. Temperatura ótima da atividade de MTGase de <i>Streptomyces sp.</i> P20.....	92
II.4.1.2. pH ótimo de atividade da MTGase de <i>Streptomyces sp. P20</i>	<i>93</i>
II.4.1.2.1. Delineamento experimental para determinação do efeito da interação da temperatura e pH na atividade da MTGase de <i>Streptomyces</i> <i>sp. P20.....</i>	<i>95</i>
II.4.1.3. Temperatura de estabilidade da MTGase de <i>Streptomyces sp. P20</i>	98
II.4.1.4. pH de estabilidade da MTGase de <i>Streptomyces sp. P20</i>	<i>101</i>
II.4.1.5. Inibidores e ativadores da MTGase de <i>Streptomyces sp. P20</i>	<i>102</i>
<i>II.4.2. Aplicação da MTGase de Streptomyces sp. P20</i>	<i>105</i>
II.4.2.1. Aplicação da MTGase na reestruturação de carne bovina.....	105
II.4.2.2. Aplicação da MTGase na reestruturação de proteína de soja texturizada.....	107
II.5. CONCLUSÕES.....	109
II.6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	110
II.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

Índice de Figuras

FIGURA 1 - LIGAÇÕES CRUZADAS ENTRE RESÍDUOS DE GLUTAMINA E LISINA DE PROTEÍNAS.	1
FIGURA I-1 – REAÇÕES CATALISADAS PELA TRANSGLUTAMINASE (A) ENTRE RESÍDUOS DE GLUTAMINA E AMINAS LIVRES; (B) ENTRE RESÍDUOS DE GLUTAMINA E LISINA; (C) ENTRE RESÍDUO DE GLUTAMINA E ÁGUA	7
FIGURA I-2 – MECANISMO DE AÇÃO DA TRANSGLUTAMINASE.	8
FIGURA I-3 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES POR CAPÍTULO	26
FIGURA I-4 - FORMAÇÃO DE ESPUMA DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM MEIO DE CULTIVO DE ALTA VISCOSIDADE, EM REATOR DE BANCADA.	32
FIGURA I-5 - PREPARO DO EXTRATO DE FARINHA DE SOJA	33
FIGURA I-6 - ILUSTRAÇÃO DO FERMENTADOR UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE MTGASE	36
FIGURA I-7 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTOURNO DA INTERAÇÃO ENTRE (A) TEMPERATURA E AERAÇÃO, (B) AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA.....	47
FIGURA I-8 - CINÉTICAS DE PRODUÇÃO DA MTGASE DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ NA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA PARA OS ENSAIOS 1 A 5 (A) E PARA OS ENSAIOS 6 A 11 (B)..	49
FIGURA I-9 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MTGASE EM REATOR DE BANCADA PELA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 UTILIZANDO OS ENSAIOS 5 E 8 E DOIS ESTÁGIOS DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO.....	54
FIGURA I-10 - VARIAÇÃO DO PH DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA NAS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS 5, 8 E COM DOIS ESTÁGIOS DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO.....	55
FIGURA I-11 - CRESCIMENTO CELULAR (G DE MASSA SECA/L) DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA NAS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS 5, 8 E COM DOIS ESTÁGIOS DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO.....	56
FIGURA I-12 – CRESCIMENTO CELULAR, PRODUÇÃO DE MTGASE E ALTERAÇÃO DE PH DURANTE A FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA NO ENSAIO DE DOIS ESTÁGIOS DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO.	57
FIGURA I-13 - CONSUMO DE CARBOIDRATOS DURANTE AS FERMENTAÇÕES DA LINHAGEM DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA NAS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS 5, 8 E DOIS ESTÁGIOS DE TEMPERATURA E AGITAÇÃO.	58
FIGURA I-14 - PRODUÇÃO DE MTGASE PELA LINHAGEM DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM FRASCOS ERLLENMEYER AGITADOS E EM REATORES DE BANCADA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	59
FIGURA II-1 - TEMPERATURA ÓTIMA DE ATIVIDADE DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM PH 6,0 E 9,0.	92
FIGURA II-2 - PH ÓTIMO DE ATIVIDADE DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 A 37°C.....	94
FIGURA II-3 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA E CURVAS DE CONTOURNO PARA O EFEITO DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE DE MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20.	97
FIGURA II-4 - TEMPERATURA DE ESTABILIDADE DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20	99
FIGURA II-5 – EFEITO DOS COMPOSTOS PEG 6000, L- CISTEÍNA E L-GLUTATIONA NA ESTABILIDADE TÉRMICA DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20.....	100

FIGURA II-6 - PH DE ESTABILIDADE DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20.	101
FIGURA II-7 – EFEITO DE DIFERENTES SAIS E DOS COMPOSTOS EDTA, L-CISTEÍNA, L-GLUTATIONA E PEG 6000 NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 0,1; 1,0 E 10 MM NA ATIVIDADE DE MTGASE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.	102
FIGURA II-8 – APLICAÇÃO DE MTGASE EM CARNE BOVINA.....	106
FIGURA II-9 - APLICAÇÃO DE MTGASE EM PROTEÍNA TEXTURIZADA DE SOJA	108

Índice de Tabelas

TABELA I-1 - ENSAIOS PARA PRODUÇÃO DE MTGASE PELA LINHAGEM DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM FRASCOS DE ERLLENMEYER DE 50 ML	31
TABELA I-2 - VALORES UTILIZADOS PARA OS COMPONENTES DO MEIO DE CULTIVO (B), pH E PRÉ-INÓCULO, FIXADOS PARA A FERMENTAÇÃO EM REATOR DE BANCADA.	34
TABELA I-3 - TEMPERATURA, AGITAÇÃO E AERAÇÃO DOS ENSAIOS PRÉVIOS EM REATOR DE BANCADA	35
TABELA I-4 - VALORES UTILIZADOS EM CADA NÍVEL DE ESTUDO PARA AS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	36
TABELA I-5 - PROPORÇÃO ENTRE SUBSTRATO E SOLUÇÃO DE SAIS UTILIZADA NA FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA	39
TABELA I-6 - PRODUÇÃO DE MTGASE PELA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM FRASCOS ERLLENMEYER DE 50 ML AGITADOS CONTENDO O MEIO DE CULTURA (A) OTIMIZADO POR MACEDO ET AL. (2007)	40
TABELA I-7 - PRODUÇÃO DE MTGASE PELA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM MEIOS DE CULTIVOS CONTENDO FARINHA DE SOJA (MEIO A) OU EXTRATO DE FARINHA DE SOJA (MEIO B) EM FRASCOS ERLLENMEYER DE 250 ML AGITADOS.....	41
TABELA I-8 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, AGITAÇÃO E AERAÇÃO DO REATOR NA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 E PRODUÇÃO DE MTGASE MÁXIMA	43
TABELA I-9 - VARIÁVEIS CODIFICADAS E VALORES REAIS (EM PARÊNTESES) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ , VALORES DE ATIVIDADE DE MTGASE MÁXIMOS E TEMPO DE OBTENÇÃO.....	44
TABELA I-10 - EFEITOS ESTIMADOS, ERRO PADRÃO, TESTE T-STUDENT E P-VALOR PARA A ATIVIDADE DE MTGASE DO PLANEJAMENTO 2 ³ EM REATOR DE BANCADA EM 62 HORAS DE FERMENTAÇÃO	45
TABELA I-11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA MÁXIMA ATIVIDADE DE MTGASE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 2 ³ EM REATOR DE BANCADA.....	45
TABELA I-12 – VALORES DOS RESÍDUOS DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA, AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA .	46
TABELA I-13 - VALORES DE PRODUTIVIDADE DE MTGASE OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS 2 ³ DA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA	51
TABELA I-14 - EFEITOS ESTIMADOS, ERRO PADRÃO, TESTE T-STUDENT E P-VALOR PARA ESTUDO DA PRODUTIVIDADE DE MTGASE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA.....	52
TABELA I-15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES DE PRODUTIVIDADE DE MTGASE NOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA	52
TABELA I-16 - INTERVALO DE CONFIANÇA PARA A PRODUTIVIDADE (U/L.H) DA FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 EM REATOR DE BANCADA	53
TABELA I-17 - PRODUÇÃO DE MTGASE PELA LINHAGEM <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20 POR FERMENTAÇÃO EM MEIOS SEMI-SÓLIDOS.	61
TABELA II-1 - VARIÁVEIS CODIFICADAS E VALORES REAIS (EM PARÊNTESES) DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² COM PONTOS AXIAIS E CENTRAIS DO ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE DE MTGASE	95

TABELA II-2 - EFEITOS ESTIMADOS, ERRO PADRÃO, TESTE T-STUDENT E P-VALOR PARA A ATIVIDADE DE MTGASE DO DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ²	96
TABELA II-3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA A ATIVIDADE DE MTGASE DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO 2 ² DO ESTUDO DO EFEITO DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE DE MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20.....	97
TABELA II-4 - ATIVIDADES RESIDUAIS RELATIVAS MÉDIAS, DESVIOS PADRÕES, INTERVALOS DE CONFIANÇA DO ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DOS COMPOSTOS PEG 6000, L-CISTEÍNA E L-GLUTATIONA NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE 10 mM NA ESTABILIDADE DA MTGASE TRATADA A 40°C EM PH 6,0.....	101
TABELA II-5 - ATIVIDADE RELATIVA RESIDUAL MÉDIA E DESVIOS PADRÕES PARA OS ENSAIOS DO EFEITO DE ATIVADORES E INIBIDORES DA MTGASE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. P20.....	104
TABELA II-6 – EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E EDTA NA ATIVIDADE DE TRANSGLUTAMINASES DE <i>STREPTOMYCES</i> SP.	105

Resumo

A transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e aminas livres de proteínas formando agregados protéicos. Foi estudado o aumento da escala de produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, de frascos Erlenmeyer agitados de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo para fermentador de bancada de 6 L com volume útil de 3 L. Para a fermentação em frascos agitados foi utilizado o meio de cultivo otimizado por MACEDO et al. (2007) e para a fermentação do microrganismo em reator de bancada foi utilizado esse último meio de cultivo modificado, composto de extrato de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , ajustado para pH 7,0. Foi estudado, através de delineamento fatorial, os efeitos da temperatura, agitação e aeração na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 no reator de bancada e a produção de transglutaminase. O aumento da escala de 200 vezes proporcionou uma elevação na atividade enzimática de 7,2 vezes, e o tempo para obtenção desta atividade foi reduzido de 120 horas para 42 horas de fermentação, utilizando dois estágios de temperatura. A atividade máxima obtida em reator de bancada foi de 2,05 U/mL de caldo fermentado. No estudo da produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, por fermentação em meio semi-sólido, utilizando-se como substratos farinha de feijão branco e farinha de amendoim, foram obtidos, respectivamente, atividade de transglutaminase iguais a 0,88 U/g de substrato seco e 0,77 U/g de substrato seco. A caracterização bioquímica da transglutaminase bruta de *Streptomyces* sp. P20 foi estudada, bem como a aplicação da enzima em carne bovina e proteína texturizada de soja. Os valores de temperatura ótima e pH ótimo desta enzima foram avaliados, sendo verificado que a temperatura ótima de atividade foi de 35°C e o pH 6,5, sendo encontrada uma segunda faixa de pH ótimo em 9,0, o que pode indicar a presença de isoenzimas. A MTGase mostrou-se estável na faixa de pH 6,0 – 9,0, e até a temperatura de 35°C em pH 6,0 por 30 minutos. O aminoácido L-cisteína aumentou a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. P20. O efeito de íons metálicos, do

EDTA, L-cisteína, L-glutathione e PEG 6000 na atividade da MTGase foram avaliados. Os íons Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , inativaram a enzima, sugerindo a presença de grupos tiol no seu sítio ativo. O íon Mg^{2+} aumentou a atividade da MTGase cerca de 100%. A aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 em carne bovina e em proteína texturizada de soja foi eficiente quando comparada a aplicação da enzima comercial Activa® TG-BP aplicada nas mesmas condições.

Summary

Transglutaminase (TGase, EC 2.3.3.13) is an enzyme that catalyzes cross-linking between the glutamine and free amine residues of proteins leading to the formation of protein aggregates. The scale up of the production of transglutaminase by *Streptomyces* sp. P20 from shaken flasks to a bench fermenter was studied. Initially, the effect of temperature and agitation on the microorganism was studied in 50 mL conical flasks containing 15 mL of culture medium previously optimized by MACEDO et al. (2007). The production in 250 mL conical flasks containing 50 mL of the same culture medium was then studied. For fermentation in the bench reactor the same medium was used, modified, containing extract of 2.5% powdered soy, 2% potato starch, 1% peptone, 0.1% glucose, 0.4% KH_2PO_4 and 0.2% MgSO_4 , pH 7.0. A factorial design was used to study the effects of temperature, agitation and aeration on the fermentation of the strain *Streptomyces* sp. P20 in a 6L bench fermenter. The x200 scale up led to a x7.2 enhancement in enzymatic activity, and the fermentation time decreased from 120 h to 42 h using two temperature (from 34°C during the first 24 hours to 26°C for the remaining time) and agitation (from 350 rpm during the first 24 hours to 150 rpm for the remaining time) shifts. The maximum transglutaminase activity obtained was 2.05 U/mL. In the solid state fermentation study using semi-solid media containing white bean flour and peanut flour, transglutaminase activities of 0.88 U/mg dried substrate and 0.77 U/mg dried substrate, respectively, were obtained. The biochemical characterization of the crude transglutaminase obtained from *Streptomyces* sp. P20 and its application in beef and texturized soy protein were studied. The optimum temperature and pH values for MTGase activity were investigated, exhibiting optimum activity at 35°C and at both pH 6.5 and pH 9.0, probably due to the presence of an isoenzyme. The enzyme was stable in the pH range from 6.0 – 9.0, and at temperatures of up to 35°C it was stable for 30 minutes at pH 6.0. The amino acid L-cysteine enhanced the thermal stability of the MTGase from *Streptomyces* sp. P20. The effects of metal ions, EDTA, L-cysteine, L-glutathione and PEG 6000 on the activity of

MTGase were investigated. The ions Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} inhibited enzyme activity, suggesting the presence of a thiol group at the active site of the enzyme. The ion Mg^{2+} increased MTGase activity by 100%. The application of MTGase from *Streptomyces* sp. P20 in beef and texturized soy protein was efficient when compared to the application of commercial Activa® TG-BP under the same conditions.

Introdução

A transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas através de ligações covalentes entre resíduos de glutamina e aminos primárias. Como exemplo tem-se a ligação entre resíduos de glutamina e lisina, ilustrado na Figura 1.

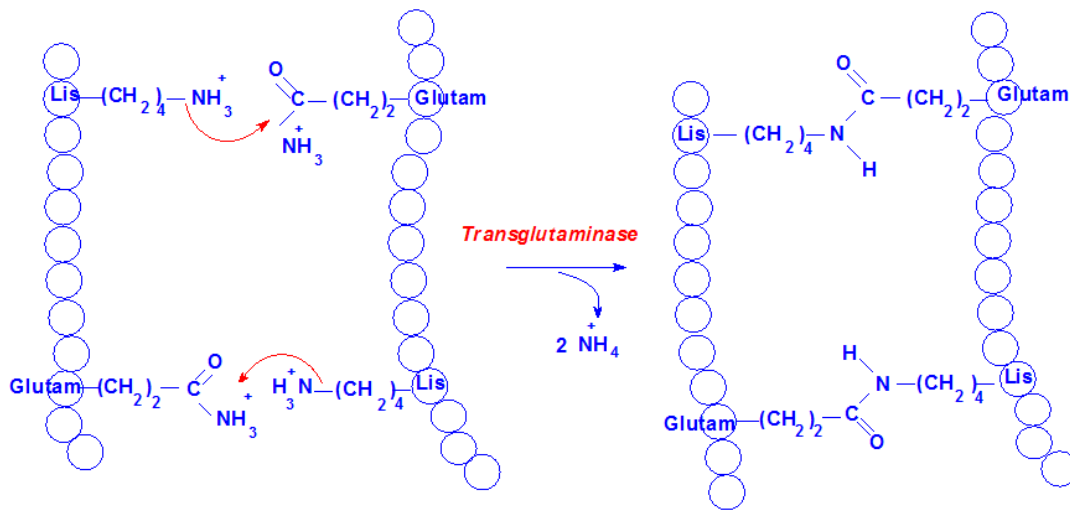


Figura 1 - Ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas.

Esta enzima está presente em tecidos e fluidos corpóreos de alguns invertebrados e vertebrados, em plantas e também em microrganismos (PASTERNAK et al., 1998). A transglutaminase tem sido relacionada a inúmeras reações envolvendo proteínas, porém sua função nos organismos ainda não está completamente elucidada. A função mais estudada desta enzima é o processo de coagulação sanguínea em mamíferos catalisada pelo fator XIIIa, uma forma ativada da transglutaminase do plasma (FOLK, 1980). Em pescados pode-se observar o fenômeno conhecido como “suwari”, no qual uma pasta de peixe moído endurece a baixas temperaturas devido à formação de ligações cruzadas entre as proteínas da pasta, o que tem sido relacionado à ação da própria transglutaminase presente no peixe (SEKI et al., 1990).

A comercialização de transglutaminase apresenta relevância devido à gama de aplicações tecnológicas em indústrias de alimentos, têxteis, de couro e outras. Assim, a busca de processos que permitam a obtenção da enzima em larga escala e a baixos custos é de grande interesse e, neste cenário, a transglutaminase microbiana adquire importância em relação à extraída de mamíferos.

A busca por linhagens de microrganismos do gênero *Streptomyces* desperta o interesse de pesquisadores devido à sua habilidade de produzir a transglutaminase em grandes quantidades, além de produzirem uma enzima extracelular, cálcio independente e de baixa massa molecular, fatores importantes para aplicação em alimentos (YOKOYAMA et al., 2004).

A transglutaminase microbiana (MTGase) apresenta a propriedade de atuar sobre diversas proteínas, tais como globulinas de soja, glúten, caseínas, actina e miosina e em proteínas de ovos, com a mesma eficiência da enzima de mamíferos. Desta forma, as potencialidades para aplicação da MTGase em indústrias de alimentos, tais como indústrias de carnes e embutidos, laticínios, produtos derivados de soja e pescado é ampla (YOKOYAMA et al, 2004; HUINONG et al., 2005).

O aumento da escala da produção da enzima é fundamental para a busca do aprimoramento do rendimento do processo e também da redução de custos, elevando a viabilidade de sua aplicação industrial (HUINONG et al., 2005).

Este trabalho visa estudar o aumento da escala de produção da transglutaminase microbiana, bem como desenvolver novas formas de produção desta enzima, caracterizá-la e verificar sua atuação em proteínas da carne bovina e soja.

I. Capítulo I – Produção de transglutaminase por *Streptomyces* sp. P20

Resumo

A transglutaminase é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas entre proteínas. Foi estudado o aumento da escala de produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, de frascos Erlenmeyer agitados para fermentador de bancada. Inicialmente foi testado o efeito da temperatura e agitação na fermentação do microrganismo em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo previamente otimizado por MACEDO et al. (2007). Em seguida foi testada a produção da enzima em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Para a fermentação do microrganismo em reator de bancada foi utilizado o meio de cultivo modificado composto de extrato de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , ajustado para pH 7,0. Foi estudado, através de delineamento fatorial, os efeitos da temperatura, agitação e aeração na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada de 6 L e produção de transglutaminase. O aumento da escala de 200 vezes proporcionou uma elevação na atividade enzimática de 7,2 vezes, e o tempo para obtenção desta atividade foi reduzido de 120 horas para 42 horas, utilizando dois estágios de temperatura (34°C nas primeiras 24 horas e 26°C nas demais) e agitação (350 rpm nas primeiras 24 horas e 150 rpm nas demais) durante a fermentação. A atividade máxima obtida em reator de bancada foi de 2,05 U/mL de caldo fermentado. No estudo da produção da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20, por fermentação em meio semi-sólido, utilizando-se como substratos farinha de feijão branco e farinha de amendoim, foram obtidos, respectivamente, atividade de transglutaminase iguais a 0,88 U/g de substrato seco e 0,77 U/g de substrato seco.

Summary

Transglutaminase is an enzyme that catalyzes cross-linking between proteins. In the present work the scale up of the production of transglutaminase by *Streptomyces* sp. P20, from shaken flasks to a bench fermenter, was studied. Initially, the effect of temperature and agitation on the microorganism was studied in 50 mL conical flasks containing 15 mL of culture medium previously optimized by MACEDO et al. (2007). The production in 250 mL conical flasks containing 50 mL of the same culture medium was then studied. For fermentation in the bench reactor the same medium was used, modified for use in a reactor and containing 2.5% powdered soy extract, 2% potato starch, 1% peptone, 0.1% glucose, 0.4% KH_2PO_4 and 0.2% MgSO_4 , adjusted to pH 7.0. A factorial design was used to study the effects of temperature, agitation and aeration on fermentation by the strain *Streptomyces* sp. P20 in a 6L bench fermenter. The x200 scale up led to a x7.2 enhancement of enzymatic activity, and the fermentation time decreased from 120 h to 42 h, using two temperature (from 34°C during the first 24 hours to 26°C for the remaining time) and agitation (from 350 rpm during the first 24 first hours to 150 rpm for the remaining time) shifts. The maximum transglutaminase activity was 2.05 U/mL. In the solid state fermentation study using white bean flour and peanut flour, transglutaminase activities of 0.88 U/mg dried substrate and 0.77 U/mg dried substrate, respectively, were obtained.

I.1. Introdução

A enzima transglutaminase produzida por microrganismos (MTGase), apresenta crescente aplicação na indústria de alimentos, devido à sua propriedade de catalisar a formação de ligações cruzadas entre proteínas e ser capaz de unir pedaços de carne, formar géis protéicos resistentes à temperatura, melhorar a textura de massas e pães, formar filmes protéicos entre outras.

Inicialmente a TGase era obtida de mamíferos como, por exemplo, do fígado de porquinho da índia e de sangue bovino, no entanto a extração e purificação da enzima era difícil, além da enzima apresentar coloração avermelhada indesejável.

Em 1989, uma linhagem de *Streptoverticillum mobaraense* foi utilizada na produção de transglutaminase (denominada MTGase) por fermentação submersa, visto que apresentava elevada atividade da enzima (2,5 U/mL de caldo fermentado) (ANDO et al., 1989). A partir de então, esta enzima foi produzida industrialmente pela indústria Ajinomoto Co. em colaboração com a Amano Enzyme INC., sendo atualmente comercializada com o nome de Activa[®].

Recentemente, estudos para isolamento de novas linhagens produtoras de MTGase e de otimização de processos fermentativos, visando a redução de custo da enzima, têm sido conduzidos. Diversas linhagens de *Streptomyces* sp. apresentam elevada atividade de transglutaminase, entre elas podemos citar *Streptomyces platensis*, *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces lividans*. Além dos actinomicetos, alguns *Bacillus* sp. (como o *Bacillus circulans*) também apresentaram atividade enzimática, tanto em fermentação submersa como em fermentação semi-sólida (SOARES et al. 2008; NAGY E SZAKACS, 2008).

A linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi isolada por MACEDO et al. (2007) de solo brasileiro e apresentou elevado potencial para produção de MTGase por fermentação em meio viscoso.

Este capítulo visou estudar a produção e o aumento de escala para obtenção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 por fermentação submersa, e estudar a produção da transglutaminase em meio semi-sólido, composto de farinha amendoim, soja e diferentes tipos de feijão.

I.2. Revisão Bibliográfica

I.2.1. Transglutaminases

A enzima transglutaminase (EC 2.3.2.13) é uma transferase que catalisa reações de acil-transferência entre um grupo γ -carboxiamida de resíduos de glutamina e diversas aminas primárias, incluindo poliaminas. Quando o aceptor da acil-transferência é um resíduo de lisina, a ligação isopeptídica ϵ -(γ -Glutamil)lisina é formada, intra e/ou intermolecularmente. Na ausência de aminas primárias, a água atua como aceptor do radical acil na reação, resultando na deaminação do grupo γ -carboxiamida do resíduo de glutamina, gerando ácido glutâmico. As equações da Figura 1 esquematizam as reações catalisadas pela enzima.

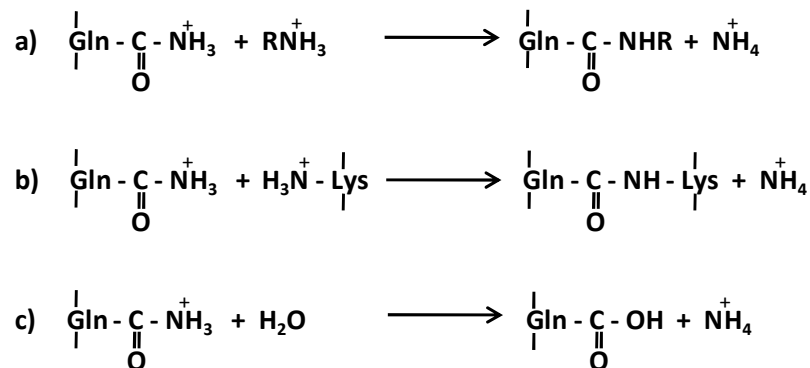


Figura I-1 – Reações catalisadas pela transglutaminase (a) entre resíduos de glutamina e aminas livres; (b) entre resíduos de glutamina e lisina; (c) entre resíduo de glutamina e água

Assim, a ação da transglutaminase resulta na formação de agregados protéicos irreversíveis, através da introdução de ligações cruzadas entre os grupos protéicos (YOKOYAMA et al., 2004).

A transglutaminase está presente em tecidos de diversos organismos e em fluidos corpóreos, tanto em invertebrados (CARIELLO et al., 1997) quanto em vertebrados (FOLK, 1980). Pode ser encontrada também em plantas (KANG e CHO, 1996) e em microrganismos (ANDO et al., 1989; KIM et al., 2000; SOUZA et al., 2006). As funções desempenhadas pelas transglutaminases nesses organismos são variadas. Segundo CARIELLO et al. (1997) existem basicamente três classes de transglutaminases: as extracelulares e dois tipos de enzimas intracelulares (ou teciduais).

Nos eucariotos, estas enzimas têm sido relacionadas ao envelhecimento e morte celular (apoptose), à diferenciação de células da epiderme (atuando na estabilidade mecânica da pele), e à coagulação sanguínea, na qual atua na estabilização da fibrina (FOLK, 1980; FRIEDRICH & ASZÓDI, 1992). Têm sido associadas à doenças degenerativas do sistema nervoso como a doença de Alzheimer (FRIEDRICH & ASZÓDI, 1992) e também à doenças crônicas como a celíaca (DEKKIN et al., 2007). O fator XIIIa, forma ativada da

TGase presente no plasma de mamíferos, é a forma mais estudada por estar relacionada à coagulação sanguínea (FOLK, 1980).

As características moleculares da enzima são diferentes de organismo para organismo. A estrutura primária de diversas transglutaminases foi identificada, sendo observado que o centro ativo destas contém um, ou mais, resíduo de cisteína, porém o grupo de peptídeos que está ao redor deste aminoácido pode ser diferente dependendo da origem da enzima, bem como o restante da estrutura primária (FOLK e GROSS, 1971; KANAJI et al., 1993). Um dos indicadores da diferença estrutural é o fato da enzima encontrada em vertebrados e alguns invertebrados ser cálcio dependente, enquanto a encontrada em microrganismos não necessitar deste íon para atuar (FOLK, 1980, ANDO et al., 1989; WADA et al., 2002; CUI et al, 2007).

O mecanismo de ação da transglutaminase é muito semelhante ao de proteases, (FRIEDRICH & ASZÓDI, 1992; PLÁCIDO al., 2007), consistindo basicamente em duas etapas. Na primeira etapa o grupo tiol da cisteína presente no sítio ativo ataca a cadeia lateral de um resíduo de glutamina disponível no substrato protéico, formando um complexo acil-enzima e liberando amônia. Em seguida, uma amina primária substitui a enzima, gerando uma glutamina carboxiamida modificada (NEGUS, 2001).

