

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**HIDRÓLISE CONTROLADA DE PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO
USANDO CARBOXIPEPTIDASE A E ALCALASE® IMOBILIZADAS
MULTIPONTUALMENTE EM AGAROSE**

PAULO WALDIR TARDIOLI

São Carlos - SP

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**HIDRÓLISE CONTROLADA DE PROTEÍNAS DO SORO DE QUEIJO
USANDO CARBOXIPEPTIDASE A E ALCALASE® IMOBILIZADAS
MULTIPONTUALMENTE EM ÁGAROSE**

PAULO WALDIR TARDIOLI

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Raquel L. C. Giordano

São Carlos - SP
2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

T183hc

Tardioli, Paulo Waldir.

Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e alcalase® immobilizadas multipontualmente em agarose / Paulo Waldir Tardioli . -- São Carlos : UFSCar, 2003.

173 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Alcalase®. 3. Carboxipeptidase A 4. Glioxil – agarose. 5. Cinética de hidrólise de polipeptídeos. I. Título.

CDD: 660.634 (20ª)



“Bem-aventurados todos aqueles que NELE confiam”.

(Salmos 02:12)

Dedico este trabalho aos meus pais, Célio e Terezinha, à minha irmã Sandra e às minhas sobrinhas Carolina, Camila e Lisiane, por todo carinho, apoio e incentivo durante todos esses anos. Dedico também à minha tia Maria e aos meus avôs Nerino e Tereza, que infelizmente não mais estão presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todas as pessoas e instituições que foram essenciais na realização deste trabalho:

À orientadora Prof^a Dr^a Raquel de Lima Camargo Giordano pela incansável orientação, dedicação, carinho e amizade. Valeu estar com você todos esses anos.

Aos Drs. José Manuel Guisán e Roberto Fernandez-Lafuente, do CSIC/ICP, Madri-Es, pela colaboração neste trabalho, orientação e dedicação em meu estágio realizado na referida instituição.

Ao prof. Roberto de Campos Giordano e ao amigo Ruy de Sousa Jr. pela ajuda com os métodos matemáticos utilizados na estimativa de parâmetros cinéticos.

À Prof^a Dr^a Gisella Maria Zanin pela indicação desta instituição e apresentação à prof^a Dr^a Raquel de Lima Camargo Giordano, orientadora do trabalho.

À amiga e colega de trabalho Miriam Maria Rezende, pela grande ajuda com as análises de aminoácidos e peptídeos.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

À Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil pela doação da enzima Alcalase®.

À Cooperativa de Laticínios São Carlos, pela doação do soro de queijo.

À Hispanagar, Burgos, Espanha, pela doação do gel de agarose 10%.

À Mari Carmen, que no momento da chegada à Madri, caminhou longos e cansáveis dias à procura de “pisos para alquilar”.

Ao amigo Beni, que durante toda a estada em Madri, esteve sempre presente, apoiando em tudo que precisava.

Aos amigos, verdadeiramente irmãos, Marcelo e Angélica, pela amizade, carinho e especialmente por me suportar, sem reclamar, nos meus muitos momentos de mau humor. Não há palavras para expressar meu carinho por vocês. Qualquer coisa seria pouco!

Aos amigos Amauri, Álvaro, Ana Cláudia, Andréa, Anny, Antônio, Célia, Charles, Edson, Guto, Juliana, Kamilla, Laura, Maria Angélica, Romilda, Rosineide, Sara e Vanessa. Foi muito bom estar com vocês todos esses anos.

A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xix
Notação	xxii
Resumo	xxvii
Abstract	xxix
1 - INTRODUÇÃO	01
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 – Soro de Queijo	04
2.2 – Proteínas	06
2.2.1 – Proteínas do soro	08
2.2.1.1 - β -lactoglobulina (β -Lg)	10
2.2.1.2 - α -lactoalbumina (α -La)	11
2.2.1.3 – Soro Albumina Bovina (SAB)	11
2.2.1.4 - Imunoglobulinas (Ig)	12
2.2.2 – Enzimas	12
2.3 – Enzimas Proteolíticas ou Peptídio Hidrolases	14
2.3.1 – Serina-proteases	16
2.3.1.1 – Mecanismo catalítico das serina-proteases	17
2.3.1.2 – Alcalase®	19
2.3.2 – Cisteína-proteases	21
2.3.3 – Metallo-proteases	22
2.3.3.1 – Carboxipeptidase A	22
2.3.3.2 – Mecanismo catalítico da carboxipeptidase A	24
2.3.4 – Carboxil-proteases (proteases ácidas)	26
2.4 – Estabilização de Enzimas	26
2.5 – Imobilização de Enzimas em Suportes Sólidos por Ligação Covalente	27
2.5.1 – Suportes	28
2.5.2 – Métodos de ativação do suporte	29

2.6 – Imobilização multipontual em gel de agarose	31
2.7- Agarose	35
2.8 – Imobilização de Carboxipeptidase A e Alcalase®	37
2.9 – Hidrólise de Proteínas por Proteases	39
2.10 – Estudo Cinético de Reações Enzimáticas	43
2.10.1 – Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática	44
2.10.2 – Influência da concentração de substrato e inibidores	45
2.10.3 – Influência da concentração de enzima	48
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 – Materiais	50
3.1.1 – Enzimas	50
3.1.2 – Substratos	50
3.1.3 – Suportes e reagentes de ativação	51
3.1.4 – Padrões e inibidores competitivos de CPA e tripsina	51
3.1.5 – Corantes e reagentes para análise de proteínas	52
3.1.6 – Reagentes para análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica	52
3.1.7 – Reagentes para eletroforese SDS-PAGE	52
3.2 – Metodologia Experimental	53
3.2.1 – Ativação de suportes	53
3.2.1.1 – Suportes glioxil-agarose	53
3.2.1.2 – Suportes glutaraldeído-agarose	55
3.2.2 – Preparação de derivados	55
3.2.2.1 – Imobilização covalente multipontual em suportes glioxil-agarose	56
3.2.2.2 – Imobilização em glioxil-agarose com ligações covalentes limitadas	56
3.2.2.3 – Imobilização em suportes glutaraldeído-agarose	57
3.2.2.4 – Imobilização em suportes CNBr-agarose (somente para Alcalase®)	57
3.2.3 – Ensaios de atividade enzimática	58
3.2.4 – Determinação de Proteínas	59
3.2.4.1 – Método de Bradford	59
3.2.4.2 – Método de Lowry	60
3.2.4.3 – Método de Kjeldahl	60
3.2.5 – Estabilidade Térmica	61
3.2.6– Estabilidade a pH Alcalino	63

3.2.7 – Ensaio de temperatura-atividade enzimática	63
3.2.8 – Ensaio de pH-atividade enzimática	64
3.2.9 – Hidrólise de proteínas catalisadas por proteases	64
3.2.10 – Fracionamento de hidrolisados de proteínas por cromatografia de exclusão de tamanho (SE-HPLC)	65
3.2.11 – Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de troca iônica	66
3.2.12 – Eletroforese SDS-PAGE	67
3.2.13 – Hidrólise ácida de enzima solúvel e imobilizada em glioxil-agarose	69
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 – Imobilização e Estabilização de CPA em Suportes Glioxil-Agarose	71
4.1.1 – Influência do grau de ativação do suporte	71
4.1.2 – Influência de substrato e inibidor na recuperação de atividade	72
4.1.3 – Estabilidade térmica e alcalina de CPA solúvel e CPA-glioxil agarose	74
4.1.4 – Seleção de inibidores competitivos da CPA	78
4.1.5 – Imobilização de CPA em glioxil-agarose 6% na presença e ausência de inibidor competitivo durante a etapa de redução com borohidreto de sódio	78
4.1.6 – Imobilização de CPA em diferentes temperaturas (20 e 25°C) e diferentes suportes (glioxil e glutaraldeído-agarose)	81
4.1.7 – Otimização de derivados CPA-glioxil: influência do tempo de contato enzima-suporte	83
4.1.8 – Influência da temperatura na atividade enzimática e na estabilidade térmica da CPA imobilizada	87
4.1.9 – Influência do pH na atividade enzimática e na estabilidade térmica de CPA	89
4.1.10 – Hidrólise de polipeptídios catalisada por CPA solúvel e imobilizada	94
4.1.10.1 – Preparação do substrato	94
4.1.10.2 – Efeito da imobilização na atividade de CPA	94
4.1.10.3 – Eficiência do derivado CPA-glioxil-48h na hidrólise de substrato macromolecular a alta temperatura	97
4.2 – Imobilização e Estabilização de Alcalase® em Suportes Glioxil-Agarose	99
4.2.1 – Influência da carga enzimática no rendimento de imobilização e na retenção de atividade	99
4.2.2 – Estabilidade térmica e ao pH alcalino de Alcalase® solúvel e imobilizada	102
4.2.3 – Diálise de preparação enzimática comercial Alcalase®	104

4.2.4 – Imobilização controle de Alcalase® a 25°C, pH 10,05	107
4.2.5 – Comparação de diferentes derivados preparados com curto tempo de contato enzima-suporte – mudança de protocolos de ativação	108
4.2.6 – Influência do tempo de contato enzima insolubilizada-suporte ativado	110
4.2.7 – Hidrólise de caseína com Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h	113
4.3 – Estudo Cinético da Hidrólise de Resíduos Carboxi-Terminais Catalisada por CPA Imobilizada em Glioxil-Agarose-6%	119
4.3.1 – Modelo cinético proposto	119
4.3.2 – Preparação do substrato	121
4.3.3 – Seleção da concentração de enzima	122
4.3.4 – Determinação dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_M e K_S	123
4.3.5 – Determinação do parâmetro cinético K_I	126
4.4 – Estudo Cinético da Hidrólise de polipeptídios Catalisada por Alcalase® Imobilizada em Glioxil-Agarose-10%	134
4.4.1 – Modelo cinético	134
4.4.2 – Seleção da concentração de enzima	136
4.4.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos k , K_M e K_I	137
4.4.3.1 – Preparação do substrato	137
4.4.3.2 – Estimativa de k e K_M	140
4.4.3.3 – Estimativa de K_I	145
4.4.4 – Estudo da variação dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_M e K_I com o grau de hidrólise inicial ($DH_{INICIAL}$)	147
4.4.5 – Estimativa do fator de efetividade - hidrólise com enzima alta carga	153
5 – CONCLUSÕES	155
5.1 – Imobilização e Estabilização de Carboxipeptidase A	156
5.2 – Imobilização e Estabilização de Alcalase®	156
5.3 – Estudo cinético da hidrólise de polipeptídeos catalisada por CPA-glioxil agarose e Alcalase®-glioxil agarose	157
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois α -aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupo R). Na cadeia peptídica os aminoácidos são chamados de resíduos 07
- Figura 2.2 - Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica 15
- Figura 2.3 - Classificação das peptídeo hidrolases de acordo com o seu mecanismo catalítico. Cada enzima dentro de um sub-sub-grupo é diferenciada com base em sua especificidade pelo substrato 15
- Figura 2.4 - Mecanismo catalítico da hidrólise de uma ligação peptídica de um substrato (proteína ou polipeptídeo) catalisada pela quimotripsina. A His⁵⁷ (desprotonada e protonada) participa de duas reações de substituição nucleofílica sucessivas: hidrólise da ligação peptídica do substrato com formação do complexo acil-enzima (fase de acilação) e liberação de um fragmento protéico; e hidrólise do complexo acil-enzima com regeneração da enzima (fase de deacilação) e liberação de outro fragmento protéico 17
- Figura 2.5 - (a) Grupos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima cataliticamente envolvidos na hidrólise de uma ligação peptídica; (b) intermediário tetraédrico enzima-substrato 18
- Figura 2.6 - Centro ativo da carboxipeptidase A, mostrando o íon zinco coordenado por duas cadeias de histidina e uma de glutamato 23
- Figura 2.7 - Complexo enzima-substrato (CPA-peptídeo com tirosina carboxi-terminal), mostrando as interações entre os resíduos do sítio ativo da enzima e o substrato a ser clivado 25
- Figura 2.8 - Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a carboxipeptidase A. O Glu²⁷⁰ ataca o carbono da carbonila da ligação cindível, formando um intermediário covalente anidrido misto 25
- Figura 2.9 - Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado 28
- Figura 2.10 - Reação enzima (amino)-suporte (aldeído) - formação da base de Schiff..... 32

Figura 2.11 - Sistema imobilização-estabilização. A ligação covalente ocorre entre grupos aminos de resíduos de lisina da molécula de enzima e grupos aldeídos alifáticos moderadamente afastados da superfície do suporte. A conexão enzima-suporte é do tipo proteína-superfície plana	33
Figura 2.12 - Reações envolvidas na obtenção do gel glioxil-agarose	34
Figura 2.13 - Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose	35
Figura 2.14 - (A) Estrutura em dupla hélice das cadeias de agarobiose e (B) estrutura porosa da agarose gelificada	36
Figura 2.15 - (A) Formação de produto P em função do tempo de reação t, para diferentes concentrações de enzima E, e (B) velocidade inicial de reação ($\Delta P/\Delta t_1$) em função da concentração de enzima	48
Figura 3.1 - Gradiente para análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica em coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na. A concentração da fase móvel A durante todo o tempo de análise é obtida por diferença com a fase móvel B (100% - concentração da fase móvel B)	67
Figura 4.1 - Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de CPA em glioxil-agarose 6%, 20 $\mu\text{eqv/mL}$, 40 $\mu\text{eqv/mL}$ e $\mu\text{eqv/mL}$. Condições: 20°C, pH 10,05	71
Figura 4.2 - Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de CPA em glioxil-agarose 40 $\mu\text{eqv/mL}$, 20°C (pH 10,05), baixa carga enzimática ($\approx 0,24$ mg de proteína/mL de suporte) e presença de Phe 20 mM, Gly-Tyr 10 mM, Gly-Tyr 100 mM e ausência de inibidor ou substrato	73
Figura 4.3 - Inativação térmica a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 50 mM) de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil agarose-6% preparados utilizando-se suportes ativados com diferentes concentrações de grupos aldeídos	75
Figura 4.4 - Inativação térmica a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 50 mM) de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil agarose-6% preparados em suporte ativado com 40 $\mu\text{eqv/mL}$, na presença de Phe 20 mM e Gly-Tyr 10 mM. Ambos derivados com 3 $U_{\text{H-PHE/mL}}$ de suporte	75
Figura 4.5 - Inativação de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil ($U_{\text{HPHE/mL}}$ de suporte) a 25°C, pH 11 (tampão bicarbonato de sódio 50 mM)	77

Figura 4.6 - Inativação térmica de (A) CPA solúvel e (B) derivado CPA-glioxil (preparado em glioxil-agarose 6%-75 $\mu\text{eqv/mL}$, com 24 h a 25°C, pH 10,05 e redução com Tyr 10 mM) a 60°C, pH 7,5 (tris-HCl 25 mM)	80
Figura 4.7 - Inativação térmica a 45°C, pH 7,0 (tampão tris-HCl 100 mM) de CPA solúvel, CPA-glutaraldeído, CPA-glioxil 20 $\mu\text{eqv/mL}$ e CPA-glioxil 75 $\mu\text{eqv/mL}$. Os derivados foram preparados a 25°C (pH 10,05) com 1 hora de contato enzima-suporte e reduzidos na presença de tirosina 10 mM	83
Figura 4.8 - Acompanhamento da imobilização de CPA em glioxil-agarose 6%-75 $\mu\text{eqv/mL}$. Atividade da enzima solúvel a 25°C, pH 10,05, retenção de atividade no derivado não reduzido, retenção de atividade no derivado reduzido e estabilização em relação à enzima solúvel a 50°C, pH 7,0	84
Figura 4.9 - Eletroforese SDS-PAGE de proteases usando gel de poliacrilamida 15%.....	86
Figura 4.10 - Inativação térmica (50°C, pH 7,0) de derivados de CPA preparados sobre glioxil-agarose-6% (75 $\mu\text{eqv/mL}$) e glioxil-agarose-10% (180 $\mu\text{eqv/mL}$)	87
Figura 4.11 - Atividades enzimáticas de CPA solúvel e CPA-glioxil-48h em função da temperatura (25 a 80°C), medidas no pH 7,5 com hipuril-L-Phe 1 mM como substrato	88
Figura 4.12 - Gráfico de Arrhenius de temperatura e atividade de CPA solúvel e derivado CPA-glioxil-48h. A energia de ativação (E_a) foi calculada multiplicando-se a tangente do trecho linear da curva pela constante dos gases ($R = 8,3 \text{ J/mol/K}$)	89
Figura 4.13 - Inativação térmica de (A) CPA-glioxil baixa ativação (20 $\mu\text{eqv/mL}$) e (B) CPA-glioxil alta ativação (75 $\mu\text{eqv/mL}$). Suspensões em tampão tris-HCl 100 mM, pH 7,5 e incubadas a 45°C, 50°C e 55°C	90
Figure 4.14 - Atividades relativas de CPA solúvel e derivado CPA-glioxil-48h, medidas a 25°C com hipuril-L-Phe 1 mM como substrato, preparado em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0 a 9,0), tampão Tris-HCl 25 mM, contendo 500 mM de NaCl (pH 7,0 a 9,0) e tampão bicarbonato 100 mM (pH 9,0 e 10,0)	91
Figura 4.15 - Atividades de CPA solúvel e CPA-glioxil medidas com hipuril-L-Phe 1 mM, preparado em tampão fosfato e tampão tris-HCl, a 25°C (pH 7,5)	92
Figura 4.16 - Efeito do pH sobre a estabilização a 50°C de CPA imobilizada (derivado CPA-glioxil-48h)	93

- Figura 4.17 - Cromatogramas de padrão de massa molecular insulina e hidrolisado de proteínas do soro de queijo com tripsina (DH de 2%) e quimotripsina (DH de 5%). Fracionamento por cromatografia líquida de exclusão de tamanho. Distribuição de massa molecular: > 5 kDa (39%), 5 – 1,7 kDa (51%), 1,7 – 1,0 kDa (8%) e 1,0 – 0,6 kDa (2%) 95
- Figura 4.18 - Liberação de fenilalanina carboxi-terminal catalisada por CPA a 45°C, pH 7,0 (2 U_{H-PHE}/g de proteína). Substrato: polipeptídios produzidos por hidrólise seqüencial das proteínas do soro com tripsina (DH 2%) e quimotripsina (DH 5%) a 55°C, pH 8 e E/S igual a 1/50 96
- Figure 4.19 - Aminoácidos liberados pela hidrólise de polipeptídios catalisada por CPA solúvel e imobilizada, após 8 horas de reação a pH 7,0 e (A) 55°C, E/S de 5 U_{H-PHE}/g e (B) 60°C, E/S igual a 1 U_{H-PHE}/g. Substrato: proteínas do soro de queijo seqüencialmente hidrolisadas com tripsina e quimotripsina imobilizadas (DH total de 7%) a 55°C, pH 8,0 e E/S igual a 1/50 97
- Figura 4.20 - Aminoácidos aromáticos liberados pela hidrólise de polipeptídios, catalisada por CPA-glioxil a 45°C, pH 7,0, E/S igual a 20 U/g de proteínas. Substrato: proteínas do soro de queijo seqüencialmente hidrolisadas com tripsina e quimotripsina imobilizadas (DH total de 7%) a 55°C, pH 8,0 e E/S igual a 1/50 98
- Figura 4.21 - Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de Alcalase® em suporte glioxil-agarose-6% (com 70 µeqv de aldeídos/mL de suporte), a 20°C, pH 10,05 100
- Figura 4.22 - Velocidades iniciais de hidrólise (V_H) de caseína em função da carga enzimática no reator (U_{BAEE}) a 50°C (pH 8,0), 25 mL de caseína 40 g/L (1 g de proteína) para derivados com baixa carga (A_{EI} de 4 U_{BAEE}/mL de suporte) e alta carga (A_{TI} de 33 U_{BAEE}/mL de suporte e A_{EI} de 11 U_{BAEE}/mL de suporte) 101
- Figura 4.23 - Inativação térmica (60°C, pH 8,0) de Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-glioxil (baixa carga) 102
- Figura 4.24 - Estabilidade a 25°C e pH 11,0 de Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil 70 µeqv/mL de suporte (baixa carga) 103
- Figura 4.25 - Inativação térmica de Alcalase® solúvel, dialisada e não dialisada, a 55°C, pH 8,0 (tampão fosfato 50 mM) 105

Figura 4.26 - Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de Alcalase® (20°C, pH 10,05) em glioxil-agarose-6% contendo 75 µeqv de aldeído/mL de suporte	105
Figura 4.27 - Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15% com 0,1% SDS) da preparação enzimática Alcalase®	106
Figura 4.28 - Acompanhamento de atividade enzimática e proteínas no sobrenadante da imobilização de Alcalase® em glioxil-agarose-10% (210 µeqv/mL) a 25°C, pH 10,05	107
Figura 4.29 - Inativação térmica (50°C e pH 8,0) de Alcalase® solúvel dialisada, Alcalase®-glutaraldeído, Alcalase®-CNBr, Alcalase®-glioxil (com 20 µeqv/mL) e Alcalase®-glioxil (com 210 µeqv/mL). Derivados preparados com 1 h de reação enzima-suporte a 25°C	109
Figura 4.30 - Acompanhamento da atividade enzimática durante a imobilização de Alcalase® em glioxil-agarose-10% altamente ativado (210 µeqv/mL)	111
Figura 4.31 - Inativação térmica a 63°C e pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM) de Alcalase®-glioxil – baixa ativação (derivado de referência) e derivados preparados sobre glioxil-agarose com alta concentração de grupos aldeídos (210 µeqv/mL) por 1 hora, 3 horas, 8 horas, 24 horas e 96 horas	112
Figura 4.32 - Velocidades iniciais de hidrólise (calculadas usando a equação 3.9) catalisadas por Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h, medidas com caseína 0,1% (p/v), pH 8,0, E/S igual a 80 U _{BANE} /g de caseína	114
Figura 4.33 - Gráfico de Arrhenius de temperatura e velocidade de hidrólise de caseína, catalisada por Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-glioxil-96h. A energia de ativação (E _a) foi calculada multiplicando-se a tangente do trecho linear da curva pela constante dos gases (R = 8,3 J/mol/K)	114
Figura 4.34 - Curvas de hidrólises de caseína 1% (p/v) catalisadas por Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h com 114 U _{BANE} /mL de suporte. (A) 45°C, pH 8,0, velocidade inicial de 91,5 µeqv/min; (B) 80°C, pH 8, velocidade inicial de 412,6 µeqv/min	116
Figura 4.35 - Curvas de hidrólises de caseína 0,2% (p/v) catalisadas por Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h com 6,3 U _{BANE} /mL de suporte. (A) 45°C, pH 8,0, velocidade inicial de 77,1 µeqv/min; (B) 80°C, pH 8, velocidade inicial de 114,9 µeqv/min	116

Figura 4.36 - Inativação térmica de Alcalase® solúvel (não dialisada) e Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), a 45°C, pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM). Atividades residuais medidas a 25°C, pH 7,0, com Boc-Ala-ONp como substrato	117
Figura 4.37 - Hidrólise de caseína 0,2 % (p/v) catalisada por Alcalase®-glioxil-96h com 6,3 U _{BANE} /mL de suporte (baixa carga). Condições experimentais: pH 8,0 (controlado pela adição de NaOH 20 mM), E/S = 158 U _{BANE} /g de proteína, 1 hora de reação	118
Figura 4.38 - Velocidades iniciais de hidrólise de resíduos carboxi-terminais, a partir de polipeptídios 0,5% (p/v), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C (pH 7,0), para diferentes E/S no meio reacional (25 mL)	123
Figura 4.39 - Hidrólises de ligações peptídicas carboxi-terminais a 45°C (pH 7,0), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga), em função da concentração inicial do hidrolisado, C _H (5 a 38 g/L), para uma concentração fixa de enzima no reator (25 U _{H-PHE} /L)	125
Figura 4.40 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C, pH 7 e 25 U _{H-PHE} /L	126
Figura 4.41 - Hidrólise em batelada de longa duração de solução de polipeptídios 40 g/L (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C, pH 7,0, E/S de 5 U _{H-PHE} /g	128
Figura 4.42 - Hidrólises em batelada de longa duração de solução de polipeptídios (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisadas por CPA-glioxil-48h com 15,7 U _{H-PHE} /g de suporte (baixa carga), a 45°C e pH 7,0	129
Figura 4.43 - Hidrólises em batelada de longa duração de solução de polipeptídios (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisadas por CPA-glioxil-48h com 148 U _{H-PHE} /g de suporte (alta carga), a 45°C e pH 7,0	129
Figura 4.44 - Liberação de aminoácidos (Thr/Asn, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe e Trp) catalisada por CPA-glioxil-baixa carga e CPA-glioxil-alta carga, a 45°C, pH 7,0	130

Figura 4.45 - Concentrações médias relativas (N° ensaios = 7) de aminoácidos liberados por ação de CPA sobre proteínas do soro de queijo previamente hidrolisado com tripsina e quimotripsina, a 45°C, pH 7,0	132
Figura 4.46 - Concentrações médias relativas de aminoácidos liberados por ação de CPA-glioxil-48h, a 45°C, pH 7,0, sobre proteínas do soro de queijo (10 a 75 g/L) previamente hidrolisado com tripsina e quimotripsina (DH de 7%)	133
Figura 4.47 - Reações de (A) degradação hidrolítica e (B) transpeptização de uma cadeia polipeptídica, mostrando a competição entre a água e o grupo amino livre pelo ataque nucleofílico	135
Figura 4.48 - Aminoácidos liberados pela ação de CPA-glioxil-48h (45°C, pH 7,0 e DH de 2,9%) sobre polipeptídios - proteínas do soro hidrolisadas seqüencialmente com tripsina (DH de 2%) e com quimotripsina (DH de 5%) a 55°C, pH 8	137
Figura 4.49 - Velocidades iniciais de hidrólises de polipeptídios, catalisadas por Alcalase®-glioxil-96h contendo 5,5 U_{BANE}/mL suporte (baixa carga), a 50°C, pH 9,5. Substrato: Hidrolisado tripsina (DH 2%)-quimotripsina (DH 5%)-CPA (DH 2,9%) de proteínas do soro de queijo 19 g/L	138
Figura 4.50 - Aminoácidos liberados pela ação de CPA-glioxil-48h (45°C, pH 7,0, E/S igual a 850 U_{H-PHE}/L de reator e DH de 7,0%) sobre polipeptídios - proteínas do soro hidrolisadas seqüencialmente com tripsina (DH de 2%) e com quimotripsina (DH de 5%) a 55°C, pH 8	139
Figura 4.51 - Hidrólises de ligações peptídicas a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), em função da concentração inicial do hidrolisado, C_H (5-41 g/L), para uma concentração fixa de enzima no reator (20 U_{BAEE}/L)	141
Figura 4.52 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga) a 50°C, pH 9,5 e 20 U_{BAEE}/L	142
Figura 4.53 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a hidrólise de polipeptídios catalisada por Alcalase® solúvel (27 U_{BAEE}/L) a 50°C, pH 9,5	144
Figura 4.54 - Hidrólise em batelada de polipeptídios a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), com E/S igual a 2 U_{BAEE}/g proteína	145

Figura 4.55 - Hidrólise em batelada de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), a 50°C (pH 9,5), N_0 igual a 38 mmol/L, E/S igual a 1,6 U_{BAEE}/g de proteína, $DH_{INICIAL}$ igual a 9,9%	147
Figura 4.56 - Velocidades iniciais de hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro hidrolisadas com diferentes graus de hidrólise) a 50°C (pH 9,5), E/S de 20 U_{BAEE}/L de reator, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga)	149
Figura 4.57 - Variação de K_M e k com o grau de hidrólise inicial do substrato (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e quimotripsina)	150
Figura 4.58 - Hidrólises em batelada de polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e/ou quimotripsina com diferentes graus de hidrólise) a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga)	151
Figura 4.59 - Variação de K_I com o grau de hidrólise inicial do substrato (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e quimotripsina)	152
Figura 4.60 - Hidrólises em batelada de polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas com diferentes valores de DH) a 50°C (pH 9,5), E/S de 2 U_{BAEE}/g de proteínas, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h	153
Figura 4.61 - Hidrólises em batelada de polipeptídios (proteínas do soro com $DH_{INICIAL}$ de 7% e DH_{CPA} de 5,3%) a 50°C (pH 9,5), E/S de 2 U_{BAEE}/g , catalisada por Alcalase®-glioxil-96h com 45,7 U_{BAEE}/g de suporte (alta carga)	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	- Composição média e pH de soro de queijo doce (caseína coagulada com renina) e soro de queijo ácido (caseína coagulada com ácido láctico)	05
Tabela 2.2	- Propriedades químicas e físico-químicas das proteínas do soro	08
Tabela 2.3	- Composição de aminoácidos de concentrados de proteínas do soro e número de resíduos nas principais proteínas do soro	09
Tabela 2.4	- Sinônimos utilizados para as várias subtilisinas	21
Tabela 2.5	- Hidrólises de proteínas do soro por algumas serina-proteases	40
Tabela 3.1	- Condições utilizadas na imobilização de proteases a 25°C, pH 10,05	56
Tabela 4.1	- Retenção de atividade (R_{EI}) de derivados CPA-glioxil agarose-6%, preparados a 25°C (pH 10,05), e meias-vidas ($t_{1/2}$) a 60°C (pH 7,5) de CPA solúvel e imobilizada	76
Tabela 4.2	- Preparação de derivados CPA-glioxil a 20°C (pH 10,05), 24 horas. Suporte: glioxil-agarose-6% ativado com 75 μ eqv de aldeídos/mL de suporte	79
Tabela 4.3	- Parâmetros de imobilização de CPA em glioxil-agarose-6% (24 h de reação, pH 10,05) e meias-vidas ($t_{1/2}$) dos derivados a 50°C, pH 7,0 (tampão tris-HCl 100 mM)	81
Tabela 4.4	- Retenção de atividade (R_{EI}) de derivados preparados a 25°C (pH 10,05) com uma hora de reação, meias-vidas a 45°C (pH 7,0) dos derivados e de CPA solúvel	82
Tabela 4.5	- Retenção de atividade (R_{EI}) e meias-vidas ($t_{1/2}$) a 50°C (pH 7,0) de derivados de CPA preparados a 25°C (pH 10,05) e com 1 a 72 horas de reação	84
Tabela 4.6	- Aminoácidos dos produtos da hidrólise ácida de CPA solúvel e CPA-glioxil-48h. Hidrólise realizada em HCl 6 N a 110°C por 24 horas. Aminoácidos analisados por cromatografia líquida de troca iônica	85
Tabela 4.7	- Atividades específicas de CPA solúvel e imobilizada, medidas com substrato de baixa massa molecular (hipuril-L-Phe 1 mM) a 25°C (pH 7,5) e com substrato de alta massa molecular (polipeptídios 1%, p/p) a 45°C (pH 7,0) e 2 U_{H-PHE} /g de proteína	96

Tabela 4.8 - Meia vida ($t_{1/2}$) a 60°C (pH 8,0) de Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil agarose-6% (baixa carga) com 70 μeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte	102
Tabela 4.9 - Retenções de atividade (R_{EI}) e meias-vidas a 50°C (pH 8,0) de Alcalase® solúvel dialisada e imobilizada sobre diferentes suportes	110
Tabela 4.10 - Meias-vidas ($t_{1/2}$) a 63°C (pH 8,0) de derivados de Alcalase® preparados com 1 a 96 horas de reação a 25°C, pH 10,05, usando como suporte glioxil-agarose-10% com 210 μeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte	112
Tabela 4.11 - Conteúdo molar (%) de alguns aminoácidos de hidrolisados de Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-glioxil-96 h. Hidrólise por 24 horas em HCl 6 M, 105°C e análise de aminoácidos em analisador automático LKB 3201	113
Tabela 4.12 - Distribuição de massa molecular de peptídios gerados após hidrólise de caseína 1% (p/v) com Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h (alta carga) a 45 e 80°C, pH 8,0. Os hidrolisados de caseína foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho	117
Tabela 4.13 - Distribuição de massa molecular de peptídios gerados após hidrólise de caseína 0,2% (p/v) com Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga) a 45 e 80°C, pH 8,0. Hidrolisados de caseína foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho	118
Tabela 4.14 - Distribuição de massa molecular (por SE-HPLC) de polipeptídios obtidos por ação seqüencial de tripsina (DH de 2%) e quimotripsina (DH de 5%) sobre as proteínas do soro de queijo concentrado. Padrões: insulina (MM 5000 Da), neurotensina (MM 1672 Da), angiotensina II (MM 1002,2 Da) e leucina encefalina (MM 555,6 Da)	122
Tabela 4.15 - Velocidades iniciais de hidrólise de resíduos carboxi-terminais (V_{N_0}), a 45°C (pH 7,0), catalisada por CPA-glioxil-48h (25 U_{H-PHE}/L de reator), em função das concentrações iniciais de ligações peptídicas carboxi-terminais disponíveis, N_0	124
Tabela 4.16 - Parâmetros cinéticos de reações de hidrólises catalisadas por CPA	127
Tabela 4.17 - Valores de K_I , em mmol de ligações peptídicas/L, estimados para a cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto	

ajustada a hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, catalisada por CPA-glioxil baixa e alta carga, a 45°C e pH 7	130
Tabela 4.18 - Valores de K_I para diferentes sistemas substrato-enzima-inibidor	131
Tabela 4.19 - Constantes da função ajustada (equação 4.3) aos dados de concentrações relativas de aminoácidos em função do tempo de hidrólise, a 45°C (pH 7,0) catalisada por CPA-glioxil-48h	133
Tabela 4.20 - Distribuição de massa molecular (MM) de polipeptídios obtido por ação seqüencial de tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 2,9%) sobre proteínas do soro de queijo 19 g/L	136
Tabela 4.21 - Distribuição de tamanho de polipeptídios gerado pela hidrólise de proteínas do soro de queijo com tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 7%)	138
Tabela 4.22 - Velocidades iniciais de hidrólise (V_{N_0}) a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (20 U_{BAEE}/L de reator), em função das concentrações iniciais de ligações peptídicas disponíveis, N_0	139
Tabela 4.23 - Parâmetros cinéticos de reações de hidrólise catalisada por Alcalase®	143
Tabela 4.24 - Distribuição de massa molecular do produto final da hidrólise de proteínas do soro de queijo 5% (p/v), DH de 29%, catalisada seqüencialmente por glioxil-tripsina-24h, glioxil-quimotripsina-24h ^b , CPA-glioxil-48h ^c e Alcalase®-glioxil-96h	146
Tabela 4.25 - Parâmetros cinéticos do modelo clássico de Michaelis-Menten estimados para a hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro hidrolisadas com diferentes $DH_{INICIAL}$), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga) a 50°C (pH 9,5) e E/S de 20 U_{BAEE}/L	148
Tabela 4.26 - Valores estimados de K_I ajustando-se o modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo produto (equação 4.5) aos dados experimentais de hidrólises (em batelada) de polipeptídios (proteínas do soro com diferentes DH) a 50°C (pH 9,5), catalisadas por Alcalase®-glioxil-96h	150

