

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Biossíntese de enzimas industriais por *Alicyclobacillus* livres e imobilizados em diferentes matrizes e o emprego da ultrafiltração na concentração das enzimas

Suelen Pereira Ruiz¹, Virgínia Maria Feitosa Santos², Aline Satomi Noce², Vanderson Carvalho Fenelon³, Benício Alves de Abreu Filho¹ e Graciette Matioli²

¹Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

²Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Farmácia

³Universidade Estadual de Maringá – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá – PR - E-mail: gmatioli@uem.br

RESUMO

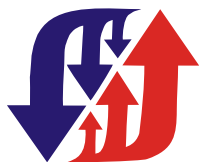
Enzimas de Alicyclobacillus, incluindo proteases e amilases, têm sido estudadas em aplicações industriais devido às suas características termoestáveis. Os objetivos deste trabalho foram a produção de amilase e colagenase, obtidas de A. acidocaldarius e A. sendaiensis, respectivamente, assim como a imobilização destes, visando otimizar a produção. Para produção das enzimas, A. acidocaldarius foi cultivado em farelo de trigo e A. sendaiensis em caldo batata. Diferentes matrizes foram avaliadas para imobilização dos microrganismos como esponja vegetal, esponja-alginato e alginato, seguido de concentração por ultrafiltração. Para amilase, os melhores resultados foram obtidos a partir da imobilização em esponja vegetal e emprego da ultrafiltração (0,67 U/mL) e, para o extrato de colagenase, a partir da biomassa livre e ultrafiltração (13,6 U/mL). Portanto, Alicyclobacillus são passíveis de produzir enzimas de interesse industrial, com possibilidade de emprego de substrato economicamente viável, e o uso da imobilização celular e ultrafiltração se mostraram favoráveis.

Palavras-chave: *Alicyclobacillus*; Amilase; Colagenase; Imobilização celular; Ultrafiltração; Subproduto industrial.

INTRODUÇÃO

Enzimas obtidas do gênero *Alicyclobacillus*, incluindo proteases e amilases, têm sido estudadas em diversas aplicações industriais, por apresentarem características termoestáveis (TSURUOKA et al., 2003; MATZKE et al., 1997). As amilases hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4, e constituem cerca de um quarto do mercado das enzimas industriais. Diversas fontes de carbono convencionais têm sido usadas para a produção de amilase, mas devido ao elevado custo, é desejável a substituição por meios economicamente viáveis (GUPTA, 2003). A ação da enzima colagenase no colágeno e a obtenção da gelatina, permitem grande utilização destas proteínas estruturais, uma vez que os peptídeos de colágeno apresentam atividades biológicas de interesse nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica (RAVANTI e KAHARI, 2000).

Diversas técnicas de imobilização celular têm sido utilizadas em processos biotecnológicos, como gel de aprisionamento, adsorção e ligação covalente. As vantagens



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

incluem o uso repetido e prolongado das células, reduzido risco de contaminação, fermentação contínua e facilidade de separação (RUIZ et al, 2015). Este trabalho teve como objetivo a produção de amilase e colagenase, obtidas de *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *Alicyclobacillus sendaiensis*, respectivamente, assim como a imobilização desses microrganismos, visando otimizar sua capacidade de produção enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

O microrganismo *A. acidocaldarius* CBMAI 0298 foi reativado e cultivado em meio BAT (DEINHARD et al., 1987), pH 4,0 a 60 °C, e *A. sendaiensis* KCTC 3843 em meio caldo batata, pH 4,8 a 55 °C. Para manutenção e armazenamento dos microrganismos no laboratório, foi realizado o processo de liofilização, e posterior utilização nos experimentos.

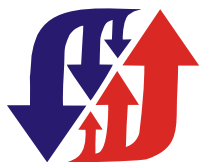
Para o preparo do pré-inóculo, 30 mg de células liofilizadas foram adicionadas em 100 mL de meio de cultivo e incubadas por 24 h a 150 rpm. As células foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min a 4 °C, lavadas em solução salina 0,9% e transferidas para o meio de produção das enzimas. Para produção da amilase, utilizou-se meio BAT contendo 1% de substrato farelo de trigo a 60 °C, e para colagenase, caldo batata suplementado com 0,5% de KH_2PO_4 a 55 °C. Após o cultivo, o meio foi centrifugado e o sobrenadante, livre de células, utilizado para os ensaios de atividade enzimática.