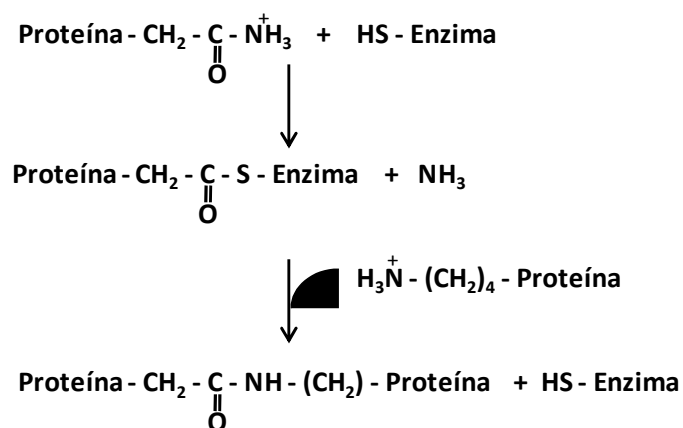


Figura I-2 – Mecanismo de ação da transglutaminase.

A principal fonte industrial da enzima, por décadas, foi o fígado de porquinhos da Índia. Pelo fato do processo de separação e purificação da enzima ser difícil, o custo da produção em escala comercial era elevado, o que dificultava a aplicação da TGase nas indústrias de alimentos (YAN et al., 2005).

O fator XIII foi extraído comercialmente na Europa a partir de sangue bovino e suíno. Esta enzima, no entanto, apresenta limitações para aplicação nas indústrias de alimentos devido à coloração avermelhada, o que pode ser prejudicial à aparência dos alimentos, além da necessidade de ser ativada pela trombina (MOTOKI & SEGURO, 1998).

A utilização de microrganismos para obtenção comercial de transglutaminase, através de processos fermentativos tradicionais, teve início com os trabalhos realizados por ANDO et al. (1989), com o isolamento de um microrganismo do gênero *Streptoverticillium*, produtor de transglutaminase, a qual foi denominada MTGase (transglutaminase microbiana).

Transglutaminase proveniente de folhas de soja (*Glycine max*) foi purificada e caracterizada por KANG e CHO (1996). Esta enzima apresentou massa molecular de 80 kDa, que é similar a TGase de tecidos animais. Foi observado que os íons Ca^{2+} nem sempre foram essenciais para a atividade enzimática, no entanto, este íon favorecia a atividade, o que foi relacionado à concentração endógena de cálcio na planta.

KUMAZAWA et al. (1997) purificaram e caracterizaram a TGase proveniente de ostras japonesas (*Crassostrea gigas*). Avaliaram o conteúdo de ligações ϵ -(γ -Glutamil)-Lisina em ostras frescas e em vários produtos de ostras. A atividade específica da enzima foi 0,6 U/mg de proteína. Os autores identificaram dois tipos de TGase, sendo que ambas se mostraram cálcio dependentes.

A capacidade de formação de gel protéicos da MTGase recombinante (contendo resíduos serina na extremidade N-terminal ao invés de asparagina) produzida por *Streptoverticillium mobaraense* foi comparada com a enzima nativa. A enzima recombinante apresentou menor atividade na formação de ligações cruzadas, além de

apresentar maior tendência de se agregar que a MTGase nativa, fatores que interferem na formação de géis (YOKOYAMA et al., 2003).

Além da importância da TGase para diferentes organismos, esta enzima apresenta grande aplicação nas indústrias de alimentos, possibilitando aprimoramentos tecnológicos e nutricionais, na formação de microcápsulas e filmes comestíveis, na “gastronomia molecular”, nas indústrias têxteis e de couro (HUINONG et al., 2005), e também em áreas médicas, em que é utilizada em cirurgias como “cola de fibrina” (NEGUS, 2001).

I.2.2. Transglutaminase microbiana

Uma das formas de produção de transglutaminases microbianas (MTGase) estudada foi o uso de microrganismos geneticamente modificados, que receberam o gene de mamíferos para expressar a transglutaminase (IKURA et al., 1988; BISHOP et al., 1990). No entanto, a comercialização desta enzima apresentou limitações devido à aceitação dos consumidores e às regulamentações para alimentos (MOTOKI et al., 1998).

A partir dos anos 80, uma nova fonte para a enzima foi estudada para a produção em larga escala. Em 1989, ANDO et al. relataram a seleção de um microrganismo capaz de produzir a enzima por meios fermentativos tradicionais, a qual foi denominada de MTGase. A empresa Ajinomoto Co. Inc. em colaboração com a Amano Enzyme Inc., iniciaram a produção industrial da MTGase utilizando o processo fermentativo (CUI et al., 2007). A partir de então, diversos estudos envolvendo *screening* de microrganismos e melhorias de processos fermentativos têm sido realizados.

O actinomiceto isolado por ANDO et al. (1989), identificado como *Streptoverticillium* sp. S-8112, posteriormente como *Streptoverticillium mobaraense*, apresentou elevada capacidade de produção de MTGase. O processo utilizado para a produção da enzima consistia na preparação de um pré-inóculo em frascos de Sakaguchi de 500mL, contendo 100mL de meio (0,2% de polipeptona, 0,5% de glicose, 0,2% de

K₂HPO₄, 0,1% de MgSO₄) ajustado para pH 7,0 incubado por 48 horas a 30°C sob agitação. A fermentação foi realizada em um reator contendo 20 L de meio de cultura (2,0% de polipeptona, 2,0% de amido solúvel, 0,2% de K₂HPO₄, 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de MgSO₄, 0,05% de surfactante) ajustado para pH 7,0, e mantido por 3 dias a 30°C, aeração de 10 L/min. e agitação de 250rpm, sendo obtida atividade de transglutaminase igual a 2,5 U/mL.

GERBER et al. (1994) estudaram a produção da MTGase por *Streptoverticillium mobaraense*, utilizando o meio basal desenvolvido por ANDO et al. (1989), utilizando duas escalas de trabalho, sendo a produção iniciada em frascos Erlenmeyer de 2L contendo 500mL de meio de cultivo, que em seguida foi expandida para produção em reator com 3,5L de volume de trabalho. Os autores realizaram algumas modificações no meio basal descrito por ANDO et al. (1989) para adaptá-lo às condições da fermentação em reator, sendo utilizado o meio de cultivo composto de 2,0% de polipeptona, 2,5% de amido solúvel, 0,2% de K₂HPO₄, 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de MgSO₄ e 1% de glicose. Nas primeiras 24 horas foi utilizada agitação média de 160rpm e depois alterada para 325 rpm. A máxima produção da enzima ocorreu em 7 dias e apresentou atividade entre 1,5 e 2,0 U/mL.

A transglutaminase produzida por microrganismo é sintetizada em sua forma inativa, evitando que a enzima ativa atue nas proteínas da estrutura celular provocando a morte do microrganismo. A transglutaminase de *Streptoverticillium mobaraense* S-8112 é ativada por uma protease termoestável solúvel, que atua sobre a transglutaminase inativa apenas fora da membrana citoplasmática (PASTERNAK et al., 1998).

Um actinomiceto com atividade de MTGase, identificado como *Actinomadura* sp. T-2, foi isolado por KIM et al. (2000). Inicialmente foi utilizado o meio de cultura composto de 0,2% de polipeptona, 0,5% de glicose, 0,2% de K₂HPO₄, 0,1% de MgSO₄ para o cultivo do microrganismo e o meio composto de 2,0% de polipeptona, 2,0% de amido solúvel, 0,2% de K₂HPO₄, 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de MgSO₄, 0,05% de surfactante para produção da enzima, ambos descritos por ANDO et al. (1989). O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de meio de cultura e 0,1 mL de suspensão

de esporos. Os frascos foram incubados sob agitação (120 rpm) a 28°C por 36 horas. Uma alíquota de 2,1 mL desta cultura foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 70mL de meio de cultura e os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 28°C por cinco dias sendo obtida atividade de MTGase de 2,26 U/mL de caldo fermentado. Em seguida, os pesquisadores estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como as concentrações de diferentes sais para a otimização da produção de transglutaminase pelo microrganismo *Actinomadura* sp. T-2. O meio otimizado foi composto de 2% de glicose, 1% de polipeptona e 1% de peptona de soja e 0,1% de $MnCl_2$, sendo obtida atividade de MTGase de 4,5 U/mL, em média, após 5 dias de fermentação.

A produção de transglutaminase foi evidenciada também em linhagens de *Bacillus* sp., sendo que a produção da enzima foi associada a formação da estrutura dos esporos destes microrganismos, visto que foram evidenciados dois tipos de ligações covalentes entre as proteínas que formam a cápsula do esporo, sendo elas entre resíduos de tirosina e ligações isopeptídicas entre resíduos de glutamina e lisina, que são características das ligações catalisadas pela TGase (PLÁCIDO et al., 2007).

KOBAYASHI et al. (1998) investigaram a atividade de transglutaminase em *Bacillus subtilis*, sendo esta detectada apenas nas células esporuladas lisadas. Nenhuma atividade foi encontrada nas células vegetativas ou no meio de cultura. A atividade enzimática aumentou durante o início da esporulação do microrganismo e atingiu seu maior valor quando as proteínas que formam as camadas do esporo estavam completamente formadas e arranjadas.

SOARES et al. (2003) purificaram e caracterizaram a MTGase obtida de *Bacillus circulans* BL32, uma linhagem isolada da Amazônia. Posteriormente os autores (SOUZA et al., 2006) estudaram a otimização dos componentes do meio de cultura utilizando métodos experimentais estatísticos. O meio otimizado composto de 9 g de glicerol, 2 g de sacarose, 7 g de peptona, 1 g de triptona, 1 g de Na_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de meio possibilitou a obtenção de atividade enzimática de 0,33 U/mL, sendo os experimentos realizados em agitador rotativo, mantido por 8 dias a 30°C e 100 rpm.

HERRERA et al. (1995) verificaram que a parede celular da levedura *Candida albicans* apresentava diversas ligações covalentes entre peptídeos. Os autores evidenciaram atividade elevada de TGase na parede celular do microrganismo e baixa atividade no citosol, concluindo que a transglutaminase apresenta um papel importante na organização da parede celular desta linhagem de microrganismo, provavelmente estabelecendo ligações cruzadas entre glicoproteínas da estrutura.

Entre os diferentes microrganismos em que a MTGase foi identificada, as linhagens de *Streptomyces*, um gênero de actinomiceto, apresentam grande destaque. A grande vantagem do uso destes microrganismos é o fato de produzirem a enzima extracelularmente reduzindo etapas na separação e purificação da enzima, além de apresentarem elevada atividade enzimática em relação aos outros microrganismos e a enzima não ser dependente de íons cálcio para sua atuação (ZOTZEL et al., 2003). Os microrganismos do gênero *Streptoverticillium* foram unificados aos do gênero *Streptomyces* devido às suas características filogenéticas, em 1990 (WITT et al., 1990; HATANO et al., 2003).

1.2.3. Produção de transglutaminase por *Streptomyces* sp. e aumento da escala do processo fermentativo

Streptomicetos são bactérias filamentosas, aeróbias, gram-positivas, presentes em solos (ZOTZEL et al., 2003) e amplamente empregados na produção de diversos metabólitos, entre eles antibióticos e enzimas (WHITAKER, 1992; O'CLEIRIGH et al., 2005). Estes microrganismos, quando submetidos ao cultivo submerso, podem apresentar morfologias muito semelhantes à de fungos filamentosos, variando de *pellets* maciços a hifas suspensas de forma homogênea (STANBURY et al., 2003; O'CLEIRIGH et al., 2005). Estas variações na morfologia das culturas submersas são de grande importância para o desenho de processos fermentativos produtivos e com elevado rendimento, uma vez que influenciam diretamente a produção de metabólitos, podendo ser controladas pelo

volume de inóculo, adição de aditivos ao meio de cultivo e força de cisalhamento no meio de cultivo (STANBURY et al., 2003; JUNKER et al., 2004). A função da TGase no ciclo de vida dos Streptomicetos ainda não é conhecida, porém há indícios de que, por atuar na interligação de proteínas, seja importante para fortificação dos micélios e esporos formados por estas bactérias (ZOTZEL et al., 2003)

O'CLEIRIGH et al. (2005) avaliaram a influência da viscosidade do meio de cultura na morfologia de *Streptomyces hygroscopicus*, adicionando goma xantana em diferentes concentrações ao meio de cultura. Os resultados mostraram que o aumento da viscosidade elevou o número de *pellets* no meio (até a concentração de 3g/L), porém o tamanho do *pellet* foi reduzido. Outro ponto importante foi o fato do aumento da viscosidade reduzir a variação dos resultados entre os frascos utilizados no experimento.

De acordo com STANBURY et al. (2003), o aumento de escala de processos fermentativos está relacionado ao aumento do volume do processo e implica na identificação da influência dos parâmetros da fermentação que são afetados pelo tamanho da unidade fermentativa, para que não ocorra redução do rendimento. Os principais tópicos envolvidos neste processo são:

- *Desenvolvimento do inóculo*: o aumento de escala pode exigir maior número de estágios para a preparação do inóculo, possibilitando quantidade e características desejadas do microrganismo para o processo.

- *Esterilização*: o processo de esterilização é dependente e deve ser ajustado de acordo com o aumento da escala. Estes ajustes podem levar a modificações no meio de cultura.

- *Parâmetros ambientais*: ao se elevar o volume do processo, o ambiente do microrganismo sofre alterações, sendo os principais parâmetros afetados o pH do meio, a disponibilidade de nutrientes, a temperatura, a concentração de oxigênio e gás carbônico dissolvidos no meio e a formação de espuma.

I.2.3.1. Inóculo

O inóculo é de grande importância para o sucesso da fermentação e para sua reprodutibilidade, uma vez que contém os microrganismos que estarão envolvidos no processo (MALDONADO, 2006). É importante que o inóculo contenha microrganismos saudáveis e em sua forma ativa, a fim de reduzir a fase *lag* do crescimento na fermentação; seu tamanho deve ser adequado e conter a forma morfológica de interesse do microrganismo além deste reter a capacidade de formação do produto desejado (STANBURY et al., 2003).

O inóculo pode influenciar a morfologia dos microrganismos filamentosos e conseqüentemente as características do processo fermentativo (WHITAKER, 1992; STUNBURY et al., 2003; JUNKER et al., 2004).

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a morfologia apresentada pelas linhagens de *Streptomyces* durante a fermentação do microrganismo em reatores para a produção de enzima transglutaminase.

I.2.3.2. Meio de cultura

O meio de cultura representa cerca de 30% do custo total de um processo fermentativo e sua composição está intimamente ligada ao crescimento microbiano e à produção de metabólitos específicos (TÉLLEZ-LUIS et al., 2004). Assim, a otimização dos componentes de um meio de cultura é de grande interesse das indústrias que utilizam esta tecnologia, com a finalidade de reduzir custos e elevar a produtividade e/ou o rendimento do processo.

As características do meio de cultura, além de influenciar a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos, estão relacionadas à facilidade de transferência de oxigênio no meio, à facilidade de mistura dos ingredientes do meio e formação de espuma ao longo do processo. No caso de bactérias filamentosas, o meio de cultura pode influenciar, ainda, a morfologia do microrganismo (STANBURY et al., 2003).

Para a produção de MTGase a partir de *Streptomyces*, alguns estudos foram realizados para obtenção de meios adequados para cada linhagem de microrganismo e desenvolvidos de modo que fornecessem os melhores resultados de atividade enzimática.

ZHU et al. (1995) formularam um meio de cultivo para obtenção da MTGase proveniente de *Streptoverticillium mobaraense*, baseando-se na modelagem estequiométrica da produção da enzima pelo microrganismo. O meio obtido apresentava em sua composição 20 g de amido, 20 g de peptona, 2 g de $MgSO_4$, 2 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de polipropileno glicol, 0,3 g de Arg, 0,649 g de Asp, 0,155 g de Asn, 0,023 g de Cys, 0,145 g de Gly, 0,083 g de His, 0,063 g de Ile e 0,092 g de Met por litro de meio de cultura, ajustado para pH 6,5. O processo foi realizado em fermentador com volume de trabalho de 2 L, com aeração de 2 L/min e agitação de 400 rpm nas primeiras 18 horas e de 500 rpm nas demais. Foi obtida atividade de MTGase em torno de 0,97 U/mL, quatro vezes superior à obtida no meio basal composto de 20g de amido solúvel, 20g de peptona de proteínas do leite, 2 g de $MgSO_4$, 2 g de KH_2PO_4 , 2 g de K_2HPO_4 , 2 g de extrato de levedura por litro de meio de cultura. O tempo necessário para obtenção da máxima atividade foi de 40 horas, sendo que no meio basal este fato ocorreu após 65 horas de fermentação, o que sugere a importância dos aminoácidos para o crescimento celular e síntese da enzima.

Em continuidade ao trabalho anterior, ZHU et al. (1998a) analisaram o metabolismo de aminoácidos do *Streptoverticillium mobaraense* para produção de transglutaminase, utilizando balanço de massa. A cinética de fermentação foi dividida em 4 etapas, sendo observado que a produção da enzima ocorria apenas após a parada do crescimento do microrganismo, período em que a concentração da maioria dos aminoácidos livres estava baixa e muitos se apresentavam ligados às proteínas. Os autores

sugeriram que o acúmulo de certa quantidade de massa celular seria necessário para a produção da enzima e esta estaria atuando sobre os aminoácidos livres ligando-os às proteínas e indisponibilizando-os para o consumo do microrganismo, o qual apresentaria queda no crescimento e por sua vez queda na produção da enzima. Foi observado ainda que o microrganismo é capaz de sintetizar todos os aminoácidos utilizados no experimento, no entanto, esta síntese é limitada pela deficiência de nitrogênio, o que poderia ser suprido pela adição de outras fontes do componente que não fossem substrato para a MTGase, tal como a amônia. De posse destas observações, ZHU et al. (1998b) utilizaram a estratégia de *fed-batch* para suprir a limitação de nitrogênio no meio de cultura e aprimorar a atividade da MTGase produzida por *Streptovercillium mobaraense*. Para tanto, utilizaram uma fonte de nitrogênio inorgânica na alimentação (evitando a ação da enzima produzida sobre proteínas presentes no meio), sendo este composto de 2 g/L de MgSO_4 , 2 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de K_2HPO_4 , 2 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A massa celular obtida neste processo foi 33% superior a fermentação realizada sem alimentação. A produção da enzima foi significativamente elevada, sendo obtido 1,8 U/mL de meio de fermentação.

JUNQUA et al. (1997) descreveram a otimização dos componentes do meio de cultura para obtenção de MTGase sintetizada por *Streptovercillium cinnamoneum* CBS 683.68, utilizando técnicas estatísticas de planejamento experimental. Sucessivos planejamentos experimentais foram realizados para avaliação da influência da concentração de glicerol, caseína, peptona, extrato de levedura e oligoelementos no meio de cultura basal (1g/L peptona de soja, 4g/L glicerol, 4g/L extrato de levedura, 0,5g/L MgSO_4 , 2g/L KH_2PO_4 , 5g/L de Na_2HPO_4 e 1mg/L de cada oligoelemento: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os resultados mostraram que o glicerol e a caseína apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a produção de MTGase e crescimento celular, sendo os valores ótimos de concentrações fornecidos pelo modelo estatístico iguais a 31,2g/L e 38,4g/L, respectivamente. Os oligoelementos não influenciaram significativamente nenhum dos dois parâmetros avaliados. Peptona e extrato de levedura apresentaram pouca influência para ambos os resultados, no entanto

se mostraram essenciais para a síntese da enzima, sendo então as concentrações desses compostos no meio de cultura fixadas no valor médio avaliado (10,5 g/L e 2,5 g/L, respectivamente). A atividade de transglutaminase obtida no meio otimizado foi de 0,3 U/mL enquanto que usando meio basal foi igual a 0,1 U/mL. Os experimentos foram realizados em escala laboratorial, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, agitados a 140 rpm e temperatura de 28°C.

TÉLLEZ-LUIS et al. (2004) estudaram a produção de MTGase por *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 utilizando glicerol como fonte de carbono. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura, sendo que os melhores resultados de atividade (0,77 U/mL) foram obtidos com um meio que consistia de 10,5 g de peptona, 2,5 g de extrato de levedura, 20g de caseinato de sódio, 50,5g de glicerol, 0,5 g de MgSO₄, 2 g de KH₂PO₄, 5 g de Na₂HPO₄ por litro de meio de cultivo. Observou-se também que a agitação a 350 rpm foi a melhor condição para máxima produção da enzima.

CUI et al. (2007) isolaram um actinomiceto com elevada atividade de MTGase, o qual foi classificado como *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13. Para a produção da enzima o microrganismo foi inoculado em 100 mL de meio de cultura composto por 20 g/L de amido, 20 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura, 2 g/L MgSO₄, 2 g/L de KH₂PO₄, 2 g/L de K₂HPO₄ em frascos de 500 mL, e mantidos por 24 horas a 32 ± 1°C e 200 rpm. Esse pré-inóculo foi então inoculado (8%, v/v) em um fermentador com volume de trabalho de 4,5 L, contendo meio de cultura composto de 5 g/L de amido, 5 g/L de glicose, 10 g/L de glicerina, 15 g/L de peptona, 20 g/L de soja em pó, 5 g/L de extrato de levedura, 2 g/L MgSO₄, 2 g/L de KH₂PO₄, 2 g/L de K₂HPO₄, 5 g/L de CaCO₃. O meio de cultura apresentou pH inicial 6,5. A agitação foi mantida a 200 rpm e a temperatura em 32°C ± 1°C. O caldo produzido foi centrifugado e o sobrenadante apresentou atividade específica de 0,25 U/mg de proteína após 42 horas de fermentação.

MACEDO et al. (2007) isolaram de amostras de solos do Brasil duas linhagens de *Streptomyces* sp. com atividade de MTGase, os quais foram identificados como *Streptomyces* sp. T10b e *Streptomyces* sp. P20, sendo que este último apresentou maior

atividade e foi utilizado para continuidade do estudo. Planejamento experimental foi utilizado para otimização do meio de cultura, sendo que o processo fermentativo foi realizado em incubador rotativo a 100 rpm, utilizando Erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de meio. O meio otimizado apresentou em sua composição 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 , sendo a atividade máxima de MTGase obtida de 1,4 U/mL de meio de cultivo, após 120 horas de fermentação.

A temperatura e agitação da fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliada e otimizada através de delineamento experimental utilizando frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo (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). A temperatura ótima para produção da enzima foi de 30°C e a agitação de 100 rpm (MACEDO et al., 2008).

LIU et al. (2008) clonaram o gene responsável pela produção da transglutaminase em *S. platensis* M5218 e o expressaram em *S. lividans* e estudaram a produção da MTGase recombinante em escala laboratorial e piloto. Na escala laboratorial, um fermentador *air-lift* de 30 L contendo 18 L de meio de cultivo (1% de glicose, 1% de glicerol, 1% de amido, 0,1% de sacarose, 1% de frutose, 0,5% de glicina, 0,05% de caseína, 0,5% de extrato de levedura, 0,05% de triptona, 0,05% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05% de polipeptona, 0,2% de MgSO_4 e 0,2% de K_2HPO_4 , com pH ajustado para 7,2) inoculado com 2 L de pré-inóculo no mesmo meio de cultivo. A fermentação foi conduzida a 30°C e aeração de 1 vvm durante 65 horas, sendo obtida atividade de transglutaminase de 5,8 U/mL de caldo fermentado. Na escala piloto, os autores utilizaram um reator de 250 L (com agitação e aeração) e volume útil de 130 L. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo da escala laboratorial, sendo inoculado com 13 L de inóculo. A fermentação foi realizada a 30°C, 1,0 vvm e 200 rpm durante 65 horas. A atividade de MTGase obtida foi de 2,54 U/mL. Assim, o valor obtido na escala piloto foi inferior ao obtido na escala laboratorial, sendo que foi observada dificuldade na aeração do meio de cultivo após o crescimento do microrganismo, reduzindo a produção da enzima na escala piloto.

Para o aumento de escala do processo fermentativo, é normal que determinados componentes do meio de cultura tenham que ser reavaliados quanto à concentração, visto que as condições de transferência de massa são distintas ao partir de um volume pequeno para um maior (TREICHEL, 2004).

I.2.3.3. Temperatura, pH, Agitação e Aeração

A agitação e aeração empregadas na fermentação têm grande relevância para os resultados do processo, visto que interferem em todos os parâmetros relacionados ao ambiente da fermentação. A quantidade de oxigênio dissolvida no meio de cultura bem como a de gás carbônico e a formação de espuma são relacionadas ao fluxo de ar e a transferência de oxigênio ao meio de cultura; pH, temperatura e a disponibilidade de nutrientes estão relacionados à homogeneidade do meio (STANBURY et al., 2003).

A temperatura do processo e os valores de pH do meio de cultura apresentam influência no metabolismo celular e, conseqüentemente no crescimento celular e na produção de metabólitos de interesse (ZHENG et al., 2001; ZHENG et al., 2002). A agitação e aeração promovem a mistura do meio através de forças de cisalhamento, além de promoverem a incorporação de oxigênio no caldo de cultura, fatores que podem interferir na morfologia de culturas submersas de bactérias filamentosas e conseqüentemente na produção de metabólitos alvo (STANBURY et al., 2003; JUNKER et al., 2004).

Poucos são os relatos da influência dos parâmetros de pH, temperatura, agitação e aeração sobre a produção de transglutaminase em especial, ao se buscar a transição entre escalas de processo.

ZHENG et al. (2001) verificaram a influência da temperatura na produção de transglutaminase em reator de bancada. A pré-cultura foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 75 mL de meio de cultura (20 g/L de peptona, 20 g/L de amido, 2 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de K_2HPO_4 , 2 g/L de MgSO_4) ajustado para pH 7,0, incubados por 40 horas a 30°C e agitação de 200 rpm. A batelada de fermentação

foi realizada em reator com volume de trabalho de 1,5 L, sendo utilizado inóculo de 150 mL. O meio utilizado foi similar ao do inóculo, sendo a quantidade de amido aumentada para 30g/L. A temperatura de fermentação foi estudada na faixa de 25 a 35°C, o pH foi mantido em 6,5, a aeração em 2 L/minuto e a agitação entre 400 e 500rpm. Os resultados dos experimentos mostraram que a temperatura ideal para o crescimento microbiano (32°C) foi superior a ideal para a produção de MTGase (28°C). Desta forma, dois estágios de temperatura foram utilizados para otimizar a produção da MTGase, sendo que nas 18 primeiras horas a temperatura de fermentação foi de 32°C e então reduzida para 28°C. A atividade de MTGase foi 14% superior ao valor obtido na fermentação a 30°C.

Em continuação a este estudo ZHENG et al. (2002) avaliaram a influência do pH na formação da MTGase e no crescimento celular de *Streptoverticillium mobaraense*. A preparação do pré-inóculo foi idêntica à utilizada no relato anterior, bem como o meio de cultura utilizado na fermentação. A aeração foi de 1,33 vvm, a temperatura mantida em 30°C e a agitação entre 400 e 500rpm. O pH do meio foi estudado na faixa de 5,0 a 8,5, sendo que em pH 5,0 e a partir de pH 8,0 o crescimento celular foi muito baixo. Valores de pH em torno de 7,0 favoreceram a redução da fase *lag* de crescimento bacteriano, enquanto que pH em torno de 6,5 favoreceram a produção de MTGase. Desta forma, a estratégia utilizada para buscar melhores resultados na produção da enzima foi utilizar o pH 7,0 no início do processo e após 13 horas alterar para 6,5. A atividade obtida foi 16% superior ao melhor resultado obtido com pH fixo. Esta estratégia também aprimorou os resultados de produtividade e rendimento da enzima. Foi obtida atividade de MTGase de 3,4 U/mL de meio de cultivo após 40 horas de fermentação.

YAN et al. (2005) estudaram a interferência da quantidade de oxigênio dissolvido (DO) no meio de cultura na produção da transglutaminase por uma linhagem mutante de *Streptoverticillium mobaraense*. A variação de DO foi obtida através da variação da agitação do meio, sendo observado que o valor deste parâmetro para o crescimento celular foi superior ao valor ideal para a produção de MTGase. Desta forma, um processo com duas etapas de agitação foi desenvolvido para otimização da produção da MTGase, sendo que nas primeiras 24 horas de processo a agitação foi de 450 rpm e então alterada

para 350 rpm e mantida até o final. A atividade enzimática foi elevada em 15,3%, sendo obtida atividade de transglutaminase de 3,3 U/mL de caldo fermentado e a produtividade foi de 83 U/L.h.