NOTAÇÃO

A_c	Área cromatográfica ($\mu V \times \text{min}$)
A_{EI}	Atividade enzimática medida na enzima imobilizada (U/mL de suporte)
A_{IO}	Atividade enzimática inicialmente oferecida para imobilização (U/mL de sobrenadante)
a_R	Atividade relativa (Atividade final, A / Atividade inicial, A_0)
	A_S Área superficial total do gel de agarose (m^2/mL de gel)
A_{SC}	Área superficial de contato entre enzima e suporte ativado (Å)
A_{SF}	Atividade medida no sobrenadante antes da redução com borohidro de sódio, ou seja, no final da imobilização (U/mL de sobrenadante)
A_{TI}	Atividade enzimática teoricamente imobilizada (U/mL suporte)
B	Consumo de solução de NaOH (mL)
C_{AA}	Concentração de aminoácido (mmol/L)
C_{cat}	Concentração de biocatalisador no reator (g_{cat}/L)
C_{GA}	Concentração de grupos aldeídos no suporte ativado ($\mu\text{moles}/\text{mL}$ de suporte)
C_H	Concentração do hidrolisado de proteínas do soro de queijo (g/L)
C_P	Concentração de proteínas (g/L)
C_{TOTAL}	Concentração total de aminoácidos liberados por CPA (mmol/L)
DH	Grau de hidrólise, definido como a porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas durante uma reação proteolítica (%)
$DH_{INICIAL}$	Grau de hidrólise inicial das proteínas do soro de queijo (%)
DH_{TOTAL}	Grau de hidrólise máximo das proteínas do soro de queijo (%)
D_S	Densidade superficial de grupos aldeídos no suporte ativado (n° resíduos/1000 Å)
E	Concentração de enzima (U/ g_{cat} ou U/L de reator)
E/S	Razão enzima/substrato (p/p ou U/g de proteína)
E_0	Concentração inicial de enzima (U/ g_{cat} ou U/L de reator)
E_a	Energia de ativação (kJ/mol)
h_{tot}	Número total de ligações peptídicas na proteína (meqv/g)
I	Concentração molar de inibidor (mmol/L)
I_0	Concentração inicial de inibidor (mmol/L)

k	Parâmetro cinético do modelo de Michaelis-Menten - número de renovação (mmol de ligações peptídicas / min / U)
k_I	Constante da taxa de desativação de primeira ordem (tempo ⁻¹)
K_I	Constante de inibição competitiva pelo produto (mmol de ligações peptídicas / L)
K_I^{EI}	Constante de inibição da reação entre enzima e inibidor não competitivo
K_I^{ESI}	Constante de inibição da reação entre inibidor não competitivo e complexo ES
K_M	Constante de Michaelis-Menten (mmol de ligações peptídicas / L)
K_S	Constante de inibição pelo substrato (mmol de ligações peptídicas / L)
L_{AA}	Número máximo de ligações que podem ser formadas entre uma molécula de enzima e o suporte ativado
M_{AL}	Massa (em gramas) de aminoácidos liberados por CPA por 100 g de proteínas do soro
M_{AT}	Massa total (em gramas) de aminoácidos em 100 g de proteínas do soro
MP	Massa de proteínas, determinada pelo método de Kjeldahl ($N \times f_N$), em gramas
$N \times f_N$	Conversão de concentração de nitrogênio total (g/L), determinada pelo método de Kjeldahl, para concentração de proteínas (g/L)
N	Concentração molar de ligações peptídicas hidrolisáveis (mmol/L)
N_0	Concentração inicial de ligações peptídicas hidrolisáveis (mmol/L)
N_0-N	Concentração de ligações peptídicas hidrolisadas (mmol/L)
N_b	Normalidade da base (solução de NaOH)
N_{HCl}	Normalidade da solução de ácido clorídrico
P	Concentração de produto
Q_{10}	Coefficiente de temperatura
R	Constante dos gases (8,3 kJ/mol/K)
R_{EI}	Retenção de atividade (%)
R_I	Rendimento de imobilização (%)
S	Concentração de substrato
t	Tempo de reação (min ou h)
$t^{1/2}$	Meia-vida (min, h ou dias)
t_i	Tempo de inativação térmica (min, h ou dias)
t_R	Tempo de retenção (min)
V	Velocidade de reação
V_0	Velocidade inicial de reação
V_A	Volume da solução de proteínas (mL)

V_H	Velocidade inicial de hidrólise (meqv/min)
V_{HCl}	Volume de solução de ácido clorídrico (mL)
V_{max}	Velocidade máxima da reação (mmol/min/ g_{cat} ou mmol/min/L)
V_N	Velocidade de hidrólise de ligações peptídicas (mmol/min/ g_{cat} ou mmol/min/L)
V_{N0}	Velocidade inicial de hidrólise de ligações peptídicas (mmol/min/ g_{cat} ou mmol/min/L)
$V_{SUPPORTE}$	Volume de suporte (mL)
$V_{SUSPENSÃO}$	Volume total da suspensão de imobilização - sobrenadante e suporte (mL)
$\Delta P/\Delta t$	Velocidade de formação de produto

Símbolos Gregos

Φ	Módulo de Thiele observável
α	Grau médio de dissociação dos grupos α -NH ₂
α_1	Razão entre a atividade enzimática do estado final, A, e a atividade enzimática do estado inicial, A ₀
β	Concentração adimensional de substrato (N_0/K_M)
σ	Desvio padrão
η_I	Fator de efetividade da Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-10% (alta carga enzimática)

Abreviações

Abs	Absorbância
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BAEE	Éster etílico de N-benzoil-L-arginina
BANE	Éster p-nitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina (Boc-Ala-ONp)
BTEE	Éster etílico de N-benzoil-L-tirosina
CPA	Carboxipeptidase A
CPS	Concentrado de proteínas do soro
CPY	Carboxipeptidase Y
C-terminal	Carboxi-terminal

Cys	Cisteína
DFP	di-isopropil-fluorofosfato
EC	Enzyme Commission
EI	Complexo enzima-inibidor
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo enzima-substrato-inibidor
ESS	Complexo enzima-substrato-substrato
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
H-PHE	Hipuril-L-fenilalanina
Ig	Imunoglobulinas
Ileu	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
MM	Massa molecular
NA	Não analisado
NH	Nitrogênio peptídico ou nitrogênio amida
N-terminal	Amino-terminal
Phe	Fenilalanina
PIS	Proteínas isoladas do soro
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
Pro	Prolina
R	Cadeia lateral de resíduos de aminoácidos
RNA	Ácido ribonucléico
SAB	Soro albumina bovina
SE-HPLC	Cromatografia líquida de exclusão de tamanho
Ser	Serina
SH	Grupo tiol
TCA	Ácido tricloro acético
Thr	Treonina
Trp	Triptofano

Tyr	Tirosina
U	Unidade enzimática
U _{BAEE}	Unidade BAEE
U _{BANE}	Unidade BANE
U _{BTEE}	Unidade BTEE
U _{H-PHE}	Unidade H-PHE
Val	Valina
X	Natureza do resíduo de aminoácido amino-terminal
Y	Natureza do resíduo de aminoácido carboxi-terminal
α -La	α -Lactoalbumina
β -Lg	β -Lactoglobulina

Abreviações de suportes e derivados

Alcalase®-glioxil agarose-10%	Alcalase® immobilizada em agarose 10% (p/p) ativada com grupos glioxil
Alcalase®-glioxil-96h	Alcalase® immobilizada em glioxil-agarose-10% com 96 horas de reação (derivado mais estável produzido)
CPA-glioxil agarose-6%	Carboxipeptidase A immobilizada em agarose 6% (p/p) ativada com grupos glioxil
CPA-glioxil-48h	Carboxipeptidase A immobilizada em glioxil-agarose-6% com 48 horas de reação (derivado mais estável produzido)
Glioxil-agarose-10%	Agarose 10% (p/p) ativada com grupos glioxil
Glioxil-agarose-6%	Agarose 6% (p/p) ativada com grupos glioxil

RESUMO

Hidrolisados protéicos de alto valor agregado podem ser obtidos através da hidrólise seqüencial de proteínas com tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A (CPA) e Alcalase® (preparação comercial de subtilisina). A viabilidade econômica do processo requer a utilização de enzimas imobilizadas e estabilizadas e o conhecimento da cinética das reações catalisadas com esse tipo de biocatalisador. Visando contribuir para o desenvolvimento de tal processo, os objetivos deste trabalho foram preparar derivados estáveis de CPA e Alcalase® e estudar a cinética da hidrólise de polipeptídios. Esses polipeptídios foram produzidos por hidrólise seqüencial de proteínas do soro de queijo com tripsina e quimotripsina. Utilizando-se agarose entrecruzada (6% p/p para CPA e 10% p/p para Alcalase®) como suporte de imobilização, foram estudados diferentes métodos de ativação e condições de imobilização. Suportes glioxil-agarose altamente ativados (75 e 210 μeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte, respectivamente para CPA e Alcalase®) 25°C, pH 10,05 e tempo prolongado de contato (48 horas para CPA e 96 horas para Alcalase®) produziram os melhores derivados. Os derivados CPA-glioxil agarose-6% e Alcalase®-glioxil agarose-10% eram aproximadamente 213 e 515 vezes mais estáveis que as respectivas enzimas na forma solúvel. Esses derivados estabilizados retiveram 42% (para CPA-glioxil agarose-6%) e 54% (para Alcalase®-glioxil agarose-10%) da atividade imobilizada, medidas com substratos de menor massa molecular (hipuril-L-Phe para CPA, e Boc-Ala-ONp para Alcalase®) e substratos de maior massa molecular (polipeptídios com Phe carboxi-terminal para CPA, e caseína para Alcalase®). Esses resultados mostraram que toda a perda de atividade estava associada à distorção da molécula de enzima imobilizada, devido a multi-interação enzima-suporte. Derivados preparados em glutaraldeído-agarose-6% apresentaram impedimentos estéricos na hidrólise de substratos macromoleculares. A análise de aminoácidos de hidrolisados ácidos das enzimas solúveis e imobilizadas (para os derivados mais estáveis) mostrou que aproximadamente 30 e 40%, para CPA e Alcalase®, dos resíduos de lisina ligaram-se no suporte, sugerindo a existência de uma intensa ligação covalente multipontual entre a enzima e o suporte. As temperaturas de máximas taxas de hidrólise, usando respectivamente os derivados estabilizados de CPA e Alcalase®, foram 20°C e 10°C mais elevadas que aquelas obtidas para as respectivas enzimas solúveis. O derivado CPA-glioxil mais estável pôde ser eficientemente utilizado na hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas

com tripsina e quimotripsina) a altas temperaturas (por exemplo, 60°C), liberando duas vezes mais aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe e Trp) do que a enzima solúvel, sob as mesmas condições operacionais. O grau de hidrólise de caseína, a 80°C, obtido com o derivado Alcalase®-glioxil mais estável, foi duas vezes maior que aquele obtido com a enzima solúvel. Assim, os derivados produzidos permitem o projeto de um processo contínuo para a produção de hidrolisados protéicos, compostos de pequenos peptídios e com uma baixa concentração de aminoácidos aromáticos. Esse processo pode ser conduzido a alta temperatura, evitando-se assim problemas de contaminação microbiana do meio reacional. A hidrólise de resíduos carboxi-terminais a 45°C (pH 7,0), catalisada pelo derivado CPA-glioxil, pôde ser adequadamente representada por cinética de Michaelis-Menten, com inibição pelo substrato e produto. O modelo cinético foi representado em termos de ligações peptídicas carboxi-terminais hidrolisáveis pela CPA, sem considerar-se a natureza do resíduo a ser liberado. A concentração de cada aminoácido liberado em função do tempo de hidrólise pôde ser ajustada por modelos empíricos (hiperbólico e decaimento exponencial). Assim, a partir da cinética de hidrólise total, é possível estimar-se a concentração de cada aminoácido em função do tempo de hidrólise. A hidrólise catalisada pelo derivado CPA-glioxil agarose-6%, com alta carga enzimática imobilizada, não foi limitada pela resistência difusional intrapartícula. A hidrólise de peptídios (bateladas de longa duração) a 50°C (pH 9,5), catalisada pelo derivado Alcalase®-glioxil agarose-10%, pôde ser adequadamente representada por cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, e os parâmetros cinéticos V_{max} , K_M e K_I foram correlacionados com o grau de hidrólise inicial do substrato (grau de hidrólise total obtido pela prévia ação de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro de queijo). Hidrólises em batelada de longa duração, catalisadas por Alcalase®-glioxil agarose-10% com alta carga enzimática imobilizada, apresentaram efeitos de difusão, com um fator de efetividade, η_I , de aproximadamente 0,5.

ABSTRACT

High value food protein hydrolysates can be obtained by sequential hydrolysis of proteins with trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase A (CPA) and Alcalase® (commercial preparation of subtilisin). For the process to be economically feasible, immobilized and stabilized enzymes should be used, and the kinetics of the reactions with this kind of biocatalyst must be known. To contribute to the development of such a process, this work focused on preparing stable CPA and Alcalase® derivatives, and on studying the kinetics of hydrolysis of polypeptides. These polypeptides were produced after the sequential hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin and chymotrypsin. Cross-linked agarose beads (6% w/w for CPA, and 10% w/w for Alcalase®) were used as immobilization support, and different methods of activation and immobilization conditions were studied. A highly activated glyoxyl-agarose support (75 and 210 µeqv of aldehyde groups per milliliter of support, respectively for CPA and Alcalase®), 25°C, pH 10.05, and longer contact time (48 hours for CPA and 96 hours for Alcalase®), provided the best derivatives. CPA-glyoxyl agarose-6% and Alcalase®-glyoxyl agarose-10% derivatives were ca. 213- and 515-fold more stable than the soluble enzymes. These stabilized derivatives retained 42% (for CPA-glyoxyl agarose-6%) and 54% (for Alcalase®-glyoxyl agarose-10%) of the immobilized activity, assessed with small substrates (hippuryl-L-Phe for CPA, and Boc-Ala-ONp for Alcalase®) and large substrates (Phe carboxy-terminal polypeptides for CPA, and casein for Alcalase®). These results showed that all activity losses were caused by the distortion of the immobilized enzyme molecule, due to the enzyme-support multi-interaction. Derivatives prepared using glutaraldehyde-agarose presented spatial hindrances when hydrolysis of macromolecular substrates was taking place. The amino acid analysis of acid hydrolysates of the soluble and immobilized enzymes (for the more stable derivatives) showed that ca. 30 and 40%, for CPA and Alcalase®, of the lysine residues were linked to the support, suggesting that there is intense multi-point interactions between enzyme and support, through covalent linkages. The temperatures for maximum hydrolysis rates, using respectively stabilized CPA and Alcalase® derivatives, were 20°C and 10°C higher than the ones obtained using soluble enzymes. The most stable CPA-glyoxyl derivative could efficiently be used for polypeptides (cheese whey proteins hydrolyzed with trypsin and chymotrypsin) hydrolysis at high temperatures (e.g., 60°C), releasing ca. 2-fold more aromatic amino acids (Tyr, Phe and Trp) than the soluble

enzyme, under the same operational conditions. The casein degree of hydrolysis, at 80°C, obtained using the most stable Alcalase®-glyoxyl derivative, was 2-fold higher than the one obtained with the soluble enzyme. Hence, the produced derivatives allow the design of a continuous process for the production of protein hydrolysates, which are composed of small peptides and have a low concentration of aromatic amino acids. This process can use higher temperature, avoiding microbial growth in the reaction medium. The C-terminal residues hydrolysis at 45°C (pH 7.0), catalyzed by CPA-glyoxyl, could be adequately represented by Michaelis-Menten kinetics, with substrate and product inhibition. The kinetic model was expressed in terms of C-terminal peptide bonds that can be hydrolyzed by CPA, regardless of the amino acid released. The concentration of each released amino acid as a function of the time of reaction could be well fitted by empirical models (hyperbolic or exponential decay). Hence, from the kinetics of total hydrolysis, it is possible to estimate the concentration of each amino acid as function of time. The hydrolysis catalyzed by the highly-loaded CPA-glyoxyl agarose-6% derivative was not limited by intra-particle diffusion resistance. The hydrolysis of peptides (long-time batch) at 50°C (pH 9.5), catalyzed by Alcalase®-glyoxyl agarose-10% derivative, could be adequately represented by Michaelis-Menten kinetics with product inhibition, and the kinetic parameters V_{max} , K_M e K_I were correlated against the substrate initial degree of hydrolysis (total degree of hydrolysis obtained by previous action of trypsin and chymotrypsin on cheese whey proteins). Long-time batch hydrolyses, catalyzed by highly-loaded Alcalase-glyoxyl agarose-10% derivative, presented diffusion effects, with effectiveness coefficient, η_I , of ca. 0.5.

1 - INTRODUÇÃO

O soro de queijo, embora represente uma fonte potencial de recursos para a indústria de laticínios, ainda tem sido tratado mais como poluente do que como matéria-prima. O reconhecimento da qualidade dos componentes do soro (proteínas, sais minerais, vitaminas e lactose), bem como a divulgação de trabalhos científicos referentes às propriedades desses componentes, tem causado um crescente interesse pela utilização do soro na indústria alimentícia, farmacêutica e química (Ponsano *et al.*, 1992). Sem tratamento, o soro pode ser utilizado na suplementação alimentar de animais, na irrigação do solo, enriquecimento de pastagens e de solo destinado à agricultura. Após algum tratamento preliminar, pode ser utilizado na produção de xaropes de glicose e galactose, na produção de álcool, em processos fermentativos, na preparação de bebidas lácteas fermentadas, vinhos e cervejas, no enriquecimento de sucos de frutas e refrigerantes, na preparação de hidrolisados protéicos para fins alimentícios, etc (González Siso, 1996).

A hidrólise de proteínas pode ser feita por ácidos, bases ou enzimas (proteases), sendo preferida a utilização de enzimas caso o produto final venha a ser utilizado para fins alimentícios. Dentre as muitas vantagens advindas da hidrólise de proteínas estão: 1) melhoramento de suas propriedades nutricionais e funcionais, podendo a mistura obtida, composta de peptídios e aminoácidos livres, ser utilizada na preparação de fórmulas alimentícias infantis, produtos farmacêuticos e para nutrição de esportistas; 2) alteração de sua solubilidade, devido à formação de uma mistura de peptídios, que inclusive podem ser melhores assimilados por microorganismos, por exemplo, obtendo-se resultados favoráveis em processos fermentativos; 3) redução das propriedades alergênicas, pela hidrólise das proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, principais componentes alergênicos do leite; e 4) remoção de sabores e fatores antinutricionais, o que permite sua utilização como aromatizantes naturais e no enriquecimento de vários produtos alimentícios, tais como sopas, sucos de frutas e refrigerantes (Hossain e Stanley, 1996; Boudrant e Cheftel, 1976; Kumar e Gupta, 1998; Schmidt e Poll, 1991).

Há muitos fatores a serem considerados na preparação de hidrolisados protéicos. Um deles é a composição em pequenos peptídios e aminoácidos livres. Não é desejável que o hidrolisado contenha somente aminoácidos livres, pois estes tornariam a dieta hiper-osmótica, causando secreção intestinal e, conseqüentemente, diarreia. Além disso, uma mistura composta por di e tripeptídios seria mais bem absorvida no intestino do que uma mistura de

aminoácidos livres, por evitar competição entre aminoácidos que compartilham o mesmo mecanismo de transporte (González-Tello *et al.*, 1994). Assim, fórmulas contendo pequenos peptídios são usadas mais eficientemente do que uma mistura de aminoácidos livres e têm maior valor nutritivo (Silvestre *et al.*, 1994).

Outro fator muito importante a ser considerado é o sabor. Durante a hidrólise são formados peptídios com sabor extremamente amargo, que tornam o produto final inaceitável para fins alimentícios e para sua inclusão em dietas especiais, como por exemplo, nutrição entérica de recém-nascidos e adultos com doenças do estômago ou outras patologias. Tem-se mostrado que o sabor amargo está relacionado com a presença dos aminoácidos hidrofóbicos Leu, Ileu, Pro, Val, Phe, Tyr e Trp próximos a N- ou C-terminal da cadeia peptídica, sendo mais acentuado quando o peptídio é abundante em Pro, e este, está próximo ao centro da cadeia peptídica (Pawlett e Bruce, 1996; Adler-Nissen, 1986). Outro fator que influencia o sabor amargo de hidrolisados protéicos é o tamanho dos peptídios (Adler-Nissen, 1986; Kukman *et al.*, 1995; Hossain e Stanley, 1996). Tem-se relatado que peptídios contendo de 3 a 15 resíduos de aminoácidos são amargos (Pawlett e Bruce, 1996) e que para se evitar o aparecimento de sabor amargo, os peptídios deveriam ter uma massa molecular a mais alta possível, como por exemplo, acima de 6 kDa (Kukman *et al.*, 1995; Adler-Nissen, 1986). Entretanto, peptídios com essa massa molecular já poderiam acarretar problemas alergênicos, pois tem sido verificado que este efeito praticamente desaparece quando os peptídios têm massa molecular menor que 2 kDa (González-Tello *et al.*, 1994). Portanto, para se obter hidrolisados compostos basicamente por di e tripetídeos, sem sabor amargo, seria necessária a separação dos peptídios hidrofóbicos amargos, o que por sua vez acarretaria uma diminuição desnecessariamente acentuada no seu valor nutricional, ao se eliminar também outros resíduos presentes no peptídio. Uma alternativa seria a redução somente dos aminoácidos aromáticos, que pode melhorar o sabor dos hidrolisados enzimáticos (Adler-Nissen, 1986; Adachi *et al.*, 1991), podendo ser utilizados para fins alimentícios. Além do que, a redução ou eliminação do conteúdo em fenilalanina (aminoácido aromático) forneceria um produto de alto valor agregado, pois seria de pronto uso por portadores de fenilcetonúria, cujo único tratamento é a restrição dietética deste aminoácido. Portanto, um hidrolisado composto de aminoácidos livres e pequenos peptídios com baixo teor de resíduos aromáticos é um produto nobre, cuja obtenção a partir do soro de queijo poderia conferir lucro à indústria de laticínios, ou, no mínimo, reduzir os custos com o tratamento do resíduo.

A produção de um preparado de pequenos peptídios, livre de aminoácidos aromáticos, seria possível, por exemplo, hidrolisando seqüencialmente as proteínas do soro de queijo com

tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A e Alcalase®. A primeira endoprotease (tripsina) seria usada no processo para desdobrar a proteína e tornar os resíduos hidrofóbicos mais acessíveis para a ação da endoprotease quimotripsina, que produziria peptídios com resíduos hidrofóbicos (entre eles os aromáticos) nas terminações carboxílicas. A exoprotease carboxipeptidase A removeria então preferencialmente os aminoácidos aromáticos (entre eles a fenilalanina) da cadeia polipeptídica e, após a remoção dos aminoácidos livres do meio reacional, por ultrafiltração ou adsorção em resinas, por exemplo, a última endoprotease, a Alcalase®, geraria o produto final, ou seja, um hidrolisado composto por pequenos peptídios com baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos.

Na preparação desse hidrolisado enzimático seria imprescindível o uso de enzima imobilizada em suportes insolúveis para a redução dos custos do processo, pois a recuperação da enzima solúvel ao final do processo é inviável economicamente, e sendo alto o custo da enzima, se não recuperada, aumentaria muito o preço do produto final. Além disso, seria muito importante a utilização de alta temperatura para prevenir contaminação do meio reacional. No entanto, essa condição promoveria a inativação da enzima, altamente indesejável neste tipo de processo onde se pretende utilizar enzimas caras, porém específicas, para obter-se produtos de médio valor. Portanto, a imobilização e a estabilização das proteases torna-se uma meta vital a ser atingida para produção industrial de um hidrolisado protéico.

Assim, visando contribuir para a obtenção do referido hidrolisado, esse trabalho teve como objetivo estudar as duas últimas etapas da hidrólise das proteínas do soro, catalisadas pela carboxipeptidase A (exoprotease) e pela Alcalase® (endoprotease comercial). Objetivou-se inicialmente atingir a meta de obtenção de enzimas imobilizadas e estabilizadas, utilizando-se a técnica de imobilização multipontual ao suporte. Essa técnica consiste na formação de várias ligações covalentes entre uma mesma molécula de enzima e vários grupos ativos do suporte. O estabelecimento destas ligações multipontuais torna a molécula de enzima muito mais rígida e, por conseguinte, muito mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por aquecimento, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (Guisán, 1988). Os derivados obtidos foram caracterizados quanto à retenção de atividade, estabilidade térmica e alcalina e eficiência na hidrólise de substratos macromoleculares. Efetuou-se a seguir estudo cinético das reações de hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro seqüencialmente hidrolisadas por tripsina e quimotripsina), catalisadas pelas proteases imobilizadas. Esse estudo envolveu a determinação das condições ótimas de hidrólise (pH, temperatura e concentração de enzima, por exemplo) e o ajuste de modelos cinéticos aos dados experimentais, com a estimativa dos respectivos parâmetros cinéticos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Soro de Queijo

O soro de queijo, de coloração amarela-esverdeada, é a porção aquosa que se separa do coágulo durante a fabricação convencional de queijo (precipitação e remoção da caseína). Esse subproduto representa de 85 a 95% do volume inicial do leite e retém aproximadamente 55% dos seus nutrientes, sendo os mais abundantes a lactose (de 4,5 a 5% p/v), responsável pelo sabor adocicado do soro; as proteínas solúveis (de 0,6 a 0,8% p/v); os lipídeos (de 0,4 a 0,5% p/v) e os sais minerais (de 8 a 10% de extrato seco); entretanto, possui também quantidades apreciáveis de outros compostos, como, por exemplo, ácido láctico e cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do grupo B (González Siso, 1996; Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997).

A composição e o tipo de soro dependem dos tipos de queijos fabricados e dos processos tecnológicos utilizados na sua produção. Basicamente há dois tipos de soro de queijo: soro doce e soro ácido. O soro doce resulta da manufatura de queijos feitos com leites coagulados inicialmente por renina (por exemplo, queijos “cheddar”, suíço e mussarela), tendo pH de 5,9 a 6,7; o soro ácido é gerado na fabricação de caseína ou de queijos frescos (coagulados por ácido), tendo pH de 4,4 a 4,8. Os soros ácidos possuem maior conteúdo de cinzas e menor concentração de proteínas, tendo utilização mais limitada devido ao sabor ácido e ao alto conteúdo salino (Richards, 1997; Ponsano *et al.*, 1992; González Siso, 1996). A Tabela 2.1 lista a composição média típica de soros produzidos na fabricação de queijo a partir da coagulação da caseína com renina ou ácido láctico.

Desde cerca de 5000 a.C., quando o homem começou a manufatura de queijos, o soro, como produto secundário, mostrou-se ser um problema de despejo. Atualmente, milhões de toneladas de soro de queijo são produzidos anualmente no mundo, sendo maioritariamente descartado nos rios como efluente (particularmente no Brasil), ou seco, gerando um produto de baixíssimo valor agregado. O despejo em rios, sem prévio tratamento, resulta em degradação ambiental, pois o soro de queijo apresenta uma altíssima demanda bioquímica de oxigênio (30.000 a 50.000 mg de oxigênio por litro de soro), além de seu despejo constituir grande perda de alimento em potencial e de grande valor energético (Richards, 1997; Ponsano *et al.*, 1992; González Siso, 1996; UNILIVRE, 2003).

Tabela 2.1 – Composição média e pH de soro de queijo doce (caseína coagulada com renina) e soro de queijo ácido (caseína coagulada com ácido láctico).

Componente	Composição (g/L)	
	Soro doce	Soro ácido
Sólidos totais	66	64
Proteína total (N ^a x 6,38 ^b)	6,57	6,20
Nitrogênio não protéico	0,37	0,40
Lactose	52,3	44,3
Gordura	0,2	0,3
Minerais	5,0	7,5
Cálcio	0,5	1,6
Fosfato	1,0	2,0
Sódio	0,53	0,51
Lactato	-	6,4
pH	6,4	4,6

Fonte: Ponsano *et al.*, 1992.

^aConcentração de nitrogênio, em g/L.

^bFator de conversão de Kjeldahl (f_N) para proteínas do soro e caseína.

O valor nutricional do soro e a despesa necessária para seu tratamento, caso seja considerado efluente, faz com que as técnicas que permitem sua transformação em um produto com valor comercial se tornem cada vez mais atraentes.

O soro de queijo *in natura* pode ser utilizado na alimentação animal, na produção de bebidas ou ingredientes para estas, na irrigação de solos (desde que devidamente aplicado) e no enriquecimento de pastagens e solos para a agricultura. Pode ainda ser utilizado como substrato em processos fermentativos, no cultivo de microorganismos e no preparo de fermentos para fabricação de alguns tipos de queijo (Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997).

O soro desmineralizado pode ser utilizado na manufatura de alimentos infantis, no enriquecimento nutricional de bebidas, em produtos de panificação e como substrato para produção de álcool etílico, através de processos fermentativos (Ponsano *et al.*, 1992). O soro acidificado ou não pode ser misturado com cacau e sucos de frutas concentrados, ser usado na preparação de bebidas fermentadas alcoólicas ou não alcoólicas, como por exemplo, frisantes, cervejas e vinhos (Richards, 1997).

As proteínas do soro, obtidas por vários processos de separação (coagulação por calor, precipitação por agentes químicos e ultrafiltração, por exemplo), são utilizadas para a alimentação humana ou animal. As proteínas coaguladas podem, por exemplo, ser utilizadas na manufatura de salsichas, como estabilizantes de emulsão e ligantes. Os concentrados protéicos, obtidos por ultrafiltração, por exemplo, apresentam boas propriedades físico-químicas (solubilidade, viscosidade, capacidade estabilizante, e outras), tendo uma série de aplicações na indústria alimentícia, incluindo sopas desidratadas, molhos para saladas, alimentos infantis, dietéticos e geriátricos, sorvetes, carnes, na produção de derivados de leite, de produtos de panificação e de bebidas, e como suplementos alimentares. O concentrado da ultrafiltração pode ainda ser utilizado pelo próprio laticínio na fabricação de requeijão cremoso, queijo tipo “cottage” e outros. (Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997).

A lactose refinada, obtida do permeado da ultrafiltração, pode ser utilizada na indústria farmacêutica (fornecendo compressibilidade, lubrificação e firmeza na confecção de comprimidos, no revestimento de pílulas, produção de penicilina, e em cosméticos), na indústria química (produção de ácidos láctico e cítrico, corantes e espumas de poliuretano) e na indústria alimentícia (utilizado em produtos de confeitaria, produção de alimentos infantis, produção de xaropes de glicose e galactose, dentre outros) (Ponsano *et al.*, 1992; Richards, 1997).

2.2 – Proteínas

As proteínas são os principais constituintes dos animais, agregando as diferentes partes do organismo e dirigindo o seu funcionamento. Encontram-se em todas as células vivas e são os principais constituintes da pele, músculos, tendões, nervos, sangue, enzimas, anticorpos e hormônios (Morrison e Boyd, 1990).

Quimicamente, são polímeros construídos a partir de um conjunto de 20 α -aminoácidos (variando em tamanho, polaridade e propriedades ácido-base), onde o grupamento α -carboxílico de um aminoácido se une ao grupamento α -amino de outro aminoácido por meio de uma ligação amida (ligação peptídica), ocorrendo a condensação de uma molécula de água - Figura 2.1 (Stryer, 1992, Kennedy, 1987). Polímeros compostos por dois, três, poucos (aproximadamente de 3 a 10) e muitos aminoácidos são conhecidos, respectivamente, como dipeptídios, tripeptídios, oligopeptídios e polipeptídios. Os

polipeptídios possuem aproximadamente de 40 a acima de 4.000 resíduos de aminoácidos e têm massa molecular de em torno de 4 a acima de 440 kDa (Voet, 1995).

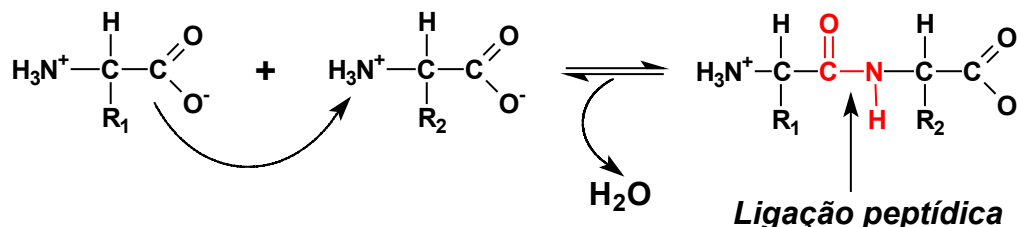


Figura 2.1 – Representação esquemática da formação de uma ligação peptídica a partir de dois α -aminoácidos com distintas cadeias laterais (grupo R). Na cadeia peptídica os aminoácidos são chamados de resíduos.

Segundo Voet (1995), a estrutura das proteínas tem sido tradicionalmente descrita em termos de quatro níveis de organização, a saber:

- a) estrutura primária - seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica;
- b) estrutura secundária – arranjo espacial local (helicoidal ou folhear) dos resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica, sem considerar-se as conformações de suas cadeias laterais;
- c) estrutura terciária – arranjo tridimensional da cadeia polipeptídica completa, ou seja, o dobramento de suas estruturas secundárias elementares, juntamente com as disposições espaciais de suas cadeias laterais;
- d) estrutura quaternária – arranjo espacial das subunidades de uma proteína formada por duas ou mais cadeias polipeptídicas, unidas por interações não covalentes e, em alguns casos, por ligações dissulfeto.

As proteínas dividem-se em duas grandes classes: proteínas globulares (solúveis em água, soluções aquosas ácidas, básicas ou salinas) e proteínas fibrosas (insolúveis em água). As moléculas de proteínas fibrosas são longas e filamentosas e se dispõem lado a lado formando fibras; as moléculas de proteínas globulares encontram-se dobradas sobre si mesmas em unidades compactas, adquirindo forma esferoidal. Como exemplo de proteínas fibrosas tem-se a queratina (presente na epiderme, cabelos, unhas e lã, dentre outros), o colágeno (presente nos tendões), a miosina (presente nos músculos) e a fibroína (presente na seda); e como exemplo de proteínas globulares tem-se a insulina (presente no pâncreas), os

anticorpos (responsáveis pela defesa do corpo contra organismos estranhos), a albumina, a hemoglobina (responsável pelo transporte de oxigênio) e todas as enzimas (Morrison e Boyd, 1990).

2.2.1 - Proteínas do soro

As principais proteínas do soro são a α -lactoalbumina (α -La), a β -lactoglobulina (β -Lg), a soro albumina bovina (SAB) e as imunoglobulinas (Ig). Além dessas, existem ainda várias outras proteínas, coletivamente denominadas “proteose-peptonas” (Morr e Ha, 1993; Ponsano *et al.*, 1992). Elas possuem aminoácidos essenciais adequados, são facilmente digeridas e são consideradas altamente nutricionais e fisiologicamente completas. O alto conteúdo de aminoácidos essenciais as torna de interesse pela indústria alimentícia por poderem ser utilizadas para aumentar o valor nutricional de proteínas de cereais ou outras de baixa qualidade (Ponsano *et al.*, 1992). A Tabela 2.2 lista algumas propriedades das principais proteínas do soro e a Tabela 2.3 seu conteúdo aproximado de aminoácidos.

Tabela 2.2 – Propriedades químicas e físico-químicas das proteínas do soro.

Propriedade	β -Lg ^a	α -La ^b	SAB ^c	Ig ^d
Ponto isoelétrico	5,2	4,2 a 4,5	4,7 a 4,9	5,5 a 8,3
Concentração no soro, g/L	2-4	0,6 a 1,7	0,4	0,4 a 1,0
Concentração no soro, % (p/p)	56 a 60	18 a 24	6 a 12	6 a 12
Massa molecular, kDa	18,3	14	66	≥146
Resíduos por molécula	162	123	582	NA
Hidrofobicidade média, kcal/resíduo	1075	1020	995	NA
Resíduos apolares por molécula	54	44	163	NA
Resíduos de Cys por molécula	5	8	35	NA
Resíduos dissulfetos por molécula	2	4	17	NA
Resíduos sulfidrilo por molécula	1	0	1	NA
Resíduos de Lys por molécula	15	12	59	NA
Resíduos de Glu por molécula	16	8	59	NA
Resíduos de Asp por molécula	10	9	39	NA

Fonte: Morr e Ha, 1993.

^a β -lactoglobulina; ^b α -lactoalbumina; ^cSoro albumina bovina; ^dImunoglobulinas.

NA – não analisado.

Tabela 2.3 – Composição de aminoácidos de concentrados de proteínas do soro^a e número de resíduos nas principais proteínas do soro^b

Resíduos de aminoácidos	Composição em gramas de aminoácidos livres por 100 g de proteínas (N x 6,38) ^c	Número de resíduos na β -Lg ^d	Número de resíduos na α -La ^e	Número de resíduos na SAB ^f
Ácidos				
Asp e Asn	12,30	15	21	54
Glu e Gln	20,41	25	13	79
Hidrofóbicos volumosos				
Val ^E	6,42	9	6	36
Leu ^E	14,01	22	13	61
Ileu ^E	6,92	10	8	14
Phe ^E	3,82	4	4	27
Tyr ^H	3,50	4	4	19
Trp ^E	2,60	2	4	2
Pro	5,18	8	2	28
Contendo enxofre				
Met ^E	2,64	4	1	4
Cys	2,51	5	8	35
Básicos				
Lys ^E	11,20	15	12	59
Arg ^E	3,01	3	1	23
His ^E	2,05	2	3	17
Neutros pequenos				
Gly	1,92	4	6	16
Ala	6,11	15	3	46
Ser	4,76	7	7	28
Thr ^E	6,18	8	7	34
Σ	115,54	162	123	582

Fonte: ^aAdler-Nissen, 1986; ^bMorr e Ha, 1993.

^cConcentração de nitrogênio (g/L) x fator de conversão de Kjeldahl (f_N) para proteínas do soro.

^d β -lactoglobulina; ^e α -lactoalbumina; ^fSoro albumina bovina.

^EAminoácido essencial.

De forma geral, as proteínas do soro são compactas e globulares, com massa molecular variando de 14 a 1000 kDa. Uma das grandes vantagens dessas proteínas é sua abundância de resíduos de Cys, os quais permitem a formação de ligações covalentes intermoleculares (ligações dissulfeto) durante o processamento do soro a alta temperatura. A formação dessas ligações dissulfeto é essencial para a formação de géis e para estabilizar espumas.