A atividade enzimática de amilase foi avaliada pela determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959). A reação consistiu na incubação de 250 μL de substrato (amido de batata solúvel 1% em tampão McIlvaine pH 3,0), e 250 μL de extrato enzimático, a 75 °C por 30 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μmol de açúcar redutor (glicose) por minuto.

A atividade colagenolítica foi avaliada com 500 μL de azocoll (suspensão em solução tampão acetato de sódio 50 μmol pH 4,0, em concentração final de 4 mg/mL) e 500 μL da enzima a 60 °C e pH 4,0, durante 18 h. A reação foi interrompida com fosfato de sódio pH 7,0, resfriamento e centrifugação. Uma unidade de atividade colagenolítica foi determinada como a quantidade de enzima que aumentou 0,1 na densidade ótica a 540 nm.

Para aprimorar a produção das enzimas, os microrganismos foram imobilizados em diferentes matrizes como esponja vegetal, alginato-esponja e alginato. A esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) foi preparada conforme descrito por Pazzeto et al. (2011). Para a imobilização em esponja vegetal, três discos de esponja vegetal foram adicionados ao meio contendo o microrganismo reativado e submetidos à incubação por 72 h e 150 rpm. Para imobilização em alginato-esponja, as células foram retiradas do meio por centrifugação após cultivo de 4 dias, ressuspensas em 5 mL de solução de NaCl 0,9% e adicionadas a 50 mL de solução de alginato 3% (p/v), formando a mistura alginato-célula. Três discos de esponjas estéreis foram imersos, transferidos para uma solução de CaCl_2 1,47% (p/v), e mantidos em leve agitação por 15 min. Para a imobilização em alginato sem a esponja, após obtenção da mistura alginato-célula, foi realizado o gotejamento em 100 mL de solução de CaCl_2 , ocorrendo a formação de esferas de gel. Após estes procedimentos, as matrizes foram lavadas em solução de NaCl 0,9% (p/v), transferidas para o meio de produção das enzimas e incubados por 48 h. A produção também foi avaliada pela biomassa livre submetida aos mesmos tratamentos.

Após cultivo em meio de produção, os extratos enzimáticos foram obtidos por centrifugação e submetido ao sistema de ultrafiltração em membrana Millipore® de 30 kDa



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) e 44,5 mm de diâmetro, utilizando dispositivo Amicon[®] acoplado a uma bomba e sob agitação. O extrato foi concentrado 2 vezes (v:v) e a atividade enzimática foi avaliada. Os resultados foram comparados com os ensaios sem o uso da ultrafiltração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização de *A. acidocaldarius* em esponja vegetal contribuiu para o aumento da atividade enzimática da amilase, diferindo da atividade enzimática obtida com a biomassa livre, correspondendo a 0,56 U/mL e 0,44 U/mL, respectivamente (Fig. 1). A atividade enzimática dos extratos produzidos pelo *A. acidocaldarius* imobilizado em esponja-alginato e apenas alginato resultou em 0,37 U/mL e 0,20 U/mL, respectivamente. Estes valores foram inferiores aos obtidos com a biomassa livre e, também, com a imobilização em esponja vegetal.

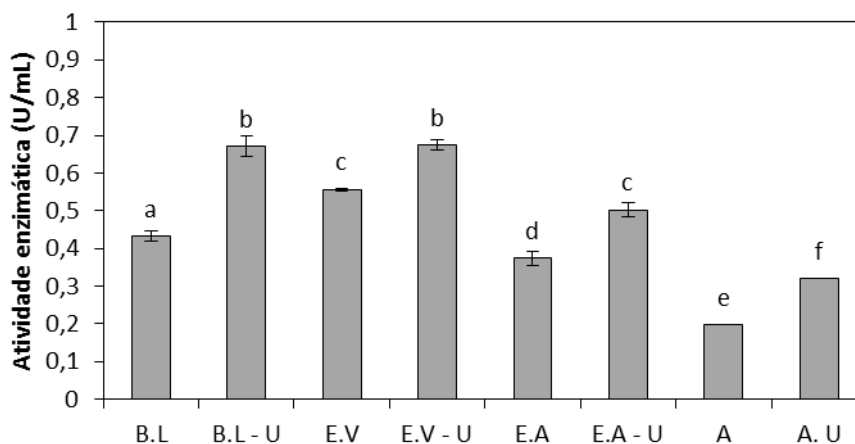
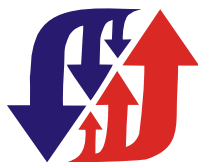


Fig. 1. Atividade enzimática de amilase produzida por *A. acidocaldarius* utilizando imobilização em esponja vegetal, esponja-alginato e biomassa livre com e sem uso de sistema de ultrafiltração. B.L: Biomassa Livre, E.V: Esponja vegetal, E.A: Esponja-alginato, A: Alginato. U: Ultrafiltração.