Conforme verificado, por relatos anteriores, as condições de processo para favorecimento do crescimento celular dos *Streptomyces* podem ser diferentes das necessárias para atingir máxima atividade enzimática, fator que pode ser de grande relevância para otimização do processo fermentativo.

I.2.3.4. Formação de espuma

A formação de espuma durante a fermentação pode ser desejada para alguns processos e prejudicial para outros. A espuma pode levar a perda de caldo, células e produto de interesse, elevar o risco de contaminação, além de dificultar a transferência de oxigênio no meio de cultura (STANBURY et al., 2003).

A espuma pode ser ocasionada devido a componentes do meio de cultura, e neste caso ocorre logo no início do processo, ou pode ser formada pelo microrganismo, vindo a ocorrer após certo tempo de início do processo. O controle da formação da espuma pode ser conseguido através do controle dos componentes do meio ou da linhagem de microrganismo, bem como pelo uso de anti-espumantes mecânicos ou químicos. O controle da espuma através de agentes químicos é um dos mais empregados e deve ser balanceado para evitar deficiências na transferência de oxigênio (evitar a coalescência das bolhas de ar), bem como, no caso de microrganismos filamentosos, possibilitar a formação da morfologia desejada para o processo (STANBURY et al., 2003).

I.2.4. Produção de MTGase por fermentação em meio semi-sólido

A produção de metabólitos pela fermentação em substratos sólidos, denominada fermentação semi-sólida, caracteriza-se pelo cultivo de microrganismos em uma matriz sólida umedecida, com ausência de fase líquida macroscópica (PANDEY, 2003). Esta técnica de fermentação têm sido aplicada para produção de alimentos fermentados, enzimas, ácidos orgânicos, aromas e biopesticidas, apresentando como vantagens frente a fermentação submersa o fato de reduzir a geração de efluentes, a possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato, o baixo consumo de energia no processo e a necessidade de equipamentos com dimensões reduzidas e de baixo custo, além dos metabólitos serem obtidos mais concentrados. Como desvantagem, o processo pode apresentar resistência a transferência de calor, gerando gradientes de temperatura, elevado volume de inóculo, além da necessidade de microrganismos que cresçam e se desenvolvam em baixos valores de atividade de água (RAIMBAULT, 1998).

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem produzir metabólitos em fermentação em meio semi-sólido, sendo que os fungos filamentosos apresentam grande destaque neste processo, pela adaptação facilitada ao tipo de cultivo. O desenvolvimento de hifas facilitam o espalhamento do microrganismo sobre o substrato, permitindo o consumo de nutrientes disponíveis (RAIMBAULT, 1998).

Os parâmetros de processo como temperatura, pH, atividade de água e nível de oxigênio são importantes para o desenho do processo fermentativo em meio semi-sólido.

A atividade de água deve ser baixa, no entanto suficiente para permitir o crescimento do microrganismo e a produção de metabólitos de interesse (PANDEY, 2003). Em geral a umidade dos substratos na fermentação em meio semi-sólido varia de 30 a 85% e este teor dependerá do tipo de substrato utilizado em relação a disponibilização da água adicionada. O cultivo de *Aspergillus niger* em arroz necessita de umidade de 40% em contraste ao cultivo deste microrganismo em resíduos de café, no qual necessita de umidade em torno de 80% (RAIMBAULT, 1998).

A aeração do substrato também é um ponto fundamental para permitir o crescimento microbiano, mantendo as condições de aerobiose da fermentação, além de contribuir para a manutenção da temperatura do substrato e regulação de sua umidade. A transferência de oxigênio entre o substrato e os micélios aéreos é facilitada devido à área de contato destes com o ar, no entanto o tamanho das partículas do substrato e suas características após tratamentos prévios podem interferir na transferência de oxigênio e também de calor (RAIMBAULT, 1998).

Os substratos utilizados na fermentação em meio semi-sólido, em geral, são resíduos agroindustriais, os quais podem ser suplementados com nutrientes, sendo uma opção de baixo custo para obtenção de metabólitos produzidos por microrganismos. O substrato deve ser insolúvel, servindo tanto de substrato como suporte para o crescimento do microrganismo. O substrato deve apresentar tamanho de partícula suficiente para permitir a transferência de oxigênio e calor, além de apresentar elevada superfície de contato com o microrganismo, sem compactar (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2003).

Recentemente foi avaliada a produção de MTGase por fermentação em meio semi-sólido como alternativa à fermentação submersa, buscando elevar a produtividade da MTGase além da redução de custos do processo fermentativo, elevando a viabilidade de aplicação industrial da enzima transglutaminase. Os resultados obtidos foram animadores.

SOUZA et al. (2008) estudaram a produção de transglutaminase por fermentação em meio semi-sólido, pela linhagem de *Bacillus circulans* BL32, isolado da Amazônia. Foram avaliados como substratos sólidos *grits* de milho, extrato seco de resíduo de arroz, resíduo fibroso de soja (rico em açúcares e proteínas), casca de soja e bagaço de malte, todos resíduos agroindustriais, umedecidos com solução salina (0,2 g/L MgSO_4 ; 1,0 g/L KH_2PO_4 ; 1,0 K_2HPO_4 ; 1,0 g/L NH_4NO_3 ; 0,02 g/L de CaCl_2 e 0,05 g/L de FeCl_2). Estes substratos foram utilizados sem tratamentos prévios. A fermentação foi realizada em reatores cilíndricos, a 30°C por 168 horas, sendo insuflado ar estéril saturado de umidade na vazão de 0,25 L/min. O substrato que proporcionou a maior atividade enzimática foi o resíduo fibroso de soja, sendo a produção da MTGase de *Bacillus circulans* BL32 otimizada

para este substrato através de delineamento experimental e obtida atividade enzimática de 1,28 U/g de substrato seco em 48 horas de fermentação. A fermentação em meio semi-sólido foi comparado com a fermentação submersa de *Bacillus circulans* BL32 através da relação entre atividade enzimática por grama de açúcares redutores presentes nos substratos de cada fermentação, sendo que em meio semi-sólido a produção de MTGase foi de 47,4 U/g de açúcares redutores enquanto a atividade obtida por fermentação submersa foi de 27,6 U/g de açúcares redutores.

NAGY e SZAKACS (2008) estudaram a produção de transglutaminase por linhagens de *Streptomyces* (*S. mobaraensis* NRRL B-3729, *S. paucisporogenes* ATCC 12596 e *S. platensis* NRRL 2364) em fermentação semi-sólida. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 10 g de substrato umedecido com solução de sais (0,8 mg/L MgSO₄; 5,0 g/L KH₂PO₄; 1,0 g/L de NaCl; 5,0 g/L NH₄NO₃; 1 mg/L de CoCl₂; 1,7 mg/L ZnSO₄; 2,5 mg/L FeSO₄ com pH ajustado para 6,0) e inoculados com 1mL de suspensão de células dos microrganismos em água destilada. Os frascos foram incubados a 30°C sem agitação. A extração da enzima foi realizada com 100 mL de água destilada e 0,1% de Tween-80, sob agitação a temperatura ambiente por duas horas. Os melhores resultados obtidos foram com a linhagem *S. platensis* NRRL 2364 utilizando como substrato feijão vermelho. A atividade de transglutaminase atingida foi de 5,1 U/g de substrato seco após 7 dias de fermentação. Outros substratos que apresentaram atividade significativa na obtenção de atividade de MTGase por fermentação semi-sólida de *Streptomyces* sp. foram soja verde, e feijão preto.

Assim como a produção elevada de MTGase por *Bacillus circulans* em fermentação semi-sólida pode estar relacionada a maior capacidade deste microrganismo esporular nas condições da fermentação em meio semi-sólido em relação à fermentação submersa (SOUZA et al., 2003), a produção desta enzima por linhagens de *Streptomyces* sp. em fermentação semi-sólida pode estar relacionada à hipótese proposta por YAN et al. (2005) de que esta enzima estaria envolvida na formação de ligações cruzadas entre proteínas da parede celular destes microrganismos durante a formação do micélio.

I.3. Material e métodos

I.3.1. Divisão de atividades por capítulo

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que o fluxograma apresentado na Figura I-3 apresenta a sequência de atividades em cada capítulo.

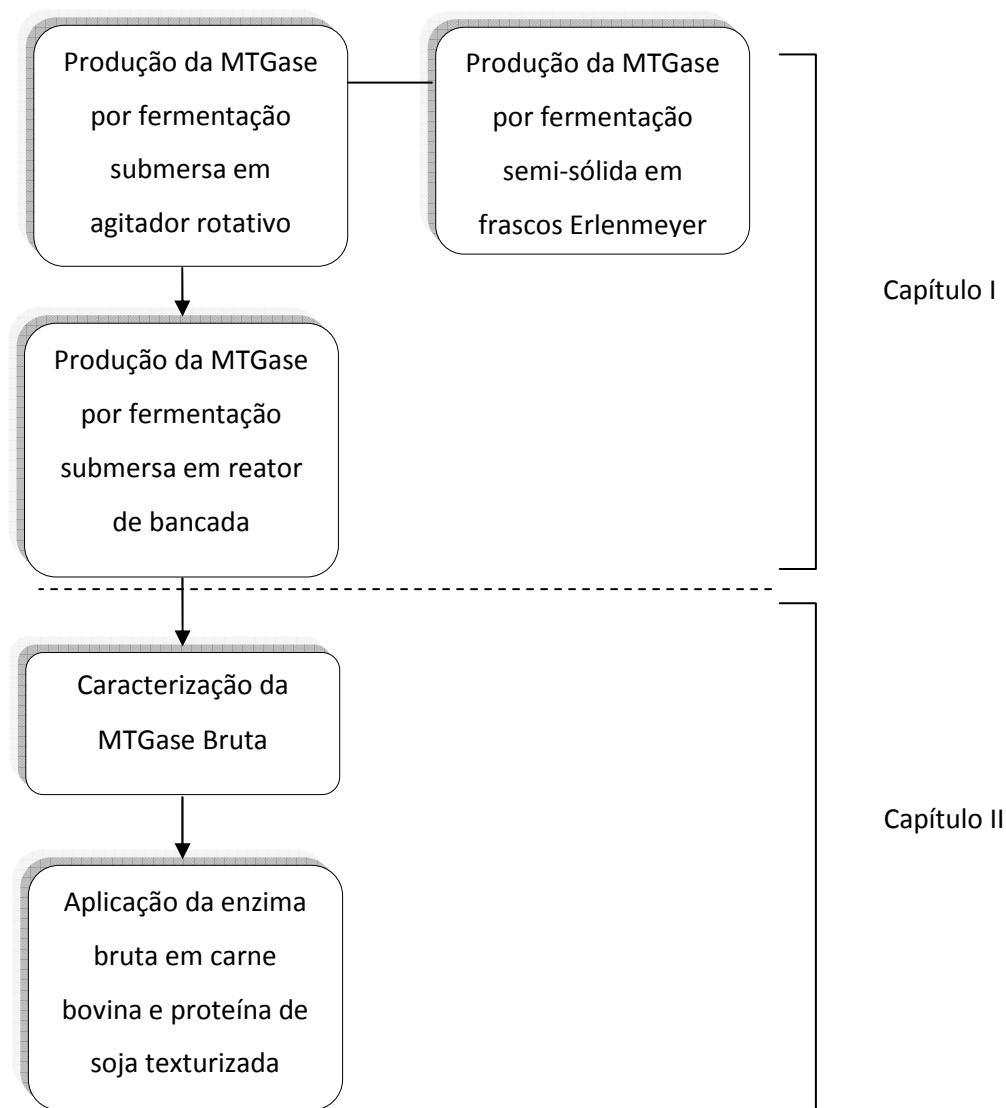


Figura I-3 – Fluxograma de atividades por capítulo.

I.3.2. Metodologias analíticas

I.3.2.1. Determinação da atividade de MTGase

A atividade de transglutaminase foi determinada utilizando-se o substrato N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (CBZ-glutaminil-glicina), como descrito por GROSSOWICZ et al. (1950) e adaptado por FOLK e COLE (1966).

A mistura de 200µL de enzima; 75µL de solução de CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 30mM; 25µL de solução de hidroxilamina 0,1M; 200 µL de tampão citrato 0,2M pH 6,0, foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação, foi adicionado 500µL de reagente paralisante, composto de 1/3 de ácido tricloroacético 15%, 1/3 de HCl 2,5N e 1/3 de solução de cloreto férrico 5% em HCl 0,1N (v:v). A mistura foi centrifugada por 1 minuto e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 525 nm contra o branco.

Uma unidade de atividade de transglutaminase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 µMol de ácido hidroxâmico por minuto. A curva padrão foi preparada com o L-ácido glutâmico-γ-ácido monohidroxâmico (Sigma G2253-100MG).

I.3.2.2. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de LOWRY modificado (HARTREE, 1972).

Tubos de ensaio contendo 2mL de amostra e 1,8 mL do 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 do reagente B. Após 10 minutos de repouso foi

adicionado 6 mL de solução diluída de Folin-Ciocalteou (1:15) e os tubos de ensaio foram incubados a 50°C por 10 minutos. Após resfriamento, a absorbância foi determinada a 660 nm. A curva padrão foi preparada com albumina de ovo.

O reagente A foi preparado pela dissolução de 2 g de tartarato de sódio e potássio e 100g de Na_2CO_3 em 50 mL de NaOH 0,1N. O volume foi completado para 1 L com água destilada.

O reagente B foi preparado pela dissolução de 5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 10 g de tartarato de sódio e potássio em 50 mL de NaOH 1 N. O volume foi completado para 500 mL com água destilada.

I.3.2.3. Determinação de açúcares totais

A determinação dos açúcares totais presentes no caldo fermentado foram avaliados pelo método do DNS, descrito por MILLER et al, 1959. A análise foi realizada no sobrenadante do caldo das fermentações centrifugados a 9630 x g por 10 minutos a 5°C, submetido à hidrólise ácida. Esta hidrólise foi realizada incubando-se 2mL da amostra e 2mL de ácido clorídrico 2N em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e a mistura da reação foi neutralizada pela adição de 2mL de solução de hidróxido de sódio 2N.

Tubos de ensaio contendo 0,5mL da amostra hidrolisada e 0,5 mL de solução DNS foram incubados em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram resfriados em banho de gelo e foi adicionado 8 mL de solução de tartarato de sódio e potássio hidratado (15,1 g/L tartarato de sódio e potássio hidratado) aos tubos de ensaio. A absorbância foi medida a 540 nm. A curva de calibração foi preparada com solução de sacarose.

O reagente DNS foi preparado pela dissolução de 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em água destilada, a quente. O volume foi completado para 1500 mL. Em seguida foram adicionados 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de metabissulfito de sódio à solução.

I.3.2.4. Determinação de massa seca

Para a determinação da massa celular seca, alíquotas de 5 mL do meio de cultura foram centrifugadas a 9630 x g por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi lavada com 5 mL de água destilada. A massa celular foi recuperada por centrifugação como descrito acima. O processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante não apresentasse coloração. As amostras de massa celular precipitadas foram transferidas para placas de Petri, secas e previamente pesadas, as quais foram mantidas em estufa a 105°C até atingir massa constante. Do valor obtido foi subtraída a massa referente ao branco (meio de cultivo não inoculado submetido à mesma sequência de procedimentos do tratamento das amostras). O resultado foi expresso em gramas de massa seca por mL de meio de cultivo.

I.3.3. Produção de MTGase por fermentação microbiana

I.3.3.1. Microrganismo

O microrganismo *Streptomyces* sp. P20, isolado por MACEDO et al., 2007, foi utilizado em todos os ensaios para obtenção da MTGase.

O microrganismo foi cultivado em placas de Petri contendo ágar extrato de malte (4,0 g/L de extrato de levedura, 10,0 g/L de extrato de malte, 4,0 g/L de glicose, 20 g/L de agar-agar, pH 7,0) sendo incubado por 5 dias a 30°C. Após este período, foi feita a segunda

repicagem do microrganismo em ágar extrato de malte. As placas foram incubadas por mais 5 dias a 30°C e então o ágar, recoberto regularmente pelo microrganismo, foi recortado em cilindros de 0,6 cm de Ø, os quais foram transferidos assepticamente para criotubos contendo solução de glicerol 10%, previamente esterilizados. Os criotubos foram armazenados a -80°C.

I.3.3.2. Produção de MTGase por fermentação submersa em frascos agitados

Primeiramente foi avaliada a produção de MTGase em frascos Erlenmeyers agitados de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura otimizado por MACEDO et al., 2007, composto por 2,5% de farinha de soja, 2,0% de amido de batata, 0,1% de glicose, 1,0% de peptona, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 . Os frascos foram inoculados com 2 cilindros de ágar de 0,6 cm de Ø cobertos com o microrganismo preparados conforme descrito anteriormente. As condições de incubação avaliadas estão apresentadas na Tabela I-1. Os frascos Erlenmeyer foram incubados durante 120 horas, conforme descrito por MACEDO et al. (2007). A atividade de transglutaminase foi determinada no sobrenadante do caldo fermentado centrifugado a 9630 x g por 10 minutos a 5°C. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados através do teste estatístico de Tukey, realizado pelo software MINITAB[®] 14.1. Estes resultados foram utilizados como referência para avaliação do resultado do aumento de escala do processo de fermentação.

Tabela I-1 - Ensaio para produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em frascos de Erlenmeyer de 50 mL

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)
1	28	50
2	28	50
3	32	150
4	32	150
5	30	100

Em seguida, foi verificada a produção da MTGase em frascos Erlenmeyers agitados de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo otimizado por MACEDO et al., 2007. Cada frasco foi inoculado com 6 cilindros de ágar preparados como descrito no item I.3.2.1. A atividade enzimática foi avaliada após 120 horas de incubação a 30°C e 100 rpm, no sobrenadante do caldo de cultivo centrifugado a 9630 x g por 10 minutos a 5°C, seguindo procedimento descrito anteriormente. O crescimento do microrganismo foi observado visualmente para identificação da morfologia predominante no meio de cultivo.

I.3.3.3. Preparação do meio de cultivo para fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator com o meio de cultivo otimizado por MACEDO et al. (2007) composto de 2,5% de farinha de soja, 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , de alta viscosidade, verificou-se formação intensa de espuma que provocava o arraste das partículas de farinha de soja, microrganismos e outros compostos do meio para a parede do reator, desestabilizando a fermentação (Figura I-4).



Figura I-4 - Formação de espuma durante a fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em meio de cultivo de alta viscosidade, em reator de bancada.

Desta forma, foi testada a substituição do componente farinha de soja do meio de cultivo descrito por MACEDO et al. (2007) por extrato de farinha de soja, preparado conforme ilustrado na Figura I-5.

A mistura de 2,5g de farinha de soja em 74 mL de água destilada foi agitada intensamente por 30 minutos em agitador turrax (Quimis, Q325.1) e filtrado em gaze. Ao extrato de farinha de soja obtido foi adicionado 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 . O pH foi ajustado para 7,0 com solução 1mol/L de NaOH e o volume completado para 100 mL.

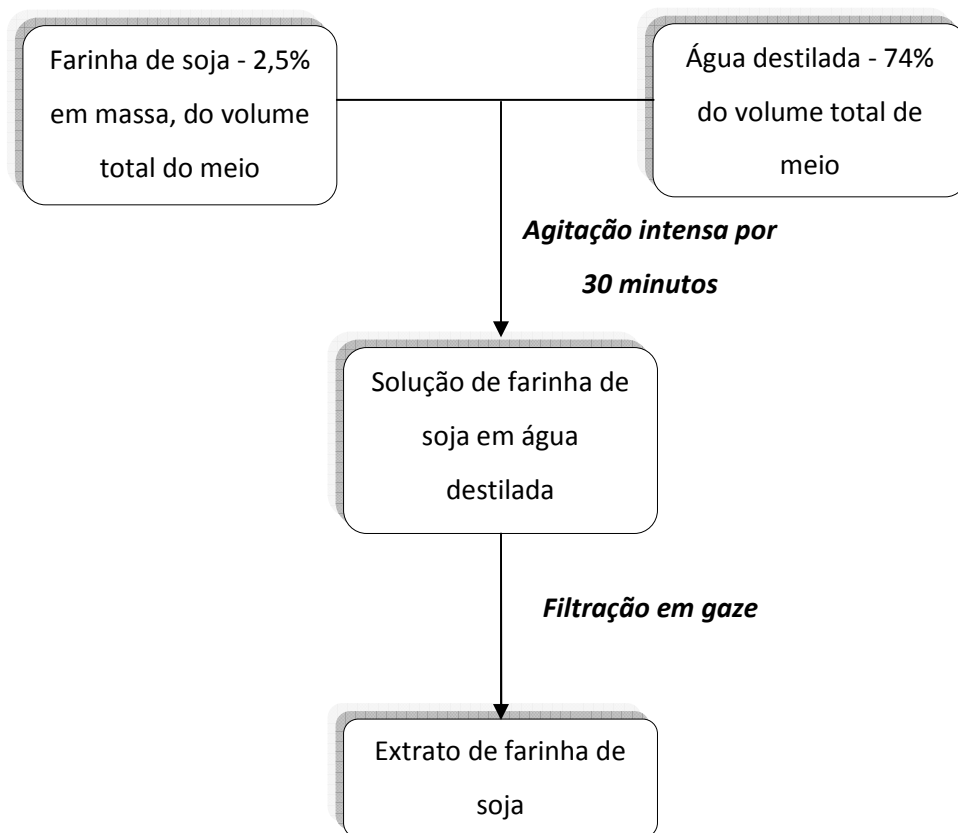


Figura I-5 - Preparo do extrato de farinha de soja

Os frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo foram inoculados de forma idêntica a descrita no teste anterior e incubados a 30°C, 100rpm por 120 horas. Após este período, a atividade de MTGase foi determinada no sobrenadante, conforme metodologia previamente descrita, e o valor médio da atividade foi comparado pelo teste de Tukey com o valor obtido no ensaio anterior. Os ensaios foram realizados em triplicata e o crescimento do microrganismo foi observado visualmente para verificação da morfologia de crescimento do microrganismo. Estes parâmetros foram definidos para obtenção do inóculo para a fermentação em reator de bancada.

I.3.4. Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 por fermentação submersa em reator de bancada

Foram estudados os efeitos da temperatura, agitação e aeração, na produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 utilizando-se o meio de cultura (B) descrito na Tabela I-2 em reator de bancada (Bioflow IIC, Newbrunswick.Co) de 6L com volume de trabalho de 3 L. Desta forma, os componentes do meio de cultura, pH e o volume e forma de obtenção do pré-inóculo foram mantidos fixos para todos os ensaios (Tabela I-2), enquanto a temperatura, agitação e aeração foram variados.

Tabela I-2 - Valores utilizados para os componentes do meio de cultivo (B), pH e pré-inóculo, fixados para a fermentação em reator de bancada.

Variável	Valor
Meio de cultivo	
<i>Farinha de soja*</i>	2,5 %
<i>Peptona</i>	1,0 %
<i>Amido de Batata</i>	2,0 %
<i>Glicose</i>	0,1 %
<i>KH₂PO₄</i>	0,4 %
<i>MgSO₄</i>	0,2 %
pH	7,0 ±0,2
Inóculo	
<i>Volume</i>	300 mL
<i>Parâmetros de incubação</i>	100 rpm e 30°C, 72 horas de incubação

*A farinha de soja foi adicionada na forma de extrato, conforme descrito anteriormente.

I.3.4.1. Ensaios prévios

Inicialmente duas condições de processo foram avaliadas no reator, tendo como referência os trabalhos realizados por ANDO et al. (1989) e YAN et al. (2005). A Tabela I-3 apresenta os parâmetros utilizados nestes testes. Devido às limitações do equipamento, a aeração máxima para este reator foi de 1,1 vvm.

Tabela I-3 - Temperatura, agitação e aeração dos ensaios prévios em reator de bancada

Ensaio	T (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Incubação do Pré- inóculo
A	30	150	0,5	100 rpm, 30°C
B	28	250	0,8	150 rpm, 28°C

I.3.4.2. Delineamento experimental para produção de MTGase em reator de bancada

Um planejamento fatorial 2^3 , com 3 repetições no ponto central, foi utilizado para verificar os efeitos da temperatura, agitação e aeração na produção de MTGase em reator de bancada. A atividade enzimática foi acompanhada em cada experimento periodicamente, até 86 horas de fermentação, sendo a análise realizada no sobrenadante do caldo fermentado centrifugado a 9630 x g por 10 minutos a 5°C, segundo a metodologia descrita anteriormente. O pH do meio de cultura não foi controlado, sendo apenas monitorado no sobrenadante utilizando o potenciômetro Orion (modelo 710-A) previamente calibrado.

O meio de cultura utilizado foi descrito por MACEDO et al., 2007, com exceção da farinha de soja que foi aplicada em forma de extrato, conforme descrito anteriormente. A cuba de fermentação foi preenchida com 2700 mL de meio de cultivo e autoclavada a

121°C, por 30 minutos. O inóculo, fixado em 300 mL, foi adicionado assepticamente à cuba estéril. Durante a fermentação, o antiespumante DC*FG-10 (Dow Corning®) foi automaticamente gotejado quando a espuma atingia o nível do sensor de espuma, evitando que o meio de cultivo transbordasse. A Figura I-6 apresenta o esquema do fermentador.

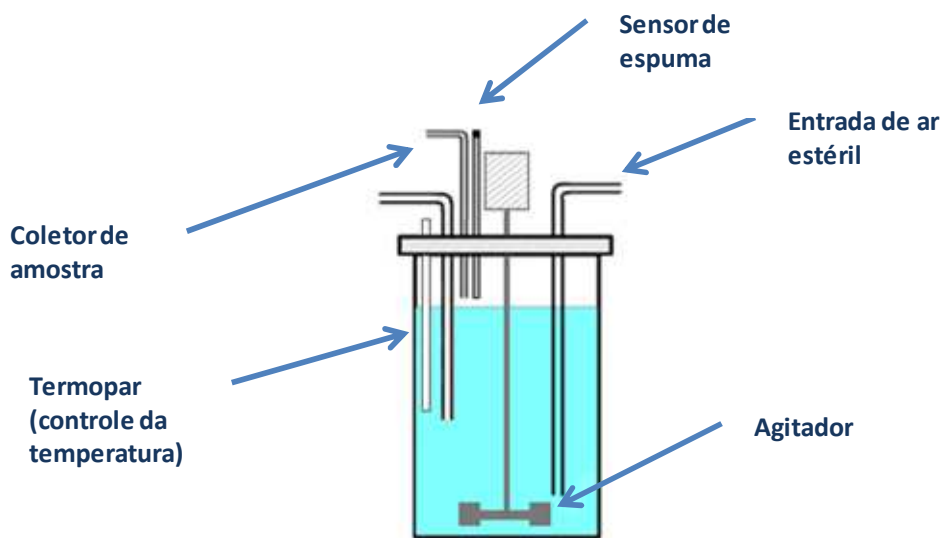


Figura I-6 - Ilustração do fermentador utilizado para produção de MTGase

A Tabela I-4 apresenta os valores utilizados em cada nível de estudo do planejamento, para cada parâmetro avaliado. Cada um dos 11 ensaios que compõe o planejamento experimental foi realizado em ordem aleatória, sendo aleatorizado com o auxílio do *software Microsoft Excel*.

Tabela I-4 - Valores utilizados em cada nível de estudo para as variáveis do planejamento fatorial 2^3

Parâmetros	-1	0	1
Temperatura (°C)	26	30	34
Agitação (rpm)	150	250	350
Aeração (vvm)	0,5	0,8	1,1

O efeito de cada variável na produção da MTGase foi obtido através do software *Statistica 7.0*, sendo que a produção de MTGase e a produtividade (a qual foi calculada pela razão entre a máxima atividade e o tempo em horas para obtenção desta atividade) foram as respostas avaliadas.