Numerosas pesquisas têm sido feitas sobre a funcionalidade das proteínas do soro em concentrados de proteínas do soro (CPS), que contém de 50 a 75% de proteínas, e nas proteínas isoladas do soro (PIS), que contém acima de 90% de proteínas. Muitas dessas pesquisas referem-se ao processamento, composição e fatores físico-químicos (pH; força iônica; concentração de cálcio e outros íons polivalentes, açúcar, proteínas e hidrocolóides; temperatura; e viscosidade) que controlam a funcionalidade das proteínas, bem como sobre as aplicações e usos de CPS e PIS como ingredientes funcionais de produtos alimentícios. Definem-se propriedades funcionais das proteínas como aquelas propriedades físico-químicas (solubilidade, viscosidade, gelificação, emulsificação, poder espumante, adsorção a interfaces água-ar e água-óleo, difusão, desnaturação e ligação proteína-proteína, proteína-íon e proteína-ligante) que influenciam a estrutura, aparência, textura, paladar, viscosidade e retenção do sabor de um determinado produto (Morr e Ha, 1993).

2.2.1.1 - β -lactoglobulina (β -Lg)

A β -Lg é a proteína mais abundante no soro de queijo, estando presente em concentrações de 2 a 4 g/L, o que corresponde a aproximadamente 50% do total das proteínas do soro. É constituída de 162 resíduos de aminoácidos e tem uma massa molecular de 18,3 kDa. A estrutura desta proteína é dependente do pH. Acima do seu ponto isoelétrico (pH 5,2) esta proteína é encontrada na forma de um dímero de 36,7 kDa. Abaixo do pH 3,5 e acima do pH 7,5 o dímero dissocia-se para um monômero lentamente expandido, e entre o pH 3,5 e 5,2 o dímero polimeriza para um octômero de 147 kDa. De grande importância para essa proteína são seus cinco resíduos de cisteína como duas ligações dissulfeto intermoleculares ligando os resíduos 66 e 160, e os resíduos 106 e 119 ou 121, e um com o grupo SH livre no resíduo 119 ou 121. Esses resíduos de aminoácidos contendo enxofre facilitam a polimerização da proteína, durante o seu processamento a altas temperaturas, pela formação de ligações dissulfeto intermoleculares. A β -Lg tem aproximadamente 15, 43 e 47% de estrutura α -hélice,

folha pregueada (arranjo β) e não ordenada, respectivamente, que é sensível ao pH e temperatura. Esta proteína desnatura-se a temperaturas acima de 65°C, sofrendo grandes transições conformacionais com a exposição dos grupos SH e ϵ -NH₂ altamente reativos (Morr e Ha, 1993).

A β -Lg é resistente à digestão por pepsina e quimotripsina, devido a sua conformação estável. A temperaturas acima de 70°C a β -Lg sofre desnaturação irreversível e polimerização (formação de ligações dissulfeto intermoleculares). As quatro ligações dissulfeto por dímero de β -Lg reagem para formar as ligações intermoleculares que mantém a integridade estrutural do polímero e aumenta a estabilidade da proteína pela diminuição de sua entropia. A quebra das ligações dissulfeto ou o aquecimento destroem a estrutura e a conformação nativa da proteína, aumentando a susceptibilidade da β -Lg ao ataque pela pepsina e quimotripsina (Morr e Ha, 1993).

2.2.1.2 - α -lactoalbumina (α -La)

A α -La, com massa molecular de 14 kDa e 123 resíduos de aminoácidos, está presente no soro de queijo em concentrações na faixa de 1 a 1,5g/L e representa aproximadamente 20% do total das proteínas. É uma proteína esferoidal e tem uma estrutura altamente compacta com quatro ligações dissulfeto intramoleculares (Morr e Ha, 1993).

Até 1977, a α -La era considerada como a proteína do soro mais estável ao calor. No entanto, pesquisas subseqüentes revelaram que esta estabilidade era aparente, pois a proteína tinha a capacidade de se renaturar quase que completamente mediante resfriamento ou ajuste de pH, após sua exposição à temperatura acima de 62°C. A extensão de renaturação dependia do tempo e da temperatura de exposição.

Esta proteína liga-se a íons Ca⁺², Zn⁺² e outros metais. A α -La ligada ao íon Ca⁺² estabiliza sua conformação em uma estrutura complexa. A remoção deste íon torna-a mais susceptível à desnaturação pelo calor, porém reduz sua habilidade de renaturação por resfriamento (Morr e Ha, 1993).

2.2.1.3 – Soro Albumina Bovina (SAB)

A SAB, com massa molecular de 66 kDa, é constituída por 582 resíduos de aminoácidos, estando presente no soro em concentrações de 0,1 a 0,4 g/L. Esta proteína

possui 17 ligações dissulfeto intramoleculares e um grupo SH livre no resíduo 34. É uma proteína de transporte de ácidos graxos insolúveis do sistema circulatório sanguíneo. A ligação a ácidos graxos estabiliza a molécula de proteína contra a desnaturação térmica. A quebra das ligações dissulfeto expõe os grupos hidrofóbicos para a fase aquosa, melhorando sua habilidade de emulsificação.

SAB é até 35% solúvel em água destilada a 3°C, mas a temperaturas de 40 a 45°C já se observa vasta precipitação desta proteína devido ao desdobramento parcial da molécula. Em pH 4 moléculas de SAB sofrem desnaturação ácida devido à repulsão mútua dos resíduos de aminoácidos positivamente carregados ao longo da cadeia polipeptídica. A molécula de SAB é mais compacta na região carboxi-terminal do que na região amino-terminal, diferenciando-se em hidrofobicidade, carga líquida e habilidade de formar ligações com ligantes (Morr e Ha, 1993).

2.2.1.4 - Imunoglobulinas (Ig)

As imunoglobulinas pertencem à família heterogênea das glicoproteínas, alcançando uma massa molecular de 15 a 1000 kDa. As Ig têm sido identificadas no leite e no plasma sanguíneo. São monômeros de duas cadeias polipeptídicas de 20 kDa e duas cadeias polipeptídicas de 50 a 70 kDa, unidas por ligações dissulfeto. O soro do leite bovino contém de 0,6 a 1,0 g/L de Ig. Em comparação com a α -La e a β -Lg, as imunoglobulinas desnaturam-se em temperaturas mais elevadas, mas na presença de outras proteínas do soro são extremamente termolábeis, devido à interação com β -Lg e SAB por meio de ligações dissulfeto (Morr e Ha, 1993).

2.2.2 – Enzimas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas (Kennedy, 1987).

As enzimas têm alta especificidade pelo substrato, pois a molécula é disposta tridimensionalmente de tal forma que apenas determinados substratos consigam atingir seu sítio ativo, encontrando-se nessa região com grupos específicos da proteína num posicionamento adequado à reação. Entretanto são, geralmente, muito sensíveis ao calor, ao

pH e à presença de certos compostos, como, por exemplo, detergentes, podendo facilmente desnaturar-se, ou seja, perderem sua estrutura tridimensional, essencial para a atividade catalítica (Kennedy, 1987).

As enzimas podem estar associadas tanto com lipídios como carboidratos e podem conter componentes não protéicos cataliticamente ativos, chamados coenzimas ou cofatores. Muitas delas, para serem cataliticamente ativas, necessitam de íons metálicos, atuando como ativadores e estando diretamente envolvidos na catálise. Por exemplo, o íon Zn^{+2} é essencial para a atividade da carboxipeptidase A, o qual atua como um catalisador eletrofílico estabilizando as cargas negativas geradas na reação. (Kennedy, 1987).

De acordo o sistema de nomenclatura e classificação de enzimas, adotado por acordo internacional (*Enzyme Commission*, EC), cada enzima recebe um número classificatório (número EC) composto por quatro dígitos separados por pontos (Hartmeier, 1988).

O primeiro dígito indica uma das seis classes em que são divididas as enzimas, de acordo com a reação que catalisam: *1-oxidoreductases* (reações de oxido-redução), *2-transferases* (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxidoreductases ou pelas hidrolases), *3-hidrolases* (reações de hidrólise, onde a água é o receptor dos grupos transferidos), *4-liases* (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), *5-isomerases* (reações de isomerização) e *6-ligases* (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP) (Lartigue, 1975; Kennedy, 1987; Whitaker, 1994).

O segundo e o terceiro dígito (subclasse e sub-subclasse, respectivamente) indicam diferentes situações, dependendo da classe que se encontram. Por exemplo, nas *oxidoreductases* (classe 1) a subclasse indica a natureza do grupo sobre o qual as enzimas atuam (álcool, aldeído, cetona, ou outro) e a sub-subclasse indica o tipo de receptor envolvido (citocromo, oxigênio ou outro); nas *transferases* (classe 2) a subclasse indica a natureza do grupo transferido (carbono, aldeído, acil, ou outro) e a sub-subclasse subdivide o tipo do grupo transferido (se o grupo carbono é um grupo metil ou hidroximetil, por exemplo) ou indica o tipo de receptor, no caso da enzima tratar-se de uma fosfotransferase. Por exemplo, a enzima ATP:D-hexose 6-fosfotransferase, recebe o número EC 2.7.1.1, indicando ser uma enzima que catalisa a transferência (2) de um grupo contendo fósforo (7), neste caso o fosfato a partir do ATP, para um receptor contendo um grupo álcool (1), neste caso o grupo 6-hidroxil da D-hexose. O quarto dígito (1 no exemplo) corresponde ao número serial da enzima na sua correspondente sub-subclasse (Whitaker, 1994; Kennedy, 1987).

2.3 – Enzimas Proteolíticas ou Peptídio Hidrolases

As enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias e plantas e animais superiores, constituem um grupo grande e complexo de enzimas, as quais diferem entre si por sua especificidade pelo substrato, sítio ativo e mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (Ward, 1985).

Participantes deste grupo, a pepsina, tripsina, quimotripsina e as carboxipeptidases e aminopeptidases são de grande importância na vida do homem, pois no trato digestivo são as responsáveis pela hidrólise de proteínas ingeridas a aminoácidos. Além disso, são de grande importância no processamento industrial de alimentos, sendo usadas, por exemplo, na produção de queijos e amaciamento de carnes (Whitaker, 1994).

A reação comumente catalisada por esse grupo de enzimas é a hidrólise de ligações peptídicas de uma proteína (Figura 2.2), mas também hidrolisam ligações ésteres (-COOR), tiol-ésteres (-COSR) e amidas (-NH₂).

A natureza do grupo R₁ ou R₂ (Figura 2.2) é o maior fator diferenciador das enzimas proteolíticas. Por exemplo, quimotripsina hidrolisa rapidamente ligações peptídicas quando o grupo R₁ for um resíduo de tirosina, fenilalanina ou triptofano. Tripsina hidrolisará somente quando o grupo R₁ for um resíduo de lisina ou arginina. Por outro lado, pepsina e carboxipeptidase A têm especificidades baseadas na natureza do grupo R₂. Ambas hidrolisam rapidamente ligações peptídicas se o grupo R₂ for um resíduo de fenilalanina. A diferença entre as duas é que para a carboxipeptidase A o resíduo deverá ser carboxi-terminal (Whitaker, 1994).

A natureza dos constituintes X e Y (Figura 2.2) permite separar as enzimas proteolíticas em endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases (por exemplo, tripsina, quimotripsina e pepsina) hidrolisam randomicamente ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica com máxima atividade quando X e Y são derivatizados (por exemplo, resíduos de aminoácidos). As exopeptidases (carboxipeptidases, aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases) hidrolisam ligações peptídicas amino- ou carboxi-terminais. As aminopeptidases requerem que X seja um grupo H e preferencialmente que Y não seja um grupo OH. As carboxipeptidases requerem que Y seja um grupo OH e preferencialmente que X não seja um grupo H. As dipeptidases e tripeptidases requerem que X e Y sejam grupos H e OH, respectivamente (Abeles *et al.*, 1992; Whitaker, 1994).

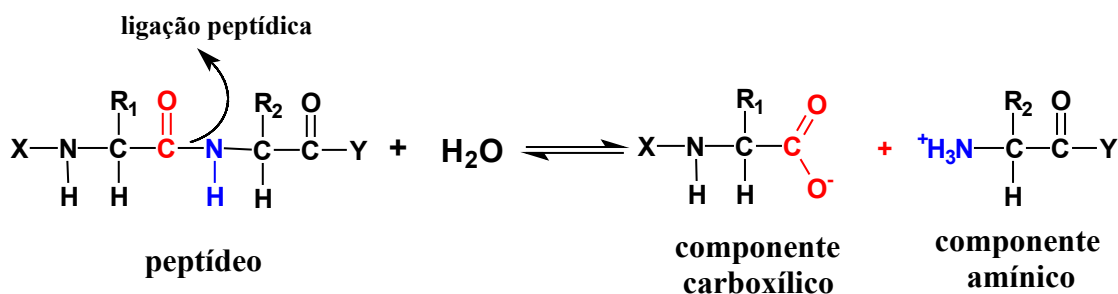


Figura 2.2 – Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por uma enzima proteolítica.

Segundo o sistema internacional de nomenclatura, as enzimas proteolíticas pertencem à subclasse 4 da classe 3 (EC 3.4 Peptídio hidrolases), conforme mostra a Figura 2.3. As proteases são subdivididas em sub-subclasses com base nos seus mecanismos catalíticos; as enzimas em cada sub-subclasse são distinguidas com base em sua especificidade pelo substrato (Ward, 1985).

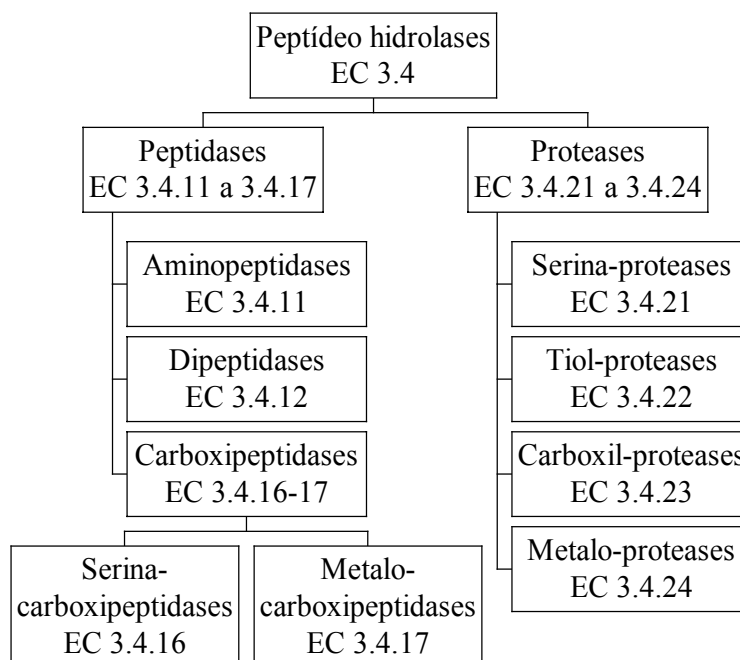


Figura 2.3 – Classificação das peptídeo hidrolases de acordo com o seu mecanismo catalítico. Cada enzima dentro de um sub-sub-grupo é diferenciada com base em sua especificidade pelo substrato (Ward, 1985).

As peptidases removem aminoácidos ou pares de aminoácidos a partir dos terminais da cadeia polipeptídica, sejam eles amino- (terminal de atuação de aminopeptidases) ou carboxi-terminais (terminal de atuação de carboxipeptidases). Essas enzimas são muito ineficientes na degradação de proteínas intactas e, portanto, são sempre usadas após ou em conjunto com uma endoprotease (Pawlett e Bruce, 1996). Esta por sua vez, se estiver operando em seu pH ótimo, reduzirá drasticamente o tamanho da molécula de proteína, e os pequenos peptídios produzidos serão mais solúveis (Godfrey, 1996).

De acordo com Hartley (1960), apud Whitaker (1994), é conveniente dividir as enzimas proteolíticas em quatro grupos, com base no seu mecanismo catalítico de ação. Os nomes dos grupos servem para indicar um dos importantes grupos catalíticos do sítio ativo. Os quatro grupos são: serina-proteases, tiol- ou cisteína-proteases, metalo-proteases e carboxil-proteases ou proteases ácidas.

2.3.1 – Serina-proteases

Estão incluídas neste grupo a quimotripsina (EC 3.4.21.1 e 3.4.21.2), a tripsina (EC 3.4.21.4), a elastase (EC 3.4.21.36), a trombina (EC 3.4.21.5), a subtilisina (EC 3.4.21.14), dentre outras, sendo todas endopeptidases, exibindo atividade catalítica na faixa de pH de 8 a 10 e sendo inibidas por DFP (di-isopropil-fluorofosfato), que se liga à hidroxila do resíduo serina do sítio ativo. Entretanto, possuem especificidades diferentes: quimotripsina tem especificidade por resíduos Tyr, Phe e Trp; tripsina por Lys e Arg; trombina por Lys e Arg, elastase por Ala e subtilisina por Tyr, Phe e Trp (Whitaker, 1994).

As serina-proteases também diferenciam entre si na seqüência de aminoácidos e em suas estruturas tridimensionais, porém apresentam em comum geometria do sítio ativo e mecanismo catalítico. Todas possuem Asp, His e Ser no sítio ativo (Beynon e Bond, 1989; Whitaker, 1994).

As enzimas deste grupo catalisam a hidrólise de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico sobre a ligação carbono-oxigênio assistida pela doação de um próton para o nitrogênio peptídico. Os resíduos de aminoácidos Asp, Ser e His atuam como nucleófilos e doadores de prótons. As serina-proteases dos mamíferos (quimotripsina tripsina e elastase) possuem a mesma seqüência próxima do resíduo Ser do sítio ativo (-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-), enquanto a subtilisina (serina-protease bacteriana) tem a seqüência -Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-. Além disso, os resíduos que formam a tríade catalítica dessas enzimas estão

localizados em posições diferentes na cadeia polipeptídica: Asp¹⁰², His⁵⁷ e Ser¹⁹⁵, para quimotripsina, tripsina e elastase, e Asp³², His⁶⁴ e Ser²²¹, para a subtilisina (Kennedy, 1987).

As serina-proteases podem ser obtidas a partir do pâncreas de animais, como por exemplo, a tripsina e quimotripsina, ou a partir de bactérias do gênero *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *licheniformis*, *subtilis*, dentre outros), como por exemplo, a subtilisina (Kennedy, 1987).

2.3.1.1 – Mecanismo catalítico das serina-proteases

O mecanismo catalítico das serina-proteases será representado pelo mecanismo proposto para a quimotripsina. A Figura 2.4 mostra a representação esquemática deste mecanismo de ação.

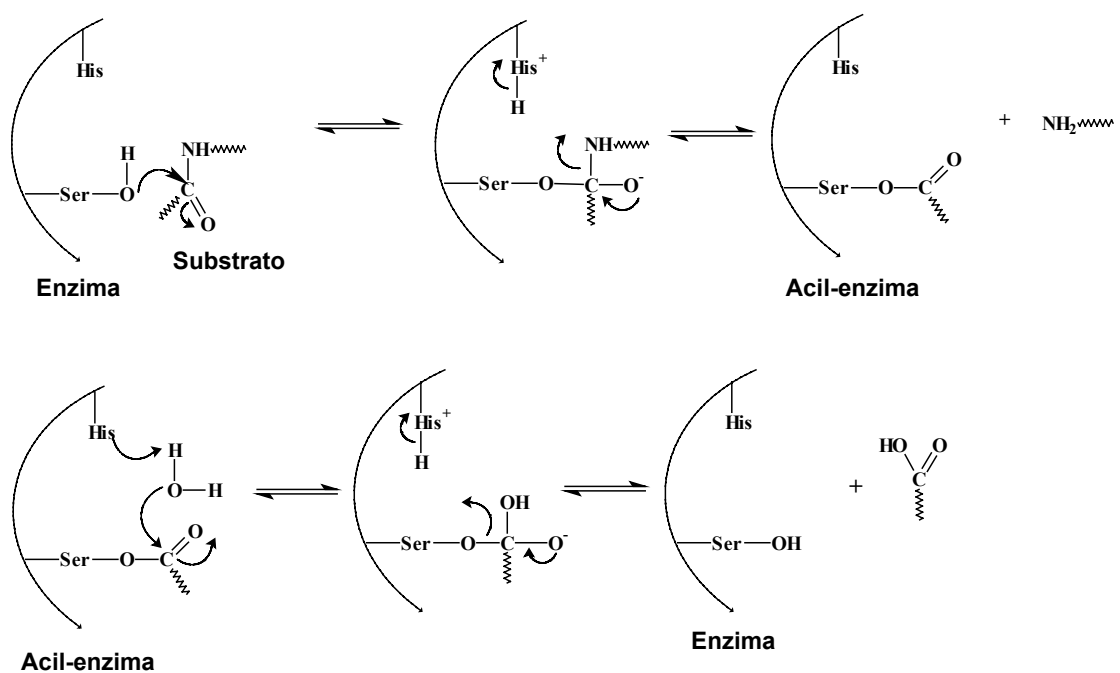


Figura 2.4 – Mecanismo catalítico da hidrólise de uma ligação peptídica de um substrato (proteína ou polipeptídeo) catalisada pela quimotripsina. A His⁵⁷ (desprotonada e protonada) participa de duas reações de substituição nucleofílica sucessivas: hidrólise da ligação peptídica do substrato com formação do complexo acil-enzima (fase de acilação) e liberação de um fragmento proteico; e hidrólise do complexo acil-enzima com regeneração da enzima (fase de deacilação) e liberação de outro fragmento proteico (Morrison e Boyd, 1990).

No mecanismo proposto, o substrato (polipeptídeo ou proteína) liga-se no sítio ativo da enzima. A ligação peptídica susceptível é posicionada próxima ao grupo hidroxila do resíduo Ser¹⁹⁵ pela ligação da cadeia lateral hidrofóbica do aminoácido adjacente (um resíduo de fenilalanina na Figura 2.5) em uma cavidade hidrofóbica da enzima. Há a formação de um intermediário covalente entre o grupo acil do substrato e a hidroxila do resíduo Ser¹⁹⁵. A hidroxila perde seu átomo de hidrogênio, o qual é fortemente atraído pelo nitrogênio do grupo imidazol da His⁵⁷. Forma-se, após, uma ligação éster entre o oxigênio da Ser¹⁹⁵ e o átomo de carbono do grupo acil do substrato, com a quebra da ligação peptídica. O primeiro produto (amino-terminal) deixa o sítio ativo com a permanência do complexo acil-enzima, conforme mostra a Figura 2.4.

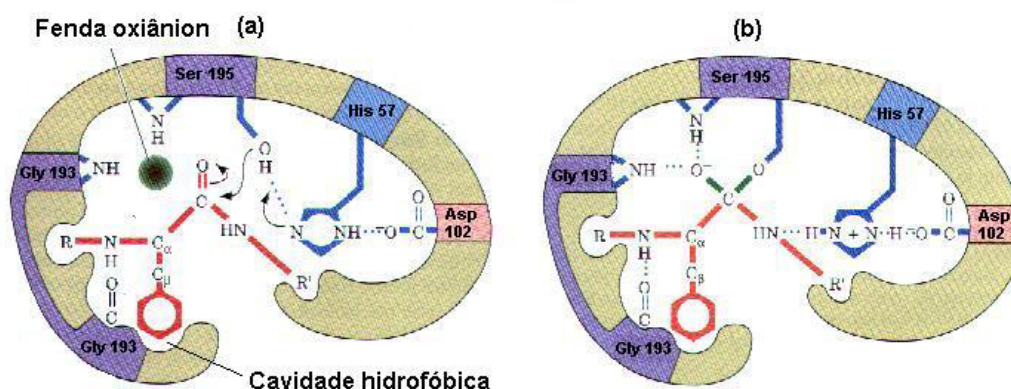


Figura 2.5 – (a) Grupos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima cataliticamente envolvidos na hidrólise de uma ligação peptídica; (b) intermediário tetraédrico enzima-substrato (Voet, 1995).

A ligação éster instável, comparada com a ligação peptídica, é hidrolisada, com a participação de uma molécula de água, e o segundo produto (carboxi-terminal) deixa o sítio ativo com a recuperação do átomo de hidrogênio pela Ser¹⁹⁵. O grupo imidazol da His⁵⁷ age como base geral, retirando um próton do grupo hidroxila da Ser¹⁹⁵ e a His⁵⁷ protonada age como um ácido, doando um próton para o grupo amino de saída. A função do grupo Asp¹⁰² (Figura 2.5) é aparentemente auxiliar a atração do átomo de hidrogênio da Ser¹⁹⁵ pelo grupo imidazol da His⁵⁷, estabilizando a carga positiva formada. Isto previne a formação de uma carga positiva muito instável na hidroxila da Ser¹⁹⁵ e aumenta sua nucleofilicidade. Nas fases de acilação e deacilação, o oxigênio carbonila do substrato adquire uma carga negativa no estado de transição. Esta carga é formada dentro de uma cavidade na enzima, chamada fenda

oxiânion (Figura 2.5a), e é estabilizada por ligações de hidrogênio aos nitrogênios amida da Gly¹⁹³ e da Ser¹⁹⁵ (Figura 2.5b). Assim, a menos da especificidade da enzima, regida pelo resíduo de posicionamento, a catálise de todas as serina-proteases é feita segundo esse mecanismo (Leningher, 1988; 1995).

Na subtilisina o resíduo Ser²²¹ do centro ativo localiza-se numa cavidade pouco profunda na superfície da enzima. Seu grupo OH posiciona-se consistentemente para a formação de uma ligação hidrogênio com o grupamento His⁶⁴. O grupamento carboxílico do resíduo Asp³² situa-se do outro lado da His⁶⁴ a uma distância relativa ao comprimento de uma ligação de hidrogênio. O arranjo estérico desses três resíduos concorda muito bem com o arranjo dos sítios ativos das proteases pancreáticas (Colowich e Kaplan, 1970).

2.3.1.2 – Alcalase®

Alcalase® é uma preparação enzimática comercial, produzida pela Novo Nordisk A/S, usada em formulações de detergentes para remover manchas a base de proteínas, como por exemplo, sangue e vários alimentos (ovos, molhos, etc). A Alcalase® hidrolisa proteínas (nas manchas) em peptídios que são facilmente dissolvidos ou dispersos no líquido de lavagem.

Segundo a Novo Nordisk, a Alcalase®, classificada como uma subtilisina (EC 3.4.21.62), é uma serina-protease, caracterizada pelo seu desempenho a altas temperaturas e moderada alcalinidade, e é produzida por fermentação submersa de um microorganismo não patogênico do gênero *Bacillus*. A preparação enzimática comercial é disponível na forma granular e líquida. Enzimas granuladas são tratadas com tiosulfato de sódio, quando na forma líquida, e revestidas com sulfato de sódio após granulação. As enzimas líquidas encontram-se diluídas em um meio composto por monopropilenoglicol ou glicerol (NOVO, 1994).

De acordo com Anwar e Saleemuddin, 1998, a Alcalase® é uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *Bacillus licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a subtilisina Carlsberg (formada por uma única cadeia polipeptídica com 274 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 27.274 Da).

Embora a Alcalase® venha sendo amplamente utilizada em várias aplicações biotecnológicas, sua especificidade não foi completamente caracterizada. Sabe-se que essa enzima hidrolisa principalmente ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico (Adler-Nissen, 1986). Adamson e Reynolds (1996) verificaram que, na hidrólise de caseína, a Alcalase® hidrolisava preferencialmente ligações peptídicas contendo resíduos

de Glu, Met, Leu, Tyr, Lys e Gln no lado carboxílico. Nitescu *et al.* (1996) verificaram que a Alcalase® hidrolisava eficientemente ésteres de α -L-aminoácidos (Ala, Phe e Leu) com o grupo amino bloqueado e que 60% (base mássica) de uma preparação comercial podia ser atribuída à subtilisina Carlsberg (massa molecular de 27.534 Da). Smyth e FitzGerald (1998) verificaram também especificidade desta enzima por resíduos de Tyr, Ala e Leu, por meio da hidrólise de substratos fluorogênicos. Kukman *et al.* (1995) hidrolisaram proteínas da soja com Alcalase® e verificaram que os peptídios formados tinham resíduos hidrofóbicos carboxi-terminais, entre eles Ser, His, Tyr, Gly, Val, Phe e Leu. Todos esses trabalhos mostram a ampla especificidade desta enzima, podendo ser utilizada eficientemente na produção de um preparado contendo pequenos peptídios a partir das proteínas do soro, por exemplo.

Em 1976, Boudrant e Cheftel determinaram a massa molecular da Alcalase® como sendo 43 kDa. No entanto, esta massa molecular parece ser um valor médio, pois como verificado por Tardioli *et al.* (2003b), a Alcalase® tem dois principais componentes enzimáticos, um em torno de 30 kDa e outro em torno de 60 kDa. A massa molecular do principal componente enzimático (aproximadamente 30 kDa) concorda bem com a massa molecular relatado para subtilisina Carlsberg (em torno de 27 kDa).

Como já discutido acima, as subtilisinas são serina-proteases obtidas a partir de linhagens de *Bacillus subtilis* ou bactérias correlatas. Sua nomenclatura tem sofrido várias alterações e isso tem causado muita confusão na literatura. Originariamente, o termo subtilisina foi sugerido como o nome de uma enzima produzida por uma linhagem de *Bacillus subtilis*, mas esse nome é também usado para proteases alcalinas, isoladas de *Bacillus subtilis* linhagem N' por Hagihara (1954), apud Colowich e Kaplan (1970), e para uma protease bacteriana isolada pela Novo Pharmaceutical Co. (Colowich e Kaplan, 1970).

A Tabela 2.4 mostra a nomenclatura dessas enzimas, sugerida por E. L. Smith (1968), apud Colowich e Kaplan (1970), e seus diferentes sinônimos. Essa nomenclatura sugere chamar a subtilisina original de *subtilisina Carlsberg*, a enzima isolada por Hagihara de *subtilisina BPN'* e a enzima isolada pela Novo de *subtilisina Novo*.

As subtilisinas são moléculas compactas e quase esféricas, com um diâmetro ao redor de 42 Å e com aproximadamente 30% da estrutura em α -hélice, distribuída em 8 segmentos. O interior da molécula é composto quase inteiramente por resíduos de aminoácidos com cadeias laterais hidrofóbicas.

As subtilisinas são desnaturadas a pH entre 1 e 2, enquanto ao redor do pH 4 uma mistura de enzima ativa e desnaturada dará origem à autólise. Em altos valores de pH (pH >

11), a estrutura da molécula de subtilisina também é desestabilizada. A subtilisina Carlsberg tem pH ótimo entre 8 e 9.

A subtilisina Carlsberg é inibida fortemente por fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e di-isopropil-fluorofosfato (DFP), os quais reagem com o grupamento serina²²¹ do sítio ativo. Também são inibidas por fenol, acetona, acetonitrila, ciclohexano, ciclohexanol e álcoois alifáticos (Colowich e Kaplan, 1970).

A subtilisina Carlsberg hidrolisa uma variedade de ésteres de α -L-aminoácidos (Tyr, Phe, Val, Arg, e outros), tendo maior especificidade por ésteres de aminoácidos aromáticos, como pode ser visto pela comparação dos parâmetros cinéticos da hidrólise dos ésteres metílicos de N-acetil-tirosina ($V_{\text{máx}}/K_M$ igual a 27.571) e de N-acetil valina ($V_{\text{máx}}/K_M$ igual a 121) (Colowich e Kaplan, 1970).

Tabela 2.4 – Sinônimos utilizados para as várias subtilisinas.

ENZIMA	SINÔNIMO	FABRICANTE
Subtilisina Carlsberg	Subtilisina Subtilisina A Subtilopeptidase A Alcalase Novo	Novo Pharmaceutical Co., Dinamarca
Subtilisina BPN'	Nagarase proteinase Nagarase BPN'	Nagarase & Co., Ltd., Japão
Subtilisina Novo	Subtilopeptidase C Proteinase bacteriana Novo Subtilisina B Subtilopeptidase B	Novo Pharmaceutical Co., Dinamarca

Fonte: Colowich e Kaplan, 1970

2.3.2 – Cisteína-proteases

Inclui-se neste grupo a papaína (EC 3.4.22.2), a ficina (EC 3.4.22.3), a bromelina (EC 3.4.22.4) e a enzima microbiana *Streptococcus* protease (Streptococcus cisteína protease, EC 3.4.22.10). A similaridade destas enzimas deve-se ao fato de todas serem inibidas por

reagentes sulfídricos e terem a mesma seqüência de aminoácidos ao redor dos resíduos de Cys e His do sítio ativo.

A papaína (obtida do mamão), a ficina (obtida do figo) e a bromelina (do abacaxi) têm em comum o fato de terem ampla faixa de pH ótimo (pH 6 a 7,5) e serem muito estáveis a temperaturas de 60 a 80°C e pH neutro. A papaína e a ficina hidrolisam com igual eficiência substratos contendo resíduos de lisina, arginina, glicina e citrulina¹ (Whitaker, 1994).

2.3.3 – Metalo-proteases

Dentro deste grupo estão as exopeptidases, encontradas nos tecidos de animais superiores e sendo todas inibidas por agentes quelantes, por conterem um íon metálico, no sítio ativo, participante do mecanismo catalítico. São também encontradas em bactérias e bolores e são mais ativas em pH neutro. Como exopeptidases que necessitam de Zn²⁺ tem-se a carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1), a carboxipeptidase B (EC 3.4.17.2), a glicil-glicina dipeptidase (3.4.13.11), a amino-acil-histidina hidrolase ou carnosinase (EC 3.4.13.3) e a citosol aminopeptidase (EC 3.4.11.1). Como aquelas que necessitam de Mn²⁺ tem-se a polidase (EC 3.4.13.9) e a iminodipeptidase (EC 3.4.13.8-9), com especificidade para resíduos de prolina carboxi- e amino-terminal, respectivamente (Kennedy, 1987; Whitaker, 1994).

A termolisina (EC 3.4.24.4) é uma metalo-endopeptidase com sítio ativo, especificidade e mecanismo catalítico muito similar aos da carboxipeptidase A. As collagenases e as proteases hemorrágicas de venenos de serpentes são também exemplos de metalo-endopeptidases.

2.3.3.1 – Carboxipeptidase A

A carboxipeptidase A (peptidil-L-aminoácido hidrolase, EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase produzida no pâncreas de animais superiores como um composto de três cadeias polipeptídicas (massa molecular de 80 kDa), que, por ativação com tripsina, produz a enzima com uma única cadeia polipeptídica, contendo 307 resíduos de aminoácidos e massa molecular aproximada de 34,5 kDa. Esta enzima possui regiões de α -hélice (38%) e de folha

¹ Intermediário na biossíntese da uréia.

pregueada β (17%). O pâncreas produz também outro zimogênio, que por ativação produz carboxipeptidase B. As duas enzimas são muito similares nos detalhes gerais do mecanismo catalítico: ambas requerem que o grupo carboxílico do resíduo carboxi-terminal seja livre e ambas possuem Zn^{2+} no sítio ativo, essencial para a atividade catalítica. Entretanto, possuem especificidades bem diferentes: carboxipeptidase B hidrolisa ligações peptídicas contendo arginina e lisina carboxi-terminais, enquanto carboxipeptidase A requer que os resíduos carboxi-terminais não sejam arginina, lisina ou prolina (Whitaker, 1994).

Carboxipeptidase A remove rapidamente os aminoácidos aromáticos carboxi-terminais Tyr, Phe e Trp (Amber, 1972; Barber e Fisher, 1992; Abeles *et al.*, 1992), mas também os aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos volumosos, tais como Leu, Ileu, Met, Thr, Gln, His, Ala e Val. Além desses, a carboxipeptidase A também remove lentamente Asn, Ser e Lys, e muito lentamente Gly, Asp e Glu (Amber, 1992).

Na carboxipeptidase A, o íon Zn^{2+} está coordenado com três resíduos de aminoácidos, His¹⁹⁶, His⁶⁹ e Glu⁷² (Figura 2.6), e uma molécula de água; entretanto, dependendo do tamanho e da natureza do substrato, este íon pode também interagir com Arg⁷¹, Tyr¹⁹⁸ e Phe²⁷⁹ (Whitaker, 1994; Stryer, 1992). O íon Zn^{2+} pode ser removido por fortes agentes quelantes, como por exemplo, EDTA e 1,10-fenantrolina, e substituído por Co^{2+} , Ni^{2+} ou Pb^{2+} . No entanto, a enzima não terá atividade igual à original (Whitaker, 1994).