Para a enzima colagenase produzida por *A. sendaiensis*, verificou-se que os melhores resultados da atividade enzimática foram obtidos com o uso da biomassa livre (7,2 U/mL) quando comparados com as matrizes de imobilização (Fig. 2). Dentre os sistemas de imobilização, o que possibilitou maior atividade enzimática foi a imobilização do microrganismo em esponja vegetal (3,17 U/mL).

Após o emprego do sistema de ultrafiltração, a atividade enzimática para ambas enzimas foi avaliada, resultando no aumento de seus valores em todas as situações estudadas (Fig 1 e 2). Para o extrato semipurificado de amilase, a maior atividade foi obtida a partir do uso do concentrado enzimático cultivado por biomassa livre e do microrganismo imobilizado em esponja vegetal, sendo 55% superior se comparado com a biomassa livre sem ultrafiltração. Para o extrato semipurificado de colagenase, a atividade enzimática obtida com a biomassa livre apresentou melhor resultado, e este foi 53% superior ao extrato sem ultrafiltração.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

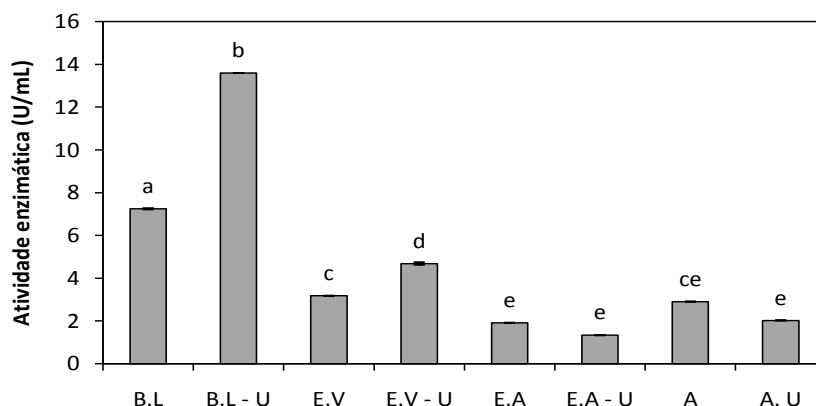


Fig. 2. Atividade enzimática de collagenase produzida por *A. sendaiensis* utilizando imobilização em esponja vegetal, esponja-alginato e biomassa livre com e sem uso de sistema de ultrafiltração. B.L: Biomassa Livre, E.V: Esponja vegetal, E.A: Esponja-alginato, A: Alginato. U: Ultrafiltração.

CONCLUSÕES

Na presente pesquisa, foi possível a produção de amilase por *A. acidocaldarius*, utilizando subproduto industrial, contribuindo como meio economicamente viável para a indústria. O uso da imobilização propiciou aumento na atividade enzimática para amilase, quando do emprego da esponja vegetal. Para a collagenase, os resultados da imobilização não diferiram quando comparados com a biomassa livre. O emprego do sistema de ultrafiltração foi favorável para ambos os extratos enzimáticos, sendo possível candidato para uso em preparações enzimáticas industriais na hidrólise do amido e colágeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Deinhard G, Blanz P, Poralla K, Altan E. 1987. *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst Appl Microbiol* 10:47-53
- Matzke J, Herrmann A, Schneider E, Bakker E, P. 2000. Gene cloning, nucleotide sequence and biochemical properties of a cytoplasmic cyclomaltodextrinase (neopullulanase) from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, reclassification of a group of enzymes. *FEMS Microbiol Letters* 183:55–61.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 3:426-428.
- Pazzetto R, Delani TCO, Fenelon VC, Matioli G. 2011. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge, *Process Biochem* 46:46–51.
- Ravanti L, Kahari V, M. 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int J Mol Med* 6: 391–407.
- Ruiz SP, Martinez CO, Noce AS, Sampaio AR, Baesso ML, Matioli G. 2015. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 122:15–28.
- Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H. 2003. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Appl Environ Microbiol* 69: 162–169.