Um modelo linear para produção da enzima foi avaliado para as respostas, sendo a análise estatística realizada pelo *Statistica 7.0*. Este modelo, que apresenta utilidade para prever as respostas da produção da enzima, não foi validado através de outros experimentos além dos que compuseram a planejamento fatorial e os 3 pontos centrais.

I.3.4.2.1. Pré-Inóculo

O pré-inóculo, conforme citado anteriormente, foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo. Os Erlenmeyers foram incubados a 30°C, 100 rpm por 72 horas e 300mL do pré-inóculo foram transferidos assepticamente para a cuba de fermentação.

Com o objetivo de se comparar a morfologia de crescimento do microrganismo no reator, em que foram obtidos os melhores valores de atividade de MTGase, e a morfologia do pré-inóculo, um novo ensaio em agitador rotativo foi realizado. Desta forma, frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo foram incubados a 30°C e 150 rpm por 120 horas. A atividade foi determinada no sobrenadante de forma idêntica a descrita nos testes anteriores. A morfologia do crescimento do microrganismo foi observada visualmente.

I.3.4.3. Produção da enzima em reator de bancada utilizando dois estágios de temperatura e agitação

Foi estudada a fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada, utilizando-se controle da temperatura e agitação em dois estágios com a finalidade de elevar a atividade de transglutaminase, como sugerido por ZHENG et al. (2000) e YAN et al. (2005), e reduzir o tempo de fermentação para obtenção da atividade máxima. O meio de cultura utilizado e a forma de preparo foram idênticos aos descritos anteriormente para o reator de bancada. A temperatura utilizada nas primeiras 24 horas de fermentação foi de 34°C e a agitação de 350 rpm. Após este período, a temperatura foi reduzida para 26°C e a agitação para 150 rpm. A mudança dos parâmetros foi realizada gradativamente dentro do período de 1 hora. A atividade enzimática foi acompanhada periodicamente até atingir 86 horas de fermentação, e determinada conforme descrito anteriormente.

I.3.5. Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 em fermentação em meio semi-sólido em frascos Erlenmeyer

A produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi testada em meio semi-sólido composto de farelo de soja e farinhas de soja, amendoim, feijão branco e feijão preto. Os grãos foram moídos em moinho até obtenção de uma farinha.

A fermentação foi conduzida em Erlenmeyer de 250 mL contendo 19g de substrato umidificado com solução de sais (1g/L K_2HPO_4 , 1g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L $MgSO_4$ e 0,3 g/L $CaCl_2$), esterilizado em autoclave a 121°C, 1atm por 20 minutos. Os frascos foram inoculados com 12 cilindros de agar de 0,6 cm de $\varnothing$ contendo o microrganismo em estudo (obtidos da mesma forma descrita anteriormente) e incubados durante 7 dias a 30°C. Os

ensaios foram realizados em triplicata. A proporção entre solução e substrato foi variada de acordo com a Tabela I-5.

Tabela I-5 - Proporção entre substrato e solução de sais utilizada na fermentação semi-sólida

Substrato	Substrato: Solução de sais (m/m)		
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
Farinha de soja	2:1	1:1	1:2
Farelo de soja	2:1	1:1	1:2
Farinha de amendoim	2:1	1:1	1:2
Farinha de feijão preto	2:1	1:1	1:2
Farinha de feijão branco	2:1	1:1	1:2

A extração da enzima produzida extracelularmente foi realizada pela adição de 50mL de água destilada nos frascos de fermentação. Os frascos foram incubados a 20°C sob agitação de 150 rpm por 2 horas. As amostras foram centrifugadas a 9630 x g por 10 minutos a 5°C. A atividade enzimática dos sobrenadantes foi determinada como descrito no item I.4.1.1. Os resultados foram expressos em unidades de atividade por grama de substrato seco utilizado na fermentação.

I.4. Resultados e discussão

I.4.1. Produção de MTGase por fermentação submersa da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em frascos agitados

A Tabela I-6 ilustra a produção de transglutaminase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 após 120 h de fermentação em frascos agitados de 50 mL, contendo 15 mL de meio de cultura otimizado por MACEDO et al.(2007). Foi obtida maior atividade (0,285

U/mL) de transglutaminase na fermentação do microrganismo a 28°C e 150 rpm (ensaio 2).

Comparando-se o efeito da agitação dos frascos na fermentação do microrganismo a 28°C, observou-se que foi obtida maior atividade no meio de cultura agitado a 150 rpm (ensaio 2) do que no meio de cultura agitado a 50 rpm (ensaio 1) em que foram obtidos respectivamente 0,285 U/mL e 0,036 U/mL.

Na fermentação do microrganismo a 28°C e 150 rpm foi obtida maior atividade de transglutaminase do que a 32°C e 150 rpm, em que foram obtidos respectivamente 0,285 U/mL e 0,152 U/mL.

Tabela I-6 - Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 em frascos Erlenmeyer de 50 mL agitados contendo o meio de cultura (A) otimizado por MACEDO et al. (2007)

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)	Atividade Média (U/mL)	Desvio padrão
1	28	50	0,036 ^c	0,002
2	28	150	0,285 ^a	0,090
3	32	50	0,026 ^c	0,005
4	32	150	0,152 ^b	0,009
5	30	100	0,180 ^b	0,008

A análise estatística dos dados obtida através do teste de Tukey, com 95% de confiança, apontou que os resultados dos ensaios 1 e 3 não apresentaram diferença significativa, bem como os ensaios 4 e 5.

MACEDO et al., (2007) obtiveram 1,4 U/mL, na fermentação do mesmo microrganismo e no mesmo meio de cultivo em frascos agitados a 150 rpm a 30°C. MACEDO (2009) verificou que a forma de preservação do microrganismo é importante para a produção de transglutaminase e propôs a metodologia de cultivo do microrganismo em placas de petri contendo o meio extrato de malte (4 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte, 4 g/L de glicose e 20 g/L de agar, pH ajustado para 7,0) e

armazenamento de discos da cultura em tubos contendo glicerol a -80°C. Os resultados de atividade de transglutaminase obtidos no presente trabalho foram inferiores ao trabalho descrito por MACEDO et al., (2007).

Considerando-se que o meio de cultivo (meio A) otimizado por MACEDO et al. (2007) não se mostrou adequado para a fermentação de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada devido à intensa formação de espuma, foi testada a fermentação do microrganismo, conforme descrito no item I.3.4, com meio de cultivo contendo o extrato de farinha de soja (meio B) em lugar de 2,5% de farinha de soja (meio A) em frascos agitados de 250 mL com 50 mL a 30°C e 100rpm, visando verificar se a modificação do meio permitiria a obtenção de atividade de MTGase e de estabelecer uma condição satisfatória para obtenção do pré-inóculo para a fermentação em reator de bancada.

A Tabela I-7 mostra que foram obtidos respectivamente 0,299 U/mL e 0,204 U/mL na fermentação do microrganismo em frascos Erlenmeyer de 250 mL a 30°C e 100 rpm nos meios de cultivo A (farinha de soja) e B (extrato de farinha de soja), respectivamente. O crescimento do microrganismo na forma de *pellets* foi similar em ambos meios de cultura.

Tabela I-7 - Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 em meios de cultivos contendo farinha de soja (meio A) ou extrato de farinha de soja (meio B) em frascos Erlenmeyer de 250 mL agitados

Meio de Cultivo	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)	Atividade Média (U/mL)	Desvio padrão	Crescimento microbiano (visual)
Meio A	30	100	0,299 ^a	0,034	Crescimento em <i>pellets</i> uniformes com cerca de 0,05cm
Meio B	30	100	0,204 ^a	0,040	Crescimento em <i>pellets</i> uniformes com cerca de 0,05cm

O teste de Tukey realizado com o auxílio do software MINITAB[®] 14.1 indicou que, com 95% de significância, não existe diferença significativa entre os testes, sendo possível

utilizar o extrato da farinha de soja obtido conforme descrito anteriormente, em substituição à farinha. Esta condição de processo foi definida para produzir o pré-inóculo da fermentação no reator de bancada.

JUNQUA et al. (1997) estudaram a produção de transglutaminase por *Streptoverticillium cinnamoneum* CBS 683.68 em frascos agitados de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo (10,5 g/L peptona de soja, 31,2 g/L glicerol, 2,5 g/L extrato de levedura, 38,4 g/L de caseína, 0,5g/L MgSO_4 , 2g/L KH_2PO_4 , 5g/L de Na_2HPO_4), agitados a 140 rpm a 28°C, sendo obtida atividade de transglutaminase de 0,3 U/mL com aproximadamente 196 horas de fermentação.

TÉLLEZ-LUIS et al. (2004) avaliaram a produção de transglutaminase por *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191, sendo obtida atividade de MTGase de 0,77 U/mL de meio de cultivo, composto de 10,5 g/L de peptona, 2,5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de caseinato de sódio, 50,5 g/L de glicerol, 0,5 g/L de MgSO_4 , 2 g/L de KH_2PO_4 , 5 g/L de Na_2HPO_4 , após a incubação dos frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo a 350 rpm.

I.4.2. Produção de MTGase por fermentação submersa da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

I.4.2.1. Testes preliminares

No estudo preliminar do efeito da temperatura, agitação e aeração do reator na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 e produção de MTGase em meio de cultivo descrito no item I.3.4 (meio B) foi obtido maior atividade (1,20 U/mL) nas condições do ensaio B, a 28°C, 250 rpm e aeração de 0,8 vvm após 66 horas de incubação.

Tabela I-8 - Condições de temperatura, agitação e aeração do reator na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 e produção de MTGase máxima

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade de MTGase (U/mL)	Tempo de fermentação (h)
A	30	150	0,5	0,248	70
B	28	250	0,8	1,199	66

ANDO et al. (1989) obtiveram atividade de transglutaminase elevada (2,5 U/mL) na fermentação da linhagem *Streptoverticillium* S-8112 em reator de 20 L com agitação de 250 rpm e aeração de 0,5vvm durante após 72 horas, com meio de cultivo composto de 2,0% de polipeptona, 2,0% de amido solúvel, 0,2% de K₂HPO₄, 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de MgSO₄ e 0,05% de surfactante (Adekanol).

YAN et al.(2005) estudaram a produção de transglutaminase pela linhagem *S. mobaraense* WSH-Z2 em reator de 5L, contendo 3,8 L de meio de cultivo composto de 15 g/L de amido, 15 g/L de glicose, 25 g/L de peptona, 4 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de MgSO₄, 2 g/L de K₂HPO₄, 2 g/L de KH₂PO₄, com pH ajustado para 6,8, obtendo maior produção de enzima (2,88 U/L) após 40 horas de fermentação, a 30°C, 350 rpm e aeração de 1vvm. Os autores observaram que agitação superior a 350 rpm resultou em diminuição da produção da enzima.

Os ensaios preliminares realizados tiveram grande importância na definição dos valores utilizados nas variáveis do planejamento experimental, permitindo, também, observar o comportamento do meio de cultivo quanto à formação de espuma e aumento de viscosidade devido ao crescimento microbiano e assim facilitando o posicionamento do sensor de espumas e do consumo de antiespumante.

I.4.2.2. Delineamento experimental para produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

I.4.2.2.1. Análise da atividade de MTGase

A Tabela I-9 ilustra os resultados do delineamento experimental para estudo do efeito de temperatura, agitação e aeração do reator na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 e produção de MTGase. Os valores da atividade de transglutaminase foram avaliados, na análise estatística do planejamento experimental, para o tempo de fermentação de 62 horas, no qual a maioria dos ensaios apresentou a máxima atividade.

Tabela I-9 - Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial 2^3 , valores de atividade de MTGase máximos e tempo de obtenção

Ensaio	Ordem de execução	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Atividade de MTGase máxima (U/mL)	Tempo (h)	Atividade de MTGase em 62 horas
1	3	-1 (26)	-1 (150)	-1 (0,5)	0,559	86	0,2095
2	7	1 (34)	-1 (150)	-1 (0,5)	0,281	72	0,1656
3	2	-1 (26)	1 (350)	-1 (0,5)	0,642	66	0,6353
4	6	1 (34)	1 (350)	-1 (0,5)	0,279	42	0,1047
5	10	-1 (26)	-1 (150)	1 (1,1)	0,953	62	0,9534
6	4	1 (34)	-1 (150)	1 (1,1)	0,602	62	0,5302
7	11	-1 (26)	1 (350)	1 (1,1)	0,532	66	0,4926
8	8	1 (34)	1 (350)	1 (1,1)	0,632	24	0,3049
9	5	0 (30)	0 (250)	0 (0,8)	0,564	66	0,4614
10	9	0 (30)	0 (250)	0 (0,8)	0,555	66	0,4546
11	1	0 (30)	0 (250)	0 (0,8)	0,537	62	0,5366

A Tabela I-10 apresenta os efeitos de cada variável, bem como de suas interações e a avaliação estatística de cada efeito para verificação de suas significâncias.

Tabela I-10 - Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor para a atividade de MTGase do planejamento 2³ em reator de bancada em 62 horas de fermentação

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t(3)	p-valor
Média/Interação*	0,4408	0,0137	32,1312	0,0010
Temperatura (L)*	-0,2964	0,0322	-9,2117	0,0116
Agitação (L)	-0,0803	0,0322	-2,4958	0,1300
Aeração (L)*	0,2915	0,0322	9,0599	0,0120
Temperatura x agitação	-0,0628	0,0322	-1,9512	0,1903
Temperatura x aeração	-0,0091	0,0322	-0,2834	0,8035
Agitação x aeração*	-0,2627	0,0322	-8,1660	0,0147

$R^2 = 0,86$, *Fatores com efeito significativo

O erro padrão foi estimado a partir do erro puro. Para a atividade de MTGase, observou-se que a temperatura e a aeração apresentaram efeito sobre a atividade enzimática em 62 horas de fermentação, sendo que o aumento da temperatura influenciou negativamente a produção da enzima enquanto o aumento da aeração apresentou efeito positivo sobre esta resposta. O p-valor calculado para cada variável e para a interação entre elas indica que a agitação, a interação entre temperatura e aeração e entre temperatura e agitação não apresentaram efeitos significativos, com 90% de confiança. O modelo linear codificado contendo os termos significativos pode ser observado na equação I-1. A Tabela I-11 ilustra a análise de variância (ANOVA) realizada para verificar a adequação estatística do modelo linear codificado aos pontos reais.

$$\text{Atividade máxima (U/mL)} = 0,441 - 0,148 T + 0,146 \text{ VVM} - 0,131 \text{ RPM VVM} \quad (\text{I-1})$$

Tabela I-11 - Análise de variância da máxima atividade de MTGase do planejamento experimental fatorial 2³ em reator de bancada

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	0,483672	3	0,1612	11,511	3,07
Resíduos	0,098043	7	0,0140		
Falta de Ajuste	0,093902	5	0,0188	9,071	9,29
Erro Puro	0,004141	2	0,0021		
Total	0,581715	10			

$R^2 = 0,83$

A ANOVA indica que a regressão foi significativa, visto que no teste de Fisher, o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o valor tabelado. A maior parte dos resíduos é explicada pela falta de ajuste do modelo, no entanto, a falta de ajuste não foi estatisticamente significativa, com 90% de confiança. O coeficiente de múltipla correlação foi de 0,83, ou seja, o modelo é capaz de explicar 83% das variações das respostas e o modelo pode ser utilizado para prever as respostas de atividade de MTGase no reator com 62 horas de fermentação. A Tabela I-12 apresenta as diferenças entre as atividades observadas experimentalmente nos ensaios do planejamento e os valores previstos pelo modelo, denominada de resíduo. Observou-se que houve uma variação normal dos resíduos ao redor da média das respostas, sendo que os valores do resíduo variaram de -0,17 U/mL (atividade prevista pelo modelo foi maior que a observada experimentalmente) a 0,15 U/mL (atividade prevista pelo modelo foi menor que a observada).

Tabela I-12 – Valores dos resíduos dos ensaios do planejamento experimental para avaliação do efeito da temperatura, agitação e aeração na produção de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Ensaio	Atividade de MTGase observada experimentalmente (U/mL)	Atividade de MTGase prevista pelo modelo (U/mL)	Resíduo (U/mL)
1	0,2095	0,3119	-0,1023
2	0,1656	0,0155	0,1501
3	0,6353	0,5746	0,0607
4	0,1047	0,2782	-0,1735
5	0,9534	0,8661	0,0873
6	0,5302	0,5697	-0,0396
7	0,4926	0,6034	-0,1107
8	0,3049	0,3070	-0,0021
9	0,4614	0,4408	0,0206
10	0,4546	0,4408	0,0138
11	0,5366	0,4408	0,0958

A Figura I-7 ilustra os efeitos da temperatura e aeração, bem como da interação entre agitação e aeração na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada.

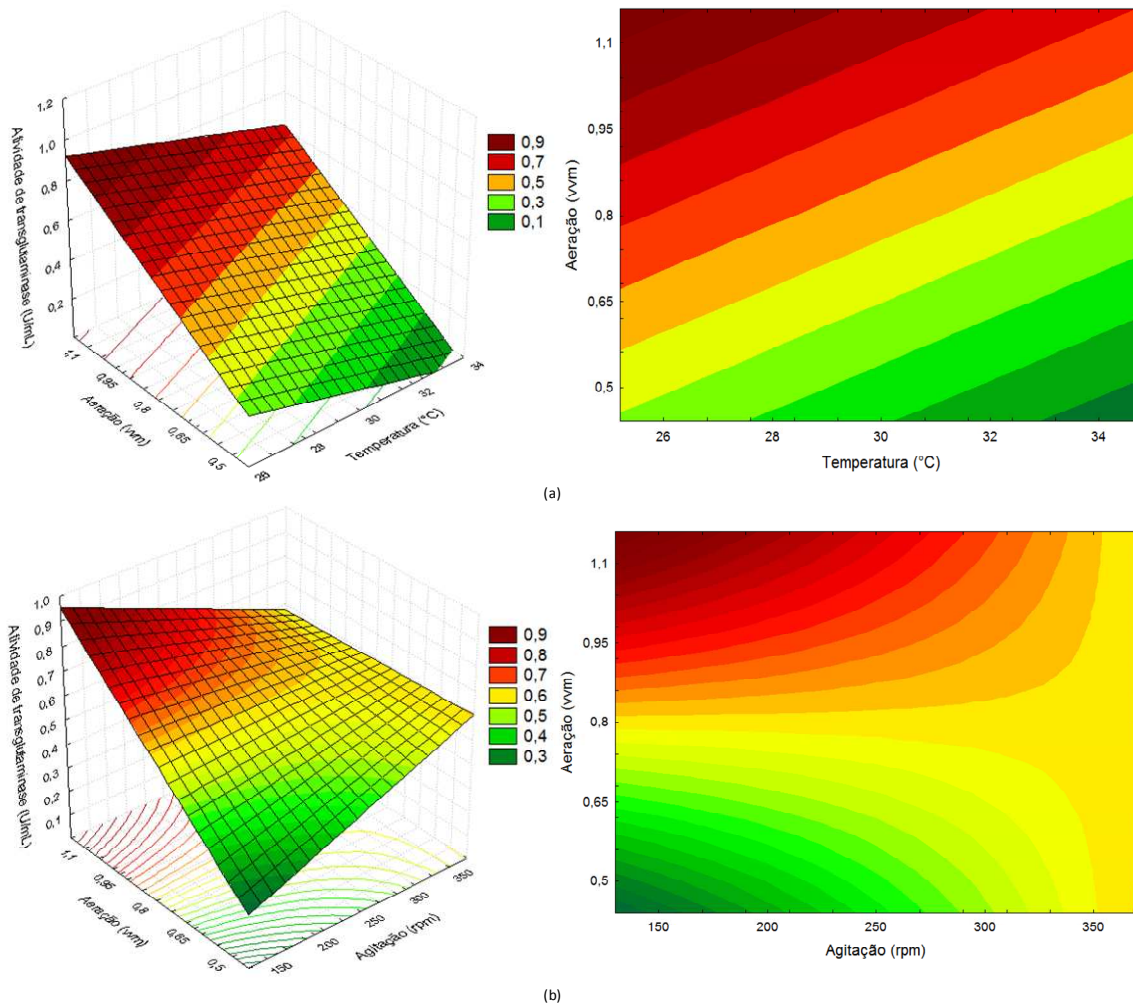


Figura I-7 - Superfícies de resposta e curvas de contorno da interação entre (a) temperatura e aeração, (b) agitação e aeração na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Os maiores valores de atividade máxima de MTGase foram obtidos nos menores valores de temperatura e de agitação (26°C e 150 rpm, respectivamente) com os maiores valores de aeração (1,1 vvm). Como o crescimento microbiano foi micelial, era esperado

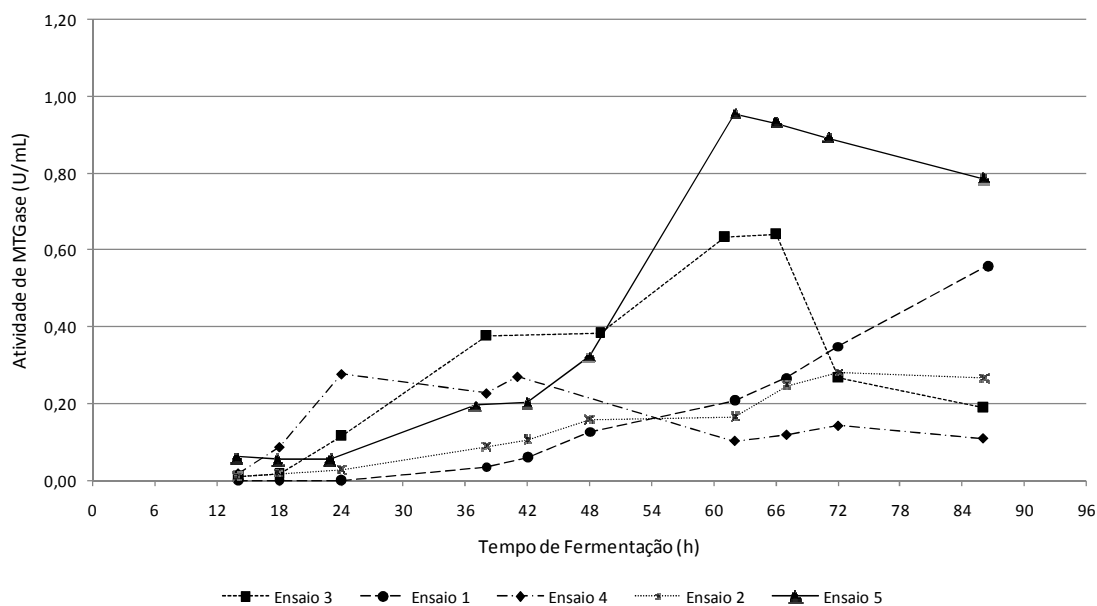
que os valores de agitação e aeração tivessem as tendências exibidas no delineamento experimental, visto que agitações elevadas podem danificar os micélios e a baixa aeração dificulta a transferência do oxigênio para as células do microrganismo, devido a elevada viscosidade do meio de cultivo (STANBURY et al., 2003).

A superfície de resposta do modelo linear apresentado na equação (I-1) indica que níveis de temperatura inferiores a 26°C e aeração superior a 1,1 vvm podem ser avaliados para otimizar a produção da enzima transglutaminase por *Streptomyces* sp. P20.

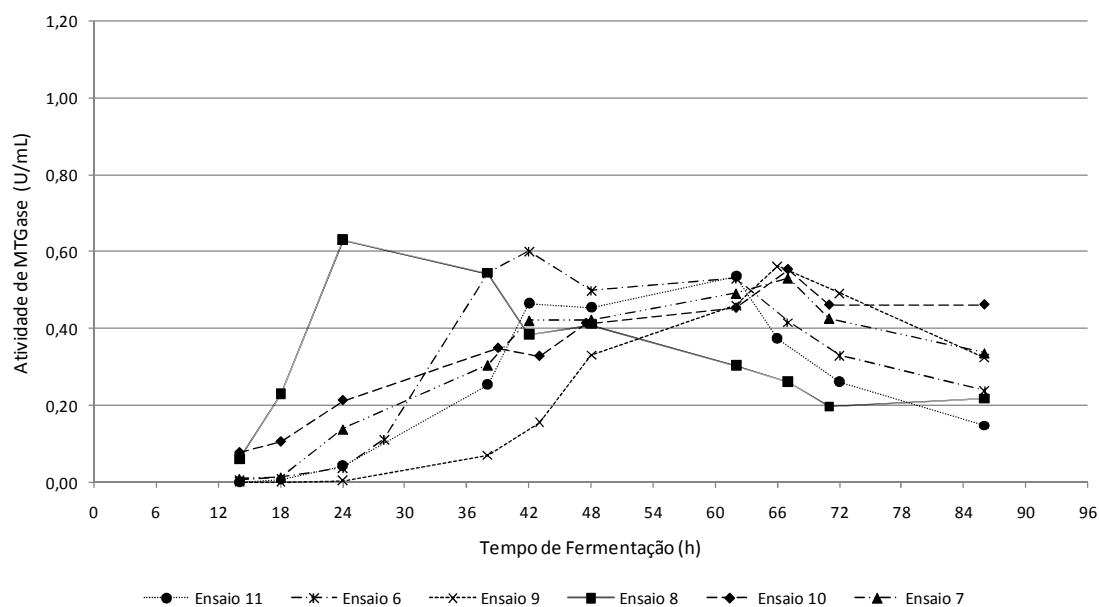
As Figuras I-8a e I-8b ilustram as cinéticas de produção da transglutaminase durante os onze ensaios de fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada em que foram utilizados diferentes combinações de temperatura, aeração e agitação, de acordo com o planejamento experimental.

Foi obtida maior atividade de transglutaminase (0,95 U/mL) na fermentação do microrganismo nas condições do ensaio 5 (Figura I-7a), no qual foi utilizado temperatura de 26°C, 150 rpm e aeração de 1,1 vvm, após 62h de fermentação.

Nas condições do ensaio 8 (Figura I-7b), no qual o microrganismo foi fermentado a 34°C, 350 rpm e aeração de 1,1 vvm, foi obtida atividade de transglutaminase igual a 0,634 U/mL após 24 horas de fermentação, enquanto no ensaio 2 (Figura I-7a), no qual o microrganismo foi fermentado a 26°C, 350 rpm e 0,5vvm de aeração, foi obtida atividade de 0,642 U/mL após 66 h de fermentação .



(a)



(b)

Figura I-8 - Cinéticas de produção da MTGase dos ensaios do planejamento experimental 2^3 na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada para os ensaios 1 a 5 (a) e para os ensaios 6 a 11 (b).

Este resultado mostrou que o aumento da escala de fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 para reator de bancada proporcionou um aumento de 3,35 vezes em relação a fermentação em frascos Erlenmeyer de 50 mL e 1,9 vezes em relação aos frascos Erlenmeyer de 250 mL.

A observação visual do crescimento microbiano indicou a formação de micélio com aumento significativo na viscosidade do meio de cultivo, o qual pode ser observado pelo movimento das bolhas de ar ao longo do meio no início do processo e no decorrer da fermentação. Não foi observada a formação de *pellets* em nenhum dos ensaios após 14 horas de fermentação. Segundo WHITAKER, 1992, micélios dispersos no meio de cultivo, sem dificultar a transferência de oxigênio e nutrientes do meio de cultivo, são normalmente considerados ideais para fermentações industriais, embora pouco seja relatado a respeito. Na produção de streptomicina (um antibiótico) de *S. griseus* a morfologia de micélios dispersos do microrganismo favoreceu a produção do metabólito, enquanto a formação de *pellets* ou formas fragmentadas não favoreceram a produção do antibiótico.

1.4.2.2.2. Análise da produtividade da MTGase

A produtividade nos pontos de máxima atividade, obtida pela razão entre atividade enzimática e tempo de fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada pode ser verificada na Tabela I-13. Foi obtida maior produtividade de transglutaminase (26,34 U/L.h) na fermentação do microrganismo nas condições do ensaio 8, no qual foi utilizada temperatura de 34°C, agitação de 350 rpm e aeração de 1,1 vvm. Nas condições do ensaio 5, no qual o microrganismo foi fermentado a 26°C, 150 rpm e 1,1 vvm, foi obtida produtividade de transglutaminase de 15,37 U/L.h.