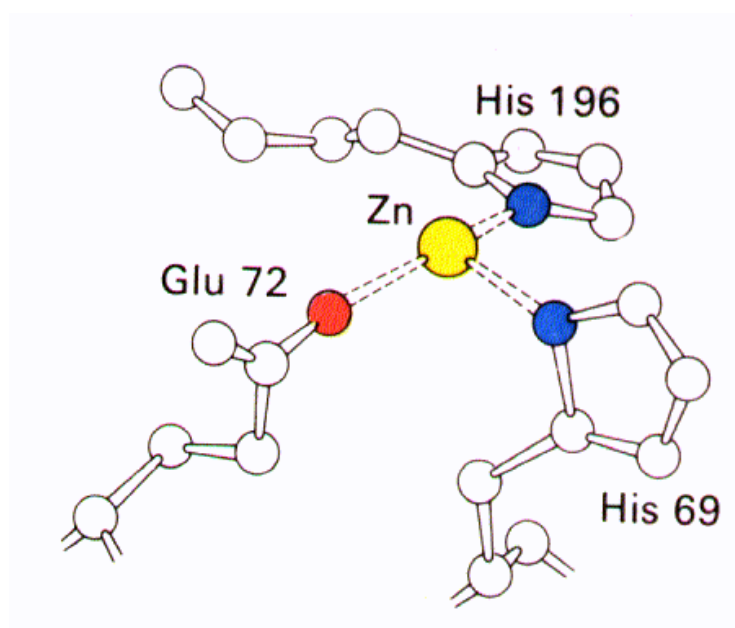


Figura 2.6 – Centro ativo da carboxipeptidase A, mostrando o íon zinco coordenado por duas cadeias de histidina e uma de glutamato (Stryer, 1992).

2.3.3.2 – Mecanismo catalítico da carboxipeptidase A

O mecanismo descrito abaixo trata-se de um compêndio feito a partir de informações dadas por Stryer (1992), Whitaker (1994) e Suckling (1985).

A cadeia lateral do resíduo carboxi-terminal a ser liberado liga-se a uma cavidade hidrofóbica expulsando moléculas de água (pelo menos quatro moléculas). Essa interação hidrofóbica é a base da preferência desta enzima por cadeias laterais aromáticas ou alifáticas volumosas. No caso da carboxipeptidase B, específica para lisina e arginina carboxi-terminais (resíduos polares), a cavidade hidrofóbica contém um resíduo aspartato.

O oxigênio carbonílico da ligação peptídica susceptível coordena-se com o íon zinco, que atua como um ácido de Lewis e polariza o grupo carbonila da ligação peptídica susceptível, facilitando o ataque no átomo de carbono polarizado pelo grupo carboxílico do Glu²⁷⁰, ou por uma molécula ativada de água. Uma polarização similar é obtida por diferentes meios nas serinas proteases (nas enzimas tripsina, quimotripsina e subtilisina o grupo carbonila é polarizado por ligações de hidrogênio estabelecidas entre grupos NH da enzima).

Grandes mudanças conformacionais ocorrem na etapa de ligação do substrato (Figura 2.7). O grupamento guanidina da Arg¹⁴⁵ move-se 2 Å para se ligar iônicamente ao grupo carboxilato terminal do substrato. O grupo hidroxila da Tyr²⁴⁸ move-se 12 Å (aproximadamente um quarto do diâmetro da molécula de enzima, a maior mudança conformacional observada), a partir da superfície da molécula, para formar uma ligação de hidrogênio com o NH da ligação peptídica susceptível e uma ligação com o NH da penúltima ligação peptídica. Uma importante consequência deste movimento é o fechamento da cavidade do sítio ativo, expulsando a água, e por último, o movimento de 2 Å do grupo carboxilado do Glu²⁷⁰.

O Glu²⁷⁰ forma um anidrido com o átomo de carbono polarizado ($C^{\delta+} \dots O^{\delta-} \dots Zn^{2+}$) da ligação peptídica susceptível (ou o Glu²⁷⁰ promove o ataque de uma molécula de água sobre esse átomo de carbono polarizado). A carga negativa do átomo de oxigênio no intermediário tetraédrico é estabilizada por uma interação eletrostática com a cadeia lateral, carregada positivamente, da Arg¹²⁷, que se moveu para uma posição estratégica próxima. O substrato ligado é envolvido por todos os lados pelos grupamentos catalíticos da enzima (Zn^{2+} , Glu²⁷⁰, Arg¹²⁷, Arg¹⁴⁵, Tyr²⁴⁸). O intermediário anidrido carboxílico formado torna a ligação cindível pronta para o ataque por uma molécula de água que está ligada ao Zn^{2+} . A

molécula de água altamente polarizada transfere um próton para o grupamento NH, quebrando a ligação cindível (Figura 2.8).

A cadeia polipeptídica remanescente deixa o sítio ativo, as mudanças conformacionais são revertidas e o resíduo carboxi-terminal deixa a cavidade hidrofóbica, permitindo a reentrada das moléculas de água.

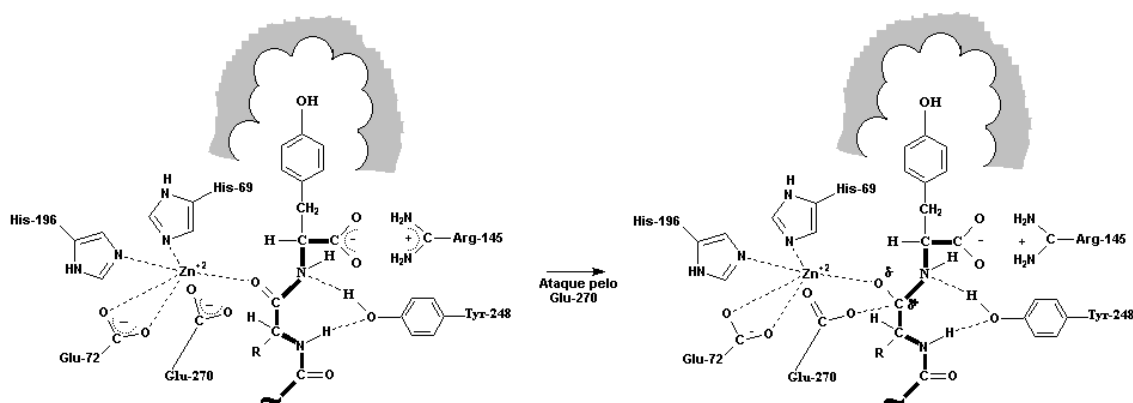


Figura 2.7 – Complexo enzima-substrato (CPA-peptídio com Tyr carboxi-terminal), mostrando as interações entre os resíduos do sítio ativo da enzima e o substrato a ser clivado (Suckling, 1985).

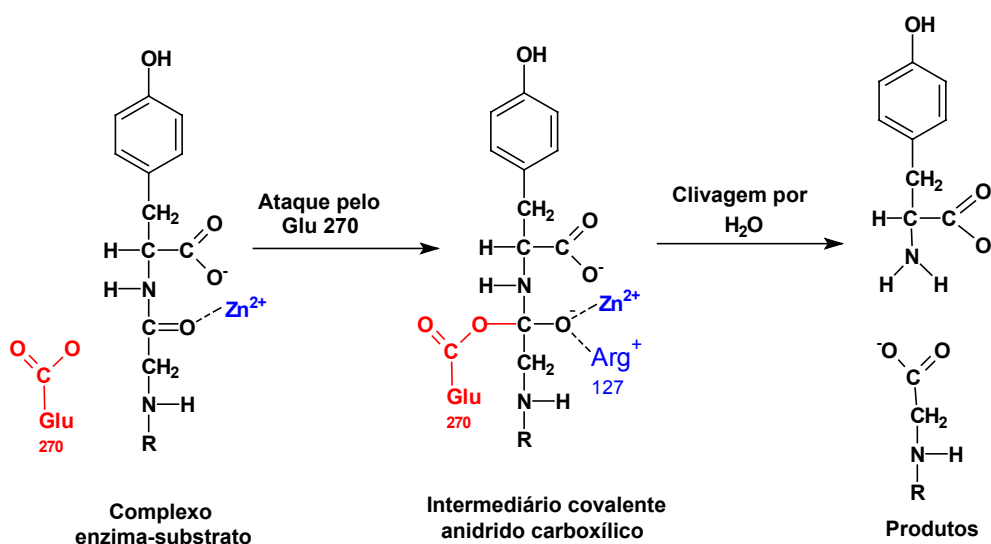


Figura 2.8 – Representação esquemática do mecanismo catalítico proposto para a carboxipeptidase A. O Glu²⁷⁰ ataca o carbono da carbonila da ligação cindível, formando um intermediário covalente anidrido misto (Stryer, 1992).

2.3.4 – Carboxil-proteases (proteases ácidas)

As proteases ácidas são representadas pelas enzimas do estômago de animais superiores, como por exemplo, a pepsina e a renina, mas também podem ser encontradas em fungos, tais como *Endothia parasítica*, *Mucor pusillus* e *M. miehei*, sendo boas substitutas da renina.

As enzimas deste grupo possuem atividade ótima em pH ácido (entre 2 e 4), utilizam o grupo carboxílico de dois resíduos de ácido aspártico do sítio ativo no mecanismo catalítico e são todas inibidas por pepstatina (Whitaker, 1994; Kennedy, 1987). A enzima mais estudada deste grupo é a pepsina e a mais importante comercialmente é a renina, pois é utilizada na produção de queijo (Whitaker, 1994).

2.4 – Estabilização de Enzimas

As enzimas por atuarem sob condições suaves e por serem estruturas altamente complexas e, geralmente, frágeis, sob condições adversas podem inativar-se, ou seja, perderem sua capacidade de catalisar reações.

Uma enzima pode desnaturar-se (perder totalmente sua estrutura terciária) em resposta a uma série de fatores, tais como calor, valores extremos de pH, solventes orgânicos miscíveis (por exemplo, álcool e acetona), uréia, agentes quelantes, alta concentração de sais e detergentes (Gupta, 1991; Volkin e Klibanov, 1989).

A primeira etapa no processo de inativação de quase todas as enzimas é o desdobramento da cadeia polipeptídica (desnaturação), o qual é um processo reversível. A segunda fase da inativação (processo irreversível) deve-se a uma série de processos, como por exemplo: agregação, instabilidade de ligações dissulfeto, hidrólise de ligações peptídicas, deaminação de resíduos asparagina e glutamina, racemização de resíduos de aminoácidos, reação de Maillard, dissociação de grupos prostéticos, e outros (Gupta, 1991; Mozhaev, 1993).

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para aumentar a estabilidade térmica das enzimas, tais como, uso de aditivos estabilizantes (por exemplo, substratos, açúcares, polióis²,

²Compostos que contêm dois ou mais grupos –OH ligados a átomos de carbono adjacentes, por exemplo, glicerol.

sais e polímeros hidrofílicos³); modificação química na estrutura da proteína; entrecruzamento com reagentes bifuncionais; imobilização em suportes sólidos; engenharia genética, dentre outras (Gupta, 1991; Klibanov, 1983). A grande preocupação com a estabilização térmica deve-se a uma série de vantagens que podem ser obtidas usando altas temperaturas em reações enzimáticas, por exemplo, taxas de conversões mais altas, redução de contaminação microbiana, aumento da solubilidade de substratos, redução da viscosidade, dentre outras (Gupta, 1991).

A imobilização em suportes sólidos insolúveis é uma das estratégias de estabilização (térmica e ao pH) de enzimas mais investigada, pois outras vantagens advêm atreladas a ela, por exemplo, uso contínuo e repetido da atividade catalítica, facilidade de separação do produto final, redução do volume de reação (alta concentração de enzima em menor volume de reator) e facilidade de controle do processo. Todas essas vantagens tornam a tecnologia de imobilização de enzimas atrativa para fins industriais.

2.5 – Imobilização de Enzimas em Suportes Sólidos por Ligação Covalente

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetidas e continuamente. O termo enzimas imobilizadas inclui enzimas modificadas para torná-las insolúveis em água; enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membranas de ultrafiltração não permeáveis, as quais retêm as moléculas de enzima no reator; e enzimas cujas moléculas foram ligadas à outra macromolécula, sendo o derivado resultante solúvel em água (Kennedy, 1987).

Quanto à obtenção de enzimas insolúveis, os métodos de imobilização são classificados em: ligação cruzada intermolecular (enzima-enzima); ligação a um suporte sólido insolúvel por adsorção, ligação iônica, covalente ou metálica; e enredamento em fibras, géis poliméricos ou microcápsulas (Kennedy, 1987).

Dentre os diferentes métodos existentes, a imobilização da enzima por ligação covalente a um suporte sólido é o método mais empregado na preparação de enzimas insolúveis, pois, quando a imobilização é bem sucedida obtém-se uma enzima imobilizada com alta estabilidade devido à forte ligação resultante, e neste caso, é difícil haver eluição da enzima do suporte, mesmo na presença de alta força iônica (Kennedy, 1987).

³ São exemplos, as dextranas e os polietileno glicóis (PEG).

Na ligação covalente, depende dos grupos ativos (ligantes) disponíveis no suporte, este se liga quimicamente a grupos funcionais específicos da enzima, tais como: aminos terminais ou de resíduos de lisinas; carboxílicos de ácidos aspárticos e ácidos glutâmicos; fenólico de tirosinas; tiol de cisteínas; hidroxil de serinas, tirosinas e treoninas; imidazol de histidinas; e indol de triptofanos (Kennedy, 1987).

Poucos suportes possuem grupos reativos para permitir o acoplamento direto enzima-suporte, necessitando, na maioria das vezes, de ativação. A ativação do grupo ligante é freqüentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima. A Figura 2.9 mostra esquematicamente a ligação de uma enzima a um suporte ativado.

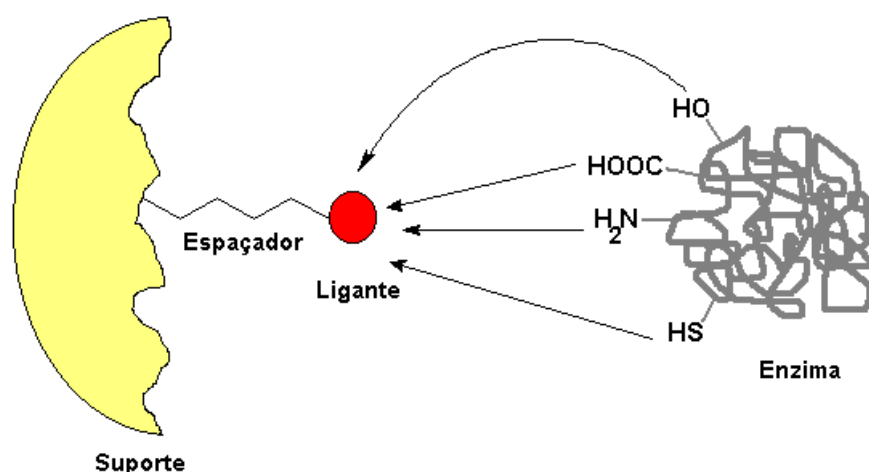


Figura 2.9 - Representação esquemática da ligação de uma enzima a um suporte sólido ativado.

2.5.1 – Suportes

Há uma gama imensa de suportes sólidos insolúveis, orgânicos (por exemplo, agarose e poliacrilamida) e inorgânicos (por exemplo, alumina, sílica e vidro de porosidade controlada). Os preferidos são aqueles altamente porosos, regeneráveis, resistentes à agitação mecânica, ao ataque microbiológico e à compactação (Kennedy, 1987). Suportes sólidos porosos têm grande área superficial disponível à imobilização, entretanto, há de se atentar

para que o diâmetro dos poros seja suficientemente grande para facilitar a transferência de massa intrapartícula (Kennedy, 1987).

Embora haja referências que para o processamento industrial os suportes inorgânicos tenham muitas vantagens sobre os suportes orgânicos (alta resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência ao ataque microbiano e de solventes orgânicos e fácil regenerabilidade) muitas das enzimas imobilizadas comercialmente disponíveis são obtidas com suportes orgânicos, devido a sua alta reatividade. Isto deve-se à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem contactar com esse tipo de suporte. Além disso, a superfície dos suportes inorgânicos exibem, em solução, grupos hidroxílicos que somente podem interagir com grupos amino ou carboxílicos das enzimas por meio de adsorção física ou ligação iônica. Para ligar os suportes inorgânicos covalentemente às enzimas há a necessidade de que estes suportes sejam ativados e somente por poucas técnicas.

Os suportes orgânicos são classificados como polímeros naturais (polissacarídeos e proteínas) ou polímeros sintéticos (poliacrilamidas, poliestireno, poliamidas, dentre outros), tendo características hidrofílicas ou hidrofóbicas. Os polissacarídeos (celulose, agarose, quitosana, dentre outros) são os polímeros mais utilizados como suportes. Os grupos hidroxílicos desses polímeros naturais podem ser ativados pela introdução de grupos eletrofílicos, que reagem posteriormente com a enzima. A maior vantagem dos derivados de polissacarídeos para a imobilização é a presença de grupos hidroxílicos residuais, os quais protegem a enzima ligada (Kennedy, 1987).

2.5.2 – Métodos de ativação do suporte

Métodos de ativação, preferencialmente realizada no suporte, tem por objetivo introduzir grupos reativos na superfície do suporte capazes de reagirem com os grupos reativos da enzima. As ativações mais usuais são feitas com brometo de cianogênio, reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos (por exemplo, dioxirano) ou aldeídos (por exemplo, glutaraldeído).

A ativação com brometo de cianogênio forma grupos imidocarbonatos cíclicos que irão reagir com grupos aminos da enzima (principalmente grupos ϵ -aminos de lisinas e α -aminos terminais), por meio de ligações isouréia. As desvantagens deste método são: instabilidade do imidocarbonato cíclico (deve reagir imediatamente com a enzima, não permitindo estocagem); toxicidade do brometo de cianogênio; possibilidade de adsorções

inespecíficas no suporte ativado; e o fato que os ligantes não possuem braço espaçador, podendo ocasionar grave impedimento estérico enzima-substrato (Kennedy, 1987).

Suportes ativados com grupos epóxidos, embora sejam capazes de reagir com distintos grupos da enzima, possuem baixa reatividade, requerendo longos tempos de imobilização, grande excesso de enzima e condições drásticas de reação para favorecer o acoplamento enzima-suporte, como por exemplo, alta força iônica. Suportes epóxidos podem ter sua reatividade melhorada por modificação parcial dos grupos epóxidos com etilenodiamina e ácido iminodiacético, por exemplo. Os grupos epóxidos modificados favorecem a adsorção prévia da enzima, que depois irá reagir covalentemente com os grupos epóxidos não modificados do suporte (Mateo *et al.*, 2000).

A ativação com glutaraldeído forma grupos aldeídos no suporte ativado que irão reagir com grupos aminos da enzima por meio de ligações covalentes instáveis (bases de Schiff). Embora seja o método de ativação mais utilizado em imobilizações de enzimas, ele apresenta alguns problemas, tais como: moléculas de enzima podem ser imobilizadas neste tipo de suporte com diferentes orientações, tornando o sítio ativo de algumas delas inacessível para grandes substratos (Tardioli *et al.*, 2003 a e b); podem ser formadas múltiplas camadas de enzima e/ou aglomerações excessivas das moléculas no interior dos poros, dificultando o acesso ao sítio ativo (Sobral *et al.*, 2002 e 2003); produzem derivados que são poucas vezes mais estáveis que a enzima solúvel; e a alta reatividade e instabilidade dos grupos reativos requerem rápido contato com a enzima, não permitindo estocagem prolongada do suporte ativado.

A ativação do suporte com grupos aldeídos usando glicidol (2,3-epoxi-propanol) como reagente bifuncional, vem sendo amplamente usado desde 1987. Este método de ativação gera aldeídos alifáticos altamente estáveis, permitindo que o suporte ativado seja estocado por tempo prolongado (1 ano a 4°C), e reaja, em pH alcalino, com grupos aminos desprotonados dos resíduos de lisinas da molécula de enzima, possibilitando a formação de várias ligações covalentes enzima-suporte. Os grupos aldeídos ativos (glioxil) por estarem moderadamente afastados da superfície do suporte (braço espaçador curto), tornam a molécula de enzima imobilizada muito mais rígida e, por conseguinte, muito mais resistente à inativação induzida por altas temperaturas, solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes (Guisán, 1988). Uma das grandes vantagens em se utilizar suportes ativados com grupos glioxil na imobilização de enzimas, é que as ligações entre os grupos aminos da enzima e os grupos aldeídos do suporte provocam uma mínima distorção da estrutura tridimensional da proteína, rendendo derivados com alta retenção da atividade catalítica (Guisán, 1988).

2.6 – Imobilização multipontual em gel de agarose

A ligação de uma molécula de enzima a um suporte sólido por meio de várias ligações químicas fortes torna a estrutura terciária da molécula de enzima mais rígida e, portanto, mais resistente ao desdobramento. Assim, a enzima quimicamente ligada ao suporte, comparada à enzima solúvel, será mais resistente à inativação térmica (Klibanov, 1983; Mozhaev *et al.*, 1990).

O desenvolvido prático desta idéia pode ser obtido por dois métodos: imobilização por copolimerização e imobilização em suportes sólidos pré-existentes.

Na copolimerização, grupos funcionais da enzima (por exemplo, lisinas) são modificados com um monômero análogo ao que será usado na polimerização (por exemplo, acroleína ou cloreto de acrilóil). A enzima modificada é então copolimerizada com um monômero (por exemplo, acrilamida ou ácido metacrílico) na presença de agente de entrecruzamento. Forma-se uma rede polimérica e as moléculas de enzima são covalentemente imobilizadas nos espaços intersticiais da rede. Neste método, forma-se ao redor das moléculas de enzima um suporte com superfície complementar à da enzima, possibilitando a formação de um grande número de ligações covalentes enzima-suporte e, portanto, rendendo enzimas imobilizadas altamente estabilizadas (Mozhaev *et al.*, 1983; Klibanov, 1983).

Embora a imobilização por copolimerização produza derivados altamente estabilizados, a imobilização multipontual em suporte sólidos pré-existentes é mais vantajosa, pois não há necessidade de prévia modificação da enzima solúvel, o processo de imobilização pode ser facilmente controlado, os derivados apresentam menores problemas difusionais, e há a possibilidade de se usar suportes rígidos e resistentes (Guisán, 1988). Para que o método seja bem sucedido, tem-se que escolher um sistema de imobilização que permita uma boa congruência geométrica entre a enzima e o suporte, tal que a conexão entre as duas estruturas seja suficiente para render ligações covalentes multipontuais.

Guisán (1988) propôs um sistema de imobilização onde a enzima, através de seus grupos aminos, liga-se a uma densa monocamada de grupos aldeídos alifáticos e lineares (glioxil) moderadamente afastados da superfície do suporte (braço espaçador curto). Guisán (1988) verificou que com a utilização de géis glioxil-agarose ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHO}$), mesmo sendo as superfícies da enzima e do suporte não complementares, a conexão entre as duas estruturas possibilitava uma intensa multi-interação enzima-suporte, sem distorção da

estrutura da enzima, devido à ausência de impedimentos estéricos para a reação química amino-aldeído, produzindo-se assim derivados rígidos e altamente estáveis.

As várias razões para se escolher grupos aminos das enzimas (ϵ -NH₂ dos resíduos de lisinas e NH₂ terminal) para ligação multipontual em suportes ativado deve-se ao fato de muitas das proteínas apresentarem resíduos de lisinas que não estão envolvidos no sítio catalítico; os grupos aminos serem polares e estarem normalmente expostos ao meio e os grupos aminos, quando desprotonados, em pH alcalino, serem muito reativos, sem prévia ativação, agindo como nucleófilos contra os átomos de carbono com carga parcialmente positiva localizados sobre a superfície do suporte, como mostra a Figura 2.10 (Guisán, 1988; Guisán *et al.*, 1993).

As bases instáveis de Schiff (-CH=N-) podem ser reduzidas a amins secundárias estáveis e os grupos aldeídos remanescentes podem ser convertidos em grupos hidroxílicos inertes, por meio de redução com borohidreto de sódio. Com isso, o processo de multi-interação amino-aldeído pode ser interrompido num estágio adequado, pela adição desse agente redutor (Guisán, 1988).

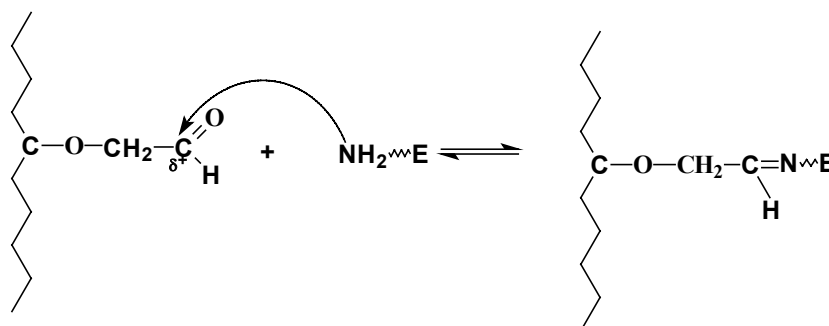


Figura 2.10 - Reação enzima (amino)-suporte (aldeído) - formação da base de Schiff.

Usando o sistema para imobilização e estabilização de enzimas (Figura 2.11) proposto por Guisán (1988) e controlando as variáveis que definem a intensidade das multi-interações enzima (amino) – suporte (aldeído), a saber: densidade superficial dos grupos aldeído no suporte ativado, tempo de contato enzima insolubilizada-suporte ativado, temperatura e pH, é possível preparar derivados com alta retenção de atividade e alta estabilidade térmica (Guisán, 1988; Guisán e Blanco, 1987; Blanco e Guisán, 1988; Blanco e Guisán, 1989; Blanco *et al.*, 1989; Guisán *et al.*, 1991; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995; Pedroche *et al.*, 2002; Tardioli *et al.*, 2003a e b; Toogood *et al.*, 2002; Ichikawa *et al.*, 2002).

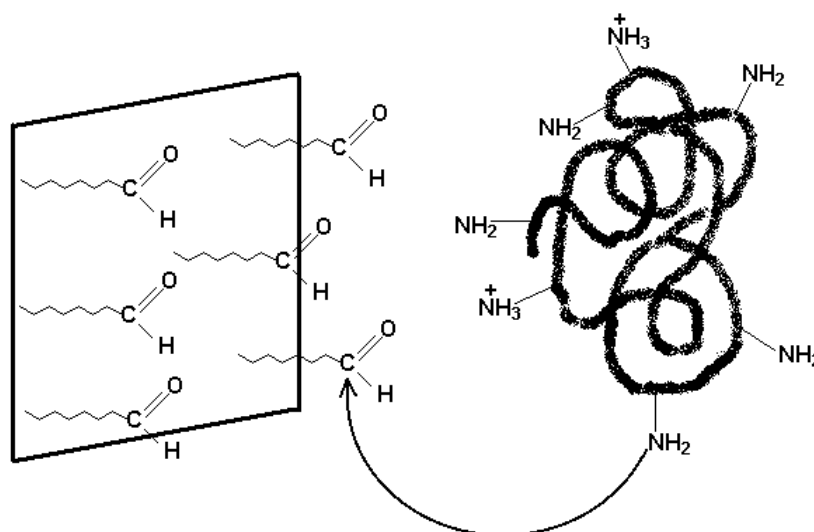


Figura 2.11 - Sistema imobilização-estabilização. A ligação covalente ocorre entre grupos aminos de resíduos de lisina da molécula de enzima e grupos aldeídos alifáticos moderadamente afastados da superfície do suporte. A conexão enzima-suporte é do tipo proteína-superfície plana (Guisán *et al.*, 1993).

A densidade dos grupos aldeídos na superfície do suporte irá determinar as possibilidades de alinhamentos corretos entre os grupos aminos da enzima e os grupos aldeído do suporte. Quanto maior a densidade de grupos aldeídos maior a possibilidade de formação de novas ligações amino-aldeído.

O tempo de contato entre a enzima e o suporte deve ser prolongado caso se deseje maior estabilização da enzima, pois a formação de novas ligações entre a enzima já imobilizada e o suporte ativado (reações intramoleculares entre duas estruturas quimicamente ligadas) é muito mais lenta que a formação da primeira ligação entre a enzima solúvel e o suporte ativado (reação intermolecular amino-aldeído). Isto deve-se ao fato dos grupos reativos remanescentes da enzima e do suporte não estarem corretamente alinhados logo após a formação da primeira ligação, sendo, portanto, o alinhamento entre os grupos reativos a etapa controladora do processo de multi-interação enzima-suporte.

O pH irá definir a densidade superficial de grupos aminos livres na superfície da enzima. Quanto mais alcalino o meio, maior a densidade de grupos aminos desprotonados.

A temperatura é um outro fator muito importante. O seu aumento provoca um aumento nos movimentos vibracionais da molécula de proteína, tornando-a mais flexível e assim possibilitando novos alinhamentos corretos amino-aldeído, após a formação das primeiras

ligações enzima-suporte. Além disso, com o aumento da temperatura há também aumento na taxa de reação, aumentando-se assim o rendimento da reação amino-aldeído. No entanto, deve haver um cuidado especial para que não haja desnaturação térmica da proteína (Guisán, 1988; Blanco e Guisán, 1988; Blanco *et al.*, 1989).

A Figura 2.12 mostra as reações envolvidas na ativação do gel de agarose com grupos aldeídos alifáticos e lineares (gloxil-agarose). A primeira etapa da ativação do suporte envolve a eterificação da agarose com glicidol (2,3 – epoxi-propanol), produzindo géis gliceril-agarose. A segunda etapa envolve a oxidação dos grupos gliceril com periodato de sódio, produzindo géis gloxil-agarose. A ativação global (eterificação e oxidação) deve ser realizada sob condições suaves, para se obter géis de agarose intactos, contendo monocamadas de grupos aldeídos idênticos (Guisán, 1988).

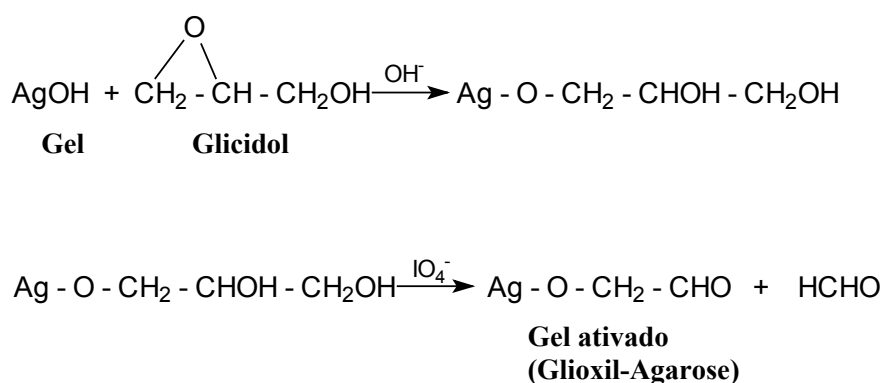


Figura 2.12 – Reações envolvidas na obtenção do gel gloxil-agarose (Guisán, 1988).

A presença de inibidores competitivos durante os processos de imobilização-estabilização e redução com borohidreto de sódio pode preservar a enzima totalmente ativa (Blanco e Guisán, 1988; Tardioli *et al.*, 2003a). A presença de inibidor competitivo durante o processo de insolubilização-estabilização reduz as possibilidades globais de multi-interação entre a enzima e o suporte, obtendo-se assim derivados mais ativos, porém menos estáveis do que derivados preparados na ausência de inibidor (Blanco e Guisán, 1988).

Resumidamente, as principais características do sistema para imobilização e estabilização de enzimas proposto por Guisán (1988) são: intensa congruência geométrica entre enzima e suporte; ausência de impedimentos estéricos para a reação química entre grupos aldeídos alifáticos e lineares moderadamente afastados da superfície do suporte e grupos aminos desprotonados da enzima, possibilitando que a multi-interação entre as duas

estruturas rígidas (enzima e suporte) seja intensa; alta estabilidade dos grupos aldeídos, permitindo prolongados tempos de reação (inclusive em meio alcalino) entre suportes com alta densidade de grupos ativos e enzimas com alta densidade de grupos aminos desprotonados e, armazenamento por tempo prolongado (1 ano a 4°C); ligação uni-pontual amino-aldeído rápida e reversível; mínima modificação química da superfície da enzima (grupos aminos primários são convertidos em secundários, com mesma estrutura química, hidrofobicidade e valor de pK) (Guisán *et al.*, 1997).

2.7- Agarose

Agarose, obtida a partir do ágar isolado de certas algas marinhas, é um polímero de galactose, cujas unidades básicas são cadeias de agarobiose (Figura 2.13), onde se alternam estruturas de β -D-galactopirranose e 3,6-anidro- α -L-galactopirranose, unidas por ligações 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 3.....e assim sucessivamente. As unidades básicas de agarobiose se repetem formando cadeias com aproximadamente 400 unidades⁴ de agarobiose (massa molecular em torno de 120.000 Da) (Kennedy, 1987)

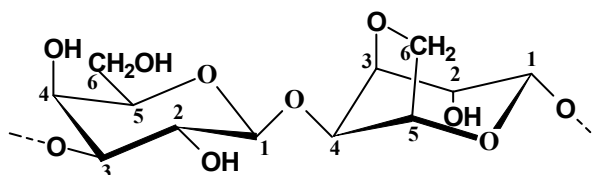


Figura 2.13 – Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose (Kennedy, 1987).

Na gelificação, as cadeias de agarobiose, que em solução estão em forma de espiral desordenada, adquirem a forma de dupla hélice (Figura 2.14a), que por sua vez agregam-se para formar uma estrutura tridimensional de tubos helicoidais capazes de reter líquidos. A capacidade de gelificação deve-se a formação de pontes de hidrogênio. A agarose quando gelificada forma géis com um estrutura altamente porosa (Figura 2.14b) e com grande área superficial (por exemplo, a agarose 6% tem uma área superficial de 25 m²/mL de gel e a agarose 10% uma área de 66 m²/mL de gel) (Guisán e Blanco, 1987; Pedroche *et al.*, 2002).

⁴ Fonte: ABT – Agarose Bead Technologies, ><http://www.abtbeads.com/support/html><.

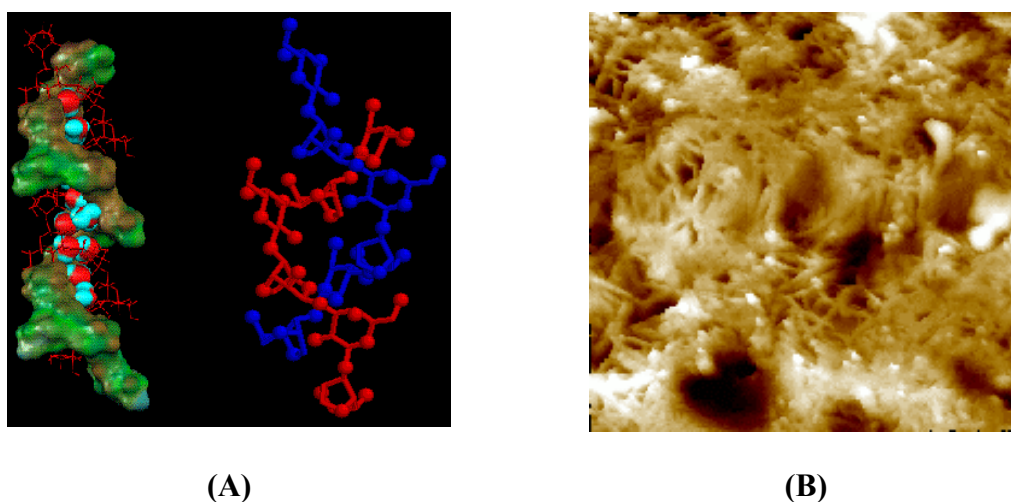


Figura 2.14 – (A) Estrutura em dupla hélice das cadeias de agarobiose e (B) estrutura porosa da agarose gelificada.

Dentre as vantagens dos géis de agarose estão: alta estabilidade mecânica; poros maiores do que os de outros géis (tipicamente entre 100 e 300 nm de diâmetro); resistência à degradação microbiana; transparência ótica, tanto nas regiões de espectro visível e ultravioleta, permitindo quantificação por espectrofotometria; fácil ativação e derivatização; ausência de toxicidade e fácil dissolução aquosa. Contudo, apresentam algumas desvantagens, como por exemplo, não poderem ser esterilizados; se desintegram em soluções fortemente alcalinas e solventes orgânicos; e terem que ser estocados na forma úmida por encolherem irreversivelmente quando secos. Suas propriedades mecânicas e sua resistência química podem ser melhoradas através de ligação cruzada entre as cadeias com reagentes bifuncionais, tais como 2,3-dibromopropanol, 3,3-dibromopropanal e 1-cloro-2,3-epoxipropano (epicloridrina), que elimina muito dessas desvantagens. No entanto, dependendo do grau de entrecruzamento há uma diminuição no tamanho dos poros (Kennedy, 1987; Stanford e Baird, 1983; Griess *et al.*, 1989).