Tabela I-13 - Valores de produtividade de MTGase obtidos nos ensaios do planejamento de experimentos 2³ da fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Ensaio	Produtividade (U/L.h)
1	6,50
2	3,91
3	9,73
4	6,65
5	15,38
6	9,70
7	8,07
8	26,34
9	8,55
10	8,40
11	8,65

Os valores de produtividade são importantes para os processos fermentativos, em especial aqueles em que o tempo necessário para se atingir quantidade significativa de metabólitos é longo, como o caso da transglutaminase. ZHENG et al. (2002) obteve produtividade de 81 U/L.h durante a produção de transglutaminase de *S. mobaraense* WSH-Z2 em reator de bancada com volume útil de 1,5 L, a 30°C, 450 rpm e 1,33 vvm, utilizando meio de cultivo composto de 30 g de amido, 20 g de peptona, 2g de extrato de levedura, 2 g de MgSO₄, 2 g de K₂HPO₄ e 2g de KH₂PO₄ por litro, com pH ajustado inicialmente para 7,0 e após 13 h de fermentação ajustado para 6,5. A produtividade de 21 U/L.h foi obtida pela fermentação de *Streptomyces hygroscopicus* em reator com 4,5 L de volume de trabalho, a 32°C e 200 rpm, utilizando meio de cultivo composto de 5 g/L de amido, 5 g/L de glicose, 10 g/L de glicerina, 15 g/L de peptona, 20 g/L de soja em pó, 5 g/L de extrato de levedura, 2 g/L MgSO₄, 2 g/L de KH₂PO₄, 2 g/L de K₂HPO₄, 5 g/L de CaCO₃, com pH ajustado para 6,5 (CUI et al., 2007).

A Tabela I-14 apresenta os efeitos de cada variável, bem como de suas interações e a avaliação estatística de cada efeito para verificação de suas significâncias.

Tabela I-14 - Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor para estudo da produtividade de MTGase dos ensaios de fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	p-valor
Média/Interação*	10,17172	0,037895	268,4220	0,000014
Temperatura (L)*	1,73098	0,088871	19,4776	0,002626
Agitação (L)*	3,82572	0,088871	43,0483	0,000539
Aeração (L)*	8,17489	0,088871	91,9865	0,000118
Temperatura x agitação*	5,86545	0,088871	66,0000	0,000229
Temperatura x aeração*	4,56973	0,088871	51,4200	0,000378
Agitação x aeração*	0,83739	0,088871	9,4225	0,011076

$R^2 = 0,77$, *Fatores com efeito significativo

Embora todos os parâmetros e suas interações tenham apresentado efeito significativo e positivo sobre o tempo de produção da enzima, a análise de variância (ANOVA) mostra que a regressão não é significativa com 90% de confiança (Tabela I-15).

Tabela I-15 - Análise de variância dos valores de produtividade de MTGase nos ensaios de fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados média	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	280,896718	5	56,1793	2,62	4,05
Resíduos	85,709795	4	21,4274		
Falta de Ajuste	85,678203	2	42,8391	2712,03	9,00
Erro Puro	0,031592	2	0,0158		
Total	366,606513	10			

$R^2 = 0,37$

Desta forma, não foi possível obter um modelo significativo para prever a produtividade do processo de produção da MTGase através do planejamento realizado.

Os intervalos de confiança de cada valor da produtividade, com 95% de significância, foram calculados utilizando o erro padrão dos pontos centrais para prever o

erro padrão das observações do planejamento. O desvio padrão da triplicata no ponto central foi de 0,126 U/mL, apresentando 2 graus de liberdade ($t_{3,0,025} = 4,303$). A tabela I-16 apresenta os intervalos de confiança para a produtividade de cada ensaio do planejamento fatorial.

Tabela I-16 - Intervalo de confiança para a produtividade (U/L.h) da fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada

Ensaio	Produtividade (U/L.h)	Mínimo (U/L.h)	Máximo (U/L.h)
1	6,50	5,96	7,04
2	3,91	3,37	4,45
3	9,73	9,19	10,27
4	6,65	6,11	7,19
5	15,38	14,84	15,92
6	9,70	9,16	10,24
7	8,07	7,53	8,61
8	26,34	25,80	26,88
9	8,55	8,01	9,09
10	8,40	7,86	8,95
11	8,65	8,11	9,20

Observou-se que a produtividade apresentada pelo ensaio 8 foi estatisticamente superior (com 95% de significância) aos demais resultados, visto que os demais intervalos de confiança não possuem intersecção com o intervalo de confiança deste ensaio. O mesmo ocorre para o ensaio 5, o qual apresentou o segundo maior valor de produtividade (15,4 U/L.h). Estes resultados de produtividade de MTGase elevada foram obtidos através de condições experimentais opostas em termos de temperatura e agitação, bem como os resultados das máximas atividades enzimáticas. Com base nestes resultados foi estudada a fermentação da linhagem *Streptomyces* SP. P20 com dois estágios de temperatura e agitação.

I.4.2.3. Produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada utilizando dois estágios de temperatura e agitação

A Figura I-9 e Figura I-10 ilustram, respectivamente, as cinéticas de produção de MTGase e a variação de pH durante a fermentação do microrganismo nas condições do ensaio 5 e 8, descritos no item I.3.4.2, e do ensaio de fermentação com dois estágios de temperatura e agitação, descrito no item I.3.4.3.

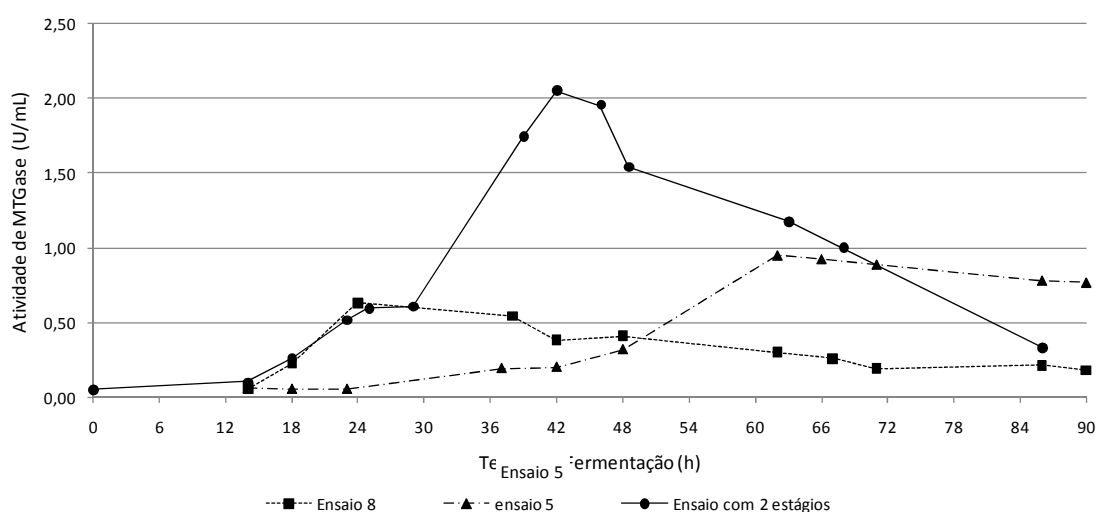


Figura I-9 - Cinética de produção de MTGase em reator de bancada pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 utilizando os ensaios 5 e 8 e dois estágios de temperatura e agitação.

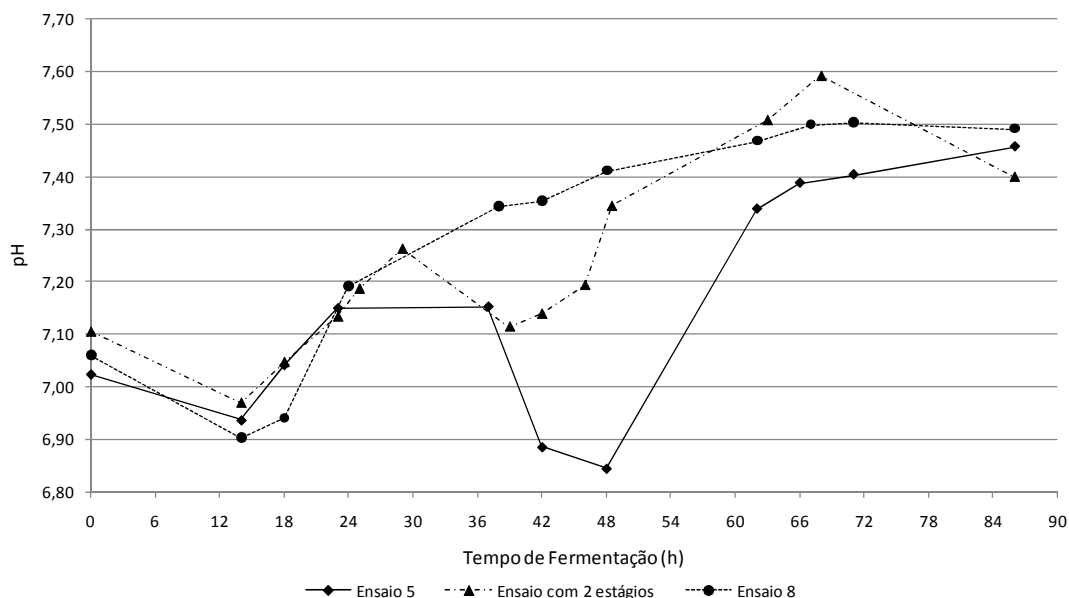


Figura I-10 - Variação do pH durante a fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada nas condições dos ensaios 5, 8 e com dois estágios de temperatura e agitação.

A variação do pH nas três fermentações apresentam em comum o fato de terem uma queda no início do processo seguida de uma elevação. Para o ensaio 8, a queda do pH ocorreu já nas primeiras 14 horas de fermentação, sendo que em seguida houve aumento do pH. No ensaio 5 e no duplo estágio, observou-se um comportamento semelhante ao do ensaio 8 nas primeiras 24 h de processo, sendo que para os dois houve uma segunda queda do pH, a qual é mais acentuada para o ensaio 5 após 42 horas de processo e esta etapa correspondeu ao momento em que a atividade enzimática começou a aumentar rapidamente.

A Figura I-11 ilustra os perfis de crescimento celular da linhagem *Streptomyces* sp. P20 durante a fermentação em reator de bancada nas condições dos ensaios 5, 8 e no ensaio com dois estágios de temperatura e agitação. A massa celular obtida no ensaio com dois estágios de temperatura e agitação apresentou valor superior ao observado para o ensaio 8 já nas 14 primeiras horas de fermentação. Embora todos os parâmetros do

processo fermentativo tenham sido os mesmos, incluindo a preparação do pré-inóculo, a diferença entre o comportamento do ensaio 8 e o ensaio com dois estágios de temperatura e agitação, nas primeiras 24 horas de fermentação, pode ter ocorrido devido ao crescimento diferenciado de microrganismos no pré-inóculo. No entanto, a atividade enzimática obtida nas primeiras 24 horas do ensaio com dois estágios de temperatura e agitação seguiu o mesmo perfil observado para o ensaio 8, sugerindo que, apenas atingir uma quantidade elevada de massa celular não é suficiente para diferenciar a atividade enzimática obtida no início da fermentação. Desta forma, as condições de processo para obtenção de massa celular e para obtenção de atividade enzimática são distintas. ZHENG et al. (2001), observou que a linhagem *S. mobaraense* WSH-Z2 apresentou temperatura ótima para o crescimento do microrganismo em 32°C enquanto a temperatura ótima para produção da MTGase foi de 26°C.

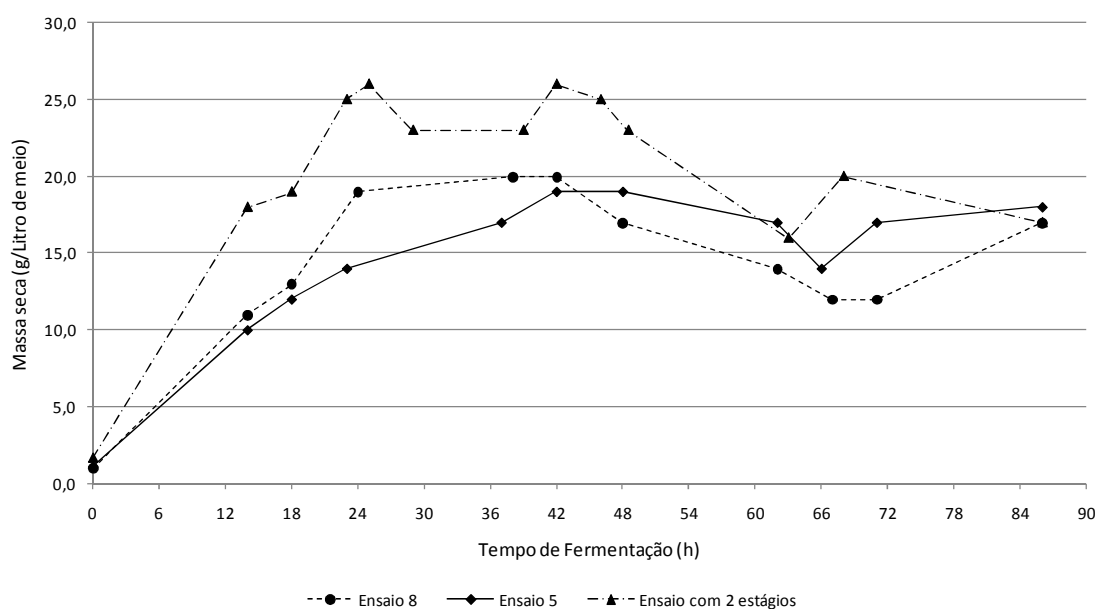


Figura I-11 - Crescimento celular (g de massa seca/L) da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada nas condições dos ensaios 5, 8 e com dois estágios de temperatura e agitação.

A Figura I-12 ilustra o crescimento (massa celular seca g/L), produção de MTGase (U/mL) e alteração de pH durante a fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em

reator de bancada no ensaio de dois estágios de temperatura e agitação. Observou-se que a produção da enzima ocorre acentuadamente no final da fase exponencial, atingindo o valor máximo (2,05 U/mL) na fase estacionária após 42 horas de incubação. O pH do meio de cultura variou de 7,0 a 7,6. ZHU et al. (1998a) estudaram a cinética de fermentação do microrganismo *Streptoverticillium mobaraense* e verificaram que a produção da transglutaminase ocorreu após a parada do crescimento do microrganismo.

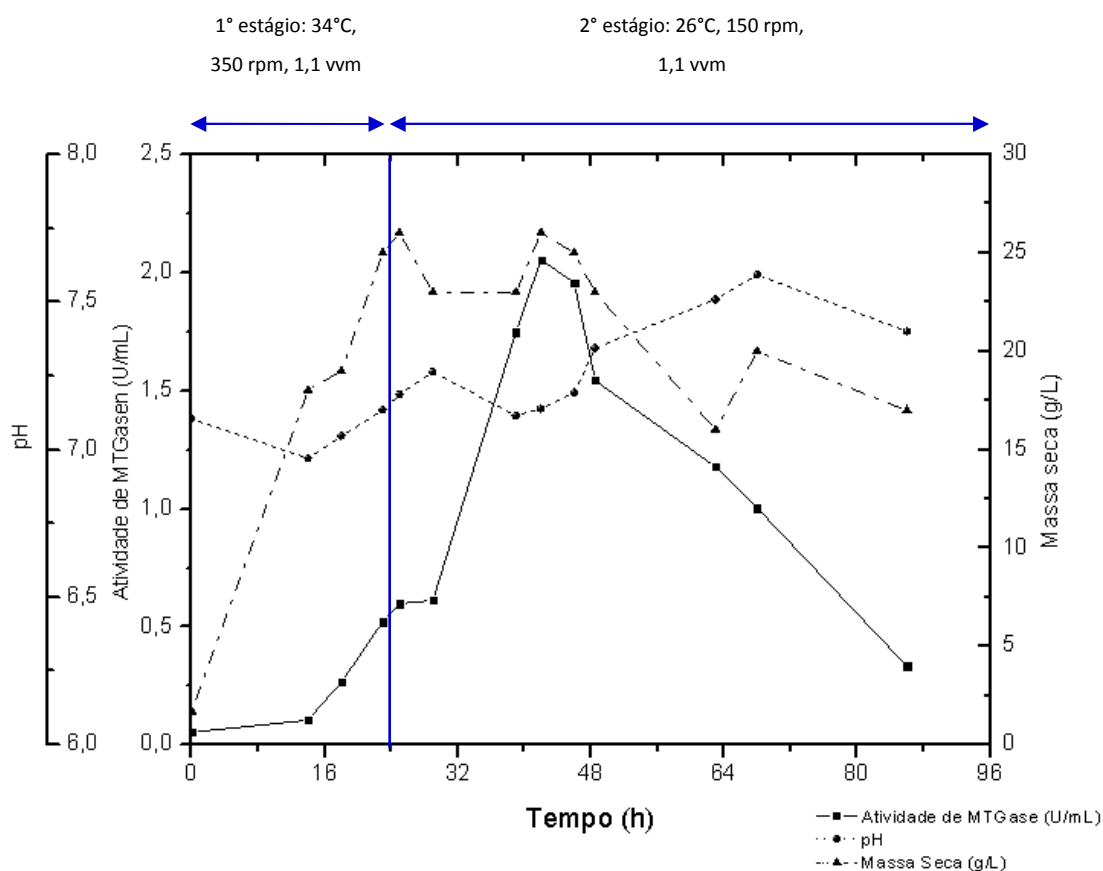


Figura I-12 – Crescimento celular, produção de MTGase e alteração de pH durante a fermentação da linhagem *Streptomyces sp. P20* em reator de bancada no ensaio de dois estágios de temperatura e agitação.

A Figura I-13 ilustra o consumo de carboidratos durante a fermentação da linhagem *Streptomyces sp. P20* nas condições dos ensaios 5, 8 e do ensaio com dois

estágios de temperatura e agitação. Observou-se que para o ensaio realizado com dois estágios de temperatura e agitação, a concentração inicial de açúcares totais caiu bruscamente durante as 14 primeiras horas de fermentação, e esta queda foi mais acentuada em comparação ao ensaio 8. O consumo de açúcares no ensaio 5 foi mais lento, sendo que a quantidade residual de açúcares redutores totais no meio de cultivo se aproximou dos demais ensaios após 62 horas de processo. O consumo de açúcares foi compatível com o crescimento celular, que foi mais acentuado para o ensaio de duplo estágio em relação aos ensaios 5 e 8.

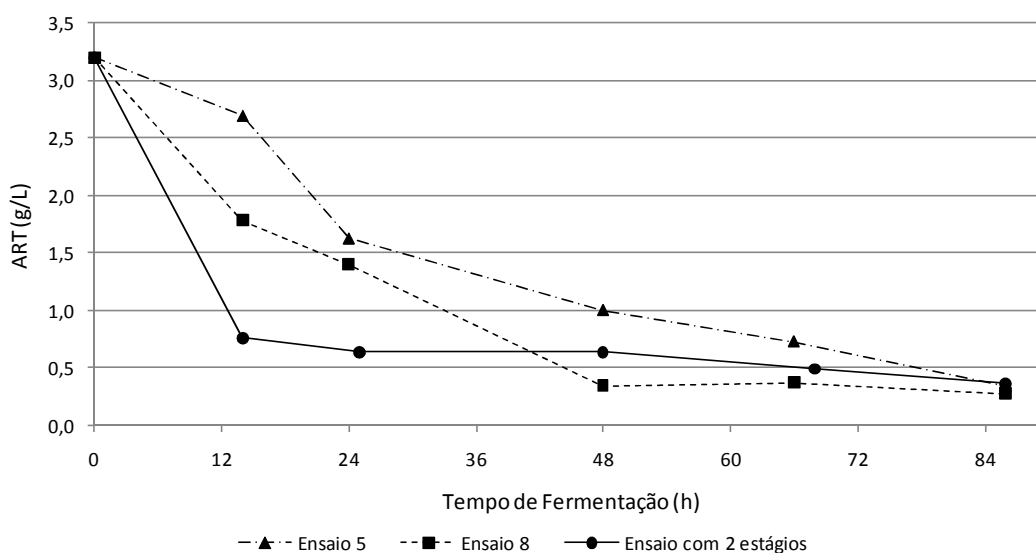


Figura I-13 - Consumo de carboidratos durante as fermentações da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada nas condições dos ensaios 5, 8 e dois estágios de temperatura e agitação.

A Figura I-14 ilustra a produção de MTGase pela linhagem do *Streptomyces* sp. P20 em frascos Erlenmeyer e reatores de bancada em diferentes condições de fermentação. Na fermentação em reator de bancada de 6L, com dois estágios de temperatura e agitação, a atividade de MTGase máxima obtida foi de 2,05U/mL de caldo de fermentação, atingida após 42 horas de fermentação. Desta forma, a produtividade foi de 50 U/L.h, resultado 1,9 vezes maior que o obtido no ensaio 8 do planejamento

experimental (34°C, 350 rpm e aeração de 1,1 vvm). A atividade enzimática foi 7,2 vezes superior a obtida em frascos agitados de 50 mL com 15 mL de meio de cultivo e 4 vezes superior ao resultado avaliado para os frascos agitados de 250 mL (incubação a 30°C e 100 rpm).

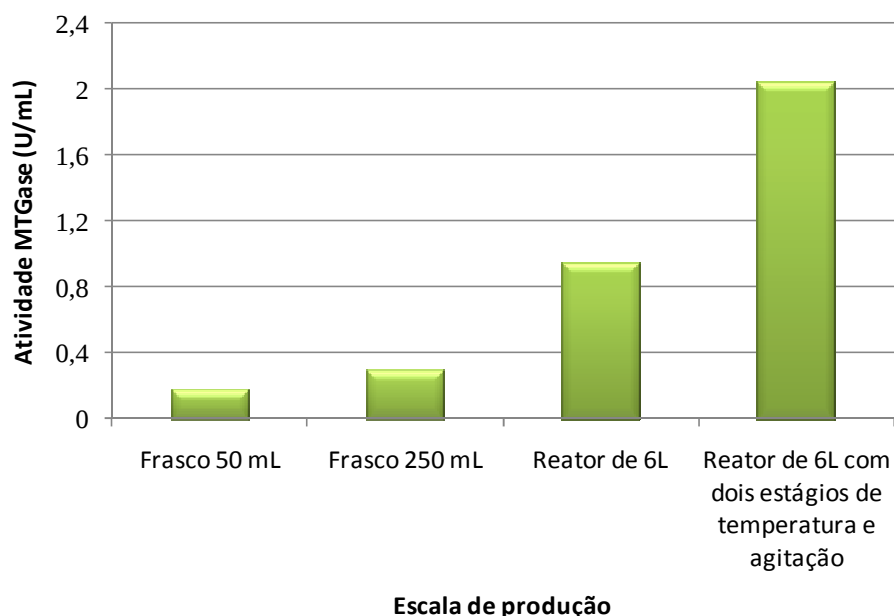


Figura I-14 - Produção de MTGase pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em frascos Erlenmeyer agitados e em reatores de bancada em diferentes condições de fermentação

A atividade específica de MTGase foi determinada no ponto de maior atividade do ensaio realizado com dois estágios de temperatura e agitação, sendo seu valor igual a 0,58U/mg de proteína. Este resultado foi 2,3 vezes superior ao obtido pela fermentação submersa com o microrganismo *Streptomyces hygroscopicus* (CUI et al.,2007). No entanto, se comparado com os resultados obtidos por Liu et al. (2007) em escala piloto (reator 130L de volume útil) pela fermentação de *S. lividans* contendo o gene responsável pela expressão da MTGase em *S. platensis* M5218M, o resultado foi 10 vezes inferior.

Os resultados dos ensaios realizados em fermentação submersa indicam que o microrganismo *Streptomyces* sp. P20 apresenta potencial para produção de MTGase

sendo possível elevar a atividade de MTGase obtida através de estudos de otimização do processo fermentativo. De acordo com o observado nos ensaios descritos acima, para otimização da produção da enzima é interessante controlar as condições de temperatura e fermentação em dois estágios, o primeiro para que ocorra o aumento da massa celular no início da fermentação e o segundo para que o microrganismo produza a enzima e que esta permaneça estável até o final do processo. Assim, realizar delineamentos experimentais para buscar as melhores condições para o crescimento microbiano e para a produção da enzima poderiam levar à obtenção de resultados otimizados.

I.4.3. Avaliação do crescimento celular no pré-inóculo.

A fim de avaliar se o aumento da agitação dos frascos Erlenmeyer durante a fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 para preparação do pré-inóculo influenciaria a morfologia de crescimento do microrganismo, foi realizado um ensaio em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo descrito na Tabela I-2, incubados a 30°C e 150 rpm. A atividade enzimática média obtida após 120 horas de fermentação foi de 0,498 U/mL e o desvio padrão da triplicata de 0,063. Pelo teste de Tukey, as médias das atividades desta condição de processo foram comparadas com as médias do ensaio realizado a 100 rpm e a diferença entre os resultados foi significativa com 95% de confiança. Quanto à análise visual do crescimento microbiano, observou-se a formação de *pellets* muito pequenos e uniformes (com tamanho inferior ao observado no teste a 100 rpm) e o meio apresentou alta viscosidade após o período de fermentação, podendo indicar a formação micelial dispersa em paralelo aos pequenos *pellets*, visto que o crescimento micelial eleva a viscosidade do meio de cultivo (JUNKER et al, 2004). De acordo com os relatos de WHITAKER (1992) há linhagens de actinomicetos que são sempre *pelletizadas*, outras que sempre produzem formas dispersas e outros que podem apresentar as duas morfologias simultaneamente, dependendo das condições do processo. Desta forma, a morfologia apresentada pelo microrganismo no pré-inóculo

preparado com agitação de 150 rpm estaria mais próximo do obtido no reator, em que há formação de micélios dispersos, do que o obtido a 100 rpm. O pré-inóculo com a morfologia do microrganismo similar à aquela obtida na fermentação em reator pode contribuir para o aumento da atividade enzimática além de reduzir a fase *lag* do crescimento microbiano.

I.4.4. Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 por fermentação em meio semi-sólido em frascos Erlenmeyer

A Tabela I-17 apresenta a produção de MTGase na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em meios semi-sólidos.

Tabela I-17 - Produção de MTGase pela linhagem *Streptomyces* sp. P20 por fermentação em meios semi-sólidos

Substrato	Substrato:Solução sais (m:m)	Atividade de MTGase (U/g de substrato seco)	Desvio Padrão
Farinha de feijão preto	2:1	0,0418 ^a	0,0016
	1:1	0,5014 ^c	0,0627
	1:2	0,0080 ^a	0,0003
Farinha de feijão branco	2:1	0,8816 ^d	0,0833
	1:1	0,8307 ^d	0,0873
	1:2	0,2011 ^{ab}	0,0486
Farinha de amendoim	2:1	0,7732 ^d	0,1008
	1:1	0,2719 ^b	0,0456
	1:2	0,2396 ^b	0,1419
Farinha de soja	2:1	0,0208 ^a	0,0089
	1:1	0,0725 ^a	0,0160
	1:2	0,00	0,00
Farelo soja	2:1	0,0206 ^a	0,0276
	1:1	0,0079 ^a	0,0073
	1:2	0,00	0,00

Na fermentação em meios semi-sólidos foi obtida maior atividade de MTGase utilizando-se meios compostos de farinha de feijão branco: solução de sais na proporção

2:1 (m:m) e na proporção de 1:1 (m:m) e farinha de amendoim: solução de sais (2:1, m:m) nos quais foram obtidos 0,88 U/g, 0,83 U/g e 0,77 U/g de substrato seco respectivamente. Pelo teste de Tukey, com 95% de confiança, não há diferenças significativas entre estes ensaios. Na fermentação do microrganismo em meios de farelo de soja:solução de sais (1:2, m:m) e farinha de soja:solução de sais (1:2, m:m) não foi obtido atividade de MTGase.