Usando a técnica de ativação proposta por Guisán, 1988, é possível obter agarose altamente ativada com grupos aldeídos, por exemplo, suportes com 75 e 220 μmoles de grupos aldeídos por mililitro de gel, respectivamente usando-se agarose 6% e 10%. Isso equivale a uma densidade superficial de grupos aldeídos, calculada utilizando-se a equação 2.1, de 18 e 20 resíduos por 1000 \AA^2 de área superficial, respectivamente para agarose 6% ativada com 75 μmoles de grupos aldeídos por mililitro de gel e agarose 10% ativada com 220

µmoles de grupos aldeídos por mililitro de gel. Essas condições são favoráveis à formação de várias ligações covalentes entre os grupos aldeídos do suporte e os grupos aminos da enzima. Por exemplo, no caso da enzima carboxipeptidase A o raio de Stokes da molécula é de aproximadamente 27 Å, assim, a área superficial ($4\pi R^2$) total da molécula é de 9.161 Å². Como somente 10% da área total (aproximadamente 900 Å²) consegue contactar com o suporte, poderiam ser estabelecidas até 16 ou 18 ligações (calculadas utilizando-se a equação 2.2) entre uma molécula de enzima e o suporte ativado (glioxil-agarose 6% ou 10%), o que pode influenciar muito positivamente na estabilização da estrutura tridimensional da molécula de enzima, tornando-a muito resistente à inativação induzida por calor, extremos de pH e agentes químicos.

$$D_s = 6,02 \times \frac{C_{GA}}{A_s} \quad (2.1)$$

onde D_s é a densidade superficial de grupos aldeídos no suporte ativado, expressa em N° resíduos/1000 Å; C_{GA} é a concentração de grupos aldeídos no suporte ativado, expressa em µmoles/mL de gel; A_s é área superficial total do gel de agarose, expressa em m²/mL de gel.

$$L_{AA} = D_s \times A_{SC} \quad (2.2)$$

onde L_{AA} é o número máximo de ligações que podem ser formadas entre uma molécula de enzima e o suporte ativado; A_{SC} é a área superficial de contato entre uma molécula de enzima e o suporte ativado, expressa em Å.

2.8 – Imobilização de Carboxipeptidase A e Alcalase®

Pouquíssimos trabalhos são encontrados na literatura com respeito à imobilização tanto de carboxipeptidase A como Alcalase® e, na quase totalidade, baixas estabilizações, em relação à enzima solúvel, foram obtidas.

Dua *et al.* (1985) imobilizaram carboxipeptidase A, do pâncreas caprino, em copolímero estireno-anidrido maléico (contendo grupos carboxílicos) ativado com diferentes reagentes bifuncionais (glutaraldeído, diazônio e diazônio reduzido), a uma temperatura entre 0 e 4°C, diferentes valores de pH (de 4 a 10) e por diferentes tempos de contato enzima-

suporte (4 a 12 horas). Os derivados de CPA retiveram de 60 a 70% da atividade catalítica inicial e eram de 8 a 10 vezes mais estáveis que a enzima solúvel, a 60°C, pH 6.

Kumar *et al.* (1986) imobilizaram CPA, do pâncreas caprino, em celulose ativada com grupos cloretos de acila, a 2°C, pH 6,5 e 6 horas de reação. O derivado produzido reteve 60% da atividade inicial e era aproximadamente 8 vezes mais estável que a enzima solúvel, a 50°C, pH 6,5.

Vertési *et al.* (1999) imobilizaram CPA, do pâncreas bovino, em Akrilex C (polímero de poliacrilamida contendo grupos carboxílicos) ativado com carbodiimida. A enzima imobilizada a 4°C, pH 6 e 24 horas de reação era aproximadamente 4 vezes mais estável que a enzima solúvel, a 50°C, pH 7,5.

Pedroche *et al.* (2002) imobilizaram CPA (adquirida da Serva, Alemanha), em agarose ativada com grupos aldeídos (glicoxil-agarose-10%) a 25°C, pH 10 e 3 horas de reação. O derivado CPA-glicoxil agarose reteve aproximadamente 55% da atividade inicial e era aproximadamente 1000 vezes mais estável que a enzima solúvel. Curiosamente, Pedroche *et al.* não observaram perdas de atividade durante o processo de redução com borohidreto de sódio e nenhuma inibição da enzima por tampão fosfato, observada por Tardioli *et al.* (2003a) e Whitaker *et al.* (1966) para a carboxipeptidase A do pâncreas bovino. Além disso, o tempo de meia-vida a 50°C (pH 7,6) era aproximadamente 4 vezes superior ao que se tem observado para a enzima obtida a partir do pâncreas bovino (15 a 20 minutos). Essas diferenças sugerem que a enzima estudada por Pedroche *et al.* era, provavelmente, originária de outra fonte ou de alguma forma estabilizada pelo fabricante.

Boudrant e Cheftel (1976) estabilizaram Alcalase® por ligação cruzada intermolecular, usando glutaraldeído com reagente bifuncional, a 4°C, pH 7,5 e 12 horas de reação. A hidrólise de caseína, a 40°C, em um reator contínuo equipado com membrana de ultrafiltração, mostrou que enquanto a enzima solúvel perdia 16% da atividade inicial por autólise e 52% por inativação térmica, a enzima insolubilizada perdia somente 8% da atividade inicial por inativação térmica, não sendo observada perda de atividade por autólise. Experimentos de longa duração mostraram que a enzima entrecruzada com glutaraldeído era aproximadamente 5 vezes mais estável que a enzima solúvel.

Shui-Tein *et al.* (1992) imobilizaram Alcalase® em Amberlite XAD-8, à temperatura ambiente e por 3 horas de reação (pH não informado). O derivado obtido reteve aproximadamente 70% da atividade imobilizada e era aproximadamente 12 vezes mais estável que a enzima solúvel quanto à presença de solventes orgânicos (acetona-água 50% v/v).

Ferreira *et al.* (2002) imobilizaram Alcalase® covalentemente em sílica (contendo grupos aminos e hidroxílicos terminais) ativada com glutaraldeído ou carbonildiimidazol, a 25°C, pH 8 e 8 horas de reação. O rendimento de fixação de proteínas variou de 30 a 70%, com retenções de atividade que variavam de 4 a 32%. Verificaram que quanto maior a concentração de glutaraldeído, maior era a fixação de proteína, no entanto, menor a atividade específica da enzima imobilizada. O melhor derivado produzido era aproximadamente 2 vezes mais estável que a enzima solúvel, a 60°C, pH 8.

2.9 – Hidrólise de Proteínas por Proteases

O valor nutritivo de uma proteína está relacionado com sua composição de aminoácidos e a disponibilidade destes. As proteínas do leite e do soro, particularmente a β -Lg, têm um alto conteúdo de aminoácidos essenciais, no entanto, tem-se mostrado resistente à digestão gástrica e aparentemente permanece intacta após passar pelo estômago e assim, torna-a nutricionalmente indisponível. Reddy *et al.* (1988) relacionaram a resistência à digestão desta proteína pela pepsina e quimotripsina à sua estabilidade conformacional (ligações dissulfeto intramoleculares mantém a integridade estrutural da proteína). Estes pesquisadores observaram que com o aquecimento a temperaturas entre 80 e 90°C essa resistência era diminuída significativamente, devido à ruptura das ligações dissulfeto, causando extensas mudanças na conformação estrutural da proteína e expondo as ligações peptídicas susceptíveis ao ataque proteolítico.

Visando encontrar novas aplicações para as proteínas do soro com alto valor agregado, Schmidt e Poll (1991) estudaram a hidrólise enzimática de β -Lg e α -La utilizando diversas proteases (serina-, cisteína-, carboxil- e metalo-proteases) a 30°C, pH 8. A Tabela 2.5 mostra alguns resultados obtidos utilizando-se serina-proteases. Os resultados da hidrólise de β -Lg com quimotripsina mostraram-se contraditórios com os obtidos por Reddy *et al.* (1988), os quais não observaram nenhuma hidrólise para essa proteína em tampão carbonato, pH 8, 37°C, diferentemente do observado por Schmidt e Poll (1991), os quais já observaram hidrólise à 30°C.

Boudrant e Cheftel (1976) hidrolisaram caseína com Alcalase® (produzida pelo gênero *Bacillus*), a 40°C, (pH 8,8), continuamente e em batelada. O hidrolisado obtido por hidrólise em batelada era composto por peptídios de baixa massa molecular (< 2 kDa) e aminoácidos livres, no entanto, a hidrólise contínua não formou aminoácidos livres. O

hidrolisado obtido, após liofilização, foi utilizado para o enriquecimento de sucos de frutas, permanecendo, os peptídios, solúveis em solução de ácido cítrico, pH 3,8 (22°C) e sem observar-se precipitado após pasteurização a 80°C (2 min). Um hidrolisado de proteína de soja, preparado nas mesmas condições, apresentou gosto desagradável e solubilização incompleta em solução de ácido cítrico, pH 3,8.

Tabela 2.5 – Hidrólises de proteínas do soro por algumas serina-proteases.

Serina-protease	Hidrólise de β -Lg	Hidrólise de α -La
Quimotripsina	Gradual – moléculas intactas permanecem por um tempo maior do que o observado para moléculas de α -La. Incubação a 40°C ao invés de 30°C torna a hidrólise 10 vezes mais rápida.	Rápida – inicialmente produz peptídios grandes que são gradualmente hidrolisados a peptídios menores não visíveis por eletroforese.
Tripsina	Muito lenta (quase não há hidrólise) Com a adição de íons Ca^{2+} nenhuma molécula intacta é observada após 23 horas	Lenta e parcial Com a adição de íons Ca^{2+} não ocorre hidrólise.
Pancreatina (complexo enzimático contendo lipase, amilase, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A e B e ribonuclease).	Diferença no grau de hidrólise com o tempo é menos pronunciada do que a observada na α -La, porém, com 8 e 23 horas a hidrólise é bem visível.	O grau de hidrólise é bem mais alto do que com tripsina. Em 23 horas essa proteína é totalmente hidrolisada. A adição de íons Ca^{2+} diminui a velocidade de hidrólise, por inibir tripsina que está presente em quantidades significativas.
Subtilisina	Rápida – nenhuma proteína intacta é observada após 30 min de hidrólise. No início forma-se alguns peptídios grandes, que desaparecem rapidamente e após 4 horas somente peptídios pequenos, que não são detectados por eletroforese, estão presentes.	Apresenta o mesmo comportamento observado para a β -Lg.
Proteinase K	Atividade proteolítica muito mais alta do que da subtilisina. Após 30 min nenhuma proteína intacta ou peptídios são visíveis em gel de eletroforese.	Apresenta o mesmo comportamento visto para a β -Lg.

Fonte: Schmidt e Poll, 1991

Otte *et al.* (1997) testaram várias proteases na hidrólise de β -Lg, entre elas: bromelina, papaína, pepsina, tripsina, endoproteinase Arg-C, aminopeptidase e carboxipeptidase Y. As condições padrões de hidrólise foram 37°C e pH 8, exceto para a pepsina (pH 4) e carboxipeptidase Y (pH 6,5). A β -Lg foi degradada rapidamente pela bromelina e parcialmente hidrolisada pela pepsina. Tanto a tripsina como a papaína degradaram a β -Lg, com a formação de peptídios de tamanho médio (1-5 kDa). A endoproteinase Arg-C somente hidrolisou β -Lg tratada com aquecimento e finalmente, nenhuma das exopeptidases (amino e carboxipeptidase) catalisaram a remoção completa de uma parte substancial da molécula de β -Lg. Comparativamente com os resultados obtidos por Schmidt e Poll (1991), observou-se para a tripsina uma considerável melhoria na hidrólise de β -Lg utilizando-se temperatura mais elevada (37°C).

Monti e Jost (1978) hidrolisaram α -La com tripsina a 50°C, pH 8, observando total digestão da proteína após 2 horas de reação. Enquanto menos de 20% da proteína intacta se dissolvia em água (pH 7), o hidrolisado tripsínico se dissolvia totalmente.

Perea *et al.* (1993) utilizaram Alcalase® 0,6L para a digestão de proteínas do soro, a 55°C (pH 8,5), 4 horas de reação. A degradação proteolítica de α -La e β -Lg resultou inicialmente em produtos com 6 kDa e 2,5 kDa, sendo formados peptídios com massa molecular menor que 1 kDa ao se atingir um grau de hidrólise⁵ em torno de 22%. As propriedades físico-químicas e nutricionais dos hidrolisados dependiam do grau de hidrólise atingido (diminuição do tamanho dos peptídios).

Mannheim e Cheryan (1990) estudaram a hidrólise de caseína usando Alcalase® 2,4L. A hidrólise foi realizada em um reator de membrana, o qual permitia uma operação contínua e separação simultânea dos produtos da mistura reacional. Após 4 horas de hidrólise, a pH 8 e 50°C, obtiveram alta conversão de caseína (acima de 90%), comparada à obtida em reatores bateladas (50-65%) sob condições equivalentes.

Synowiecki e Al-Khateeb (2000) selecionaram Alcalase® 2,4L para a obtenção de quitina e hidrolisado protéico a partir da hidrólise (55°C, pH 8) de rejeitos de camarão. Hidrólise em batelada por 4 horas rendeu um grau de hidrólise de 30%. Estes pesquisadores justificaram a escolha desta endoprotease baseados na especificidade da enzima por resíduos hidrofóbicos terminais, sendo possível a obtenção de hidrolisados sem sabor amargo. Parece ter havido um equívoco. Diferentemente do que foi relatado, Alcalase® cliva ligações

⁵ Grau de hidrólise (DH) é definido como a porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas durante uma reação proteolítica (Adler-Nissen, 1986).

peptídicas contendo principalmente resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico. A redução do sabor amargo em hidrolisados com altos graus de hidrólise (por exemplo, 30%) deve-se, provavelmente, conforme relata Adler-Nissen (1986), à degradação dos peptídios amargos, inicialmente produzidos, a peptídios com aminoácidos hidrofóbicos terminais. A redução do sabor amargo deve, provavelmente, à presença de aminopeptidases e carboxipeptidases na preparação da protease, particularmente encontradas em preparações de proteases fungais (Adler-Nissen, 1986).

Smyth e Fitzgerald (1998) hidrolisaram concentrados de proteínas do soro com Alcalase® 0,6L, a 37°C e pH 8, por 8 horas. Verificaram que após os 30 min de digestão ainda havia proteína intacta no hidrolisado, no entanto, após 8 horas, mais de 80% dos peptídios em solução tinham massa molecular menor que 5 kDa, sendo o grau de hidrólise aproximadamente 8%.

González-Tello *et al.* (1994) hidrolisaram uma preparação comercial de proteínas do soro, Lactoalbumina 75 L, com Alcalase® 0,6L, a 50°C e pH 8, e verificaram que a distribuição de massa molecular dos peptídios dependia do grau de hidrólise. Para graus de hidrólises em torno de 20%, aproximadamente 96% do hidrolisado era formado por peptídios com massa molecular menor que 1 kDa, 3% com massa molecular entre 1 e 3 kDa, e somente 1% de moléculas intactas de soro albumina, resistente a hidrólise nas condições usadas. Hidrólises com outras endopeptidases, de origem bacteriana ou animal, resultaram em frações de peptídios (61 a 67%) com massa molecular menor que 1 kDa e frações (30 a 35%) com massa molecular entre 1 e 3 kDa. Vemos assim que, como muitas das propriedades benéficas dos hidrolisados protéicos dependem do comprimento das cadeias dos peptídios formados, a hidrólise pelo uso de proteases pode ser facilmente controlada para se obter um produto com as propriedades desejadas, manipulando-se o tempo de hidrólise (ou o grau de hidrólise) ou o sistema proteína-endopeptidase.

Adachi *et al.* (1991) usaram termolisina (37°C, pH 7,5, 5 horas) e papaína (37°C, pH 6,5, 3 horas), seqüencialmente, para a preparação de hidrolisados a partir de caseína, com subsequente fracionamento por cromatografia em gel dos peptídios gerados em frações contendo peptídios com alto e baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos, e alto e baixo conteúdo de aminoácidos ramificados. O grau de hidrólise final foi de 20%, indicando que os peptídios formados tinham em média 5 resíduos de aminoácidos.

Pedroche *et al.* (2002) hidrolisaram caseína seqüencialmente com quimotripsina (50°C, pH 8, 1 h, grau de hidrólise de 14,3%) e CPA (50°C, pH 8, de 30 min a 24 horas, em reator de leite fluidizado) imobilizadas em glioxil-agarose. O grau de hidrólise com CPA

variou de 7% (30 min de reação) para 23% (24 h de reação), sendo suficiente para que quase todos os resíduos disponibilizados pela quimotripsina fossem liberados pela CPA. Análise de aminoácidos revelou que após 2 horas havia a presença de Tyr, Phe, Trp e Leu, após 8 horas Val, Ileu, Thr, Arg, Ala e Lys, e após 24 horas Ser, Gly e His. Esses resultados mostram a especificidade da CPA por aminoácidos aromáticos.

Lara (1997) hidrolisou uma preparação comercial de proteínas do soro de leite com pancreatina e Proteomix® (mistura de tripsina e quimotripsina bovinas e suínas), conjuntamente, a 37°C (pH entre 7 e 8), por 27 horas de reação, sendo a cada 9 horas adicionado nova carga enzimática sempre na razão pancreatina:Proteomix® de 6:1 (p/p). Essas condições possibilitaram a liberação de em média 77% de fenilalanina, com 81% dos aminoácidos ainda na forma de peptídios, ou seja, com uma liberação total de aminoácidos de aproximadamente 19%.

Numerosos trabalhos sobre preparação de hidrolisados protéicos podem ainda ser encontrados na literatura, os quais utilizam diferentes proteases e diferentes proteínas (animal e vegetal), o que tornaria extremamente longo a sua exposição. Contudo, a partir dos trabalhos citamos acima vemos que a hidrólise enzimática de proteínas é de relevante interesse pela comunidade científica, pois hidrolisados compostos por peptídios de características definidas podem ser úteis para diferentes aplicações industriais, tais como, alimentícias, terapêuticas, dentre outras.

2.10 – Estudo Cinético de Reações Enzimáticas

O estudo cinético compreende o estudo da velocidade de reação e como ela se altera em resposta a mudanças nas condições experimentais, tais como temperatura, pH, concentração de enzima, substrato e inibidores.

Cada enzima possui seus ótimos de pH e temperatura e seus parâmetros cinéticos (por exemplo, V_{\max} e K_M) pertinentes a cada sistema enzima-substrato (Kumar e Gupta, 1998), onde a influência da concentração de substrato na velocidade de reação pode ser representada pelo modelo cinético de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos, e, por conseguinte, a velocidade de reação, podem ser alterados com a imobilização da enzima, em resposta a uma série de fatores como, por exemplo, mudança na estabilidade da enzima (térmica ou com o pH); efeitos conformacionais (a conformação da molécula de enzima pode ser alterada pela imobilização); efeitos eletrostáticos ou de partição (a concentração de espécies químicas

importantes, tais como íons H^+ e moléculas de substrato ou produto, no micro-ambiente próxima à enzima imobilizada pode ser diferente da concentração “bulk”, devido às propriedades físico-químicas do suporte, por exemplo, se o suporte é carregado positivamente ou negativamente, ou inerte); efeitos difusionais (a velocidade de reação enzimática pode ser limitada pela taxa de difusão do substrato na superfície externa do suporte e pela taxa de difusão do substrato no interior dos poros do suporte) (Blanch e Clark, 1997).

Portanto, para cada caso sistema enzima-substrato há de se determinar as condições ótimas de trabalho (temperatura e pH) e a influência da concentração de substrato na velocidade de reação da enzima.

2.10.1 – Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações enzimáticas aumenta com a temperatura, dentro de certa faixa de temperatura na qual a enzima é estável e mantém atividade integral. A velocidade da maioria das reações enzimáticas se duplica aproximadamente para cada elevação de $10^{\circ}C$ na temperatura ($Q_{10} \approx 2$). Entretanto, o coeficiente de temperatura Q_{10} varia consideravelmente de uma enzima para outra, dependendo da energia de ativação da reação catalisada; as velocidades de reações com alta energia de ativação são muito mais sensíveis a variações de temperatura do que reações com baixa energia de ativação - Teoria de Arrhenius (Whitaker, 1994; Leningher *et al.*, 1995).

As enzimas, contudo, são, em geral, estruturas muito sensíveis quanto à temperatura e ao pH, desnaturando-se a temperaturas elevadas, ou em alguns casos até mesmo a moderadas temperaturas, e fora de uma faixa muito estreita de pH. Assim, o ótimo aparente de temperatura observado nos perfis de atividade em função da temperatura é resultante de dois processos: aumento na velocidade de reação com a temperatura e crescente desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (Whitaker, 1994; Leningher *et al.*, 1995).

No caso do pH, a estrutura tridimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, depende das interações hidrofóbicas e hidrofílicas da enzima, que são afetadas pelo pH. Assim, alterações nesse parâmetro podem alterar o sítio ativo, diminuindo a atividade catalítica reversivelmente, ou mesmo desnaturar a enzima, causando uma perda irreversível de atividade. Faz-se necessário assim trabalhar em condições (temperatura e pH) ótimas, onde a atividade catalítica se conserve por um maior período de tempo, mesmo que nessas condições suas velocidades não sejam máximas (Whitaker, 1994; Leningher *et al.*, 1995).

2.10.2 – Influência da concentração de substrato e inibidores

A concentração de substrato é também uma variável de grande importância no estudo cinético, pois afeta diretamente a velocidade da reação catalisada. O efeito desta variável na cinética de uma reação catalisada por uma enzima (solúvel ou imobilizada) pode ser analisado mediante ensaios de velocidades iniciais. Nesse método, a tangente da curva de liberação do produto em função do tempo, tomada no trecho linear da reação, é tomada como a velocidade inicial da reação correspondente a cada concentração inicial de substrato utilizada no ensaio. O mais simples modelo cinético utilizado para representar a influência da concentração do substrato (S) na velocidade da reação (V) é o de Michaelis-Menten, que considera a existência de apenas um complexo enzima-substrato (ES) no sistema reacional (Leningher *et al.*, 1995):

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_M + S} \quad (2.3)$$

onde: V é a velocidade de reação; S é a concentração de substrato; V_{\max} ($k \times E_0$) é a velocidade máxima da reação, ou seja, a velocidade medida em condições de saturação da enzima pelo substrato; K_M é a constante de Michaelis-Menten, definida como a constante de dissociação do complexo ES e corresponde à concentração de substrato na qual a velocidade da reação é igual a metade da velocidade máxima.

Dependendo do mecanismo de reação, K_M assume uma relação entre as constantes das reações; num dos casos mais simples, esse parâmetro pode ser considerado como uma medida da afinidade da enzima pelo substrato. Como o parâmetro V_{\max} indica a velocidade limitante de uma reação catalisada por uma enzima nas condições de saturação, o parâmetro k , também chamado número de renovação, indica o número de moléculas de substrato que são convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo, quando a enzima está saturada com o substrato (Leningher *et al.*, 1995).

O grau de complexidade dos modelos cinéticos pode ser aumentado desde a simples inclusão de termos de inibição pelo produto (equação 2.4), pelo substrato (equação 2.5) e pelo produto e substrato (equação 2.6) no modelo de Michaelis-Menten, até modelos mais complexos, os quais consideram mais de um substrato e, portanto, a presença simultânea no sistema de diferentes complexos ES. Esses últimos resultam em um grande número de

parâmetros cinéticos, tornando os modelos de difícil uso e aplicação restrita (Gonçalves *et al.*, 2002).

Os inibidores são compostos que reduzem a velocidade de uma reação enzimática por mecanismos distintos, sendo de grande valor na elucidação de mecanismos de reações, na determinação de grupos pertencentes ao sítio ativo de enzimas e no estabelecimento da seqüência de rotas metabólicas. Eles podem ser produtos da reação ou compostos estruturalmente análogos a substratos da enzima, que participam na reação a uma taxa maior ou menor que a dos substratos normais, interferindo no processo catalítico, normalmente, por evitar que o substrato se ligue ao sítio ativo (Whitaker, 1994).

A inibição pode ser irreversível ou reversível. Na inibição irreversível, o inibidor destrói ou liga-se covalentemente a grupos funcionais da enzima essenciais para sua atividade catalítica, formando um complexo estável e inativo. Na inibição reversível, o complexo enzima-inibidor (EI) não é estável, podendo, ocasionalmente, ser revertido pelo substrato. A inibição reversível, segundo o efeito que ela exerce sobre a velocidade inicial observada, é dividida em competitiva, incompetiva e não-competitiva ou mista (Leningher, 1976; Leningher *et al.*, 1995).

Na inibição competitiva, o inibidor pode combinar-se com a enzima livre competindo com o substrato pelo sítio ativo. Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima para formar um complexo EI análogo ao complexo ES, sem, contudo, ser modificado quimicamente pela enzima. Na presença deste tipo de inibição o valor aparente do parâmetro K_M aumenta, enquanto V_{max} permanece inalterada, embora a concentração de substrato necessária para se atingir qualquer fração de $V_{máx}$ seja maior comparada com àquela da reação sem inibidor. A equação de Michaelis-Menten com inibição competitiva é, assim, dada por:

$$V = \frac{V_{max} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S} \quad (2.4)$$

onde: I é a concentração de inibidor e K_I é a constante de dissociação do complexo EI, e representa a afinidade da enzima pelo inibidor (afinidade é o recíproco da constante K_I).

Na inibição incompetiva, o inibidor não se combina com a enzima livre e nem afeta sua reação com o seu substrato normal. O inibidor liga-se diretamente no complexo ES, em um local distinto ao do sítio ativo, formando um complexo inativo enzima-substrato-inibidor

(ESI), impedindo a formação do produto normal da reação. Esta inibição não é revertida aumentando-se a concentração de substrato; sempre haverá uma forma improdutiva da enzima (complexo ESI), reduzindo-se assim o valor aparente de V_{\max} . Frequentemente, pouco ou nenhum efeito é observado sobre K_M . A inibição incompetitiva é rara em reações de um substrato, porém comum em reações de dois substratos.

A inibição pelo substrato comporta-se como uma inibição incompetitiva, pois uma segunda molécula de substrato liga-se em um local próximo ao sítio ativo da enzima, reduzindo a velocidade inicial da reação, por impedir que a primeira molécula se ligue corretamente ao sítio ativo ou por impedir ela seja transformada em produto (Whitaker, 1994). Assim, a equação de Michaelis-Menten com inibição incompetitiva, aqui representada pela inibição pelo substrato, seria:

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_M + S(1 + \frac{S}{K_S})} \quad (2.5)$$

onde: K_S é a constante de dissociação do complexo inativo enzima-substrato-substrato (ESS).

A combinação de inibição competitiva pelo produto e inibição incompetitiva pelo substrato resulta em uma equação de Michaelis-Menten do tipo:

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_M(1 + \frac{I}{K_I}) + S(1 + \frac{S}{K_S})} \quad (2.6)$$

Na inibição mista ou não-competitiva, o inibidor pode se ligar tanto à enzima livre como ao complexo ES, interferindo na ação de ambos. Os inibidores não-competitivos ligam-se a um sítio da enzima distinto do sítio ativo, muitas vezes ocasionando a deformação da enzima, de modo que ela não forme o complexo ES na velocidade usual e, uma vez que ele se forme, o complexo ES não se desdobra na velocidade normal para originar os produtos. Na inibição não-competitiva, a reação com o inibidor produz duas formas inativas, EI e ESI, para as quais existem duas constantes de inibição (K_I^{EI} e K_I^{ESI}) que podem ou não ser iguais. Neste tipo de inibição V_{\max} diminui, pois, uma parte do complexo produtivo ES é consumido na formação do complexo improdutivo ESI, e não pode ser restabelecida pela adição de

concentrações elevadas de substrato. A equação de Michaelis-Menten com inibição não-competitiva é dada por (Leningher, 1976; Leningher *et al.*, 1995):

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I^{EI}}\right) + S \left(1 + \frac{I}{K_I^{ESI}}\right)} \quad (2.7)$$

onde: K_I^{EI} e K_I^{ESI} são as constantes de inibição das reações entre enzima e inibidor e complexo ES e inibidor, respectivamente.

2.10.3 – Influência da concentração de enzima

Como ocorre para qualquer catalisador, a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima depende diretamente da concentração desta. Contudo, esta relação é linear somente se as verdadeiras velocidades iniciais são tomadas; isto é, a velocidade de formação do produto deve ser constante em todo o tempo de ensaio escolhido. A Figura 2.15 mostra que a velocidade de formação do produto ($\Delta P/\Delta t$) é constante para as concentrações de enzima E_1 , E_2 e E_3 , se o tempo de reação t_1 é escolhido; entretanto, se o tempo de reação t_2 é escolhido, a velocidade será constante somente para as concentrações de enzima E_1 e E_2 (Giordano, 1987).

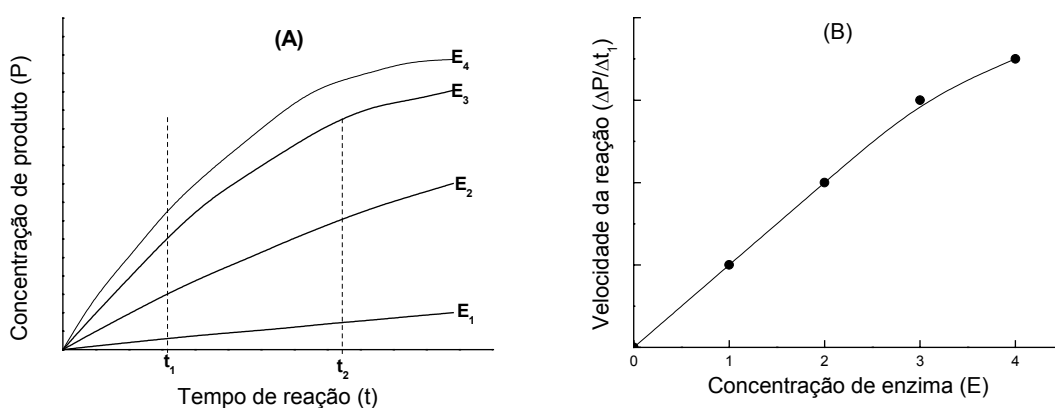


Figura 2.15 – (A) Formação de produto P em função do tempo de reação t, para diferentes concentrações de enzima E, e (B) velocidade inicial de reação ($\Delta P/\Delta t_1$) em função da concentração de enzima.

Similarmente, se uma concentração alta de enzima é escolhida (E_4 , por exemplo), $\Delta P/\Delta t$ não é constante para o intervalo de tempo $0-t_1$, conforme mostra a Figura 2.15. Dessa forma, verifica-se que para estudos cinéticos, onde velocidades iniciais são tomadas, é necessário estabelecer-se os limites de linearidade, isto é, estabelecer a quantidade máxima de produto que pode ser acumulada tal que as relações entre a concentração de produto e tempo e entre velocidade de aparecimento de produto e concentração de enzima sejam lineares (Giordano, 1987).

Para o estudo cinético, onde se pretende ajustar modelo tipo Michaelis-Menten, a linearidade de uma curva $V_0 \times E$ mostra que para qualquer concentração de enzima escolhida, na faixa de região linear, a influência da concentração do substrato na velocidade da reação segue modelo cinético de Michaelis-Menten. Nessa região, a concentração do substrato é suficientemente maior que a concentração da enzima tal que a hipótese de estado pseudo-estacionário, postulado por Briggs e Haldane, seja válida para praticamente todo o tempo amostrado, ou seja, o tempo para atingir a concentração do estado pseudo-estacionário para o complexo ES é muito curto comparado com o tempo de reação amostrado. Essa é uma condição que tem que ser aferida sempre que se realizam estudos cinéticos assumindo-se modelo de Michaelis-Menten (Voet, 1995).

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

3.1.1 – Enzimas

Tripsina (EC 3.4.21.1) do pâncreas bovino, liofilizada, e Alcalase[®] 2,4L (EC 3.4.21.62), tipo FG, líquida, em um meio composto por monopropilenoglicol ou glicerol, foram doadas pela Novo Nordisk A/S (Dinamarca).

Quimotripsina (EC 3.4.21.4) do pâncreas bovino, Tipo II, cristalina, e carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) do pâncreas bovino, tipo II, suspensão aquosa com tolueno, foram adquiridas da Sigma Chemical Company (EUA).

As atividades enzimáticas destas enzimas, determinadas neste trabalho pelos métodos descritos a seguir, eram de 160 U_{BAEE}/mg de proteína (tripsina), 148 U_{BTEE}/mg de proteína (quimotripsina), 47 U_{H-PHE}/mg de proteína (carboxipeptidase A) e 2,88 U_{BAEE}/mg de proteína, 28 U_{BTEE}/mg de proteína e 68 U_{BANE}/mg de proteína (Alcalase[®]).

A concentração de proteínas da preparação comercial Alcalase[®], determinada pelos métodos de Bradford e Lowry, descritos a seguir, eram de 32 mg/mL e 140 mg/mL, respectivamente. A concentração de proteínas de rótulo da suspensão aquosa de carboxipeptidase A (CPA) era entre 21 e 22 mg de proteína/mL de suspensão.

3.1.2 – Substratos

Éster etílico de N-benzoil-L-arginina (BAEE), éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) e N-benzoil-glicina-fenilalanina (hipuril-L-fenilalanina, H-PHE) adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA) e éster p-nitrofenílico de N-butiloxicarbonil-L-alanina (Boc-Ala-ONp, BANE) adquirido da Bachem AG (Suíça), foram utilizados na determinação das atividades enzimáticas das proteases utilizadas neste trabalho.

Caseína do leite bovino (massa molecular igual a 30 kDa) adquirida da Sigma Chemical Company (EUA) foi utilizada para medida de atividade proteolítica de Alcalase[®]

solúvel e imobilizada em glioxil-agarose e desempenho destas na produção de peptídios de baixa massa molecular.

Soro de queijo “Minas Frescal” (pH entre 4,5 e 5,0 e uma concentração de proteínas entre 6,0 e 7,0 g/L, determinada pelo método de Kjeldahl, descrito a seguir) doado pela Cooperativa de Laticínios São Carlos (Brasil) foi utilizado nas hidrólises seqüenciais e controladas de proteínas, catalisadas por tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A e Alcalase®, imobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose.

3.1.3 – Suportes e reagentes de ativação

Agarose 10% doada pela Hispanagar AS (Espanha) e Sepharose 6B-CL (agarose 6%) adquirida da Amersham Pharmacia Biotech AB (Suécia) foram utilizadas na preparação de suportes glioxil-agarose e glutaraldeído-agarose. Sepharose 4B ativada com CNBr, adquirida da Amersham Pharmacia Biotech AB (Suécia), foi utilizada como suporte para a imobilização de Alcalase®.

Glicidol (2,3-epóxi-1-propanol), borohidreto de sódio, etanolamina e etilenodiamina adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA); periodato de sódio adquirido da Merck (Alemanha); e solução de glutaraldeído 25% adquirida da Fluka Chemie AG (Suiça), foram utilizados na ativação dos suportes com grupos aminos e aldeídos.

3.1.4 – Padrões e inibidores competitivos de CPA e tripsina

Aminoácidos padrões (Asp, Thr, Asn, Ser, Glu, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe, His, Trp, Lys e Arg) e solução padrão de aminoácidos (com norleucina, taurina, ácido cistéico e cloreto de amônio incluídos), adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA), foram utilizados na calibração de uma coluna de troca iônica Shim-pack Amino-Na (Shimadzu, Japão) para análise de aminoácidos por HPLC (Shimadzu, Japão) de hidrolisados de proteínas do soro de queijo.

Proteínas e peptídios padrões (soro albumina bovina - MM 67000 Da, β -lactoglobulina - MM 18000 Da, α -lactoalbumina - MM 14400 Da, [Gln⁴]-neurotensina - MM 1672 Da, angiotensina II - MM 1046,2 Da, [Sar]-angiotensina II - MM 1002,2 Da e leucina encefalina - MM 555,6 Da) adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA) e insulina regular humana

(BioHulin®) - MM 5000 Da adquirida da Biobrás S/A (Brasil), foram utilizados na calibração de uma coluna de exclusão de tamanho Superdex Peptide HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suécia) para análise de peptídios por cromatografia líquida.

Kit de calibração de massa molecular, composto por fosforilase B (MM 97 kDa), soro albumina bovina (MM 66 kDa), ovoalbumina (MM 45 kDa), anidrase carbônica (MM 30 kDa), inibidor de tripsina (MM 20,1 kDa) e α -lactoalbumina (MM 14,4 kDa), adquirido da Amersham Pharmacia Biotech AB (Suécia), foi utilizado como marcadores de massas moleculares em eletroforese SDS-PAGE.

Os aminoácidos tirosina e fenilalanina (inibidores competitivos de carboxipeptidase A), o dipeptídeo glicil-tirosina (substrato cuja clivagem é catalisada lentamente por CPA), e benzamidina (inibidor competitivo de tripsina) adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA), foram utilizados durante a imobilização das enzimas CPA e tripsina. Estes compostos, ligados reversivelmente ao sítio ativo da enzima, podem minimizar perdas de atividade catalítica promovidas por distorção da molécula de enzima durante a formação de ligações covalentes entre grupos ativos do suporte e grupos funcionais da molécula de enzima.