SOUZA et al. (2008) obtiveram atividade de MTGase igual a 1,25U/g de substrato seco na fermentação da linhagem *Bacillus circulans* BL32 em bioreator contendo meio de cultivo semi-sólido composto de resíduo fibroso da indústria de soja (rico em açúcares e proteínas) umedecido com solução de sais (0,2 g/L de $MgSO_4$; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de K_2HPO_4 ; 1,0 g/L de NH_4NO_3 ; 0,02 g/L de $CaCl_2$ e 0,05 g/L de $FeCl_2$).

NAGY e SZAKACS (2008) fermentaram linhagens de *Streptomyces* sp. em meios semi-sólidos composto de feijão vermelho e soja verde (entre outros) e obtiveram atividade de MTGase iguais a 5,1 U/g de substrato seco e 4,9 U/g de substrato seco, respectivamente, para a linhagem de *Streptomyces platensis* NRRL 2364, utilizando a solução de sais composta de 0,8 mg/L $MgSO_4$; 5,0 g/L KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de NaCl; 5,0 g/L NH_4NO_3 ; 1 mg/L de $CoCl_2$; 1,7 mg/L $ZnSO_4$; 2,5 mg/L $FeSO_4$ com pH ajustado para 6,0, para umedecer os substratos.

Embora os resultados obtidos nos ensaios realizados com o *Streptomyces* sp. P20 na fermentação semi-sólida tenham sido inferiores aos apresentados na literatura, esta linhagem apresenta potencial para obtenção da MTGase, sendo possível elevar a atividade enzimática obtida em estudos de otimização para definição dos parâmetros da fermentação (temperatura de incubação, umidade do substrato e quantidade de inóculo) bem como outros substratos sólidos. Pode-se ainda otimizar o processo de extração da enzima, avaliando o tempo de extração e a solução extratora.

I.4.5. Avaliação dos custos dos meios de cultivos utilizados na fermentação submersa e em meio semi-sólido.

O custo do meio de cultura composto de 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 e extrato de 2,5% de farinha de soja, utilizado na fermentação submersa da linhagem *Streptomyces* sp. P20, para obtenção de 2,05U/mL de atividade de MTGase foi estimado em R\$ 5,59/L (R\$0,27/100U de atividade).

O custo estimado do meio de cultivo descrito por ANDO et al. (1989) composto de 2,0% de polipeptona, 2,0% de amido solúvel, 0,2% de K_2HPO_4 , 0,2% de extrato de levedura, 0,1% de MgSO_4 , foi de R\$ 12,43/L. Os pesquisadores obtiveram pela fermentação da linhagem *Streptoverticillium* S-8112 atividade de transglutaminase de 2,5U/mL do meio de cultivo, o que corresponde a um custo de R\$ 0,49/100U de atividade de MTGase.

O custo estimado do meio de cultivo composto de 5g/L de amido, 5g/L de glicose, 10g/L de glicerina, 15g/L de peptona, 20g/L de soja em pó, 5g/L de extrato de levedura, 2g/L MgSO_4 , 2g/L de KH_2PO_4 , 2g/L de K_2HPO_4 , 5g/L de CaCO_3 , para produção de transglutaminase de *Streptomyces hygroscopicus* descrito por CUI et al. (2007), no qual os autores obtiveram atividade de 0,9 U/mL de meio de cultivo, foi de R\$ 11,11/L que, em termos de atividade enzimática, corresponde a um custo de R\$1,23/100U de atividade.

O custo do meio semi-sólido composto de farinha de feijão branco:solução de sais (2:1, m:m) e farinha de amendoim:solução de sais (2:1, m:m) foi estimado em R\$2,43/Kg de meio de cultivo e R\$1,63/Kg de meio de cultivo, respectivamente. Estes valores em termos de unidades de atividade de MTGase correspondem a R\$0,28/100U e R\$0,21/100U, respectivamente.

I.5. Conclusões

No estudo da fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P 20 em frascos Erlenmeyer agitados de 50 mL, contendo 15 mL de meio de cultura otimizado por MACEDO et al. (2007) composto de 2,5% de farinha de soja, 2,0% de amido de batata, 0,1% de glicose, 1,0% de peptona, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 , após 120 h (conforme definido por MACEDO et al., 2007), foi obtido maior atividade de transglutaminase (0,285 U/mL) incubando-se os frascos a 28°C e 150 rpm.

A modificação do meio de cultivo descrito por MACEDO et al. (2007), substituindo-se a farinha de soja pelo extrato de farinha de soja, resultou em meio de cultivo mais adequado para a fermentação do microrganismo em reator de bancada. Foi obtida maior atividade de MTGase em meio de cultura (B) composto de extrato de 2,5% de farinha de soja em água destilada, 2,0% de amido de batata, 0,1% de glicose, 1,0% de peptona, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 .

No estudo do efeito da temperatura, agitação e aeração na fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P 20, em reator de bancada, realizado através de delineamento fatorial 2^3 com 3 repetições no ponto central, utilizando-se o meio de cultivo (B) foram obtidos melhores resultados de atividade de transglutaminase com 62 horas de fermentação (0,95 U/mL e 0,63 U/mL) nas condições 26°C, 150 rpm e aeração de 1,1 vvm e na fermentação do microrganismo a 26°C, 350 rpm e 0,5 vvm, respectivamente. Verificou-se que o aumento da temperatura e agitação apresentou efeito negativo na produção da enzima, enquanto o aumento da aeração teve efeito positivo. A máxima atividade enzimática foi obtida nas condições de 26°C, 150 rpm e aeração de 1,1 vvm, sendo que a maior produtividade foi alcançada nas condições de 34°C, 350 rpm e 1,1 vvm.

A fermentação da linhagem *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada com controle da temperatura e agitação em dois estágios, utilizando-se inicialmente 34°C e 350 rpm e após 24 horas de fermentação alteradas para temperatura de 26°C e agitação

de 150 rpm, levou ao aumento da atividade de MTGase, sendo obtido 2,05 U/mL de atividade enzimática.

A atividade de transglutaminase obtida em reator de bancada de 6L foi 7,2 vezes superior a obtida inicialmente em Erlenmeyers agitados de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo.

Na fermentação da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 em frascos Erlenmeyer contendo meio semi-sólido foi obtido maior atividade de MTGase em meio de cultivo composto de farinha de feijão branco:solução de sais (2:1, m:m) sendo obtido 0,88 U/g de substrato seco.

O custo estimado para a produção de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 utilizando o meio de cultivo descrito por MACEDO et al.(2009) em cultura submersa e utilizando meios semi-sólido composto de farinha de feijão-branco:solução de sais (2:1, m:m) apresentaram valores semelhantes, em torno de R\$0,28/100U.

A linhagem de *Streptomyces* sp. P20 apresentou bons resultados para obtenção de MTGase por fermentação submersa e em estado sólido , sendo uma linhagem potencial para aplicação industrial na produção da enzima.

I.6. Sugestões para trabalhos futuros

A otimização da produção da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 em reator de bancada pode ser alcançada através de delineamentos experimentais levando em consideração as diferenças de condições de temperatura e agitação para favorecimento do crescimento microbiano e da produção da enzima.

O estudo de outros substratos para a fermentação em meio semi-sólido podem ser avaliados bem como a otimização do processo de extração da enzima e uso de reatores de fermentação semi-sólidas para a produção da enzima.

I.7. 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.

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

CUI, L.; DU, G.; ZHANG, D. 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.

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

FOLK, J. E., GROSS, M. Mechanism of action of pig liver transglutaminase. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 246, p. 6683-6691, 1971.

FOLK, J. E. Transglutaminases. ***Annual Reviews Biochemistry***, v.49, p. 517-531, 1980.

FRIEDRICH, P.; ASZÓDI, A. Calcium dependent proteolysis and isopeptide bond formation: Calpains and transglutaminases. ***Pure & Applied Chemistry***, v. 64, n. 8, p. 1093-1097, 1992.

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. and WAELSCH, H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from 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.

HATANO, K.; NISHII, T.; KASAI, H. Taxonomic re-evaluation of whorl-forming *Streptomyces* (formerly *Streptoverticillium*) species by using phenotypes, DNA–DNA hybridization and sequences of gyrB, and proposal of *Streptomyces luteireticuli* (ex Katoh and Arai 1957) corrig., sp. nov., nom. rev. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, v. 53, p. 1519–1529, 2003.

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

HUINONG, C., YALING, L., XINZHENG, L., XINGYAO, G., QIUMING, Y., ZHAOPENG, H., WENJIN, S., ZHANG, W. Optimizing fermentation conditions for pilot plant production of microbial transglutaminase by *Streptomyces* sp. WJS-825. ***Chinese Journal of Applied and Environmental Biology***, v.11, n. 1, p. 98-103, 2005.

IKURA, K.; TSUCHIYA, Y.; SASAKI, R.; CHIBA, H. Expression of guinea-pig transglutaminase cDNA in *Escherichia coli*. Amino-terminal N^α-acetyl group is not essential for catalytic function of transglutaminase. ***European Journal of Biochemistry***, v. 187, p. 705 – 711, 1990.

JUNKER, B. H.; HESSE, M.; BURGESS, B.; MASUREKAR, P. Early phase process scale-up challenges for fungal and filamentous bacterial cultures. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 119, p.241-277, 2004.

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. 1997.

KANAJI, T., OZAKI, H., TAKAO, T., KAWAJIRI, H., IDE, H., MOTOKI, M., SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain s-8112. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 268, p.11565-11572. 1993.

KANG, H.; CHO, Y. D. Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 223, p.288-292, 1996.

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

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.

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.

KUMAZAWA, Y.; SANO, K.; SEGURO, K.; YASUEDA, H.; NIO, N.; MOTOKI, M. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.604-610, 1997.

LIN, S.; HSIEH, Y.; WANG, P. Efficient purification of transglutaminase from recombinant *Streptomyces platensis* at various scales. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.111-115, 2007.

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

MACEDO, J. A.; SETTE, L.D.; SATO, H. H. Optimization studies for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p.904-911, 2008.

MALDONADO, R.R. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtido a partir de meios industriais. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2006.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, No 3, p. 426 – 428, 1959.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, n. 9, p.204-210, 1998.

NAGY, V. e SZAKACS, G. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n.2, p. 122-127, 2008.

NEGUS, S. S. A novel microbial transglutaminase derived from *Streptoverticillium baldaccii*. Tese de doutorado – School of Biomolecular and Biomedical Science, Griffith University, Queensland, 2001.

O'CLEIRIGH, C.; CASEY, J. T.; WALSH, P. K.; O'SHEA, D. G.. Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. geldanus: Regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p.305-310, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal.**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PASTERNAK, R., DORSCH, S., OTTERBACH, J., ROBENEK, I., WOLF, S., FUCHSBAUER, H-L. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. Purification, characterization and sequence of the zymogen. **European Journal of Biochemistry**, v. 257, p.570-576. 1998.

PLÁCIDO, D.; FERNANDES, C. F.; ISIDRO, A.; CARRONDO, M. A.; HENRIQUES, A. O.; ARCHER, M. Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis* transglutaminase (Tgl)

and its preliminary crystallographic characterization. ***Protein Expression and Purification***, v. 59, p. 1 - 8. 2008.

SEKI, N., UNO, H., LEE, N. H., KIMURA, I., TOYODA, K., FUJITA, I., ARAI, K. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin. ***Nippon Suisan Gakkaishi***, v. 56, p.125-132. 1990.

SOARES, 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.

SOUZA, C. F. V. de; FLÔRES, S. H.; AYUB, M. A. Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL 32 using statistical experimental methods. ***Process Biochemistry***, v. 41, p.1186-1192, 2006.

SOUZA, C. F. V. de; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Z. Solid state bioreactor production of transglutaminase by Amazonian *Bacillus circulans* BL32 strain. ***Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, v. 35 , p. 1677 - 1685 , 2008.

Stambury, P. F., WHITAKER, A., Hall, S. J., ***Principles of Fermentation Technology***. Oxford, Butterworth Heinemann, 2a edição, 1995.

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source. ***Food Technology and Biotechnology***, v. 42, n. 2, p.75-81, 2004.

TREICHEL, H. Estudo de otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2004.

WADA, F.; NAKAMURA, A.; MASUTANI, T.; IKURA, K.; MAKI, M. Identification of mammalian-type transglutaminase in *Physarum polycephalum*: Evidence from the cDNA sequence and involvement of GTP in the regulation of transamidating activity. ***European Journal of Biochemistry***, v. 269, p.3451-3460, 2002.

WHITAKER, A. Actinomycetes in submerged culture. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 32, p.23-35, 1992.

WITT, D.; STACKEBRANDT, E. Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces Waksman* and *Henrici* 1943, 339(AL). ***Systematic and Applied Microbiology***, v.13, p. 361 – 371, 1990.

YAN, G., DU, G., LI, Y., CHEN, J., ZHONG, J. Enhancement of microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: application of a two-stage agitation speed control strategy. ***Process Biochemistry***, v.40, p. 963 – 968, 2004.

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

ZHENG, M., DU, G., CHEN, J. pH control strategy of batch microbial transglutaminase production with *Streptoverticillium mobaraense*. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 31, p.477 – 481, 2002.

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

ZHU, Y., RIZEMA, 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., BONARIUS, H. P. J., TRAMPER, J., BOL, J. Microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*: Analysis of amino acid metabolism using mass balances. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 23, p.216 – 226, 1998a.

ZHU, Y., RINZEMA, A., TRAMPER, J., BOL, J., BRUIN, E. Fed-batch fermentation dealing with nitrogen limitation in microbial transglutaminase production by *Streptoverticillium mobaraense*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 49, p.251 – 257, 1998b.

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 II – Caracterização e Aplicação da MTGase bruta de *Streptomyces* sp.

P20

Resumo

A transglutaminase é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas entre proteínas. Foi estudada a caracterização e aplicação da transglutaminase bruta de *Streptomyces* sp. P20. Os valores de temperatura ótima e pH ótimo de atividade desta enzima foram avaliados por ensaios univariados e por delineamento experimental fatorial, sendo verificado que a enzima apresentou atividade ótima a 35°C e pH 6,5. Foi encontrada uma segunda faixa de pH ótimo em 9,0, o que pode indicar a presença de isoenzimas. A enzima mostrou-se estável na faixa de pH 6,0 – 9,0, sendo estável em pH 6,0 por 30 minutos até a temperatura de 35°C. O aminoácido L-cisteína exerceu efeito positivo na estabilização térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. P20. Os íons metálicos Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} , inativaram a enzima, sugerindo a presença de grupos tiol no seu sítio ativo. A L- cisteína e Mg^{2+} exerceram efeito positivo sobre a atividade da MTGase sendo a atividade relativa da enzima elevada 130% com a aplicação da L-cisteína na concentração de 1mM. A MTGase de *Streptomyces* sp. P20 na concentração de 1U/g de amostra, foi capaz de unir pedaços de carne bovina e também estruturar proteína texturizada de soja.

Summary

Transglutaminase is an enzyme that catalyzes cross-linking of proteins, modifying their properties. The biochemical characterization and application of crude transglutaminase derived from *Streptomyces* sp. P20 were studied. The optimum temperature and pH for MTGase activity were investigated by one step at a time experiments and using an experimental factorial design. The MTGase exhibited optimum activity at 35°C and at both pH 6.5 and pH 9.0, probably due to the presence of an isoenzyme. The enzyme was stable over the pH range from 6.0 – 9.0 and up to a temperature of 35°C it was stable for 30 minutes at pH 6.0. The amino acid L-cysteine enhanced the thermal stability of the MTGase obtained from *Streptomyces* sp. P20. The metal ions Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} inhibited the enzyme activity, suggesting the presence of a thiol group at the active site. L-cysteine and Mg^{2+} had a positive effect on the MTGase activity, 1mM L-cysteine increasing the relative activity by 130%. At a concentration of 1 U/g of sample, the MTGase from *Streptomyces* sp. P20 was capable of joining together pieces of beef and texturized soy protein.

II.1. Introdução

A transglutaminase é uma enzima que catalisa a formação de ligações cruzadas em resíduos de glutamina e aminas primárias, modificando as propriedades de proteínas.

A produção da transglutaminase por microrganismo potencializou as aplicações industriais desta enzima tanto pelo fato da obtenção em escala industrial ser facilitada em relação a obtenção de fontes animais ou vegetais, bem como pelo fato da enzima não necessitar de cálcio para catalisar as reações entre proteínas.

As transglutaminases de diversas linhagens de microrganismos, descritos na literatura, têm como característica comum grupo tiol, proveniente de resíduos de cisteína, no sítio ativo. A massa molecular, sequência de aminoácidos da cadeia peptídica e especificidade da enzima quanto ao substrato pode variar entre os microrganismos produtores, no entanto, a enzima obtida de microrganismo apresenta massa molecular significativamente inferior à enzima extraída de mamíferos.

A linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi isolada por MACEDO et al. (2007) de solo brasileiro e apresentou elevado potencial para produção de MTGase.

Este capítulo tem como objetivo estudar as características bioquímicas da MTGase bruta de *Streptomyces* sp. P20, determinando a temperatura e o pH ótimo de atividade enzimática e estabilidade da enzima e o efeito de íons metálicos, EDTA, L-cisteína, L-glutamina e polietilenoglicol (PEG 6000) na atividade da MTGase. Foi testada a aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 na união de pedaços de carne bovina e reestruturação de proteína de soja texturizada.

II.2. Revisão bibliográfica

II.2.1. Características bioquímicas da transglutaminase

O conhecimento das características bioquímicas de enzimas é de grande importância para determinar as formas de purificação, de armazenamento e conservação da enzima, bem como sua aplicação.

A transglutaminase apresenta diferentes características bioquímicas dependendo da fonte enzimática, como, por exemplo, a transglutaminase extraída de vísceras de mamíferos necessitam de cálcio como um ativador fisiológico enquanto a transglutaminase de diversos microrganismos não dependem deste íon (FOLK, 1980; KANAJI et al., 1993).

As diferentes transglutaminases sequenciadas apresentam estrutura de aminoácidos muito diferentes entre si, no entanto, na região do sítio ativo, onde se encontram um ou mais resíduos de cisteína, e nas regiões que se ligam aos cátions cálcio, há grande semelhança entre elas (KANAJI et al., 1993).

A transglutaminase presente em tilápias tropicais (*Oreochromis niloticus*) foi purificada e caracterizada por Worratao et al. (2005). A massa molecular da transglutaminase extraída de tilápias tropicais foi estimada em 85 kDa, enquanto a enzima extraída de fígado de porquinho da Índia foi estimada em 90 kDa (Folk e Cole, 1966). A TGase de tilápia apresentou atividade ótima a 37°C e pH 7,5, sendo que a enzima não apresenta atividade em pH inferiores a 6,0. Assim como a TGase de mamíferos, a enzima de tilápias tropicais apresentou extrema necessidade de íons cálcio para apresentar atividade, sendo fortemente inibida por íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ e por EDTA.

A transglutaminase de *Streptovercillium* S-8112, descrita por ANDO et al., 1989, apresentou pH ótimo na faixa de 6,0 a 7,0, a 37°C, e mostrou-se estável na faixa de pH de 5,0 a 9,0 por 10 minutos a 37°C. A temperatura ótima de atividade da MTGase foi 50°C em pH 6,0. A enzima apresentou 100% de atividade quando incubada na temperatura de 40°C por 10 minutos em pH 7,0 e apresentou 74% da atividade residual quando incubada na temperatura de 50°C em pH 7,0. A MTGase deste microrganismo mostrou-se independente de íons cálcio e foi inibida por Zn^{2+} e Cu^{2+} . A massa molecular da MTGase de *Streptovercillium* S-8112 foi estimada em 40 kDa, apresentando uma única cadeia peptídica. Esta massa molecular correspondeu à metade da massa determinada para a transglutaminase extraída de fígado de porquinhos da Índia. Os autores estudaram, também, a atuação da MTGase de *Streptovercillium* S-8112 em peptídeos sintéticos para formação de ácidos hidroxâmicos. A MTGase não atuou nos substratos CBZ-Gln, CBZ-Asn-Gly e CBZ-Gln-Gly, apresentando especificidade de substratos diferente da enzima derivada de porquinhos da Índia.

A transglutaminase da linhagem de *Streptovercillium* S-8112, foi seqüenciada (KANAJI et al. 1993) sendo verificada uma estrutura composta por 331 aminoácidos em uma única cadeia peptídica, contendo um resíduo de cisteína com um grupo tiol livre, essencial para a atividade enzimática. A estrutura secundária apresentou conformação globular. A massa molecular da MTGase foi estimada em 37,86 kDa. Este trabalho mostrou que a enzima proveniente do microrganismo apresenta estrutura muito distinta da enzima obtida de porquinhos da Índia.

LU et al. (2002), caracterizaram a MTGase bruta de *S. mobaraense* WSH-Z2, sendo verificado que a enzima é estável de 20°C a 40°C, sendo rapidamente inativada em temperaturas superiores a 50°C e a temperatura ótima de atividade foi de 52°C. A atividade de MTGase foi elevada na faixa de pH 5,0 a 7,0. O íon Zn^{2+} e N-etilmaleimida (NEM) inibiram a atividade de MTGase, sugerindo que a enzima apresenta grupos sulfidril envolvidos na reação catalítica.

KOBAYASHI et al. (1998), caracterizaram a transglutaminase purificada obtida de esporos de *Bacillus subtilis* AJ12866. Esta enzima apresentou massa molecular de aproximadamente 23 kDa. O íon Ca^{2+} (nas concentrações de 2 e 5 mM) não elevou a atividade da transglutaminase e o EDTA (na concentração de 10 mM) não inibiu a atividade enzimática. N-etilmaleimida (NEM) e o ditioneitol (DTT) inibiram fortemente a enzima, indicando a presença de um grupo sulfidril que participa da reação enzimática. A temperatura ótima de atividade da TGase foi de 50°C, sendo que a 80°C não foi identificada atividade enzimática e o pH ótimo foi de 8,0, sendo a enzima inibida abaixo de pH 5,0 e acima de pH 9,0.

A linhagem de *Bacillus subtilis* AJ1307 foi isolada por SUZUKI et al. (2000) e apresentou elevada atividade de MTGase. A enzima foi produzida por fermentação, purificada e caracterizada. A temperatura ótima de atividade da MTGase foi de 60°C e o pH ótimo de atividade de 8,2. A massa molecular da MTGase foi estimada em 29 kDa, valor inferior ao da MTGase de *Streptoverticillium* sp. S-8112, que apresentou 37,9 kDa (KANAJI et al., 1993).

A transglutaminase produzida pela linhagem de *Actinomadura* sp. T-2 apresentou mais de 80% de atividade residual após 10 minutos de incubação a 37°C na faixa de pH de 5,0 a 9,0, sendo o pH ótimo de 8,0. A temperatura ótima de atividade foi de 45°C, sendo que a enzima apresentou boa estabilidade em temperaturas abaixo de 45°C. A MTGase de *Actinomadura* sp. apresentou atividade mesmo na ausência de íons cálcio, sendo, portanto, cálcio independente. Quanto à habilidade de formar gel em solução de proteínas, foi observado que esta MTGase pode atuar sobre albuminas, caseínas, gelatina, hemoglobina, proteínas da soja, porém não atuou sobre as proteínas da gema do ovo (KIM et al., 2000).

HO et al. (2000) estudaram a produção, purificação e caracterização da transglutaminase obtida pela fermentação da linhagem *Streptoverticillium ladakanum*. A MTGase purificada apresentou pH ótimo na faixa de 5,0 a 6,0 e pH de estabilidade na faixa de 5,0 a 7,0. A temperatura ótima de atividade da MTGase foi de 40°C, sendo estável até

35°C. Esta enzima purificada não foi inibida por EDTA, porém sua atividade foi inibida pelos cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Cd^{2+} . Os cátions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} elevaram a atividade da MTGase.

A linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* isolada por CUI et al. (2007a) apresentou elevada atividade de transglutaminase sendo que a enzima purificada apresentou massa molecular de 38 kDa e temperatura de atividade ótima entre 37°C e 45°C apresentando boa estabilidade quando incubada por 30 minutos a 40°C. A faixa de pH ótimo de atividade da MTGase foi de 6,0 a 7,0 apresentando boa estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 9,0. A MTGase desta linhagem de *Streptomyces* foi fortemente inibida pelos cátions Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} (os quais reagem preferencialmente com grupos tiol) e Fe^{3+} , não sendo inibida por Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} e Co^{2+} .

A transglutaminase recombinante de *Streptoverticillium platensis* foi purificada e caracterizada por LIN et al., 2008. Os autores verificaram que o pH ótimo de atividade da MTGase recombinante purificada foi de 5,0 - 6,0, sendo estável na faixa de pH de 4,0 a 8,0 por 30 minutos a 37°C. A temperatura ótima de atividade da transglutaminase recombinante foi 50°C, sendo estável até a temperatura de 55°C durante 30 minutos de incubação. Esta MTGase não apresentou dependência na atividade de íons cálcio e a presença de grupos tióis no sítio ativo foi sugerido pela forte inibição da atividade da MTGase recombinante por íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} e por p-cloromercuribenzoato (PCMB). A massa molecular foi estimada em 40 kDa.

Desta forma, as diferentes fontes de transglutaminase podem apresentar diferentes características bioquímicas, sendo que a enzima obtida de microrganismos, em geral, apresenta uma ampla faixa de pH de estabilidade (pH 5,0 a 8,0), a temperatura de estabilidade está em torno de 40°C, e a temperatura ótima em torno de 45°C, sendo que apresentam atividade enzimática a temperaturas baixas. As transglutaminases microbianas apresentam massa molecular em torno de 38kDa, a qual é inferior a massa molecular da transglutaminase purificada de porquinhos da índia. As transglutaminases também apresentam variações quanto a especificidade em relação ao substrato

dependendo da fonte. Estas características bioquímicas permitem que a MTGase seja aplicada em produtos variados tanto na indústria de alimentos quanto em outros ramos de atuação.

A estabilidade térmica da transglutaminase pode ser aumentada através da aplicação de estabilizantes. CUI et al. (2007b) avaliaram o efeito da aplicação de polióis e outros compostos (sorbitol, glicerol, sacarose, maltodextrina, PEG 6000 e fucose) na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus*. A MTGase foi incubada na presença dos diferentes compostos a 50°C por 30 minutos, na concentração de 10% (com exceção do PEG 6000 que foi aplicado na concentração de 0,8 mol/L), sendo que o glicerol e o sorbitol apresentaram o maior efeito na estabilidade térmica da enzima, sendo preservada cerca de 75% da atividade enzimática em comparação a 35% quando a enzima foi incubada nas mesmas condições sem aditivos.

O efeito do etanol na estabilidade e nas alterações conformacionais da estrutura da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* em solução aquosa contendo etanol foi estudado por CUI et al. (2008). Os pesquisadores evidenciaram que a enzima em solução aquosa com 10% de etanol teve sua atividade elevada cerca de 20%, após incubação por 60 minutos a 25°C e que soluções enzimáticas com 50% de etanol levavam a redução da atividade de MTGase em torno de 84%, sendo observado que em concentrações acima de 30% de etanol a estabilidade da MTGase foi reduzida por mudanças conformacionais na estrutura molecular. A fim de avaliar o aumento da estabilidade da MTGase em soluções aquosas contendo etanol, foram avaliadas a adição de substâncias estabilizadoras (cálcio, glicerol, sacarose, sorbitol e PEG 6000). O PEG 6000 foi o estabilizador que apresentou maior efeito na solução de MTGase com 50% de etanol, sendo que 40% da atividade enzimática foi preservada.

Desta forma, é possível aprimorar a estabilidade térmica da MTGase em meio aquoso ou em soluções aquosas em presença de etanol, a qual pode ser utilizado como meio reacional para a MTGase atuar em proteínas não solúveis em água, mas solúveis em

soluções aquosas de solventes orgânicos (CUI et al., 2008), ampliando as possibilidades de aplicação industrial da MTGase.