3.1.5 – Corantes e reagentes para análise de proteínas

Azul brilhante de Coomassie, verde de bromocresol e p-nitrofenol foram adquiridos da Merck (Alemanha) e Ponceau 4 R foi adquirido da Sigma Chemical Company (EUA).

3.1.6 – Reagentes para análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica

Mercaptoetanol e o-ftaldeído (OPA) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA) e Bry-35 (polietilenoglicol dodecil éter) foi adquirido da Fluka Chemie AG (Suíça).

3.1.7 – Reagentes para eletroforese SDS-PAGE

Acrilamida e bis-acrilamida foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotech Inc. (EUA); SDS (dodecilsulfato de sódio), TEMED (tetrametilenodiamina), tris(hidroximetil)aminometano (tris básico), persulfato de amônio e mercaptoetanol foram

adquiridos da Sigma Chemical Company (EUA) e azul brilhante de bromofenol foi adquirido da Merck (Alemanha).

3.2 – Metodologia Experimental

3.2.1 – Ativação de suportes

3.2.1.1 – Suportes glioxil-agarose

Suportes glioxil-agarose foram preparados por eterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio, de acordo com a metodologia de Guisán (1988). Para cada grama de agarose adicionava-se, sob banho de gelo, 286 µL de água, 476 µL de NaOH 1,7 N (preparado previamente a frio e contendo 28,5 mg de borohidreto de sódio⁶ por mililitro de solução) e 343 µL de glicidol. A suspensão era mantida sob suave agitação mecânica, à temperatura ambiente, por 12 a 15 horas. O suporte eterificado (gliceril-agarose) era lavado com água destilada, seco a vácuo, e suspenso novamente em água destilada na razão $V_{\text{SUPPORTE}}/V_{\text{SUSPENSÃO}}$ igual a 1/10. Para cada mililitro de suporte, era adicionado à suspensão 214 µg de periodato de sódio por microequivalente de grupos aldeídos desejados⁷. Após 2 horas de suave agitação à temperatura ambiente, o suporte glioxil-agarose era finalmente lavado com água destilada, seco a vácuo e estocado a 4°C.

A quantificação de grupos aldeídos formados por mililitro de suporte era feita por iodometria, segundo adaptação da metodologia de Pereira (1996), descrita a seguir.

O periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril (álcoois) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando o íon tri-iodeto (I_3^-), o qual é quantificado por colorimetria:



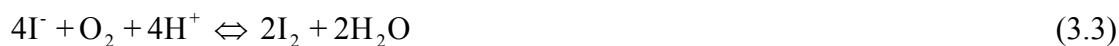
⁶ Utilizado para manter intacta a estrutura do gel durante eterificação em meio alcalino.

⁷ A concentração do gel de agarose utilizado definirá a concentração máxima possível de grupos aldeídos no suporte ativado. Por exemplo, agarose 6% poderá ser ativada com no máximo 70 a 80 µeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte, e agarose 10% com no máximo 210 a 220 µeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte.

É necessário iodeto em excesso para gerar o íon tri-iodeto (equação 3.2), pois o iodo na forma I_2 é muito volátil.



Em solução ácida há perda de iodo, por volatilização, devido à oxidação de iodeto por oxigênio atmosférico (equação 3.3). Assim, a quantificação do periodato de sódio não consumido era realizada em meio contendo bicarbonato de sódio, pois, a oxidação atmosférica de iodeto é desprezível em solução neutra (Vogel, 1981).



Em uma cubeta de vidro contendo 3 mL de uma solução 1:1 (v/v) de iodeto de potássio 10%⁸ e bicarbonato de sódio saturado era adicionado 100 μ L de uma solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão do gel gliceril-agarose (substituindo suporte por água). Em um espectrofotômetro fazia-se uma varredura de comprimentos de ondas, escolhendo-se aquela que fornecesse uma absorbância igual a 1 (423 nm para uma solução aquosa de periodato 0,01 M). Cem microlitros do sobrenadante final da oxidação era posteriormente adicionado a 3 mL da solução 1:1 descrita acima, correspondendo o decréscimo na absorbância à porcentagem de grupos aldeídos formados.

Na ativação de 1 mL de agarose com 75 μ eqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte, por exemplo, era adicionado aos 10 mL da suspensão 21,4 mg de periodato de sódio (100 μ moles de periodato por mililitro de suporte). A absorbância inicialmente medida da solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão de oxidação do gel gliceril-agarose, correspondia a 100% de periodato não consumido. Após 2 horas de reação, a absorbância do sobrenadante final da oxidação, nas condições descritas acima, media entre 0,2 e 0,3 (em média 75% de periodato consumido). Portanto, como a reação de oxidação de grupos gliceril (álcoois) a aldeídos é equimolar, o total de periodato consumido era igual ao total de grupos aldeídos formados no suporte, ou seja, em média 75 μ eqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte.

⁸ A perda de iodo, por volatilização, de uma solução que contenha pelo menos 4% de iodeto de potássio é praticamente desprezível (Vogel, 1981).

3.2.1.2 – Suportes glutaraldeído-agarose

O suporte glioxil-agarose era primeiramente aminado com etilenodiamina, de acordo com a metodologia de Fernández-Lafuente *et al.* (1993) e em seguida, ativado com glutaraldeído, de acordo com a metodologia de Fernández-Lafuente *et al.* (1998). Para cada grama de suporte adicionava-se 5,72 mL de etilenodiamina 2 M, pH 10 (preparado previamente a frio) e após agitação suave por 2 horas à temperatura ambiente, adicionava-se 57,14 mg de borohidreto de sódio⁹ e agitava-se suavemente a suspensão por mais 2 horas. O suporte amino-agarose era lavado com acetato de sódio 100 mM, pH 4 (30 mL/g de suporte), borato de sódio 0,1 M, pH 9,00 (30 mL/g de suporte) e água destilada em abundância. Para cada grama de suporte amino-agarose era adicionado 1,12 mL de tampão fosfato 200 mM, pH 7,0 e 1,68 mL de solução de glutaraldeído 25%. Após reajustar o pH em 7,0, a suspensão (em frasco coberto com papel alumínio) era agitada suavemente por 12 a 14 horas. O suporte glutaraldeído-agarose era finalmente lavado com água destilada e usado imediatamente na imobilização da enzima desejada.

3.2.2 – Preparação de derivados

Serão apresentados os protocolos de preparação de derivados de tripsina e quimotripsina, descritos por Blanco e Guisán (1988) e Guisán *et al.* (1991), respectivamente. Esses derivados foram preparados somente em suportes glioxil-agarose para utilização nas hidrólises de proteínas do soro de queijo. Para CPA e Alcalase® serão apresentados os protocolos de imobilização otimizados neste trabalho. Possíveis variações nestes protocolos serão comentadas no decorrer da discussão dos resultados. A carga enzimática dos derivados de tripsina e quimotripsina foram sempre de 10 mg de proteína / mL de suporte. As cargas enzimáticas para CPA e Alcalase® variaram ao longo do trabalho e serão informadas à medida que se fizer necessário. Via de regra, baixa carga sempre foi utilizada (menos de 1 mg de proteína / mL de suporte) para evitar ou minimizar problemas de transferência de massa intrapartícula.

⁹ Borohidreto de sódio era utilizado para reduzir os grupos aldeídos remanescentes em hidroxilas inertes e para transformar as bases instáveis de Schiff entre grupos aldeídos do suporte e grupos aminos do etilenodiamina em ligações covalentes estáveis.

3.2.2.1 – Imobilização covalente multipontual em suportes glioxil-agarose

Tipicamente, 10 mL (7 g) de glioxil-agarose-6% ativada com 75 μ eqv de aldeídos por mililitro de suporte (para o caso de tripsina, quimotripsina e CPA) ou glioxil-agarose-10% ativada com 210 μ eqv de aldeídos por mililitro de suporte (para o caso de Alcalase®) eram adicionados a 43 mL de uma preparação enzimática em tampão bicarbonato de sódio 100 mM (pH 10,05), contendo ou não inibidor competitivo, dependendo da necessidade de cada enzima (ver tabela 3.1). A suspensão de imobilização era suavemente agitada a 25°C em agitador recíproco e orbital (New Brunswick Scientific, EUA). Amostras do sobrenadante e da suspensão total eram coletadas para medida de atividade enzimática e proteína. Após imobilização total (desaparecimento de toda atividade do sobrenadante), a reação enzima-suporte era continuada por um tempo adequado para cada enzima (Tabela 3.1) ou suficiente para a preparação de derivados com diferentes tempos de contato enzima-suporte (1 a 96 h). Os derivados eram reduzidos com borohidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) após a adição de 50 mL de tampão bicarbonato 100 mM (pH 10,05) ou solução de inibidor preparada no mesmo tampão, com uma concentração de inibidor suficiente para se obter a concentração final necessária para cada enzima em particular (ver tabela 3.1). Após 30 minutos de agitação mecânica suave, os derivados eram lavados com excesso de água destilada e finalmente com azida (0,05%)-NaCl 0,9% (p/v) para armazenamento após secagem a vácuo.

Tabela 3.1 – Condições utilizadas na imobilização de proteases a 25°C, pH 10,05.

Enzima	Inibidor durante a etapa de imobilização	Tempo de imobilização (horas)	Inibidor durante a etapa de redução
Tripsina	Benzamidina 3 mM	24	Benzamidina 3 mM
Quimotripsina	Ausente	24	Ausente
CPA	Ausente	48	Tirosina 10 mM
Alcalase®	Ausente	96	Ausente

3.2.2.2 – Imobilização em glioxil-agarose com ligações covalentes limitadas

Dez mililitros de glioxil-agarose 6 ou 10%, ativados com 20 μ eqv de aldeídos / mL de suporte eram suspensos em 43 mL (no caso de CPA) ou 93 mL (no caso de Alcalase®) de

preparação enzimática em tampão bicarbonato 100 mM (pH 10,05). Após 1 hora de suave agitação à 25°C, 100 mg de borohidreto de sódio eram adicionados à suspensão de imobilização de Alcalase® para reduzir os grupos aldeídos remanescentes em hidroxilas inertes, evitando-se assim a formação de novas ligações entre enzima e suporte e transformando as bases instáveis de Schiff entre grupos aldeídos do suporte e grupos aminos da enzima em ligações covalentes estáveis (Blanco e Guisán, 1989). Após 30 minutos, o derivado Alcalase®-glioxil era lavado com água destilada. No caso da suspensão de imobilização de CPA, antes da redução com borohidreto era adicionado 50 mL de solução de tirosina 20 mM, preparada em tampão bicarbonato 100 mM (pH 10,05), para dar uma razão volume de suporte-volume total de 1:10. Então, 100 mg de borohidreto de sódio eram adicionados, e a suspensão agitada por 30 minutos, lavando-se ao final o derivado reduzido com água destilada.

3.2.2.3 – Imobilização em suportes glutaraldeído-agarose

Dez mililitros de glutaraldeído-agarose-6% eram suspensos em 93 mL de preparação enzimática em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0). A suspensão era suavemente agitada a 25°C. Após 1 hora de agitação os derivados eram lavados com água destilada e resuspensos em 93 mL de tampão borato de sódio 100 mM, pH 9,00 (para o caso de Alcalase®) ou 93 mL de solução de tirosina 10 mM, preparada no mesmo tampão (para o caso de CPA). Cem miligramas de borohidreto de sódio eram adicionados e a suspensão agitada por 30 min à temperatura ambiente. Os derivados reduzidos eram então lavados com excesso de água destilada.

3.2.2.4 – Imobilização em suportes CNBr-agarose (somente para Alcalase®)

O suporte comercial liofilizado era suspenso em HCl 1 mM (pH 2,5) na razão de 1/100 (p/v) e a suspensão mantida sob suave agitação por 15 minutos. O suporte hidratado era lavado com água destilada e NaCl 50 mM até pH neutro. O suporte hidratado (10 mL) era suspenso em 43 mL de preparação enzimática em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,5) e a suspensão agitada por 1 hora. Após esse tempo, o derivado Alcalase®-CNBr era lavado com excesso de água destilada e resuspenso em 93 mL de etanolamina 200 mM, pH 8,0, para

bloqueio dos grupos ativos remanescentes. A suspensão era suavemente agitada por 12 a 15 h a 4°C e o derivado final lavado com água destilada em abundância.

3.2.3 – Ensaio de atividade enzimática

As atividades enzimáticas eram determinadas espectrofotometricamente, medindo-se o aumento de absorvância provocado pela hidrólise do substrato. Os ensaios eram realizados em cubeta de vidro (região visível) ou quartzo (região do UV) de 1 cm de caminho óptico, termostaticamente controlada a 25°C, em um espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech, EUA), adaptado com agitação magnética e célula para circulação de água.

Atividade BAEE: 250 µL de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluída, eram adicionados a 2,5 mL de éster etílico de N-benzoil-L-arginina (BAEE) 0,5 mM, preparado em tampão fosfato 50 mM (pH 7,6). O aumento na absorvância, medida em 253 nm, era continuamente monitorado por 5 a 10 minutos. A tangente da região linear era tomada e a atividade calculada usando-se um coeficiente de extinção molar de 980 L / (mol x cm). Uma unidade (U_{BAEE}) hidrolisava 1 µmol de BAEE por min, nas condições descritas.

Atividade BTEE: 140 µL de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluída, eram adicionados à mistura reacional - 2,8 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 e 140 µL de éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) 8 mM, preparado em etanol. O aumento na absorvância, medida em 258 nm, era acompanhado por 5 a 10 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade era calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 870 L / (mol x cm). Uma unidade (U_{BTEE}) hidrolisava 1 µmol de BTEE por min, nas condições descritas.

Atividade BANE: 20-100 µL de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluída, eram adicionados à mistura reacional - 1,98 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, contendo 20% de etanol e 20 µL de Boc-Ala-ONp (BANE) 100 mM, preparado em acetonitrila. O aumento na absorvância, medida em 405 nm, era acompanhado por 5 a 10 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade era

calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 7840 L / (mol x cm). Uma unidade (U_{BANE}) hidrolisava 1 μmol de BANE por min, nas condições descritas.

Atividade H-PHE: 100 μL de solução enzimática ou suspensão de enzima imobilizada, convenientemente diluída, eram adicionados a 2,90 mL de hipuril-L-Phe (H-PHE) 1 mM, preparado em tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 500 mM (protocolo de acordo com Sigma Chemical Company.). O aumento na absorbância, medida a 254 nm, era acompanhado por 5 a 10 minutos, tomando-se a tangente da região linear. A atividade era calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 360 L / (mol x cm). Uma unidade ($U_{\text{H-PHE}}$) hidrolisava 1 μmol de H-PHE por min, nas condições descritas.

3.2.4 – Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas de preparações enzimáticas comerciais e sobrenadante de suspensões de imobilizações foi determinada pelos métodos de Bradford (1976) ou Lowry *et al.* (1951) e as concentrações de proteínas de soro de queijo *in natura* e concentrado foram determinadas pelo método de Kjeldahl (MICRONAL, 1995), usando uma unidade de digestão (B-435) e uma unidade de destilação de amônia (B-323) Buchi (suíça).

3.2.4.1 – Método de Bradford

a) Reagente *de Bradford*: dissolvia-se 100 mg de azul brilhante de Coomassie em 50 mL de etanol 95%. Após a adição de 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, completava-se o volume da solução para 1 L.

b) *Dosagem*: em um tubo de ensaio adicionava-se 100 μL da amostra a dosar e 5 mL do reagente de Bradford. Agitava-se imediatamente a solução em agitador em vórtex e após 5 minutos fazia-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. O equipamento era zerado com o reagente de Bradford nas mesmas condições da dosagem, substituindo solução de proteína por água destilada.

A concentração de proteínas era calculada pela equação 3.4, construída com proteína padrão (soro albumina bovina) e válida para concentrações de proteínas de 0 a 0,6 mg/mL.

$$C_p = (\text{Abs}_{595} - 15,15 \times 10^{-3}) \div 1,13 \quad (3.4)$$

onde: C_p é a concentração de proteínas, em g/L, e Abs_{595} é a absorvância da amostra medida em 595 nm.

3.2.4.2 – Método de Lowry

a) *Reagente de Lowry*: misturava-se 2 mL de solução de sulfato de cobre 2% (p/v) e 2 mL de solução de tartarato de sódio e potássio 4% (p/v). Completava-se o volume da solução para 100 mL com solução de carbonato de sódio 2% (p/v) em NaOH 0,1 N.

b) *Dosagem*: em um tubo de ensaio adicionava-se 100 μL da amostra a dosar, 400 μL de água destilada e 5 mL do reagente de Lowry. Agitava-se em vórtex, aguardava-se 10 minutos e adicionava-se 500 μL de reagente de Folin diluído 1:3 com água destilada (1 mL do reagente de Folin e 3 mL de água destilada). Agitava-se novamente em vórtex e após 10 minutos fazia-se a leitura da absorvância em 625 nm. O equipamento era zerado com uma solução preparada nas mesmas condições da dosagem, simplesmente substituindo a amostra por água destilada.

A concentração de proteínas era calculada pela equação 3.5, construída com proteína padrão (soro albumina bovina) e válida para concentrações de proteínas de 0 a 1,0 mg/mL.

$$C_p = (\text{Abs}_{625} - 1,69 \times 10^{-3}) \div 202,19 \times 10^{-3} \quad (3.5)$$

onde: Abs_{625} é a absorvância da amostra medida em 625 nm.

3.2.4.3 – Método de Kjeldahl

Um mililitro de amostra de proteína era digerida com 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, usando-se 1 g de catalisador (mistura 3:1, p/p, de sulfato de potássio e cobre). A digestão era feita até a mistura adquirir uma coloração verde clara (aproximadamente 2 horas). Em seguida, adicionava-se 30 mL de água destilada, solução de NaOH 32% (p/v) até a

mistura adquirir coloração marrom escura e destilava-se a mistura por 7 minutos. Coletava-se o destilado em erlenmeyer de 300 mL, contendo 100 mL de ácido bórico 2% (p/v) e 2 a 3 gotas de indicador misto II, preparado como descrito a seguir. Titulava-se o destilado até o ponto final (coloração azul) com HCl 0,1 N e calculava-se a concentração de proteínas usando-se a equação 3.6.

$$C_P = \frac{V_{HCl} N_{HCl}}{V_A} \times 14 \times f_N = N \times f_N \quad (3.6)$$

onde: C_P é a concentração de proteínas em g/L; V_{HCl} é o volume de HCl 0,1 N gasto na titulação da amostra, em mL; N_{HCl} é a normalidade da solução de HCl; V_A é o volume da solução de proteínas; N é a concentração de nitrogênio, em g/L; e f_N é o fator de conversão de Kjeldahl (6,38 para as proteínas do soro).

O indicador misto II era preparado dissolvendo-se 350 mg de verde de bromocresol em 10 mL de etanol 96%. Em seguida, adicionava-se 10 mL de solução de NaOH 0,1 N, 200 mL de água destilada, 22 mL de solução aquosa 1% (v/v) de Ponceau 4 R e 0,75 g de p-nitrofenol, dissolvido em 5 mL de etanol 96%. O volume final da solução era completado para 250 mL com água destilada.

3.2.5 – Estabilidade Térmica

Eram preparadas soluções das enzimas solúveis (CPA e Alcalase®) e suspensões das enzimas imobilizadas em tampão tris-HCl pH 6,0-9,0 (para a CPA) ou tampão fosfato pH 8,0 (para a Alcalase®). As atividades enzimáticas iniciais eram medidas pelos procedimentos descritos acima: atividade H-PHE (para a CPA) e atividade BAEE ou atividade BANE (para a Alcalase®). As soluções e suspensões eram incubadas em frascos fechados nas temperaturas ensaiadas (45 a 60°C). As condições (pH, temperatura e concentração do tampão) para cada ensaio serão detalhadas na discussão dos resultados. De acordo com a velocidade de inativação térmica da enzima nas condições ensaiadas, eram coletadas amostras em intervalos apropriados de tempo e as atividades residuais eram medidas imediatamente a 25°C. Para casos onde a inativação térmica da enzima solúvel era muito rápida, as amostras eram

rapidamente resfriadas para 25°C em banho de gelo, sendo medidas em seguida suas atividades residuais.

Um modelo de dois parâmetros (k_1 e α_1), proposto por Sadana e Henley (1987), foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica. Este modelo considera que uma simples etapa de inativação (equação 3.7) conduz a molécula de enzima a um estado final com alguma atividade residual. Neste estado, a enzima é muito mais estável e não se desdobra ou inativa para um outro estado, pelo menos para o intervalo de tempo ensaiado. O modelo de Sadana e Henley (1987) admite decaimento segundo uma reação de 1ª ordem para a fração $(1-\alpha_1)$ da enzima, sendo α_1 uma constante, conforme mostra a expressão (equação 3.8) da atividade em função do tempo.



$$a_R = (1 - \alpha_1) \exp(-k_1 t_1) + \alpha_1 \quad (3.8)$$

onde: a_R é a atividade relativa (A / A_0); α_1 é a razão entre a atividade enzimática do estado final, A , e a atividade enzimática do estado inicial, A_0 ; k_1 é a constante da taxa de desativação de primeira ordem (tempo^{-1}) e t_1 é o tempo ensaiado de inativação térmica. O parâmetro k_1 descreve o processo de desdobramento ou inativação da molécula de enzima e o parâmetro α_1 descreve o nível de estabilização da atividade.

O modelo foi ajustado aos dados experimentais usando o método iterativo de convergência Levenberg-Marquardt com uma confiança de 0,95. Os parâmetros k_1 e α_1 foram limitados a convergirem para valores maiores do que zero. As meias-vidas (tempo de inativação necessário para que a enzima perca 50% de sua atividade inicial) foram calculadas a partir da equação modelo ajustada aos dados experimentais, e os fatores de estabilidade da enzima foram calculados como a razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel.

Para casos onde o modelo não se ajustou razoavelmente aos dados experimentais meias-vidas foram determinadas diretamente a partir das curvas de inativação térmica (atividade residual em função do tempo).

3.2.6– Estabilidade a pH Alcalino

Soluções ou suspensões de CPA e Alcalase® eram preparadas em tampão bicarbonato de sódio 50 mM, pH 11,0 e incubadas a 25°C. De acordo com a velocidade de inativação da enzima nas condições ensaiadas, eram retiradas amostras em intervalos apropriados de tempo e o pH das amostras ajustado imediatamente para próximo da neutralidade com solução diluída de HCl. As atividades residuais eram determinadas de acordo com os procedimentos de medida de atividade enzimática descritos acima.

3.2.7 –Ensaio de temperatura-atividade enzimática

Eram preparadas soluções de CPA solúvel e suspensões de derivados estabilizados em tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 500 mM. As atividades enzimáticas eram medidas nas temperaturas de 25 a 80°C, com hipuril-L-fenilalanina como substrato, pelo procedimento descrito no item 3.2.3 (atividade H-PHE).

Para o caso de Alcalase®, eram preparadas soluções da enzima solúvel e suspensões de derivados estabilizados em tampão fosfato 100 mM (pH 8,0) e as velocidades iniciais de hidrólise eram medidas nas temperaturas de 40 a 80°C (pH 8,0), com caseína 0,1% (p/v) como substrato. A partir do consumo de solução de NaOH em pHsato modelo Titrimo (Metrohm Ltd., Suíça), necessário para manter o pH da reação constante, era determinado o número de ligações peptídicas hidrolisadas ($B \times N_b \times 1/\alpha$) em função do tempo de hidrólise em minutos. A tangente da região linear dessa curva (equação 3.9) correspondia à velocidade inicial de hidrólise (V_H), expressa em miliequivalentes de ligações peptídicas hidrolisadas por minuto (meqv/min) ou milimol de ligações peptídicas hidrolisadas por minuto (mmol/min).

$$B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} = V_H \times t \quad 3.9)$$

onde: B é o volume de base consumida durante a reação de hidrólise, expresso em mililitros; N_b é a normalidade da base (solução de NaOH), expressa em miliequivalentes por mililitro (meqv/mL); α é o grau médio de dissociação dos grupos α -NH₂ (valores tabelados para cada temperatura e pH, fornecidos por Adler-Nissen, 1986, p. 123) e t é o tempo da reação de hidrólise, em minutos.

3.2.8 – Ensaios de pH-atividade enzimática

As atividades enzimáticas de CPA solúvel e derivado CPA-glioxil agarose estabilizado eram medidas a 25°C pelo procedimento descrito no item 3.2.3 (atividade H-PHE). O substrato hipuril-L-Phe 1 mM era preparado em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0-8,0), tampão tris-HCl 25 mM (pH 7,2-9,0) e tampão bicarbonato 100 mM (pH 9,0-10,0).

Para Alcalase® não foram medidas neste trabalho as atividades em função do pH, pois já havia sido determinado por Sousa Jr., 2003, do grupo de pesquisa do DEQ/UFSCar, o pH ótimo (pH 9,5) para a hidrólise de proteínas, utilizando-se Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose 6%.

3.2.9 – Hidrólise de proteínas catalisadas por proteases

Dado à diversidade de experimentos realizados e a variabilidade das condições ao longo deste trabalho, detalhes de cada experimento serão discutidos à medida que se fizer necessário ao longo da discussão dos resultados. De modo geral, hidrólises de caseína ou proteínas de soro de queijo, após esterilização, por microfiltração em membrana de 0,45 µm (A/G Technology Corp., EUA) e concentração, por ultrafiltração em membrana com corte de 10 kDa (Amicon Inc., EUA), eram realizadas em pHstato modelo Titrino (Metrohm Ltd., Suíça), com agitação mecânica intensa e controle de temperatura e pH. Durante o curso da reação de hidrólise, os prótons liberados eram titulados com solução de NaOH na concentração apropriada para cada experimento. As velocidades iniciais de hidrólise eram calculadas pela equação 3.9 e o grau de hidrólise, para substratos hidrolisados por tripsina, quimotripsina e Alcalase®, eram calculados usando a equação 3.10, fornecida por Adler-Nissen (1986, p. 122).

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad (3.10)$$

onde: DH é o grau de hidrólise, definido como a porcentagem de ligações peptídicas hidrolisadas durante a reação proteolítica; B é o consumo de solução de NaOH em mililitros; MP é a massa de proteína determinada pelo método de Kjeldahl ($N \times f_N$), em gramas e h_{tot} é o

número total de ligações peptídicas no substrato: 8,2 meqv/g para caseína, e 8,8 meqv/g para proteínas do soro (valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986, p. 146-147).

Para substratos hidrolisados por carboxipeptidase A, aminoácidos eram determinados por cromatografia de troca iônica e o grau de hidrólise determinado utilizando-se a equação 3.11. As velocidades iniciais de hidrólise eram calculadas a partir da tangente das curvas de aminoácidos liberados em função do tempo.

$$DH = \frac{M_{AL}}{M_{AT}} \times 100\% \quad (3.11)$$

onde: M_{AL} é massa (em gramas) de aminoácidos liberados pela CPA por 100 g de proteínas e M_{AT} é a massa total (em gramas) de aminoácidos em 100 g de proteínas do soro (115,54 g de aminoácidos por 100 g de proteína, conforme Tabela 2.3).

3.2.10 – Fracionamento de hidrolisados de proteínas por cromatografia de exclusão de tamanho (SE-HPLC)

O fracionamento de hidrolisados de caseína e proteínas do soro de queijo foi realizado em uma coluna Superdex Peptide HR 10/30, usando-se tampão fosfato 0,02 M, pH 7,2 (contendo NaCl 0,25 M) como fase móvel, a uma vazão de 0,25 mL/min. Vinte e cinco microlitros de soluções de hidrolisados, 0,2 a 0,5% (p/v), eram injetados na coluna e os peptídios detectados a 214 nm. A distribuição de massa molecular dos peptídios fracionados era determinada de acordo com a metodologia de Souza *et al.* (no prelo-a): cinco padrões (SAB, β -Lg, insulina, angiotensina II e leucina encefalina) foram injetados na coluna e uma curva, concentração mássica ($N \times f_N$, em g/L) *versus* área cromatográfica do pico (em $\mu V \times \text{min}$), foi construída para cada padrão. O coeficiente linear das curvas foi assumido constante e igual a 0,03 g/L. Dessa forma, as tangentes puderam ser ajustadas como uma função da massa molecular, em Da, e estas, como uma função do tempo de retenção na coluna (t_R , em min), como mostram as equações 3.12 e 3.13, respectivamente.

$$\text{Tangente} = -9,14 \times 10^{-9} + 5,03 \times 10^{-9} \log (\text{MM}) \quad (3.12)$$

$$\log (\text{MM}) = 5,40 - 0,04 \times t_R \quad (3.13)$$

Combinando as equações 3.12 e 3.13, foi obtida uma equação geral que relaciona concentração mássica (C_p , em g/L) com área cromatográfica (A_c , em $\mu\text{V} \times \text{min}$), como uma função do tempo de retenção t_R (min), como mostra a equação 3.14.

$$C_p = 0,03 + [9,14 \times 10^{-9} + 5,03 \times 10^{-9} \times (5,40 - 0,04 \times t_R)] \times A_c \quad (3.14)$$

3.2.11 – Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de troca iônica

Para análise de aminoácidos foi usada uma coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na e as fases móveis A (tampão citrato de sódio 0,2 N, pH 3,2), B (citrato de sódio 0,6 N e ácido bórico, pH 10,0) e C (hidróxido de sódio 0,2 N) em um gradiente apropriado a uma vazão constante de 0,50 mL/min. Foram usados para derivatização pós-coluna dos aminoácidos as soluções RA (solução de ácido bórico-ácido carbônico, pH 10, contendo 0,04% (p/v) de hipoclorito de sódio comercial) e RB (solução 0,8 mg/mL de o-ftaldeído, contendo 0,4 mg/mL de Bry-35 e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol) a uma vazão total de 0,40 mL/min. A temperatura de análise era de 60°C e os aminoácidos derivatizados eram detectados por fluorescência (excitação a 350 nm e emissão a 450 nm).

Inicialmente, proteínas e peptídios presentes nas amostras de hidrolisados eram precipitados pela adição de ácido tricloroacético 2,4 M para uma razão final amostra/ácido igual a 1/1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante era diluído com tampão citrato de sódio 0,2 N (pH 2,2) e filtrado em membranas de 0,45 μm . Dez microlitros das amostras eram automaticamente injetados na coluna e um gradiente apropriado¹⁰ (Figura 3.1) era aplicado por 72 minutos.

A concentração de aminoácido (C_{AA}) era determinada por meio de curvas padrões (C_{AA} versus A_c) construídas para os vinte aminoácidos padrões.

¹⁰ Os valores tabelados do gradiente podem ser encontrados no Manual de instrução para análise de aminoácidos em HPLC LC-10A/C-R7A SHIMADZU, cap. 3, pg. 3-19.

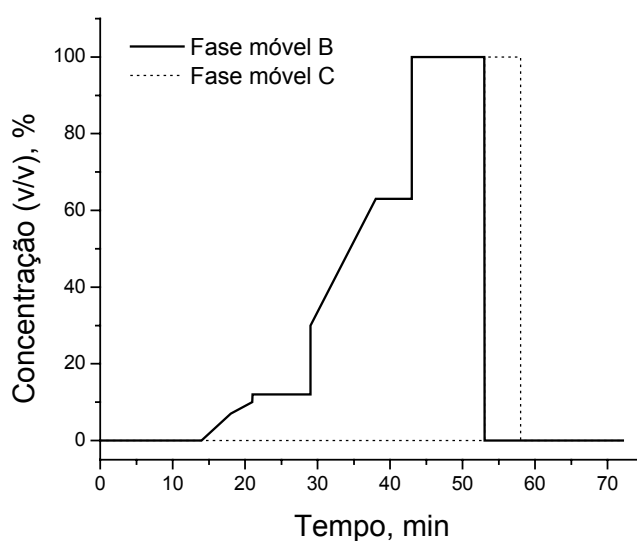


Figura 3.1 – Gradiente para análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica em coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na. A concentração da fase móvel A durante todo o tempo de análise é obtida por diferença com a fase móvel B (100% - concentração da fase móvel B).

3.2.12 – Eletroforese SDS-PAGE

Para a determinação da pureza das proteases tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A e Alcalase®, foram realizadas eletroforeses SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15% com 0,1% de SDS) em um sistema Hoefer modelo mini VE (Amersham Pharmacia Biotech Inc., EUA).

A seguir será descrita a preparação das principais soluções utilizadas.

- Tampão de separação, pH 8,8*: tris básico (18,17 g) era dissolvido em água destilada e o pH ajustado para 8,8 com HCl diluído. SDS (400 mg) era adicionado e o volume final completado para 100 mL com água destilada.
- Solução de acrilamida (30%) e bis-acrilamida (0,8%) – Acril-bis*: acrilamida (30 g) e bis acrilamida (800 mg) eram dissolvidas em água destilada e o volume final completado para 100 mL com água destilada.
- Persulfato de amônio 10% (p/v)*: persulfato de amônio (50 mg) era dissolvido em 500 μ L de água destilada.

- d) *Tampão de concentração, pH 6,8*: tris básico (6,06 g) era dissolvido em água destilada e o pH ajustado para 6,8. Após completar-se o volume para 100 mL com água destilada eram adicionados 400 mg de SDS.
- e) *Solução de bis acrilamida 2%*: para 100 mL de solução, eram dissolvidos 2 g de bis acrilamida em água destilada.
- f) *Tampão de ruptura*: tris básico (378 mg) era dissolvido em 15 mL de água destilada, o pH ajustado para 6,8 e adicionados 2,5 mL de mercaptoetanol, 1 g de SDS, 5 mL de glicerina e 3 mg de azul de bromofenol. O volume final era completado para 25 mL com água destilada.
- g) *Eletrólito*: tris básico (30,29 g) era dissolvido em aproximadamente 800 mL de água destilada e eram adicionados 144,4 g de glicina e 10 g de SDS, completando-se o volume para 1 L com água destilada. A solução final era então diluída 10 vezes para uso.
- h) *Corante azul brilhante de Coomassie*: em 454 mL de metanol 50% (v/v) e 46 mL de ácido acético eram dissolvidos 1,25 g de azul brilhante de Coomassie e o volume final completado para 500 mL com água destilada. Filtrava-se a solução de corante em filtro de papel.
- i) *Descorante*: para 1 L de solução aquosa eram misturados 370 mL de metanol e 11,3 mL de ácido acético glacial.

Primeiramente, gel de poliacrilamida 15% (contendo SDS 0,1%) era preparado misturando-se 1,25 mL de tampão de separação, 2,5 mL de solução Acril-bis, 1,22 mL de água destilada, 7 μ L de TEMED e 25 μ L de persulfato de amônio 10%. Esta solução era cuidadosamente transferida entre as placas de eletroforese, deixando-se 1 cm livre, onde era adicionado butanol para nivelar o gel. Após 1 hora de polimerização, preparava-se o gel de concentração 5% (750 μ L de tampão de concentração, 300 μ L de Acril-bis, 1,55 mL de água destilada, 200 μ L de bis-acrilamida 2%, 5 μ L de TEMED e 15 μ L de persulfato de amônio 10%). Depois de retirado o butanol, adicionava-se o gel de concentração 5% e introduzia-se o pente de eletroforese para a formação das pistas de aplicação de amostras. Após 1 hora de polimerização eram aplicados 8 μ L de amostra (diluída 1:1 com tampão de ruptura) por pista, sendo as primeiras e últimas pistas destinadas aos marcadores de massas moleculares (mistura de proteínas padrões com massas moleculares de 14,4 a 97,0 kDa). As placas contendo o gel

de eletroforese eram transferidas para uma cuba contendo eletrólito (800 mL no compartimento positivo e 100 mL no compartimento negativo). O tempo de corrida era de aproximadamente 1 h e 50 min a uma corrente constante de 20 mA por placa. O gel de eletroforese era retirado da célula e transferido para um recipiente contendo corante de azul brilhante de Coomassie. Após coloração por aproximadamente 1 hora, o gel de eletroforese era revelado com solução descorante e finalmente seco à temperatura ambiente entre folhas de papel celofane.