II.2.2. Aplicações industriais da TGase

Os agregados protéicos gerados pela ação da transglutaminase são de interesse para as indústrias alimentícias, pois podem elevar o valor nutricional de produtos protéicos, devido à incorporação de aminoácidos. Segundo YOKOYAMA et al. (2004), os aminoácidos agregados pelas ligações cruzadas catalisadas pela MTGase podem ser metabolizados por enzimas endógenas. O aprimoramento das características reológicas de produtos protéicos também é de grande interesse (MOTOKI e Seguro, 1998; YOKOYAMA et. al, 2004). Um fato importante é a enzima apresentar atividade mesmo a baixas temperaturas (ANDO et al., 1989), o que pode ser um diferencial para determinados produtos em que a aplicação de calor é indesejada.

A transglutaminase pode ser utilizada na reestruturação de carnes ao formar ligações cruzadas entre as proteínas de diversos pedaços pequenos. Este processo não necessita de adição de cloreto de sódio e nem de fosfatos, fato positivo para a saúde do consumidor (YOKOYAMA et al., 2004). Esta propriedade tem chamado a atenção não somente das indústrias alimentícias, mas também de chefes de cozinha que utilizam a enzima para unir carnes de diversos sabores, inclusive agregando pescados à carne bovina. Na fabricação de produtos lácteos, a MTGase 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 enzima possibilita a redução do teor de gorduras ou de sólidos não gordurosos (YOKOYAMA et al., 2004).

Na produção de iogurte a base de leite caprino, a aplicação da transglutaminase apresenta-se como uma alternativa tecnológica para aprimorar a textura do produto, o

qual apresenta baixa consistência quando comparado ao produto de origem bovina. FARNSWORTH et al. (2006) aplicaram MTGase comercial no tratamento de leite de cabra reconstituído utilizado na formulação de iogurte com probióticos. A consistência do produto foi significativamente melhorada e a sinerese reduzida, além da sobrevivência da cultura probiótica não sofrer interferências negativas.

A aplicação da transglutaminase em produtos derivados do leite também apresenta importância nas formulações em que parte do leite é substituída por soro de leite (uma prática importante para redução dos descartes de efluentes e redução de custos). A TGase, pode melhorar a textura de produtos como iogurtes, além de reduzir a sinerese, sem a necessidade de adição de hidrocolóides ou outras matérias sólidas (LORENZEN et al, 2002). GAUCHE et al. (2009) observaram que a aplicação de TGase em iogurtes formulados com 20% e 30% de soro de leite líquido reduziu a sinerese do produto em relação ao iogurte de mesma formulação sem o tratamento enzimático. A consistência do iogurte contendo 20% de soro de leite líquido foi similar a do produto contendo apenas leite sem tratamento enzimático.

Para produtos a base de peixe, a transglutaminase está relacionada ao processo conhecido como *suwari*, no qual uma pasta consistente é formada a baixa temperatura. Tanto a enzima endógena quanto a MTGase podem atuar nas proteínas gerando a consistência desejada para os produtos (YOKOYAMA et al., 2004). Como exemplo de produtos que podem ser produzidos por este processo tem-se o *surimi* e *kamaboko*.

Na fabricação do tofu, um produto a base de soja curado, a MTGase pode ser utilizada para elevar a vida útil do produto, tornando o gel mais resistente à ação da temperatura utilizada no processo de fabricação (YOKOYAMA et al., 2004). Em macarrão tipo *noodles* e outras massas, a MTGase previne modificações drásticas na textura da massa durante cozimento, além de aprimorar a força do produto. Em massas para pão, a enzima melhora o volume do produto quando utilizado na produção da massa (YOKOYAMA et al., 2004).

A aplicação da transglutaminase na produção de produtos cárneos, reestruturados ou emulsionados, é de grande interesse visto que as ligações cruzadas formadas entre as proteínas da carne permitem a obtenção de produtos com textura aprimorada e sem a necessidade de adição de fosfatos, coadjuvante que retém água melhorando a textura e suculência de produtos cárneos. O efeito da TGase nos produtos cárneos depende da variedade de carne, desta forma a especificidade de substratos desta enzima tornam sua ação diferente nas proteínas de carne de porco, frango ou carne bovina (AHHMED et al., 2009). MUGURUMA et al. (2003) evidenciaram que a incorporação de proteínas de soja e leite, modificadas pela ação da transglutaminase, em lingüiça de frango aprimoraram sua textura com a redução da concentração de tripolifosfato de sódio na formulação.

Na produção de microcápsulas por coacervação complexa, é interessante que a cápsula seja fortalecida. Este processo é conhecido como *cross-linking* ou *hardening*. DONG et al. (2008) avaliaram a aplicação de transglutaminase como agente para formação de ligações cruzadas entre os polímeros que formam a parede de microcápsulas esféricas multinucleadas, sendo que estas apresentaram características similares a apresentadas pelos agentes tradicionais e apresentando a vantagem de não interferir no sabor e não ser tóxica.

CORTEZ et al. (2007) avaliaram a aplicação de MTGase para enxertar proteínas de seda em fibras de algodão e observaram a elevação da força dos fios do tecido (o que eleva a longevidade do mesmo) bem como o aumento da maciez do tecido em comparação a tratamentos semelhantes comercialmente disponíveis no mercado.

A transglutaminase apresenta aplicação na engenharia de tecidos humanos, não sendo utilizada diretamente no crescimento destes tecidos, mas sim na produção de matrizes protéicas (de colágeno ou gelatina), suportes para o seu desenvolvimento (ZHU & TRAMPER, 2009).

II.3. Material e métodos

II.3.1. Caracterização bioquímica da MTGase bruta de *Streptomyces* sp. P20

II.3.1.1. Preparo do extrato enzimático

Para a produção de transglutaminase a linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi fermentada em reator de bancada de 6L contendo 2,7 L de meio de cultivo composto de 2,5% de extrato de farinha de soja (preparado conforme descrito no item I.3.3.3), 2% de amido de batata, 1% de peptona, 0,1% de glicose, 0,4% de KH_2PO_4 e 0,2% de MgSO_4 ajustado para pH 7,0. O reator foi inoculado assepticamente com 300 mL de pré-inóculo preparado conforme descrito no item I.3.3.3 e a fermentação foi realizada a 26°C, 150 rpm e 1,1 vvm, durante 86 horas. O meio de cultivo foi centrifugado a 9630 x g por 10 minutos a 5°C e o sobrenadante foi liofilizado e mantido a -4°C.

II.3.1.2. Temperatura ótima de atividade da MTGase

A temperatura ótima de atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliada a 5, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70°C. O pH da reação foi mantido em 6,0 que é o valor de referência da literatura para medida de atividade. Como foram obtidas duas faixas de pH ótimo de atividade, o ensaio foi realizado também em pH 9,0.

Uma alíquota de 400 µL de solução de extrato enzimático (0,01 g/mL) em tampão citrato 0,2 M, pH 6,0 foi adicionada a 75 µL de solução CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 30 mM, 25 µL de solução de hidroxilamina 0,1 M. Os tubos de ensaio foram

incubados nas diferentes temperaturas por 60 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram transferidos para banho de gelo e 500 µL de solução ácida de FeCl₃ e TCA (preparada conforme descrito no item I.4.1.1). foi adicionado aos tubos de ensaio. A absorbância das soluções foi medida a 525 nm em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter_{TM}) e a atividade enzimática calculada como µmol de ácido hidroxâmico formado por minuto por mL de enzima usando curva padrão obtida com L-ácido glutâmico-γ-ácido monohidroxâmico e expressa em termos de atividade relativa. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

II.3.1.3. pH ótimo de atividade da MTGase

O pH ótimo de atividade da MTGase da linhagem de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliado em pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0. Para os valores de pH 3,0 a 6,5 foi utilizado tampão citrato, 0,05M. Para os valores de pH de 7,2 a 9,0 foi utilizado tampão TRIS-HCl, 0,05M e para o pH 10,0 foi utilizado tampão bórax – NaOH , 0,05 M.

Uma alíquota de 400 µL de solução de extrato enzimático (0,01g/mL) em tampão com pH a ser avaliado foi adicionada a 75 µL de solução CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 30mM, 25µL de solução de hidroxilamina 0,1M. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 60 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram transferidos para banho de gelo e 500 µL de solução ácida de FeCl₃ e TCA (preparada conforme descrito no item I.4.1.1) foi adicionada à reação. A absorbância das soluções foi avaliada a 525nm em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter_{TM}) e a atividade enzimática calculada como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

II.3.1.4. Delineamento experimental para determinação do pH e temperatura ótimo de atividade da MTGase.

Para verificar se o efeito da interação entre pH e temperatura de incubação da enzima apresentava interferência na atividade enzimática, foi realizado um delineamento fatorial completo, com 3 pontos centrais. As variáveis foram codificadas de acordo com a equação (II.1), onde x_i é a variável codificada, X_i é a variável natural, X_0 é a variável natural no ponto central, e ΔX_i é faixa de variação entre as variáveis. As variáveis e seus níveis estão detalhados na Tabela 15. Os valores das variáveis aplicados a cada nível do estudo foram baseados nos resultados obtidos nos ensaios univariados descritos anteriormente.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (\text{II} - 1)$$

Desta forma, foram realizados 4 ensaios referentes ao delineamento fatorial, 4 ensaios referentes aos pontos axiais e 3 ensaios no ponto central, totalizando 11 experimentos. Os efeitos das variáveis, lineares e quadráticos, e de suas interações foram avaliados quanto à significância estatística com 95% de confiança.

Os efeitos significativos foram utilizados para compor um modelo matemático capaz de prever a atividade de MTGase dentro das faixas de pH e temperatura estudadas. Este modelo foi avaliado quanto a sua significância estatística através da análise de variância (ANOVA) e foi calculado o coeficiente de múltipla correlação (R^2) para verificar quanto da variabilidade das respostas são previstas pelo modelo. Todas as análises estatísticas foram avaliadas com auxílio do software Statistica 7.0.

II.3.1.5. Temperatura de estabilidade da MTGase

A temperatura de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliada a 5, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70°C. O pH da reação foi mantido em 6,0 que é o valor de referência da literatura para realização da medida de atividade.

Alíquotas de 400 µL de solução de extrato enzimático (0,01g/mL) em tampão citrato 0,2 M, pH 6,0 foi incubada nas diferentes temperaturas por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 µL de solução CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 30 mM, 25 µL de solução de hidroxilamina 0,1 M e os tubos de ensaio foram incubados por 60 minutos a 37°C. Os tubos de ensaio foram, então, transferidos para banho de gelo e 500 µL de solução ácida de FeCl₃ e TCA (preparada conforme descrito no item I.4.1.1) foi adicionada às misturas de reação. A absorbância das soluções foi avaliada a 525nm em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter_{TM}) e a atividade enzimática residual calculada como descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Foi estudada a influência de L-cisteína, L- glutationa e PEG 6000 na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. P20. Alíquotas de 200 µL de solução de extrato enzimático bruto (0,02g/mL) em tampão citrato 0,2M, pH6,0 e 200 µL de solução de L-cisteína, L-glutaciona e PEG 6000, na concentração final de 10mM foram incubadas a 35, 40, 45, e 50°C por 30 minutos. Em seguida a atividade residual foi determinada adicionando-se 75µl de solução CBZ-glutaminil-glicina 30mM e 25µL de solução de hidroxilamina 0,1M. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 60 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Como controle foi determinada a atividade de MTGase da solução de extrato enzimático bruto sem adição de reagentes. A atividade residual foi determinada conforme descrito anteriormente. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, realizado com auxílio do software MINITAB[®] 14.1.

II.3.1.6. pH de estabilidade da MTGase

A faixa de pH de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliada em pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0. Para os valores de pH 3,0 a 6,5 foi utilizado tampão citrato, 0,05M. Para os valores de pH de 7,2 a 9,0 foi utilizado tampão TRIS-HCl, 0,05M.

Alíquotas de 200 µL de solução de extrato enzimático (0,02g/L) em diferentes soluções tampão foram incubadas a 25°C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 µL de solução CBZ-glutaminil-glicina (Sigma C6154-1G) 30mM, 25µL de solução de hidroxilamina 0,1M e 200 µL de tampão citrato 0,2M com pH 6,0. As misturas de reações foram incubadas a 37°C por 60 minutos, e em seguida, os tubos de ensaio foram transferidos para banho de gelo e 500 µL de solução ácida de FeCl₃ e TCA (preparado conforme descrito anteriormente) foi adicionada aos tubos de ensaio. A absorbância das soluções foi avaliada a 525nm em espectrofotômetro (DU[®] 640, Beckman Coulter_{TM}) e a atividade enzimática residual calculada da mesma forma descrita anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

II.3.1.7. Inibidores e ativadores da MTGase

O efeito de alguns sais e compostos inibidores na atividade enzimática da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20 foi avaliado pela incubação de alíquotas de 200µL de solução de extrato enzimático bruto em tampão citrato 0,2M pH 6,0, contendo 10,0 , 1,0 e 0,1 mM dos compostos EDTA, L-cisteína, L- glutationa, ZnCl₂, CoCl₂, CuSO₄, BaCl₂, FeCl₃, KCl, MnCl₂, MgSO₄, HgCl₂, PEG 6000, CaCl₂ e NaCl, por 30 min a 25°C. Em seguida a atividade residual de MTGase foi determinada adicionando-se 75 µl de solução

de CBZ-glutaminil-glicina 30 mM e 25 µL de solução de hidroxilamina 0,1M e 200µL de tampão citrato 0,2M pH6,0. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C por 60 minutos e em seguida, transferidos para banho de gelo e 500 µL de solução ácida de FeCl₃ e TCA (preparado conforme descrito anteriormente) foi adicionada aos tubos de ensaio. A absorbância das soluções foi medida a 525nm em espectrofotômetro (DU® 640, Beckman Coulter™) e a atividade enzimática residual foi calculada conforme descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

II.3.2. Aplicação da enzima MTGase de *Streptomyces* sp. P20

II.3.2.1. Aplicação da MTGase na reestruturação de pedaços de carne bovina

A preparação bruta de MTGase obtida por fermentação de *Streptomyces* sp. P20 foi aplicada em cubos de carne bovina, a fim de avaliar sua capacidade de unir os pedaços de carne. Os resultados da reestruturação foram comparados com o efeito da enzima comercial (Activa® TG-BP, Ajinomoto Co.) e com o controle, no qual não foi aplicada enzima.

A enzima comercial e a produzida pelo microrganismo em estudo foram aplicadas aos pedaços de carne na forma de solução aquosa.

Para a utilização das enzimas em solução aquosa, foram preparadas soluções de extrato enzimático bruto de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e de MTGase comercial contendo 1 U/mL. Alíquotas de 10 mL de solução de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e de MTGase comercial foram adicionadas às amostras de 10 g de carne bovina cortadas em cubos de 1 cm de aresta e misturadas com bastão de vidro, para obtenção de 1 U/g de

carne. Amostras controle foram preparadas utilizando-se água destilada no lugar da solução enzimática.

As amostras de carne tratadas com as enzimas foram transferidas para sacos plásticos (20 x 4 cm), o ar foi retirado das mesmas com uma bomba de vácuo e os sacos foram fechados com barbante. As amostras foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após a incubação os sacos plásticos foram abertos e a união dos pedaços de carne crua foi observada visualmente.

II.3.2.2. Aplicação da MTGase em proteína de soja texturizada

A proteína de soja texturizada foi previamente hidratada na proporção soja:água destilada de 1:1 (m:v). A enzima comercial e a produzida pelo microrganismo em estudo foram aplicadas aos pedaços de carne na forma de solução aquosa.

Para a utilização das enzimas em solução aquosa, foram preparadas soluções de extrato enzimático bruto de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e de MTGase comercial contendo 1U/mL. Alíquotas de 10 mL de solução de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e de MTGase comercial foram adicionadas às amostras de 10 g de proteína de soja texturizada umedecida e misturadas com bastão de vidro, para obtenção de 1 U/g de soja texturizada. Amostras controle foram preparadas utilizando-se água destilada no lugar da solução enzimática.

As amostras de proteína de soja tratadas com as enzimas foram transferidas para sacos plásticos (20 x 4 cm), o ar foi retirado dos mesmos com uma bomba de vácuo e os sacos foram fechados com barbante. As amostras foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após a incubação os sacos plásticos foram abertos e a união dos pedaços da proteína de soja foi observada visualmente.

II.4. Resultados e discussões

II.4.1. Caracterização da MTGase bruta de *Streptomyces* sp. P20

II.4.1.1. Temperatura ótima da atividade de MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Figura II-1 ilustra que o extrato bruto de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 apresentou duas frações com atividade de transglutaminase, sendo que a fração ativa em pH 6,0 mostrou atividade ótima a 35°C e a fração ativa em pH 9,0 mostrou atividade ótima a 40°C.

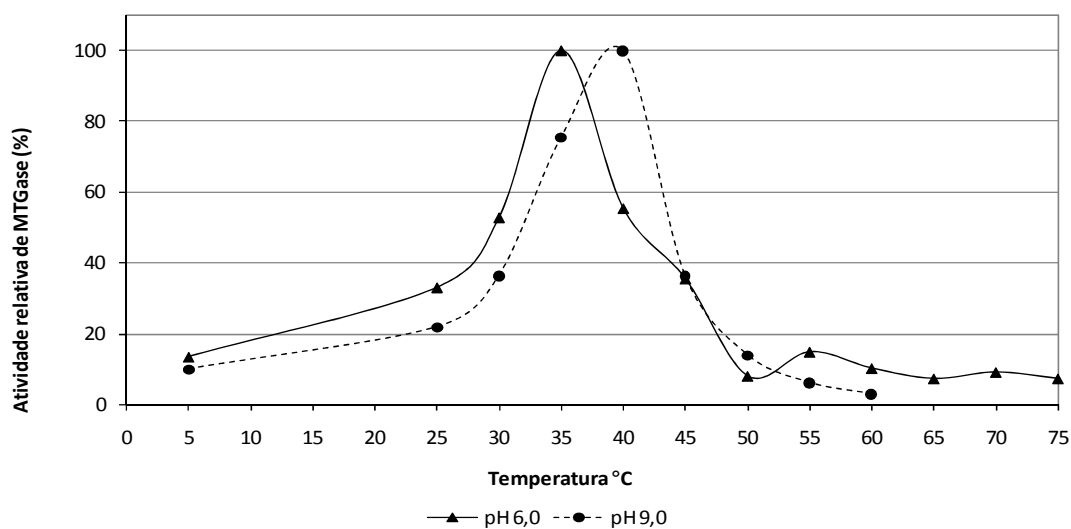


Figura II-1 - Temperatura ótima de atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 em pH 6,0 e 9,0.

Os resultados obtidos para a temperatura ótima da MTGase bruta de *Streptomyces* sp. P20, tanto com a incubação em pH 6,5 quanto em pH 9,0, foi inferior a da MTGase purificada obtida de *Streptoverticillium* S-8112 (ANDO et al., 1989) que apresentou temperatura ótima de atividade de 50°C, resultado semelhante ao obtido para a MTGase purificada de *S. mobaraense* WSH-Z2, que foi de 52°C (LU et al., 2002) e a MTGase purificada de *Bacillus subtilis*, com temperatura ótima de 50°C (KOBAYASHI et al., 1998). MACEDO (2009) purificou e caracterizou a transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20 obtida por fermentação. A temperatura ótima da enzima purificada foi de 40°C, levemente superior a temperatura obtida para a MTGase bruta em pH 6,5. A temperatura ótima da enzima após a purificação pode sofrer alterações, devido à retirada de componentes presentes no meio de cultura que influenciam este parâmetro.

A MTGase purificada de MTGase de *Streptoverticillium Idakanum* descrita por HO et al. (2000) apresentou temperatura ótima de atividade a 40°C enquanto que a MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* mostrou atividade ótima entre 37°C e 45°C (CUI et al., 2007a).

II.4.1.2. pH ótimo de atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Figura II-2 ilustra que o extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. P20 apresentou frações de MTGase com atividade ótima em pH 6,5 e pH 9,0, sugerindo a presença de isoenzimas com características de pH e temperatura ótima de atividade diferentes.

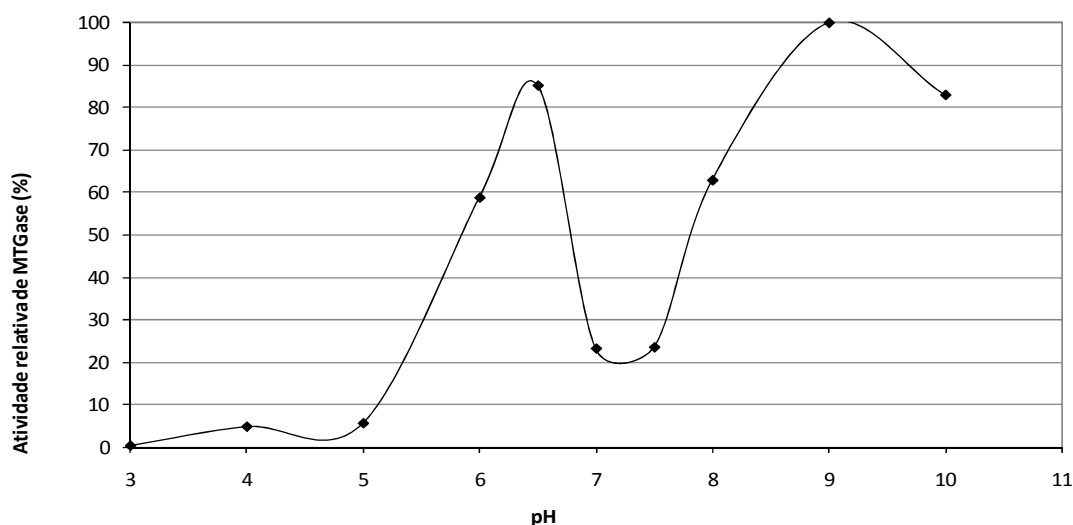


Figura II-2 - pH ótimo de atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 a 37°C.

A enzima purificada de *Streptomyces* sp. P20 (MACEDO, 2009) apresentou pH ótimo de atividade na faixa de 6,0 a 6,5. Muitas MTGases descritas na literatura apresentam atividade ótima próxima a estes valores. As MTGases de *Streptoverticillium* S-8112 (ANDO et al., 1989) e *Streptomyces hygroscopicus* (CUI et al., 2007a) apresentaram atividade ótima na faixa de pH 6,0 a 7,0; a enzima de *Streptoverticillium ladakanum* (HO et al., 2000) mostrou atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 6,0. Em contraste a estes valores, as MTGases das linhagens de *Bacillus subtilis* AJ1307 e *Actinomadura* sp. T-2 apresentaram atividade ótima em pH 8,2 e 8,0, respectivamente (SUZUKI et al., 2000; KIM et al., 2000).

MACEDO (2009) observou que a preparação bruta de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 apresentou atividade ótima em pH 6,5 e pH 9,0. Na purificação da enzima por filtração em coluna de Sephadex G-75, concentração das frações ativas e novamente filtração da amostra na mesma coluna, a fração de MTGase purificada apresentou atividade ótima em pH 6,5.

II.4.1.2.1. Delineamento experimental para determinação do efeito da interação da temperatura e pH na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Tabela II-1 apresenta os resultados obtidos no planejamento fatorial completo e os níveis de estudo para as variáveis temperatura (T) e pH.

Tabela II-1 - Variáveis codificadas e valores reais (em parênteses) das variáveis do planejamento fatorial 2^2 com pontos axiais e centrais do estudo do efeito da temperatura e do pH na atividade de MTGase

Ensaio	T(°C)	pH	Atividade (U/mg de extrato enzimático)	Atividade Enzimática Relativa (%)
1	31,5	5,8	5,308	70,4
2	38,5	5,8	2,807	37,2
3	31,5	7,2	2,873	38,1
4	38,5	7,2	1,475	19,6
5	30	6,5	4,412	58,5
6	40	6,5	2,212	29,3
7	35	5,5	2,034	27,0
8	35	7,5	1,401	18,6
9	35	6,5	7,278	96,5
10	35	6,5	7,540	100,0
11	35	6,5	6,929	91,9

A Tabela II-2 apresenta os efeitos de cada variável, bem como de suas interações e a avaliação estatística de cada efeito para verificação de suas significâncias.

Tabela II-2 - Efeitos estimados, erro padrão, Teste t-Student e p-valor para a atividade de MTGase do delineamento fatorial completo 2².

Fator	Efeito	Desvio Padrão	t(2)	p-valor
Média/Interação*	7,249	0,177	40,982	0,000595
Temperatura (L)*	-1,753	0,217	-8,090	0,014937
pH (L)*	-3,637	0,258	-14,103	0,004990
Temperatura (Q)*	-1,165	0,217	-5,379	0,032872
pH (Q)*	-5,231	0,259	-20,287	0,002421
Temperatura x pH	0,552	0,306	1,801	0,213465

R² = 0,96, *Fatores com efeito significativo

Os p-valores calculados pelo software Statistica 7.0 indicam que todos os termos lineares e quadráticos apresentam efeito significativo (com 95% de confiança) sobre a atividade da enzima. A interação entre as variáveis não apresenta efeito sobre a resposta. Desta forma, a equação II-2 apresenta o modelo estatístico com termos significativos, codificados.

$$\text{Atividade (U/mg de extrato enzimático)} = 7,25 - 0,88.T - 1,82.T^2 - 0,58.pH - 2,62.pH^2 \quad (\text{II-2})$$

O modelo estatístico foi avaliado através da ANOVA, cujos resultados estão na Tabela II- 3. Observou-se que a regressão foi significativa, visto que no teste de Fisher, o F_{calculado} foi maior que o valor tabelado. A falta de ajuste não foi significativa a 95% de confiança e o coeficiente de regressão múltipla foi de 0,96, indicando que o modelo estatístico é capaz de justificar 96% da variabilidade das observações realizadas. Desta forma, a equação II-2 pode ser utilizada para prever os valores de atividade de TGase, em U/ mg de extrato enzimático, para reações incubadas dentro das faixas de pH e temperatura avaliadas no planejamento, e para determinar o valor ótimo para estes parâmetros, dentro da faixa estudada.

Tabela II-3 - Análise de variância para a atividade de MTGase do planejamento experimental fatorial completo 2² do estudo do efeito da temperatura e pH na atividade de MTGase de *Streptomyces* sp. P20

Fator	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Soma dos quadrados médios	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	54,30	4,00	13,57	35,05	4,53
Resíduos	2,32	6,00	0,39		
Falta de Ajuste	2,14	4,00	0,53	5,69	19,25
Erro Puro	0,19	2,00	0,09		
Total	56,62	10,00			

$$R^2 = 0,96$$

A Figura II-3 ilustra a superfície de resposta e as curvas de contorno para a atividade de MTGase em função da temperatura e pH de incubação indicando que a temperatura ótima e o pH ótimo de atividade enzimática ocorrerão em 35°C e 6,5 respectivamente. Estes resultados estão compatíveis com os valores obtidos nos ensaios univariados, fato esperado, visto que o efeito da interação entre a temperatura e o pH foi estatisticamente não significativo.

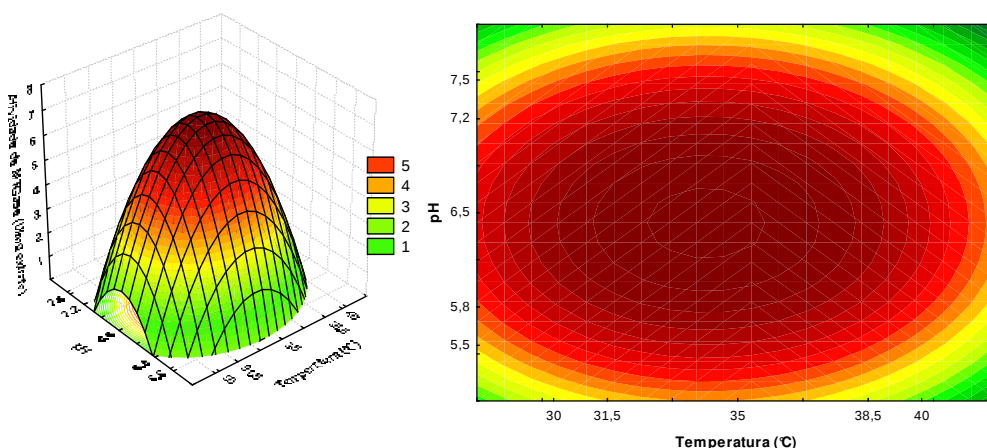


Figura II-3 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para o efeito da temperatura e pH na atividade de MTGase de *Streptomyces* sp. P20.

A faixa de pH estudada não permitiu avaliar a melhor temperatura para regiões de pH próximas ao valor 9,0. Como os resultados dos ensaios univariados foram similares para as duas faixas de pH e como no planejamento fatorial completo 2^2 o efeito da interação entre pH e temperatura não foi significativo, optou-se por realizar o planejamento experimental apenas para esta faixa de pH.

II.4.1.3. Temperatura de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Figura II- 4 apresenta a atividade relativa residual de MTGase quando submetidas a diferentes temperaturas por 30 minutos em pH 6,0. A enzima produzida por *Streptomyces* sp. P20 apresentou 70% de atividade residual quando submetida à 30°C por 30 minutos, sendo que, quando submetida à temperaturas superiores a 35°C a enzima foi inativada rapidamente, sendo que praticamente não foi verificada atividade residual em temperaturas acima de 50°C.

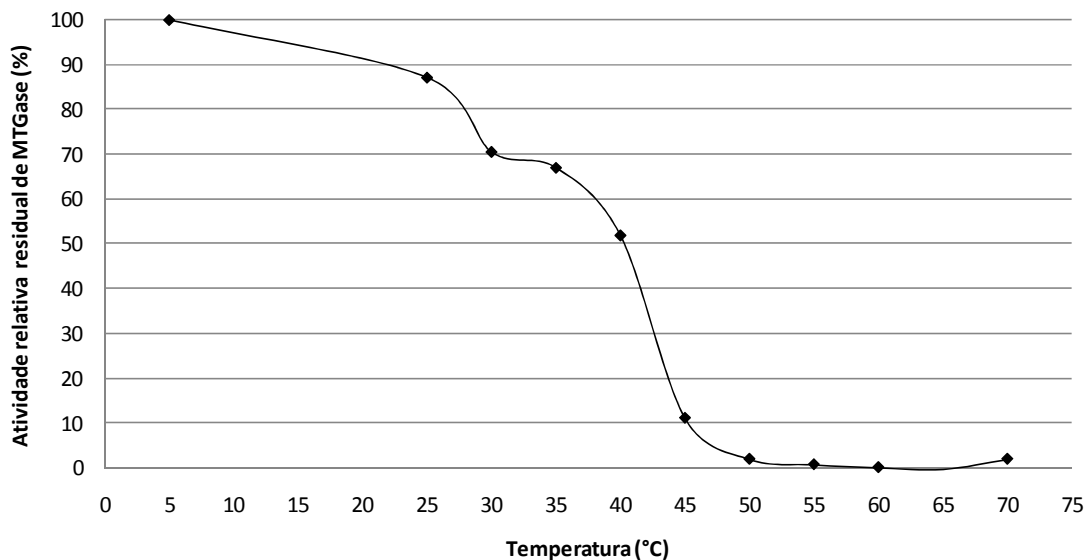


Figura II-4 - Temperatura de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A MTGase de *Streptomyces* sp. P20 purificada apresentou boa estabilidade até a temperatura de 45°C, quando incubada por 30 minutos em pH 6,0, sendo que a incubação da enzima a 50°C por 30 minutos levou a perda de aproximadamente 80% da atividade inicial (MACEDO, 2009). Desta forma, a purificação elevou a estabilidade térmica da transglutaminase de *Streptomyces* sp. P20. A estabilidade térmica da MTGase purificada de *Streptomyces* sp. P20 foi semelhante a da MTGase obtida pela linhagem de *Streptomyces hygroscopicus* isolada por CUI et al. (2007a), que mostrou-se estável até 40°C por 30 minutos.

A Figura II-5 ilustra o efeito dos reagentes PEG 6000, L-cisteína e L-glutathione, na concentração final de 10 mM, na estabilidade térmica da TGase de *Streptomyces* sp. P20. Observou-se que os três reagentes apresentaram efeito sobre a estabilidade térmica da MTGase, além de exercer efeito ativador da enzima. A L-cisteína aumentou em 114% a atividade inicial da MTGase, sendo que após 30 minutos de incubação a 40°C a atividade da MTGase foi superior à do extrato bruto sem adição das substâncias. O efeito da L-glutathione e do PEG 6000 também foram positivos em relação a estabilização da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 a 40°C.

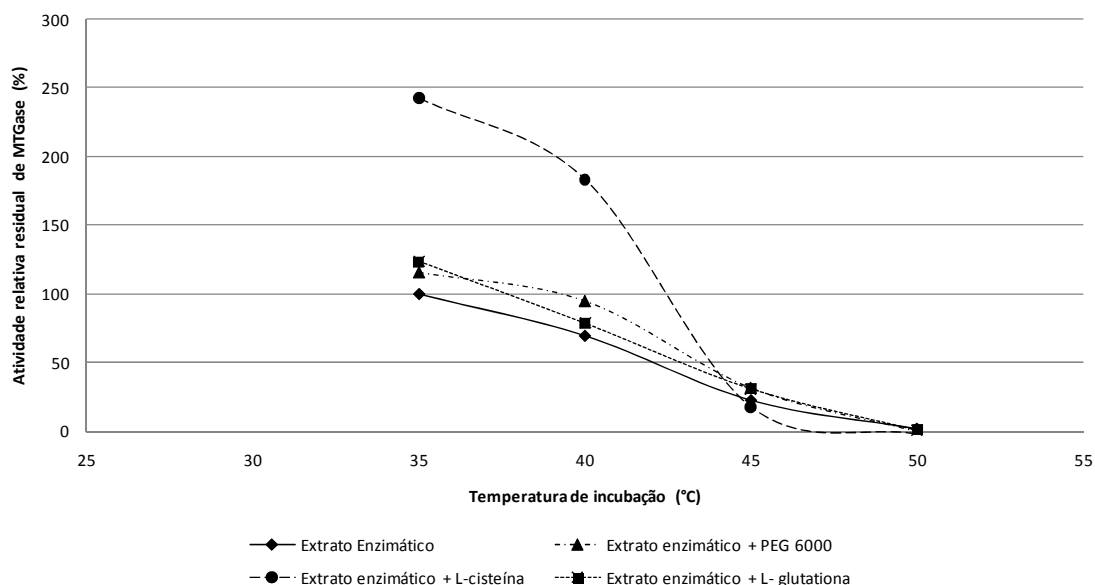


Figura II-5 – Efeito dos compostos PEG 6000, L- cisteína e L-glutaciona na estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Tabela II-4 apresenta as médias das atividades residuais relativas de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e seus desvios padrão. A comparação estatística das médias (teste de Tukey) apontou que não há diferença significativa, com 95% de confiança, entre os resultados de atividade enzimática do extrato enzimático bruto e do extrato enzimático bruto incubado com 10 mM de L-glutaciona e PEG 6000, no entanto a L-cisteína apresentou efeito significativo sobre a atividade residual enzimática, sendo uma opção para aumentar a estabilidade térmica da transglutaminase. CUI et al. (2007b) observaram que o PEG 6000, na concentração de 0,8 mol/L, melhorou a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13, incubada a 40°C por 30 minutos, sendo a atividade residual cerca de 30% superior a observada para a MTGase incubada sem aditivos.

Tabela II-4 - Atividades residuais relativas médias, desvios padrões, intervalos de confiança do estudo do efeito da adição dos compostos PEG 6000, L-cisteína e L-glutathiona na concentração final de 10 mM na estabilidade da MTGase tratada a 40°C em pH 6,0.

Ensaio	Atividade relativa residual	Desvio padrão
Extrato enzimático	69,70 ^a	5,95
Extrato enzimático + PEG 6000 10mM	94,61 ^a	4,05
Extrato enzimático + L-cisteína 10 mM	183,20 ^b	9,34
Extrato enzimático + L-glutathiona 10 mM	78,78 ^a	12,18

II.4.1.4. pH de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Figura II-7 ilustra que a MTGase de *Streptomyces* sp. P20 apresentou maior estabilidade na faixa de pH 6,0 a 9,0 após incubação a 25°C por 30 minutos, mantendo mais que 64% da atividade inicial.

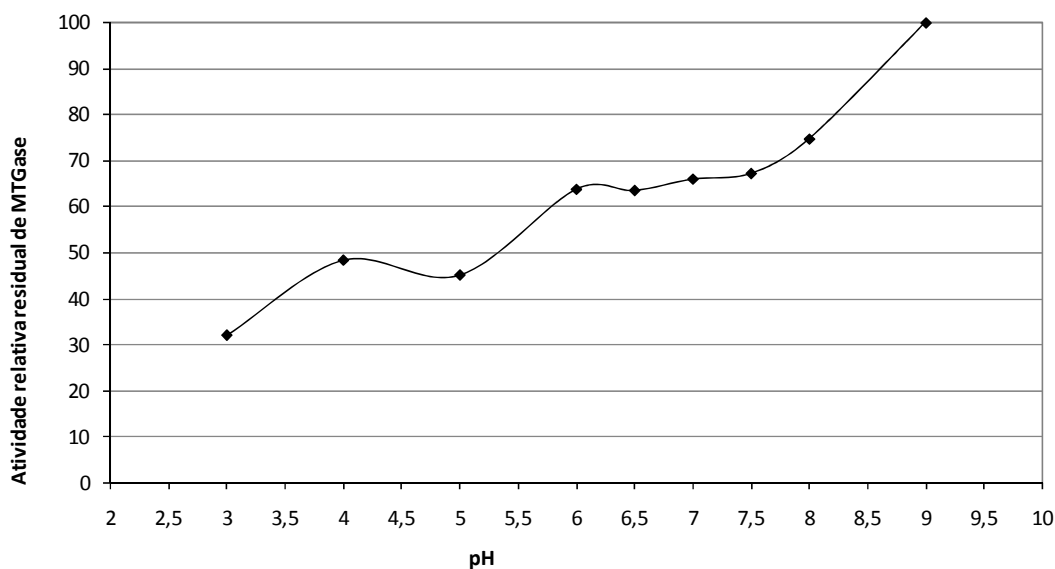


Figura II-6 - pH de estabilidade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20.

As transglutaminases produzidas por linhagens de *Streptomyces* sp. apresentam estabilidade na faixa de 5,0 a 8,0 (ANDO et al., 1989; HO et al., 2000; CUI et al., 2007; LIU et al., 2008; MACEDO, 2009). Assim a MTGase de *Streptomyces* sp. P20 apresentou estabilidade em ampla faixa de pH, contudo, em pH baixos (menores que 4,0), a enzima não é estável, podendo dificultar a aplicação em produtos alimentícios de alta acidez.

II.4.1.5. Inibidores e ativadores da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

A Figura II-8 ilustra o efeito de diferentes sais e dos compostos PEG 6000, L-cisteína, L-glutathione e EDTA na atividade de TGase de *Streptomyces* sp. P20.

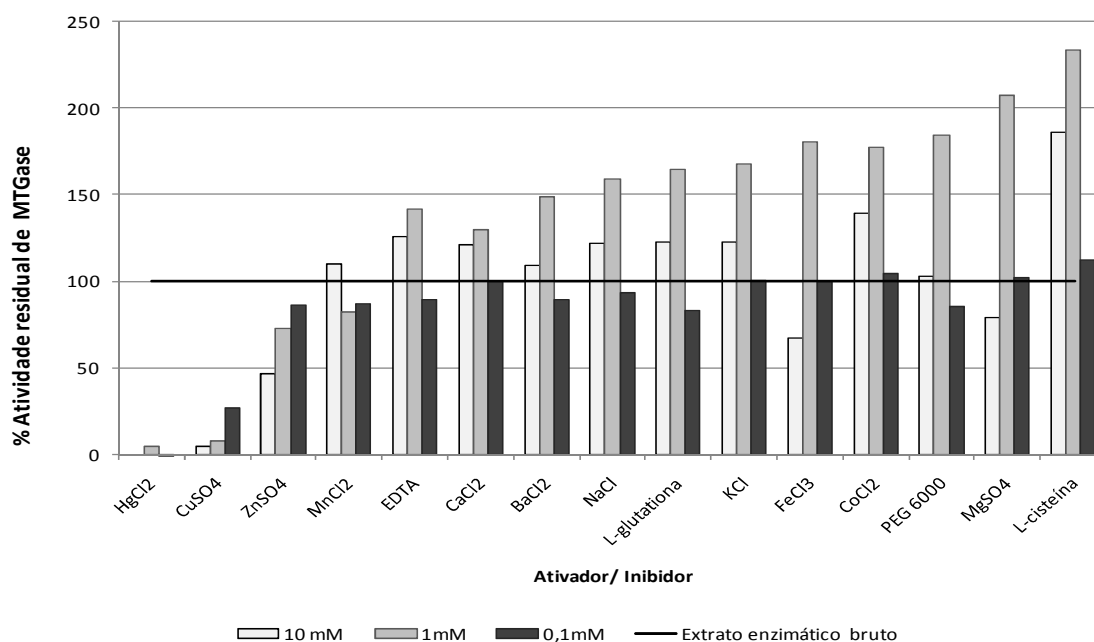


Figura II-7 – Efeito de diferentes sais e dos compostos EDTA, L-cisteína, L-glutathione e PEG 6000 na concentração final de 0,1; 1,0 e 10 mM na atividade de MTGase do extrato enzimático bruto.

O HgCl_2 e o CuSO_4 foram inibidores da enzima nas três concentrações avaliadas. O MnCl_2 e o ZnSO_4 também apresentou efeito inibitório na atividade enzimática, no entanto menos intenso que o HgCl_2 e o CuSO_4 . Os íons Hg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , reagem preferencialmente com grupos tiol sugerindo que a MTGase de *Streptomyces* sp. P20 apresenta na estrutura de seu sítio ativo grupo tiol. ANDO et al. (1989), HO et al. (2000), SUZUKI et al. (2000), CUI et al. (2007), LIU et al. (2008) relataram que a MTGase de linhagens de *Streptomyces* e *Streptoverticillium* apresentam grupo tiol no sítio ativo.

Os íons Ca^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{3+} , Co^{2+} e Mg^{2+} , na concentração de 1 mM ativaram a transglutaminase do extrato enzimático obtido de *Streptomyces* sp. P20, no entanto, na concentração final de 10 mM nas misturas de reação, não afetaram ou inativaram a enzima. Embora os íons Ca^{2+} tenham elevado a atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20, ele não foi essencial para a atividade enzimática, indicando que a enzima é cálcio independente, tal como as demais transglutaminases microbianas caracterizadas para outros microrganismos (ANDO et al., 1989; HO et al., 2000; SUZUKI et al., 2000; CUI et al., 2007; LIU et al., 2008).

O complexante EDTA na concentração final de 1 mM e 10 mM ativou a MTGase cerca de 41% e 26%, respectivamente, mas na concentração de 0,1 mM inibiu a enzima cerca de 10%.

Os compostos L-glutamina, PEG 6000 e L- cisteína nas concentrações finais de 10 mM e 1mM ativaram a MTGase de *Streptomyces* sp. P20, sendo que na concentração de 0,1 mM não houve diferença significativa entre a atividade do extrato bruto e do extrato adicionado dos compostos.

Entre os sais minerais e os compostos testados, o aminoácido L-cisteína, na concentração de 1 mM apresentou maior efeito ativador da MTGase, sendo obtido atividade 130% superior à enzima do extrato bruto sem adição de reagentes.

A Tabela II-5 apresenta os valores médios de atividade residual relativa e os desvios padrões de cada ensaio, bem como o resultado do teste de Tukey para a diferença estatística entre os resultados, com 95% de confiança.

Tabela II-5 - Atividade relativa residual média e desvios padrões para os ensaios do efeito de ativadores e inibidores da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

Concentração	Atividade relativa residual de MTGase					
	10 mM		1Mm		0,1mM	
Composto	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
HgCl₂	0 ^o	-	4,5 ^o	1,5	0,2 ^o	0,5
CuSO₄	4,8 ^o	0,7	7,8 ^{no}	0,2	26,9 ^{mno}	9,4
ZnSO₄	46,6 ^{lmno}	3,1	72,8 ^{klm}	7,0	86,9 ^{ijklm}	11,4
MnCl₂	110,2 ^{fghijk}	9,0	82,0 ^{iklm}	8,9	87,0 ^{ijklm}	9,4
EDTA	126,2 ^{cdefghijk}	2,4	141,6 ^{cdefghij}	24,7	89,7 ^{ijkl}	3,5
CaCl₂	120,7 ^{efghijk}	18,2	129,6 ^{cdefghijk}	1,5	99,9 ^{hijkl}	2,3
BaCl₂	109,0 ^{fghijkl}	6,7	148,9 ^{bcdefghi}	19,2	89,1 ^{ijklm}	35,1
NaCl	121,5 ^{efghijk}	2,4	159,3 ^{bcdefgh}	22,2	93,4 ^{ijkl}	8,0
L-glutaciona	122,6 ^{defghijk}	14,1	164,8 ^{bcdefg}	36,2	83,0 ^{ijklm}	4,4
KCl	122,9 ^{defghijk}	12,7	167,9 ^{bcdef}	27,1	100,9 ^{hijkl}	2,5
FeCl₃	67,2 ^{klmn}	10,2	180,5 ^{abcde}	0,2	100,0 ^{hijkl}	8,0
CoCl₂	139,1 ^{cdefghij}	7,5	177,6 ^{abcde}	37,4	104,8 ^{ghijkl}	1,3
PEG 6000	102,6 ^{ghijkl}	9,7	184,7 ^{abcd}	37,4	85,2 ^{ijklm}	13,8
MgSO₄	79,3 ^{klm}	1,6	207,2 ^{ab}	6,7	102,7 ^{ghijkl}	22,3
L-cisteína	186,0 ^{abc}	15,2	233,3 ^a	6,3	112,5 ^{fghijk}	11,6
Controle	100,0 ^{hijkl}	-	100,0 ^{hijkl}	-	100,0 ^{hijkl}	-

A Tabela II-6 ilustra os resultados obtidos para o efeito de íons metálicos e EDTA na ativação ou inibição das transglutaminases de *Streptomyces* sp. P 20, *Streptoverticillium* S-8112 (ANDO et al, 1989) e *Streptomyces hygroscopicus* WSH03-13 (CUI et al., 2007a) e *Streptomyces* sp. P20 (MACEDO, 2009). O controle correspondeu a incubação da enzima sem a adição de metais ou de EDTA.

Tabela II-6 – Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade de transglutaminases de *Streptomyces* sp.

Ativadores e inibidores	% de atividade relativa de MTGase			
	<i>Streptomyces</i> sp. P20 bruta (concentração dos íons de 10 mM)	<i>Streptomyces</i> sp. P20 purificada(MACEDO, 2009) (concentração dos íons de 5 mM)	<i>Streptoverticillium</i> sp. S-8112 purificada (ANDO et al., 1989) (concentração dos íons de 1 mM)	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> WSH03-13 purificada (CUI et al., 2007) (concentração dos íons de 5 mM)
Controle	100	100	100	100
Ba²⁺	109	123	94	110,6
Ca²⁺	121	112	100	107,9
Co²⁺	139	118	99	90,8
Cu²⁺	4,8	21	84	9,5
Fe³⁺	67	97	89	10,3
Mg²⁺	79	83	102	109,1
Mn²⁺	110	115	89	111
Na⁺	121	118	95	105,2
Zn²⁺	47	74	11	4,5
EDTA	126	70	111	103

O comportamento dos íons na atividade da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 bruta e purificada apresentam poucas variações, sendo a principal diferença observada, o efeito do EDTA na atividade enzimática.

II.4.2. Aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. P20

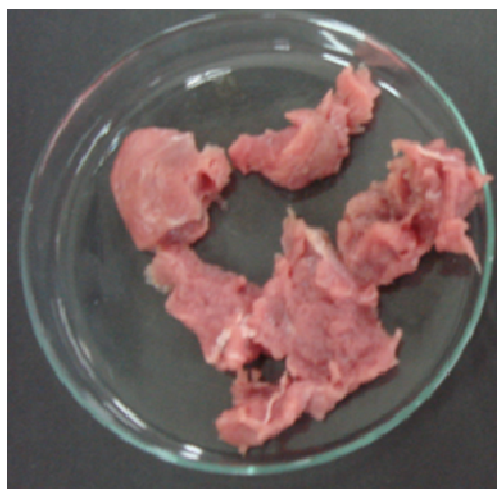
II.4.2.1. Aplicação da MTGase na reestruturação de carne bovina

A Figura II-8 apresenta os resultados da aplicação da MTGase de *Streptomyces* sp. P20 em comparação com a enzima comercial Activa® TG-BP, ambas aplicadas em solução

aquosa, e o controle, ao qual foi adicionado apenas água destilada. Observou-se que no controle, os pedaços de carne não apresentaram nenhuma aderência entre si, sendo que o bloco de carne se desfez ao ser retirado da embalagem plástica. As preparações de MTGase de *Streptomyces* sp. P20 e da enzima comercial adicionadas nas amostras de carne bovina, na concentração de 1U/g, mostraram efetivas, unindo os pedaços de carne.



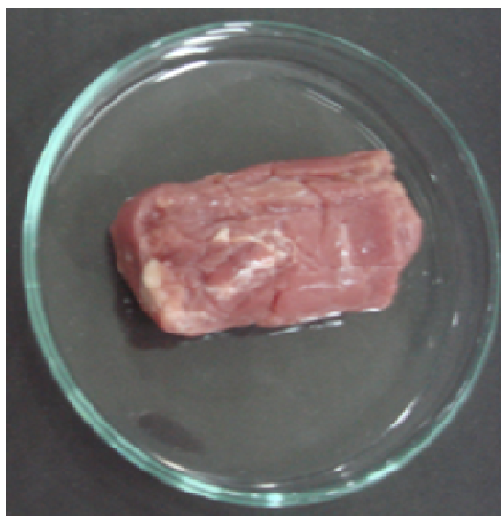
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura II-8 – Aplicação de MTGase em carne bovina

(a) Pedacos de carne sem tratamento; (b) Controle; (c) tratamento com Activa® TG-BP (1 U/g); (d) tratamento com MTGase de *Streptomyces* sp. P20 (1 U/g).

II.4.2.2. Aplicação da MTGase na reestruturação de proteína de soja texturizada

A Figura II-9 ilustra a aplicação da TGase de *Streptomyces* sp. P20 e a TGase comercial Activa® TG-BP na reestruturação de proteína texturizada de soja, aplicadas em solução aquosa. Observou-se que na amostra controle, na qual foi adicionada apenas água destilada, não houve aderência entre os pedaços da proteína de soja, sendo que o bloco se desfez ao ser retirado da embalagem plástica. A proteína texturizada tratada com TGase comercial e de *Streptomyces* sp. P20, contendo 1U/g de proteína texturizada de soja umedecida, apresentou boa aderência.

O bloco de proteína de soja formado no controle se desfez logo que o saco plástico foi aberto. Os blocos tratados com as duas enzimas foram pressionados com o bastão de vidro para verificar a aderência entre os pedaços de proteína. Foi observado que a enzima produzida pela linhagem de *Streptomyces* sp. P20 apresentou a capacidade de unir os pedaços de proteína de soja texturizada, de forma similar à enzima comercial.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura II-9 - Aplicação de MTGase em proteína texturizada de soja

(a) Proteína de soja texturizada sem tratamento enzimático; (b) Controle; (c) tratamento com Activa® TG-BP (1U/g); (d) tratamento com TGase de *Streptomyces* sp. P20 (1U/g).

II.5. Conclusões

O extrato enzimático bruto de *Streptomyces* sp. P20 apresentou atividade ótima de transglutaminase em pH 6,5 e 9,0, sugerindo a presença de isoenzimas com pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de atividade a 35°C e com pH ótimo igual a 9,0 e temperatura ótima de atividade a 40°C.

No estudo do efeito da interação do pH e da temperatura na atividade de TGase, utilizando delineamento experimental fatorial 2², foi verificado que não houve efeito de interação entre pH e temperatura, sendo a atividade ótima da MTGase em pH 6,5 e temperatura em 35°C.

A MTGase do extrato enzimático bruto mostrou-se termossensível, retendo cerca de 50% da atividade inicial após 30 minutos de tratamento térmico a 40°C, sendo inativada após tratamento térmico a 50°C por 30 minutos.

A MTGase do extrato enzimático bruto apresentou maior estabilidade na faixa de pH de 6,0 a 9,0, sendo que reteve cerca de 65% da atividade na faixa de 6,0 a 7,5 e 100% da atividade em pH 9,0 após 30 minutos a 25°C.

A adição de L-cisteína, L- glutationa e PEG 6000, na concentração de 10 mM, ao extrato enzimático aumentou a estabilidade térmica da MTGase de *Streptomyces* sp. P20, sendo que a L-cisteína apresentou maior efeito, aumentando cerca de 114% a atividade da enzima em relação ao extrato enzimático controle sem adição do ativador, incubado nas mesmas condições.

A MTGase de *Streptomyces* sp. P20 foi eficiente na reestruturação de pedaços de carne bovina quando aplicada na concentração de 1U/g de carne. A aplicação da MTGase do microrganismo em estudo foi eficiente também na reestruturação da proteína de soja, sendo os resultados obtidos semelhantes ao resultado com aplicação da enzima comercial.

II.6. Sugestões para trabalhos futuros

Estudos futuros envolvendo a aplicação desta TGase em carne de frango e suína, bem como na elaboração de produtos mistos de proteína animal e vegetal podem ser avaliados.

II.7. Referências Bibliográficas

AHHAMED, A.M.; NASU, T.; HUY, D.Q.; TOMISAKA, Y.; KAWAHARA, S.; MUGURUMA, M. Effect of microbial transglutaminase on the natural actomyosin cross-linking in chicken and beef. ***Meat Science***, v.82, No 2, p. 170 – 178, 2009.

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.

CORTEZ, J.; ANGHIERI, A.; BONNER, P.L.R.; GRIFFIN, M.; FREDDI, G. Transglutaminase mediated grafting of silk proteins onto wool fabrics leading to improved physical and mechanical properties. ***Enzyme and Microbial Technology***, v. 40, No 7, p. 1698 – 1704, 2007.

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

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, 2007b.

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.

DONG, Z.J.; XIA, S.Q.; HUA, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.M.; XU, S.Y. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerferences**, v. 63, No 1, p. 41 – 47, 2008.

FARNSWORTH, J. P.; LI, J.; HENDRICKS, G. M. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. **Small Ruminant Research**, v. 65, p.113-121, 2006.

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.; BARRETO, P.L.M.; OGLIARI, P.J.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, No 1, p. 239 – 243, 2009.

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 ladakum*. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 38, p.76-80, 2000.

KANAJI, T., OZAKI, H., TAKAO, T., KAWAJIRI, H., IDE, H., MOTOKI, M., SHIMONISHI, Y. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p.11565-11572. 1993.

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.

LIN, S.; HSIEH, Y.; WANG, P. Efficient purification of transglutaminase from recombinant *Streptomyces platensis* at various scales. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.111-115, 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.

LORENZENS, P.CHR.; NEVE, H.; MAUTNER, A.; SCHLIMME, E. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, No 3, p. 152 – 157, 2002.

LU, S. Y.; ZHOU, N. D.; TIAN, Y. P. Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 2, p.109-125, 2003.

MACEDO, J. A. Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Junho de 2009.

MOTOKI, M.; SEGURO, K.. Transglutaminase and its use for food processing. ***Trends in Food Science and Technology***, v. 5, n. 9, p.204-210, 1998.

MUGURUMA, 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 reduced levels of phosphate. ***Meat Science***, v. 63, No 2, p. 191 – 197, 2003.

SEKI, N., UNO, H., LEE, N. H., KIMURA, I., TOYODA, K., FUJITA, I., ARAI, K. Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin. ***Nippon Suisan Gakkaishi***, v. 56, p.125-132. 1990.

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

WORRATAO, A.; YONGSAWATDIGUL, J. Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). ***Food Chemistry***, v. 93, No 4, p. 651 – 658, 2005.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. ***Trends in Biotechnology***, v.26 , No.10 , p.559 – 565, 2008.