3.2.13 – Hidrólise ácida de enzima solúvel e imobilizada em glioxil-agarose

Enzima solúvel (1 mL) e imobilizada (1 g de derivado), contendo aproximadamente um miligrama de proteínas, eram transferidas para tubos com roscas. Cinco mililitros de HCl 6,8 N eram adicionados e as soluções desaeradas, sob vácuo, em ultra-som. Os frascos eram completamente vedados e levados à estufa por 24 horas a 105°C. Os hidrolisados de derivados eram filtrados em funil de vidro sinterizado, e ambos, hidrolisados de derivados e enzimas solúveis, eram secos sob vácuo em banho seco. O extrato de aminoácidos era dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2 N (pH 2,2) para posterior análise de aminoácidos de acordo com o item 3.2.11.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já mencionado anteriormente, pretendeu-se neste trabalho estudar as duas últimas etapas da hidrólise das proteínas do soro de queijo, catalisadas pela exoprotease CPA e pela endoprotease comercial Alcalase®, immobilizadas multipontualmente em glioxil-agarose. Portanto, uma das etapas deste trabalho consistiu em estudar a preparação dos derivados multipontuais das proteases citadas. Este estudo compreendeu a obtenção e a caracterização dos derivados, no que se refere ao rendimento de imobilização, a retenção de atividade e a estabilização da enzima imobilizada e a eficiência dos derivados glioxil-agarose na hidrólise de substratos macromoleculares em relação à enzima solúvel e a derivados preparados em suportes ativados por métodos convencionais (por exemplo, ativação com glutaraldeído e CNBr). Rendimento de imobilização, retenção de atividade e estabilização da enzima imobilizada foram definidas como segue:

- a) rendimento de imobilização (R_I) - razão entre atividade enzimática teoricamente imobilizada (A_{TI}) e atividade enzimática inicialmente oferecida (A_{IO});
- b) retenção de atividade (R_{EI}) - razão entre atividade enzimática medida na enzima imobilizada (A_{EI}) e atividade teoricamente imobilizada (A_{TI});
- c) A_{TI} - diferença entre A_{IO} e A_{SF} (atividade medida no sobrenadante antes da redução com borohidreto de sódio, ou seja, no final da imobilização);
- d) estabilização da enzima imobilizada-razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel.

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho dividindo-os em quatro tópicos, a saber:

- 4.1) imobilização e estabilização de CPA em suportes glioxil-agarose;
- 4.2) imobilização e estabilização de Alcalase® em suportes glioxil-agarose;
- 4.3) estudo cinético da hidrólise de resíduos carboxi-terminais catalisada por CPA imobilizada em glioxil-agarose-6%;
- 4.4) estudo cinético da hidrólise de polipeptídios catalisada por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-10%.

4.1 – Imobilização e Estabilização de CPA em Suportes Glioxil-Agarose

4.1.1 – Influência do grau de ativação do suporte

CPA foi inicialmente imobilizada a 20°C (pH 10,05) em suportes glioxil-agarose 6%, ativados com diferentes concentrações de grupos aldeídos alifáticos: 20, 40 e 70 μeqv de aldeídos/mL de suporte ($\mu\text{eqv/mL}$). A Figura 4.1 mostra as curvas de diminuição da atividade enzimática nos sobrenadantes das imobilizações. A partir das atividades medidas no sobrenadante no início (A_{IO}) e no final da imobilização (A_{SF}), calculou-se os rendimentos de imobilização (R_I) de 57, 100 e 92%, respectivamente para imobilizações de CPA em glioxil-agarose-6% ativada com 20, 40 e 70 $\mu\text{eqv/mL}$.

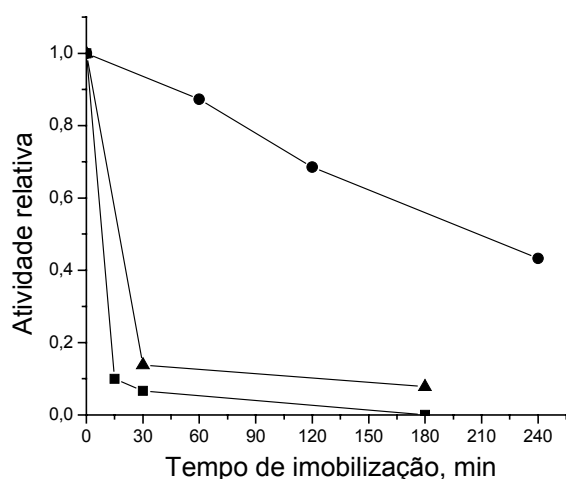


Figura 4.1 – Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de CPA em glioxil-agarose 6% (●) 20 $\mu\text{eqv/mL}$ (■) 40 $\mu\text{eqv/mL}$ e (▲) 70 $\mu\text{eqv/mL}$. Condições: 20°C, pH 10,05. A atividade inicial do sobrenadante da suspensão de imobilização foi considerada igual à unidade.

Segundo Guisán (1988), é esperada uma baixa velocidade de imobilização em suportes com baixa concentração de grupos aldeídos (20 $\mu\text{eqv/mL}$), pois o número de grupos aldeídos sobre o suporte determina a possibilidade total que a superfície do suporte tem para interagir com a enzima. No entanto, toda a enzima imobilizada permaneceria ativa, pois a possibilidade

de formar múltiplas ligações covalentes também seria muito limitada e, por conseguinte, nenhuma distorção da molécula de proteína seria possível. Entretanto, obteve-se retenções de atividades muito baixas (25 a 35%) para todos os derivados. Possíveis efeitos de atraso difusional não poderiam sozinhos explicar perdas tão grandes de atividade, pois cargas muito baixas foram oferecidas (entre 0,1 e 0,4 mg de proteína/mL de suporte) em relação à capacidade máxima dos suportes (até 40 mg/mL de suporte). Perdas tão significativas de atividade (aproximadamente 70%) em tão curto tempo de contato enzima-suporte foi uma grande surpresa a princípio, pois a literatura relatava retenções de atividade de até 100%, inclusive, obtidas experimentalmente no grupo de pesquisa do DEQ/UFSCar para as enzimas tripsina e quimotripsina (Galvão e Giordano, 2002). Porém, essas perdas eram prováveis dados à complexidade e à sensibilidade conferida à enzima pelo íon zinco, localizado no centro ativo da enzima e essencial para a atividade catalítica. Este íon está coordenado com resíduos de His e Glu, e qualquer mudança conformacional que destrua esta coordenação implicará na perda de atividade catalítica. Além disso, o resíduo Tyr²⁴⁸, na presença de substrato, move-se cerca de um quarto do diâmetro da proteína, sendo responsável pelo fechando da cavidade do centro ativo. Se alguma distorção da molécula, por menor que seja, impedir esse movimento implicará inevitavelmente na desativação da enzima (Whitaker, 1994).

O menor rendimento de imobilização obtido utilizando-se suporte ativado com 70 $\mu\text{eqv/mL}$ (R_1 de 92%) em relação ao rendimento de imobilização obtido utilizando-se suporte ativado com 40 $\mu\text{eqv/mL}$ (R_1 de 100%) deveu-se ao fato de ter-se utilizado tampão borato de sódio ao invés de tampão bicarbonato, pois segundo Blanco e Guisán (1988), o íon BO_3H^{2-} do tampão borato forma um complexo aldeído- BO_3H^{2-} , reduzindo a reatividade do suporte. Este fenômeno foi observado experimentalmente pela variação do pH do meio reacional durante a imobilização, devido à redução da força iônica do tampão. Utilizando-se tampão bicarbonato e suportes com alta ativação (70 $\mu\text{eqv/mL}$) as imobilizações foram rápidas e completas (R_1 de 100%).

4.1.2 – Influência de substrato e inibidor na recuperação de atividade

Segundo Blanco e Guisán (1988), um inibidor competitivo fortemente adsorvido no sítio ativo da enzima, pode tanto minimizar mudanças conformacionais distorsivas na molécula de proteína, durante a etapa de multi-interação enzima-suporte, quanto proteger a

enzima de efeitos negativos do borohidreto de sódio durante a etapa de redução (encerramento da reação). Portanto, CPA foi imobilizada na presença de um inibidor competitivo (Phe) e de um substrato (Gly-Tyr) cuja clivagem, segundo Stryer (1992), é catalisada lentamente pela enzima. Como estas moléculas possuem grupos aminos livres, que poderiam competir com a enzima pelos grupos aldeídos do suporte, foram adicionadas ao meio reacional trinta minutos após ter-se iniciado a reação, tempo este que já seria suficiente para ter imobilizado, em suporte com média ativação ($40 \mu\text{eqv/mL}$), mais de 60% da carga enzimática oferecida.

A Figura 4.2 mostra a influência dessas moléculas na diminuição da atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de CPA.

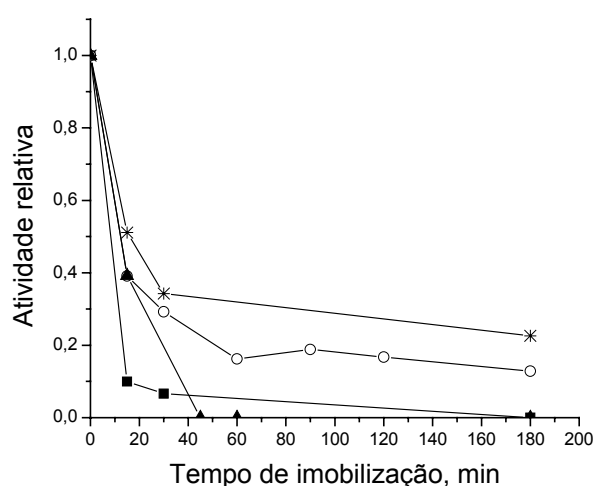


Figura 4.2 – Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de CPA em glioxil-agarose $40 \mu\text{eqv/mL}$, 20°C (pH 10,05), baixa carga enzimática ($\approx 0,24 \text{ mg de proteína/mL de suporte}$) e presença de (○) Phe 20 mM, (▲) Gly-Tyr 10 mM, (*) Gly-Tyr 100 mM e ausência de (■) inibidor ou substrato. A atividade inicial do sobrenadante da suspensão de imobilização foi considerada igual à unidade.

Phe 20 mM e Gly-Tyr 100 mM retardaram a imobilização da enzima, sendo ainda medida atividade enzimática no sobrenadante após três horas de reação. Quanto maior a concentração de inibidor ou substrato maior foi porcentagem de atividade não imobilizada. Os rendimentos de imobilização foram de 100%, 87% e 77%, respectivamente para imobilizações na presença de Gly-Tyr 10 mM, Phe 20 mM e Gly-Tyr 100 mM. Acontece que as ligações enzima (amino)-suporte (aldeído) são reversíveis e o que torna a molécula de enzima quimicamente ligada ao suporte é a formação de múltiplas ligações. Phe e Gly-Tyr,

por terem grupos aminos livres, provavelmente competiram com a enzima pelos grupos aldeídos do suporte, impedindo a formação de novas ligações entre a enzima imobilizada e o suporte ativado, facilitando assim a desorção da enzima do suporte. O que se pôde concluir de relevante desse experimento é que as perdas de atividade não deviam estar relacionadas com distorção da molécula de proteína durante o processo de imobilização, pois todas as retenções de atividades (27 a 32%) foram baixas e da mesma ordem daquelas obtidas anteriormente. Provavelmente, as perdas deviam estar relacionadas à etapa de encerramento da reação (redução com borohidreto de sódio), mas como nesse experimento o inibidor e o substrato (ambos com grupos aminos livres) já estavam, possivelmente, ligados ao suporte no final da imobilização, a etapa de redução ficou completamente desprotegida.

É importante salientar que perdas de atividade não estavam associadas à inativação da enzima solúvel nas condições da imobilização (20°C, pH 10), pois, em um ensaio controle da imobilização (contendo suporte inerte ao invés de suporte ativado) não se observou nenhuma perda de atividade, pelo menos dentro do intervalo de tempo que foram conduzidas as imobilizações (3 horas).

4.1.3 – Estabilidade térmica e alcalina de CPA solúvel e CPA-glioxil agarose

CPA solúvel e imobilizada foram inativadas a 60°C (pH 7,5) e o modelo de inativação térmica Sadana-Henley foi ajustado aos dados experimentais. Observa-se nas Figuras 4.3 e 4.4 que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais. Os parâmetros do modelo (k_1 e α_1) e as meias vidas, calculadas utilizando-se a equação 3.8, são mostrados na Tabela 4.1.

Observa-se na Figura 4.3 um aumento da meia-vida da enzima imobilizada com o aumento do grau de ativação do suporte (possibilidade de formação de múltiplas ligações enzima-suporte), embora todos atinjam um mesmo patamar de atividade residual (α_1), com o exceção do derivado CPA-glioxil 70 $\mu\text{eqv/mL}$, o qual foi preparado em tampão borato, e que como discutido anteriormente reduz as possibilidades globais de multi-interação enzima-suporte. Mesmo assim, sua meia-vida foi superior a dos outros derivados.

Embora a estabilidade do melhor derivado produzido não seja muito alta (24,4 vezes superior à enzima solúvel, conforme lista a Tabela 4.1), esta já é superior às obtidas em outros trabalhos reportados na literatura utilizando-se suportes ativadas por outros métodos. Vértesi *et al.* (1999) obtiveram para CPA imobilizada covalentemente em poliacrilamida, contendo grupos carboxílicos ativados, uma estabilização de três vezes (60°C, pH 7,5). Dua *et al.*

(1985) obtiveram para CPA immobilizada em copolímero de estireno-anidrido-maléico uma estabilização de 10 vezes (60°C, pH 6).

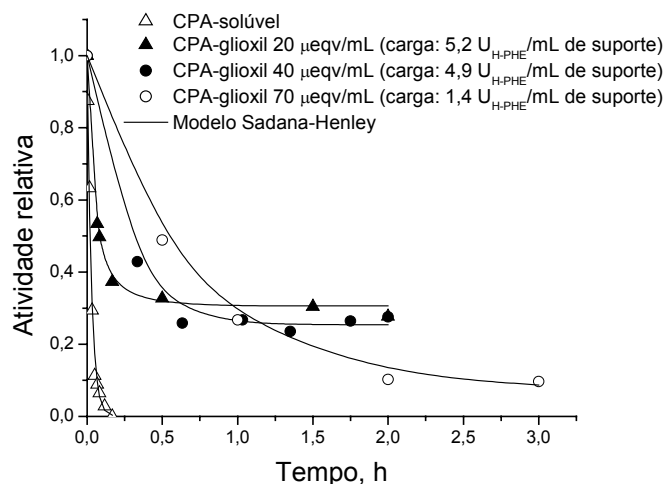


Figura 4.3 – Inativação térmica a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 50 mM) de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil agarose-6% preparados utilizando-se suportes ativados com diferentes concentrações de grupos aldeídos. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

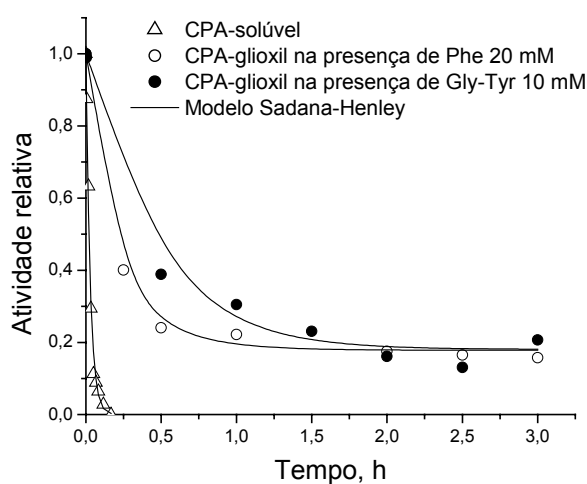


Figura 4.4 – Inativação térmica a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 50 mM) de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil agarose-6% preparados em suporte ativado com 40 μeqv/mL, na presença de Phe 20 mM e Gly-Tyr 10 mM. Ambos derivados com 3 U_{H-PHE}/mL de suporte. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

A presença de Phe e Gly-Tyr durante a imobilização, além de não proteger a enzima contra inativação, pois as retenções de atividade foram baixas para todos os derivados, reduziu a estabilidade da enzima imobilizada (Tabela 4.1). A competição entre inibidor e enzima pelos grupos ativos do suporte impediram a rigidificação da molécula de enzima imobilizada, tornando-a mais susceptível à inativação induzida pelo aquecimento. Uma maior rigidificação da enzima e, por conseguinte, uma maior estabilização, requer a formação de múltiplas ligações entre a enzima e o suporte, que por sua vez dependem de alinhamentos corretos entre grupos aminos da enzima já imobilizada e de grupos aldeídos do suporte. Inibidores, que possuam grupos aminos livres, poderão impedir a formação dessas novas ligações, levando à formação de derivados menos estáveis que aqueles preparados na ausência de inibidor competitivo.

Tabela 4.1 – Retenção de atividade (R_{EI}) de derivados CPA-glioxil agarose-6%, preparados a 25°C (pH 10,05), e meias-vidas^a ($t_{1/2}$) a 60°C (pH 7,5) de CPA solúvel e imobilizada.

Enzima ^b	R_{EI} (%)	$k_1 \pm \sigma$ (h ⁻¹)	$\alpha_1 \pm \sigma$	$t_{1/2}$ (min)	Estabilização
CPA solúvel	-	34,87 ± 1,89	0	1,19	1,0
CPA-glioxil - 20 µeqv/mL	34,8	15,82 ± 0,97	0,306 ± 0,010	4,84	4,1
CPA-glioxil - 40 µeqv /mL	25,2	4,64 ± 0,45	0,254 ± 0,011	14,33	12,0
CPA-glioxil - 70 µeqv /mL	30,3	1,62 ± 0,05	0,080 ± 0,009	29,03	24,4
CPA-glioxil - 40 µeqv /mL (presença de Phe 20 mM)	31,5	5,17 ± 0,37	0,178 ± 0,010	10,88	9,1
CPA-glioxil - 40 µeqv /mL (presença de Gly-Tyr 10 mM)	26,8	2,44 ± 0,33	0,181 ± 0,021	23,18	19,5

^aOs parâmetros k_1 e α_1 do modelo de inativação térmica (equação 3.8) foram utilizados nos cálculos das meias-vidas

^bEsta coluna indica a forma da enzima, o grau de ativação do suporte empregado na preparação dos derivados e o inibidor competitivo e sua concentração no meio reacional.

A tabela 4.1 mostra que CPA imobilizada na presença de Phe foi cerca de duas vezes menos estável que a enzima imobilizada na presença de Gly-Tyr. Como já comentado, a clivagem deste substrato é catalisada lentamente pela CPA e, portanto, a ligação do substrato ao sítio ativo da enzima deve ser lenta, comparada à ligação da Phe, pela qual a enzima parece ter uma alta afinidade. Assim, sendo rápido o ligamento e o desligamento da Phe no sítio

ativo, tornará a molécula de enzima menos flexível e, portanto, dificultará alinhamentos corretos entre grupos aminos e grupos aldeídos impedindo a formação de múltiplas ligações enzima-suporte, produzindo-se assim derivados menos rígidos e menos estáveis.

A Figura 4.5 mostra a estabilidade da enzima ao pH alcalino. CPA immobilizada em glioxil-agarose-6% com baixa ativação (20 $\mu\text{eqv/mL}$) mostrou-se 5,5 vezes mais estável que a enzima solúvel. O derivado preparado em glioxil-agarose com média ativação (40 $\mu\text{eqv/mL}$) mostrou-se muito estável, exibindo uma atividade residual de aproximadamente 70% após 2,5 horas, não sendo possível determinar a meia-vida da enzima immobilizada para o tempo ensaiado utilizando o modelo de Sadana e Henley (1987), pois α_1 era maior que 0,5.

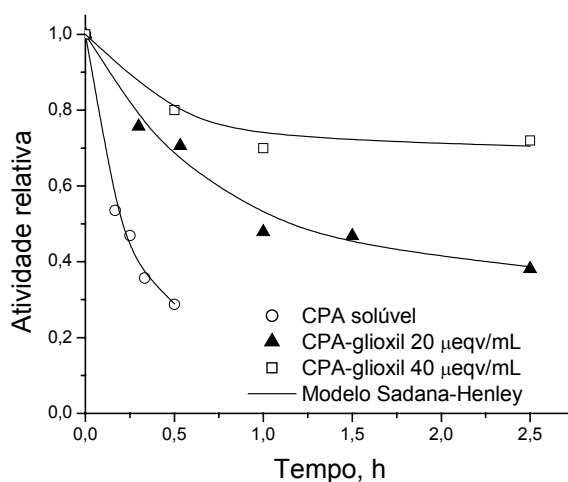


Figura 4.5 – Inativação de CPA solúvel e derivados CPA-glioxil (ambos com 5 $U_{\text{HPHE/mL}}$ de suporte) a 25°C, pH 11 (tampão bicarbonato de sódio 50 mM). Os parâmetros do modelo de inativação ajustado aos dados experimentais e a meia-vida calculada pela equação 3.8 foram: (○) $k_1 = 5,25 \pm 0,61 \text{ h}^{-1}$; $\alpha_1 = 0,234 \pm 0,036$; $t_{1/2} = 12 \text{ min}$, (▲) $k_1 = 1,43 \pm 0,23 \text{ h}^{-1}$; $\alpha_1 = 0,369 \pm 0,038$; $t_{1/2} = 66 \text{ min}$ e (□) $k_1 = 2,59 \pm 0,75 \text{ h}^{-1}$; $\alpha_1 = 0,705 \pm 0,022$; com $\alpha_1 > 0,5$ não foi possível determinar $t_{1/2}$ pelo modelo de Sadana-Henley. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

Pôde-se concluir que suportes com alta ativação (70 $\mu\text{eqv/mL}$) possibilitaram a produção de derivados CPA-glioxil mais estabilizados. Todavia, fazia-se necessário ainda verificar se havia desativação da enzima durante a etapa de imobilização, pois caso não houvesse, as perdas de atividade deveriam estar relacionadas com a etapa de redução. Assim, esta etapa deveria ser conduzida na presença de um inibidor competitivo que protegesse

eficientemente o sítio ativo da enzima, permitindo retenções de atividade aceitáveis, como será discutido a seguir. Contornado esse problema, foi investigada a influência do tempo de contato enzima-suporte na estabilização da enzima e na retenção de atividade, visando a obtenção de derivados ativos e estáveis para serem utilizados em reações de hidrólises a moderadas ou altas temperaturas, evitando-se problemas de contaminação microbiana do meio.

4.1.4 – Seleção de inibidores competitivos da CPA

Nesta etapa, investigou-se a influência de Phe, Tyr e Trp na atividade catalítica da CPA. Estes aminoácidos são preferencialmente liberados por esta enzima durante a hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminal de substratos protéicos.

As velocidades iniciais de hidrólise de hipuril-L-Phe (0,2 – 1,0 mM), catalisada por CPA solúvel (0,03 U_{H-PHE}/mL de reator), foram medidas a 25°C (pH 7,5), na ausência e na presença de 4,8 mM de Phe, 1,0 mM de Tyr e 5,0 mM de Trp.

Verificou-se que tanto Phe como Tyr inibem competitivamente a hidrólise de hipuril-L-Phe. As velocidades de hidrólise do dipeptídeo não eram influenciadas pela presença de Trp. As constantes cinéticas K_M , k e K_I do modelo de Michaelis-Menten, determinadas pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, eram de: $K_M = 0,93$ mM, $k = 1,96$ $\mu mol/(min \times U_{H-PHE})$, $K_I = 4,0$ mM (para Phe) e $K_I = 1,5$ mM (para Tyr). Embora CPA tenha maior afinidade por Tyr, Phe também foi selecionada para se estudar a influência desses inibidores competitivos na etapa de redução com borohidreto de sódio.

4.1.5 – Imobilização de CPA em glioxil-agarose 6% na presença e ausência de inibidor competitivo durante a etapa de redução com borohidreto de sódio

Primeiramente, CPA foi imobilizada em glioxil-agarose-75 $\mu eqv/mL$ de suporte, a 20°C (pH 10,05), por 3 horas de reação, na ausência de inibidor competitivo e baixa carga enzimática (< 0,5 mg de proteína/mL de suporte). As imobilizações eram rápidas e com rendimentos de 100% (após 30 minutos de reação, nenhuma atividade era medida no sobrenadante da suspensão de imobilização) e a enzima solúvel mantinha-se totalmente ativa durante o período de 3 horas. A atividade da enzima imobilizada foi medida antes e após a

redução com borohidreto de sódio. Verificou-se que as retenções de atividade na enzima imobilizada, antes da redução, eram de aproximadamente 100% (mostrando que não havia resistência difusional para as cargas enzimáticas utilizadas) e após a redução, em torno de 32%, como observado em imobilizações anteriores. Portanto, toda a perda de atividade da enzima imobilizada, com curto tempo de reação, devia-se exclusivamente a redução dos derivados com borohidreto, provavelmente por ser capaz de reduzir o íon Zn^{2+} no sítio ativo da enzima, necessário para a catálise. Fazia-se necessário, portanto, o uso de inibidores competitivos somente durante a etapa de redução.

A Tabela 4.2 mostra os resultados de imobilizações realizadas a 20°C (pH 10,05) por 24 horas, com a etapa de redução realizada na ausência de inibidor e na presença de 20 mM de Phe e 10 mM de Tyr. Resultados mostram que a enzima imobilizada perdeu em média 24% da atividade inicial em 24 horas de reação. Embora a enzima solúvel, a 20°C (pH 10,05) perca em torno de 10% de atividade em 24 horas, a enzima insolubilizada (após os 30 minutos iniciais não havia mais enzima no sobrenadante) já é mais estável e, portanto, pode-se associar toda perda de atividade à distorção da molécula de proteína promovida pelas ligações covalentes enzima-suporte. A enzima na ausência de inibidor novamente perdeu, após redução com borohidreto, 70% da atividade retida antes da redução, enquanto na presença de Phe (20 mM) e Tyr (10 mM) a enzima perdeu 31% e 7%, respectivamente. A maior proteção do sítio ativo pela Tyr confirma a maior afinidade da enzima por este aminoácido. Portanto, fazendo-se o encerramento da reação com a enzima protegida por Tyr, foi possível preparar a 20°C (pH 10,05 e 24 horas de interação enzima-suporte) um derivado CPA-glioxil com um rendimento de imobilização de 100% e uma retenção de atividade de 70%.

Tabela 4.2 – Preparação de derivados CPA-glioxil a 20°C (pH 10,05), 24 horas. Suporte: glioxil-agarose-6% ativado com 75 µeqv de aldeídos/mL de suporte.

Inibidor	Atividade Enzimática U_{H-PHE} / mL de suporte		^b R_{EI} antes da redução (%)	Atividade medida na EI após redução (U_{H-PHE} /mL)	R_{EI} após redução (%)
	Oferecida para imobilização	Medida na EI ^a antes da redução			
<i>Ausente</i>	16,9	13,0	77	3,9	23
<i>Phe 20 mM</i>	24,5	18,4	75	12,7	52
<i>Tyr 10 mM</i>	24,5	18,4	75	17,2	70

^aEnzima Imobilizada.

^bRetenção de atividade na enzima imobilizada.

Enzima solúvel e derivado CPA-glioxil-24h (derivado reduzido na presença de 10 mM de Tyr após 24 horas de reação) foram inativados a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 25 mM). As atividades residuais eram medidas a 25°C (pH 7,5) conforme protocolo de medida de atividade enzimática - atividade H-PHE.

Meias-vidas (1,2 min para CPA solúvel e 55 min para CPA imobilizada), calculadas pela equação 3.8, usando os parâmetros do modelo Sadana-Henley ajustado aos dados de inativação térmica (Figura 4.6), mostraram que a enzima imobilizada era 45,8 vezes mais estável que a enzima solúvel. Portanto, variando o tempo de contato enzima-suporte de 3 para 24 horas, a estabilidade da enzima imobilizada, em relação à enzima solúvel, variou de 24,4 para 45,8 vezes.

Assim, vê-se que o tempo de interação enzima-suporte exerce um importante efeito na estabilização da enzima, promovendo a formação de ligações covalentes multipontuais e, por conseguinte, conferindo maior rigidez à molécula de enzima imobilizada.

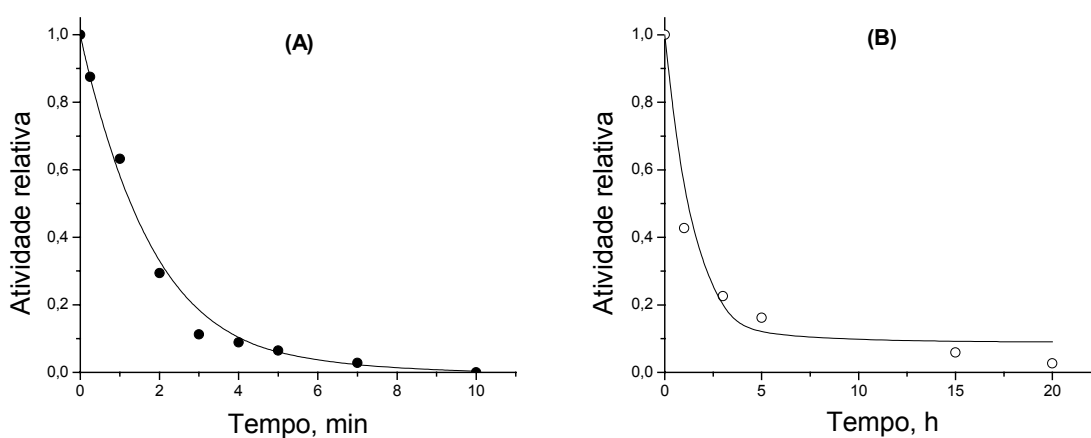


Figura 4.6 – Inativação térmica de (A) CPA solúvel e (B) derivado CPA-glioxil (preparado em glioxil-agarose 6%-75 $\mu\text{eqv/mL}$, com 24 h a 25°C, pH 10,05 e redução com Tyr 10 mM) a 60°C, pH 7,5 (tampão tris-HCl 25 mM). Parâmetros do modelo de inativação térmica: k_1 igual a $(34,87 \pm 1,89) \text{ h}^{-1}$ e α_1 igual a zero, para CPA solúvel; k_1 igual a $(0,867 \pm 0,17) \text{ h}^{-1}$ e α_1 igual a $0,091 \pm 0,04$, para CPA-glioxil. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

4.1.6 – Imobilização de CPA em diferentes temperaturas (20 e 25°C) e diferentes suportes (glicoxil e glutaraldeído-agarose)

Primeiramente, estudou-se a influência da temperatura na retenção de atividade e na estabilização dos derivados. Neste estudo, derivados de CPA foram produzidos a 20 e 25°C \pm 0,5°C, em um reator termostatisado. A enzima solúvel no pH 10,05 perdia 10% e 15%, respectivamente para 20 e 25°C, após 24 horas.

A Tabela 4.3 mostra que as retenções de atividade dos derivados preparados com 24 horas de reação eram de 70% e 55%, respectivamente quando preparados a 20 e 25°C. Embora a retenção de atividade do derivado preparado a 20°C era 15% maior que aquela obtida a 25°C, a estabilidade térmica do derivado preparado na temperatura mais alta era 2,5 vezes maior. O aumento de 15 horas na meia-vida do derivado preparado a 25°C deveu-se a maior estabilização da enzima, promovida pela maior rigidez da molécula de enzima imobilizada, devido à formação de um maior número de ligações covalentes enzima-suporte, sendo, portanto, a temperatura escolhida para a imobilização da CPA.

Tabela 4.3 – Parâmetros de imobilização^a de CPA em glicoxil-agarose-6% (24 h de reação, pH 10,05) e meias-vidas^b ($t_{1/2}$) dos derivados a 50°C, pH 7,0 (tampão tris-HCl 100 mM)

Temperatura de imobilização (°C)	R _I (%)	R _{EI} (%)	$t_{1/2}$ (horas)
20	100	70	10,1
25	100	55	25,4

^aRendimento de imobilização (R_I) e retenção de atividade na enzima imobilizada (R_{EI}).

^bCalculadas utilizando-se a equação 3.8 (parâmetros do modelo de inativação ajustado aos dados experimentais: $k_1 = (0,120 \pm 0,019) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0,289 \pm 0,035$, para 20°C, e $k_1 = (0,092 \pm 0,014) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0,447 \pm 0,027$, para 25°C).

Finalmente, investigou-se a influência do tipo de ativação do suporte (aldeídos gerados por ativação com glicidol, seguido de oxidação com periodato de sódio, ou por ativação com glutaraldeído) na retenção de atividade e na estabilidade da enzima imobilizada. CPA foi imobilizada em suportes glicoxil-agarose com duas concentrações de grupos aldeídos (20 $\mu\text{eqv/mL}$ e 75 $\mu\text{eqv/mL}$) e suporte glutaraldeído-agarose. As reações foram realizadas a 25°C,

pH 10,05 (suportes glioxil-agarose) ou pH 7,0 (suporte glutaraldeído-agarose), com curto tempo de contato enzima-suporte (1 hora) e redução com borohidreto de sódio na presença de 10 mM de tirosina. Todos os derivados foram preparados com baixa carga (< 1 mg de proteína/mL de suporte) para evitar problemas difusionais intrapartícula.

O rendimento de imobilização em suporte glioxil-agarose 20 $\mu\text{eqv/mL}$ foi baixo (em torno de 23%), pois a baixa concentração de grupos aldeídos restringe a possibilidade da enzima interagir com o suporte. No entanto, após redução com borohidreto de sódio, a retenção de atividade foi de 94%. O rendimento de imobilização em suportes glioxil-agarose 75 $\mu\text{eqv/mL}$ e glutaraldeído-agarose foi de 100% e as retenções de atividade, antes da redução com borohidreto de sódio, foram de 86% e 97%, respectivamente para CPA-glioxil e CPA-glutaraldeído. Após redução na presença de 10 mM de Tyr, as retenções de atividade diminuíram para 78% e 93%, respectivamente.

A Tabela 4.4 mostra, a partir das meias-vidas calculadas pelo modelo de inativação (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais (Figura 4.7), que o derivado preparado no suporte com baixa concentração de grupos aldeídos já era 9,9 vezes mais estável que o derivado preparado no suporte ativado pelo método convencional (ativação com glutaraldeído). Enquanto este derivado era somente 2,2 vezes mais estável que a enzima solúvel, o derivado CPA preparado no suporte glioxil-agarose com alta concentração de grupos aldeídos era 48,1 vezes mais estável que a enzima solúvel.

Tabela 4.4 – Retenção de atividade (R_{EI}) de derivados preparados a 25°C (pH 10,05) com uma hora de reação, meias-vidas^a a 45°C (pH 7,0) dos derivados e de CPA solúvel.

Suporte	R_{EI} (%) após redução com NaBH_4	$k_1 \pm \sigma$ (h^{-1})	$\alpha_1 \pm \sigma$	Meia vida (h)	Estabilização em relação à enzima solúvel
CPA-solúvel	-	$0,954 \pm 0,131$	$0,301 \pm 0,036$	1,32	1
CPA-Glutaraldeído-agarose	93	$0,468 \pm 0,061$	$0,327 \pm 0,033$	2,90	2,2
CPA-Glioxil-agarose (20 $\mu\text{eqv mL}^{-1}$)	94	$0,052 \pm 0,003$	$0,356 \pm 0,014$	28,81	21,8
CPA-Glioxil-agarose (75 $\mu\text{eqv mL}^{-1}$)	78	$0,011 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,093$	63,47	48,1

^aOs parâmetros k_1 e α_1 do modelo de inativação térmica (equação 3.8) foram utilizados nos cálculos das meias-vidas.

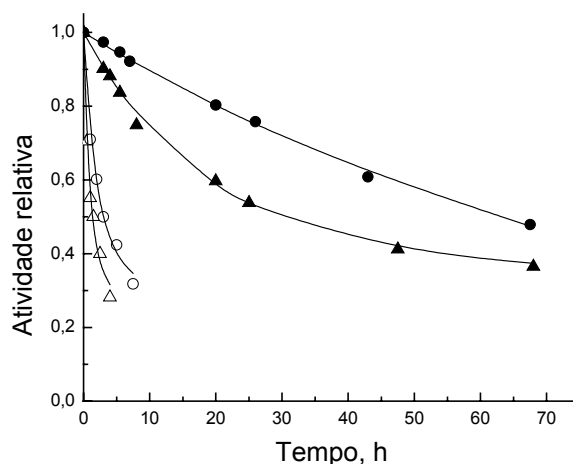


Figura 4.7 – Inativação térmica a 45°C, pH 7,0 (tampão tris-HCl 100 mM) de (△) CPA solúvel, (○) CPA-glutaraldeído, (▲) CPA-glioxil 20 µeqv/mL e (●) CPA-glioxil 75 µeqv/mL. Os derivados foram preparados a 25°C (pH 10,05) com 1 hora de contato enzima-suporte e reduzidos na presença de tirosina 10 mM. As curvas foram obtidas a partir do modelo de Sadana-Henley (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

4.1.7 – Otimização de derivados CPA-glioxil: influência do tempo de contato enzima-suporte

Como já comentado anteriormente, o tempo de imobilização é uma variável que controla a atividade e a estabilidade final da enzima imobilizada. Portanto, verificou-se a influência desta variável imobilizando CPA (baixa carga) em glioxil-agarose 75 µeqv/mL, a 25°C (pH 10,05), reduzindo os derivados após diferentes tempos de contato enzima-suporte (1 a 72 horas) e inativando-os, juntamente com um derivado de referência (CPA-glioxil 20 µeqv/mL) a 50°C, pH 7,0 (tampão tris-HCl 100 mM). A Tabela 4.5 lista as meias-vidas dos derivados, calculadas pela equação 3.8. A estabilização da enzima imobilizada aumentou de 37,3 vezes (derivado reduzido com 1 hora) para 213,4 vezes (derivado reduzido com 48 horas), enquanto a retenção de atividade diminuiu de 78% (1 h de contato enzima-suporte) para 42% (48 h de contato enzima-suporte). Para tempos mais prolongados, a estabilidade térmica diminuiu bruscamente, enquanto a atividade recuperada continuava a cair lentamente, conforme mostra a Figura 4.8. Dessa forma, selecionou-se o tempo de 48 horas como o tempo

ótimo de imobilização de CPA. A retenção de atividade pode ser considerada muito boa considerando-se o mecanismo catalítico desta enzima, que requer a coordenação do íon zinco com as cadeias laterais do Glu⁷², His¹⁹⁶ e His⁶⁹ e grande movimento da hidroxila do resíduo Tyr²⁴⁸.

Tabela 4.5 – Retenção de atividade (R_{EI}) e meias-vidas^a ($t_{1/2}$) a 50°C (pH 7,0) de derivados de CPA preparados a 25°C (pH 10,05) e com 1 a 72 horas de reação.

Derivado	R_{EI} após redução com NaBH ₄	$k_1 \pm \sigma$ (h ⁻¹)	$\alpha_1 \pm \sigma$	Meia vida (h)	Estabilização em relação enzima solúvel ^b
Referência	94	0,284 ± 0,005	0,224 ± 0,006	3,64	21,8
CPA-glioxil-1h	78	0,232 ± 0,011	0,346 ± 0,014	6,23	37,3
CPA-Glioxil-3h	63	0,168 ± 0,014	0,405 ± 0,019	10,92	65,4
CPA-Glioxil-6h	62	0,141 ± 0,013	0,410 ± 0,020	13,33	79,8
CPA-Glioxil-24h	56	0,092 ± 0,014	0,447 ± 0,027	25,49	152,6
CPA-Glioxil-48h	42	0,051 ± 0,008	0,403 ± 0,032	35,63	213,4
CPA-Glioxil-72h	38	0,118 ± 0,019	0,441 ± 0,023	19,06	114,2

^aOs parâmetros k_1 e α_1 do modelo de inativação térmica (equação 3.8) foram utilizados nos cálculos das meias-vidas.

^b($t_{1/2}$ derivado/ $t_{1/2}$ referência) x Estabilização do derivado de referência a 45°C

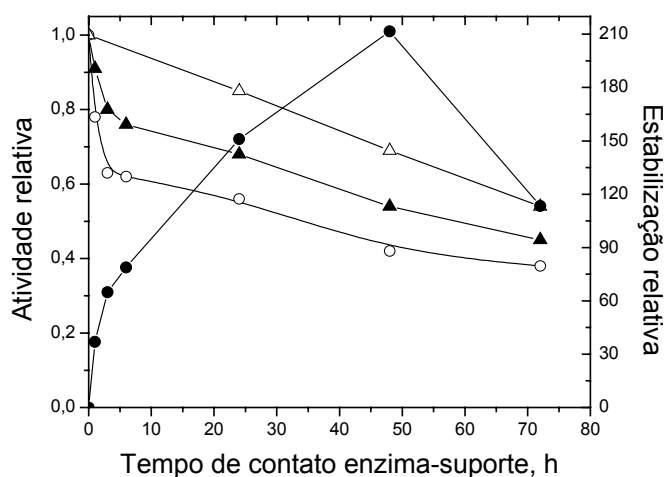


Figura 4.8 – Acompanhamento da imobilização de CPA em glioxil-agarose 6%-75 µeqv/mL. (Δ) atividade da enzima solúvel a 25°C, pH 10,05, (▲) retenção de atividade no derivado não reduzido, (○) retenção de atividade no derivado reduzido e (●) estabilização em relação à enzima solúvel a 50°C, pH 7,0.

A análise de aminoácidos dos hidrolisados de CPA solúvel e do derivado CPA-glioxil-48h (Tabela 4.6) mostrou que o conteúdo de resíduos de lisina diminuiu aproximadamente 30% (de 4,4% para a enzima solúvel, para 3,1% para a enzima imobilizada), enquanto apenas um erro experimental de aproximadamente 3% foi observado para os outros aminoácidos. Portanto, 30% dos resíduos de lisina envolveram-se nas ligações covalentes enzima-suporte, indicando que o aumento na estabilidade da enzima imobilizada é uma consequência da rigidez da molécula de enzima, promovida pela formação de ligações covalentes multipontuais enzima-suporte. Como a CPA têm 15 resíduos de lisina por molécula¹¹ e a enzima usada neste trabalho era relativamente pura (Figura 4.9), pode-se acreditar que de 4 a 5 resíduos de lisina por molécula de enzima ligaram-se ao suporte.

Tabela 4.6 - Aminoácidos dos produtos da hidrólise ácida de CPA solúvel e CPA-glioxil-48h. Hidrólise realizada em HCl 6 N a 110°C por 24 horas. Aminoácidos analisados por cromatografia líquida de troca iônica.

Aminoácido	Porcentagem de área cromatográfica $\pm \sigma$	
	CPA solúvel	CPA-glioxil-48h
Asp	7,9 \pm 0,9	7,5 \pm 0,7
Glu	18,5 \pm 1,0	19,0 \pm 1,0
Gly	22,7 \pm 0,6	23,0 \pm 0,5
Ala	11,0 \pm 0,5	11,4 \pm 0,4
Ileu	14,9 \pm 0,4	14,8 \pm 0,3
Leu	11,6 \pm 0,9	12,0 \pm 0,8
Phe	9,0 \pm 0,3	9,3 \pm 0,3
Lys	4,4 \pm 0,4	3,1 \pm 0,2

É possível preparar derivados CPA-glioxil mais estáveis usando como suporte glioxil-agarose-10%, todavia, desfavorecendo muito a retenção de atividade. A imobilização da enzima em glioxil-agarose-10%, contendo 180 $\mu\text{eqv/mL}$, a 25°C (pH 10,05) mostrou que a suspensão perdeu aproximadamente 65% da atividade inicial em 24 horas de reação, enquanto a perda era de somente 26% quando glioxil-agarose-6% (contendo 75 $\mu\text{eqv/mL}$) era usado. Possivelmente, a formação de muitas ligações multipontuais, devido à alta concentração de grupos aldeídos, pode acarretar severas distorções da molécula de enzima, facilitando a perda do íon zinco do sítio catalítico.

¹¹ Fonte: Protein Data Bank

Curiosamente Pedroche *et al.* (2002) imobilizaram CPA em glioxil-agarose-10%, com 220 μeqv de grupos aldeído por mililitro de suporte, e obtiveram um derivado com uma retenção de atividade em torno de 55% sem usarem inibidor competitivo durante a etapa de redução com borohidreto de sódio, sendo o derivado preparado com 3 horas de reação aproximadamente 1000 vezes mais estável que a enzima solúvel. Provavelmente a enzima utilizada por eles deveria ser originária de outra fonte ou de alguma forma estabilizada pelo fabricante, pois a meia-vida a 50°C (pH 7,5) da enzima solúvel era aproximadamente 4 vezes superior à que tem observado para a CPA do pâncreas bovino (entre 15 e 20 minutos).

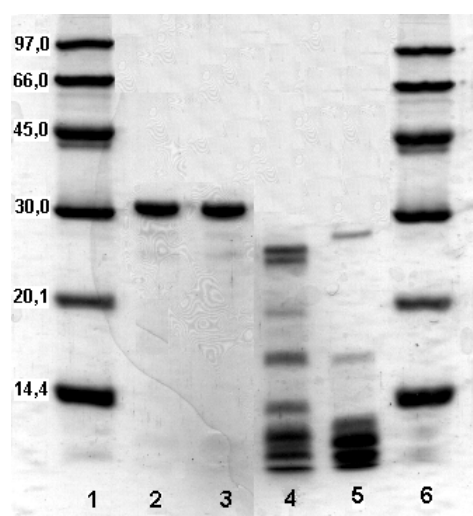


Figura 4.9 – Eletroforese SDS-PAGE de proteases usando gel de poliacrilamida 15%. Pistas 1 e 6: padrões de massa molecular em kDa (aplicado 11,5 μg de proteínas); pistas 2 e 3: CPA (aplicado 4,0 μg de proteínas); pista 4: tripsina (aplicado 8,0 μg de proteínas) e pista 5: quimotripsina (aplicados 8,0 μg de proteínas). O tempo de corrida da eletroforese foi de 1 h e 50 min a 20 mA por placa.

A inativação térmica desses derivados a 50°C, pH 7,0 (Figura 4.10) mostrou que o derivado CPA-glioxil agarose-10% era em torno de duas vezes mais estável que o derivado CPA-glioxil agarose-6% (meias-vidas eram de 49,5 e 25,5 horas, respectivamente). O ganho em estabilidade não justifica, todavia, a utilização do suporte glioxil-agarose-10%, devido à baixa retenção de atividade da enzima imobilizada e ainda, a possíveis maiores problemas difusionais quando cargas mais altas forem usadas.

Finalizando, as condições ótimas de preparação de derivados CPA-glioxil estabilizados e com boa retenção de atividade são:

- Suporte: glioxil-agarose-6%, com 75 μeqv de aldeídos/mL de suporte;
- Imobilização a 25°C, pH 10,05 (tampão bicarbonato 100 mM), 48 horas, ausência de inibidor competitivo durante o processo de insolubilização/estabilização, relação $V_{\text{SUPPORTO}}/V_{\text{SUSPENSÃO}}$ igual a 1/5.
- Redução com borohidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) a 25°C, pH 10,05, 30 minutos, presença de 10 mM de tirosina, relação $V_{\text{SUPPORTO}}/V_{\text{SUSPENSÃO}}$ igual a 1/10.

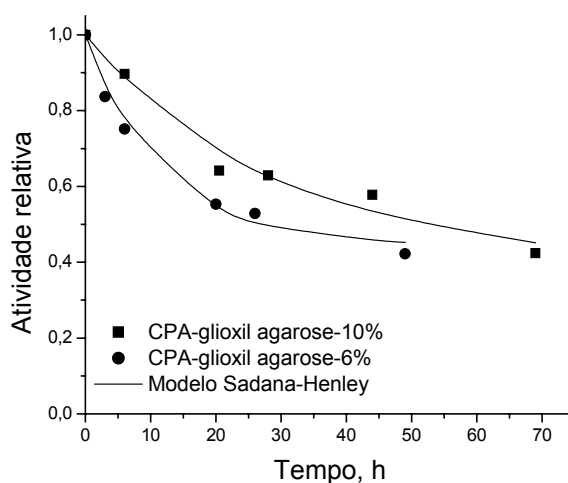


Figura 4.10 – Inativação térmica (50°C, pH 7,0) de derivados de CPA preparados sobre (●) glioxil-agarose-6% (75 $\mu\text{eqv/mL}$) e (■) glioxil-agarose 10B-CL (180 $\mu\text{eqv/mL}$). Parâmetros do modelo de inativação ajustado aos dados experimentais: $k_1 = (0,036 \pm 0,009) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0,399 \pm 0,067$ (CPA-glioxil agarose-10%) e $k_1 = (0,092 \pm 0,014) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0,447 \pm 0,027$ (CPA-glioxil agarose-6%). A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

4.1.8 – Influência da temperatura na atividade enzimática e na estabilidade térmica da CPA imobilizada

Solução de CPA solúvel e suspensão do derivado CPA-glioxil-48h, contendo a mesma atividade inicial (5,58 $U_{\text{H-PHE/mL}}$), foram preparadas em tampão tris-HCl 25 mM (contendo NaCl 500 mM), pH 7,5 e as atividades foram medidas em diferentes temperaturas (25 a 80°C), usando hipuril-L-Phe 1 mM como substrato.

A Figura 4.11 mostra os perfis de temperatura e atividade para a enzima solúvel e imobilizada, onde pode se observar que a atividade catalítica máxima da enzima solúvel foi obtida em 50°C (22,8 U_{H-PHE}/mL), enquanto a atividade catalítica máxima da enzima imobilizada foi obtida em 70°C (30 U_{H-PHE}/mL). Este deslocamento de 20°C da temperatura ótima aparente indica uma maior rigidez da molécula de enzima imobilizada, que demora mais para se inativar, e também que a reação catalisada pela CPA imobilizada é menos acelerada com a temperatura, devido a sua menor energia de ativação (Figura 4.12). Além da atividade máxima da enzima imobilizada ter sido maior, o decréscimo da atividade a altas temperaturas foi menor. Enquanto a 80°C a enzima solúvel reteve aproximadamente 20% de sua atividade máxima, o derivado CPA-glioxil-48h preservou aproximadamente 70%.

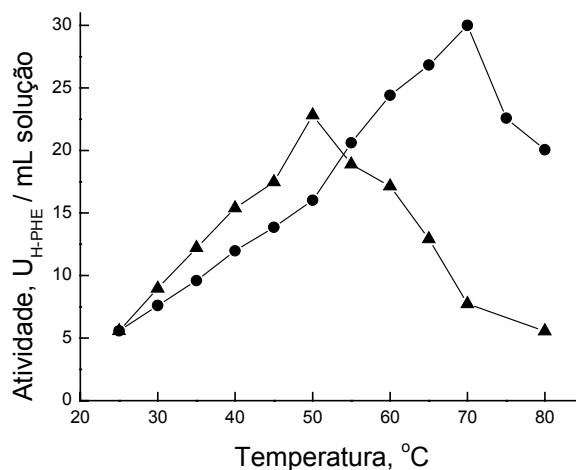


Figura 4.11 – Atividades enzimáticas de (▲) CPA solúvel e (●) CPA-glioxil-48h em função da temperatura (25 a 80°C), medidas no pH 7,5 com hipuril-L-Phe 1 mM como substrato.

A Figura 4.13 (A) mostra que a meia-vida a 45°C da CPA imobilizada era 58,8 vezes maior que a meia-vida a 55°C, enquanto, a partir da Figura 4.11, pode se observar uma redução na atividade enzimática de somente 1,5 vezes (a atividade da CPA imobilizada variou de 21 U_{H-PHE}/mL, a 55°C, para 14 U_{H-PHE}/mL, a 45°C). O aumento na estabilidade da enzima imobilizada foi o fator determinante para se escolher a temperatura de 45°C para as hidrólises de polipeptídios. Nesta temperatura, a partir dos resultados mostrados na Figura 4.13 (A e B), pôde-se estimar uma meia-vida de aproximadamente 10 dias¹² para o derivado CPA-glioxil

¹² Um aumento de 5°C na temperatura provoca em média uma redução de 7 vezes na meia-vida da EI. A partir da Figura 4.13 (B) tem-se: $t_{1/2} \text{ a } 45^\circ\text{C} = t_{1/2} \text{ a } 50^\circ\text{C} \times 7 = 35,56 \text{ h} \times 7 = 248,92 \text{ h} \approx 10 \text{ dias}$.

mais estável. Essa estimativa foi possível porque as relações entre as meias-vidas a 50 e 55°C se mantiveram aproximadamente constantes para os derivados CPA-glioxil menos estável (derivado preparado em glioxil-agarose 20 µeqv/mL com 1 hora de reação) e CPA glioxil mais estável (derivado preparado em glioxil-agarose 75 µeqv/mL com 48 horas de reação).

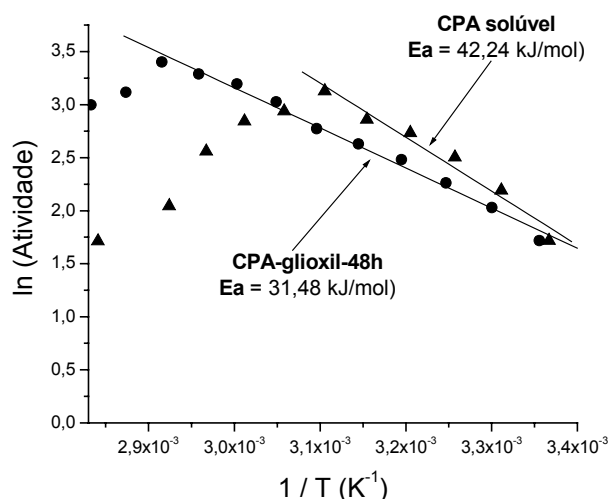


Figura 4.12 – Gráfico de Arrhenius de temperatura e atividade de (7) CPA solúvel e (,) derivado CPA-glioxil-48h. A energia de ativação (E_a) foi calculada multiplicando-se a tangente do trecho linear da curva pela constante dos gases ($R = 8,3 \text{ J/mol/K}$).

4.1.9 – Influência do pH na atividade enzimática e na estabilidade térmica de CPA

Primeiramente, foram medidas as velocidades iniciais de hidrólise de hipuril-L-Phe 1 mM, preparado em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0 a 8,0), tampão tris-HCl 25 mM, contendo NaCl 500 mM (pH 7,0 a 9,0) e tampão bicarbonato 100 mM (pH 9,0 e 10,0), catalisada por CPA solúvel e derivado CPA-glioxil-48h (derivado mais estável), a 25°C.

A Figura 4.14 mostra o perfil da atividade em função do pH (6,0 a 10,0) para CPA solúvel e imobilizada. Tanto CPA solúvel como derivado CPA-glioxil-48h apresentaram pH ótimo em 7,5 para a atividade catalítica. Esse resultado mostra que provavelmente a concentração de íons H^+ no micro-ambiente próximo a CPA imobilizada era igual à concentração “bulk”. Essa hipótese é aceitável uma vez que efeito de partição é comumente verificado para suportes carregados negativa ou positivamente, e glioxil-agarose, após

redução com borohidreto de sódio, contém apenas grupos OH inertes, não afetando o pH do micro-ambiente da enzima imobilizada, diferentemente do que poderia ser observado para suportes com grupos de carga positiva ou negativa (Blanch e Clark, 1997).

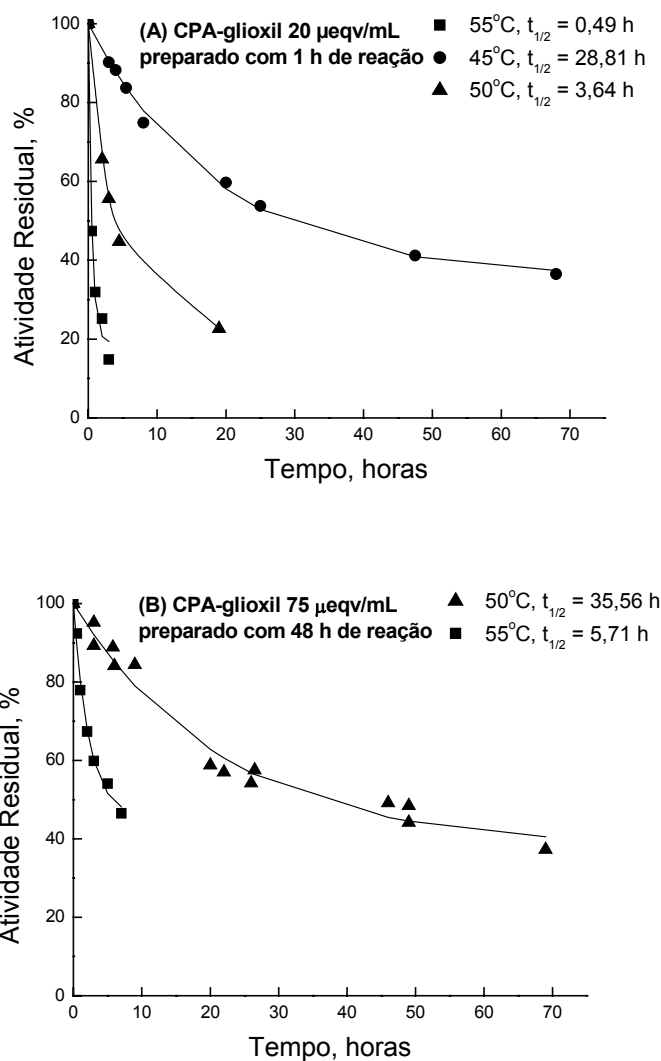


Figura 4.13 - Inativação térmica de (A) CPA-glioxil baixa ativação (20 µeqv/mL) e (B) CPA-glioxil alta ativação (75 µeqv/mL). Suspensões em tampão tris-HCl 100 mM, pH 7,5 e incubadas a (●) 45°C, (▲) 50°C e (■) 55°C. O modelo de Sadana-Henley¹³ foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica. A atividade inicial da suspensão de inativação foi considerada igual a 100%.

¹³ Parâmetros para o derivado CPA-glioxil 20 µeqv/mL: 45°C ($k_1 = 0,052 \pm 0,003$ h⁻¹; $\alpha_1 = 0,356 \pm 0,014$), 50°C ($k_1 = 0,284 \pm 0,005$ h⁻¹; $\alpha_1 = 0,224 \pm 0,006$), 55°C ($k_1 = 1,974 \pm 0,284$ h⁻¹; $\alpha_1 = 0,191 \pm 0,031$), e para o derivado CPA-glioxil 75 µeqv/mL: 50°C ($k_1 = 0,046 \pm 0,006$ h⁻¹; $\alpha_1 = 0,379 \pm 0,032$), 55°C ($k_1 = 0,448 \pm 0,027$ h⁻¹; $\alpha_1 = 0,458 \pm 0,027$).

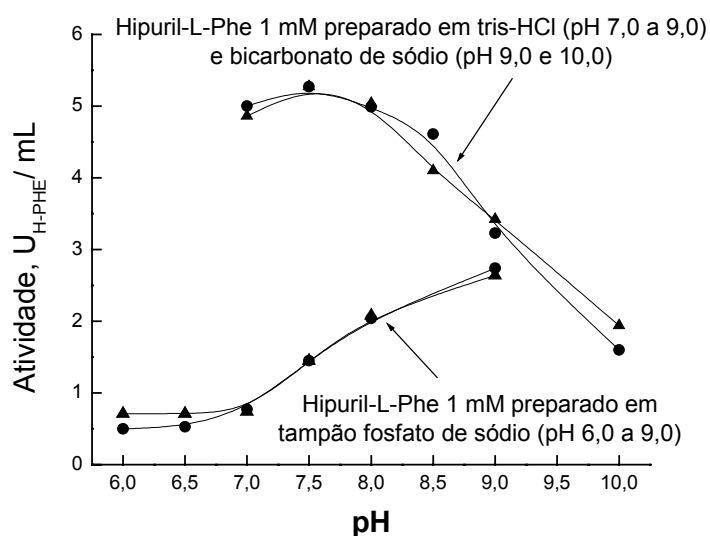


Figure 4.14 - Atividades relativas de (●) CPA solúvel e (▲) derivado CPA-glioxil-48h, medidas a 25°C com hipuril-L-Phe 1 mM como substrato, preparado em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0 a 9,0), tampão Tris-HCl 25 mM, contendo 500 mM de NaCl (pH 7,0 a 9,0) e tampão bicarbonato 100 mM (pH 9,0 e 10,0). Atividades medidas no pH 7,5 correspondem a 100%.

Pode-se observar também na Figura 4.14 que as atividades catalíticas medidas no pH 7,0 e 8,0 (hipuril-L-Phe preparado em tampão tris-HCL), tanto de CPA solúvel como CPA imobilizada, correspondem a aproximadamente 95% da atividade medida no pH 7,5. Fora desta faixa estreita, as atividades caem rapidamente, tanto com o aumento ou com a diminuição do pH, provavelmente por afetar o estado de ionização de grupos cataliticamente essenciais, que podem resultar na inativação da enzima sem, contudo, provocar mudanças severas na estrutura da proteína, bastando um simples reajuste de pH para restaurar a atividade catalítica.

A queda mais pronunciada para valores ácidos de pH deveu-se ao efeito inibitório que o tampão fosfato exerce sobre a atividade catalítica da enzima. Pode-se observar na Figura 4.14 que as velocidades de hidrólise de hipuril-L-Phe preparado em tampão tris-HCl eram sempre maiores que aquelas medidas com o substrato preparado em tampão fosfato, sendo a diferença menos pronunciada para valores básicos de pH. Por exemplo, no pH 7,0 a velocidade de hidrólise de hipuril-L-Phe (preparado em tampão fosfato), catalisada por CPA solúvel ou imobilizada, corresponde a 14% da velocidade medida com o substrato preparado em tampão tris-HCl, e no pH 9,0 corresponde em média a 81%. A Figura 4.15 mostra que esse efeito inibitório do tampão fosfato na atividade catalítica da CPA é influenciado pela

concentração do tampão. Para uma concentração de apenas 10 mM, a atividade da enzima já era reduzida em média em 45%, e para 100 mM aproximadamente em 81%. Whitaker *et al.* (1966) verificaram comportamento semelhante na hidrólise de benziloxycarbonil-glicil-L-Phe, preparado em tampão fosfato (pH 7,5), catalisada por CPA do pâncreas bovino. Portanto, tampão fosfato deve ser evitado ao trabalhar-se com CPA (seja solúvel ou imobilizada), pelo menos CPA do pâncreas bovino (Sigma), utilizada nestes ensaios.

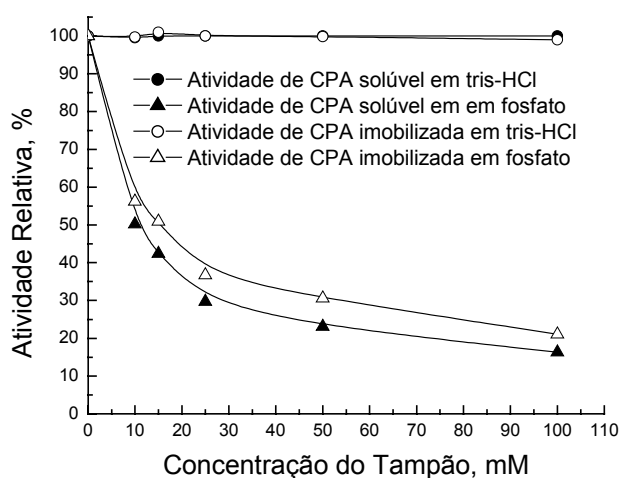


Figura 4.15 - Atividades de CPA solúvel (símbolos fechados) e CPA-glioxil (símbolos abertos) medidas com hipuril-L-Phe 1 mM, preparado em tampão fosfato (triângulos) e tampão tris-HCl (círculos), a 25°C (pH 7,5). Como as atividades medidas na presença de tampão tris-HCl não variaram para todas as concentrações testadas, foram tomadas como 100% (2,30 U_{H-PHE}/L para enzima solúvel e 5,89 U_{H-PHE}/mL para enzima imobilizada).

Finalmente, verificou-se a influência do pH na estabilidade da CPA imobilizada (derivado CPA-glioxil-48h). Soluções e suspensões enzimáticas foram preparadas em tampão tris-HCl 25 mM, contendo 500 mM de NaCl, pH 6,0 a 9,0 e incubadas a 50°C. Em intervalos apropriados de tempo media-se as atividades residuais a 25°C, pH 7,5, com hipuril-L-Phe 1 mM como substrato. A estabilização da enzima em um dado pH foi calculada como a razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel, calculadas a partir da equação do modelo de inativação (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais. Observa-se na Figura 4.16 que a maior estabilização da enzima imobilizada foi encontrada na faixa de pH entre 6,9 e 7,5.

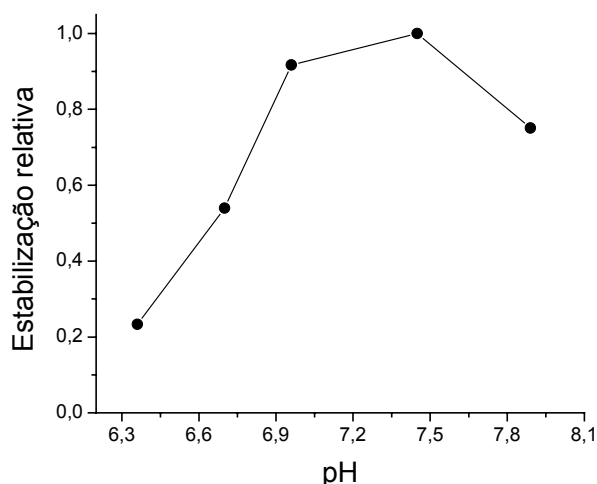


Figura 4.16 – Efeito do pH sobre a estabilização a 50°C de CPA immobilizada (derivado CPA-glioxil-48h). Soluções ou suspensões de CPA foram preparadas em tampão tris-HCl 25 mM (contendo 500 mM de NaCl). A estabilização (razão entre a meia-vida da enzima immobilizada e a meia-vida da enzima solúvel) para o pH 7,5 foi considerada como máxima (estabilização relativa igual à unidade).

A maior estabilização da enzima immobilizada em valores de pH de neutro a alcalino do que em valores ácidos de pH, deveu-se provavelmente ao fato da rigidificação da enzima immobilizada, promovida pela formação de ligações covalentes multipontuais, não afetar da mesma forma todas as partes da molécula e, ainda, o processo de inativação ter mecanismos diferentes para pH ácido, neutro ou alcalino. Por exemplo, em pH ácido, os resíduos de His são os principais responsáveis pelo desdobramento da proteína, levando à inativação irreversível tanto por agregação como por autólise, em se tratando de enzima solúvel (Blanch e Clark, 1997). No caso da enzima immobilizada, e particularmente no caso da CPA, embora não ocorra inativação por agregação, pode haver desorsão do íon Zn^{2+} , que está coordenado no centro catalítico da enzima a duas cadeias laterais de His. A immobilização, por melhor que seja, não protegerá a enzima desse fenômeno.

Como a atividade enzimática da CPA é praticamente a mesma na faixa de pH entre 7 e 8 e a estabilização da enzima immobilizada é maior na faixa entre 6,9 e 7,5, adotou-se o pH 7,0 para as reações de hidrólise de polipeptídios.

4.1.10 – Hidrólise de polipeptídios catalisada por CPA solúvel e imobilizada

4.1.10.1 – Preparação do substrato

Proteínas do soro de queijo (micro e ultrafiltrado) 2% (p/v) foram hidrolisadas, em pHstato, seqüencialmente por:

- Tripsina imobilizada em glioxil-agarose-6% (10 mg de proteína/mL de suporte): 100 mL de substrato, 55°C, pH 8 (controlado pela adição de NaOH 0,1 N), razão enzima/substrato, E/S, igual a 1/50 (Galvão e Giordano, 2002), DH de 2%, determinado pela equação 3.10 ($B=3,2$ mL; $N_b=0,1$ N, $1/\alpha = 1,0984$, $MP = 2$ g e $h_{tot} = 8,8$ meqv/g de proteína).

- Quimotripsina imobilizada em glioxil-agarose-6% (10 mg de proteína/mL de suporte): 100 mL de substrato, 55°C, pH 8 (controlado pela adição de NaOH 0,1 N), E/S igual a 1/50 (Galvão e Giordano, 2002), DH de 5%, determinado pela equação 3.10 ($B=7,6$ mL; $N_b=0,1$ N, $1/\alpha = 1,0984$, $MP = 1,89$ g e $h_{tot} = 8,8$ meqv/g de proteína).

O produto obtido (mistura de polipeptídios), resultante da ação seqüencial das duas endoproteases, era formado por aproximadamente 60% de polipeptídios com massa molecular abaixo de 5 kDa (distribuição de massa molecular mostrada na Figura 4.17) e continha apenas pequena quantidade do aminoácido His em solução, liberado provavelmente por exoproteases, presentes como contaminantes nas preparações comerciais de tripsina e quimotripsina. Esse produto, diluído para uma concentração final de 1% (p/v), foi usado em todos os ensaios seguintes com CPA.

As atividades específicas de CPA solúvel e imobilizada, em glutaraldeído-agarose (0,77 mg de proteína/mL de suporte) e glioxil-agarose (0,74 mg de proteína/mL de suporte), foram determinadas usando hipuril-L-Phe 1 mM (substrato de baixa massa molecular) e solução de polipeptídios (substrato de alta massa molecular) 1% (p/v), produzida por hidrólise seqüencial das proteínas do soro, catalisada por tripsina e quimotripsina imobilizadas.

4.1.10.2 – Efeito da imobilização na atividade de CPA

A hidrólise do substrato de baixa massa molecular, a 25°C (pH 7,5), foi acompanhada em espectrofotômetro, conforme procedimento padrão de medida de atividade enzimática, descrito no capítulo 3 – atividade H-PHE. A hidrólise do substrato de alta massa molecular, a

45°C (pH 7) e E/S igual a 2 U_{H-PHE}/g de proteína (22 U_{H-PHE} /L de reator), foi acompanhada medindo-se o aumento na concentração de Phe (aminoácido liberado a uma velocidade mais alta) durante 30 minutos de reação, por cromatografia líquida de troca iônica. Neste caso, a partir dos coeficientes angulares das curvas de liberação de Phe em função do tempo, mostradas na Figura 4.18, foram calculadas as velocidades iniciais específicas para CPA solúvel e imobilizada (resultados mostrados na Tabela 4.7).

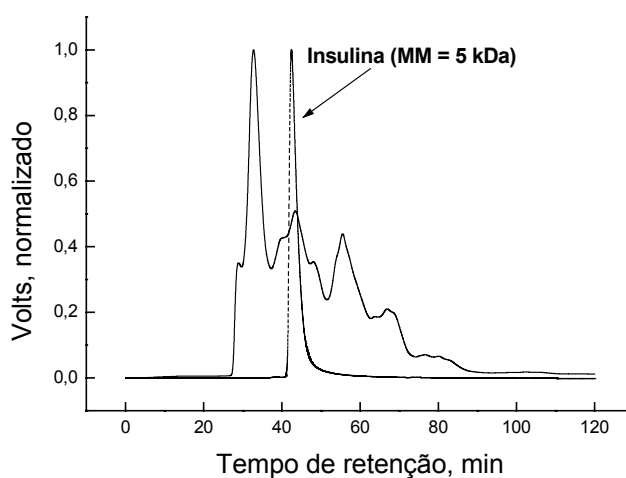


Figura 4.17 - Cromatogramas de (---) padrão de massa molecular insulina e (—) hidrolisado de proteínas do soro de queijo com tripsina (DH de 2%) e quimotripsina (DH de 5%). Fracionamento por cromatografia líquida de exclusão de tamanho. Distribuição de massa molecular: > 5 kDa (39%), 5 – 1,7 kDa (51%), 1,7 – 1,0 kDa (8%) e 1,0 – 0,6 kDa (2%).

Os resultados mostraram que a taxa inicial de produção de Phe, catalisada pelo derivado CPA-glioxil-48h (derivado mais estável), era aproximadamente 42% daquela catalisada por CPA solúvel, tanto utilizando substrato de baixa massa molecular como de alta massa molecular. Esse resultado sugere que a enzima imobilizada não apresentava impedimento estérico, que poderia retardar a hidrólise de substratos de alta massa molecular. Portanto, a diminuição de 58% na atividade específica contra substratos de baixa e alta massa molecular, observado para o derivado CPA-glioxil-48h, deveu-se provavelmente a distorção da estrutura da enzima causada pela multi-interação enzima-suporte (pode ser visto na Figura 4.8 que a retenção de atividade deste derivado era de 42%).

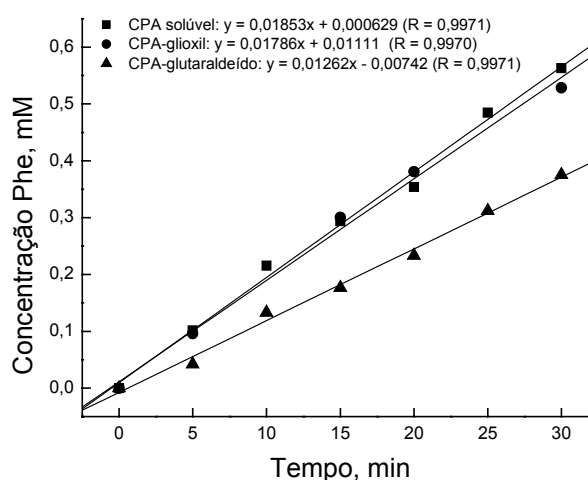


Figura 4.18 – Liberação de fenilalanina (Phe) carboxi-terminal catalisada por CPA a 45°C, pH 7,0 (2 U_{H-PHE}/g de proteína). Substrato: polipeptídios produzidos por hidrólise seqüencial das proteínas do soro com tripsina (DH 2%) e quimotripsina (DH 5%) a 55°C, pH 8 e E/S igual a 1/50.

Tabela 4.7 - Atividades específicas de CPA solúvel e imobilizada, medidas com substrato de baixa massa molecular (hipuril-L-Phe 1 mM) a 25°C (pH 7,5) e com substrato de alta massa molecular (polipeptídios 1%, p/p) a 45°C (pH 7,0) e 2 U_{H-PHE}/g de proteína.

Enzima	Atividade Específica contra hipuril-L-Phe (U _{H-PHE} mg ⁻¹ proteína)	Atividade Específica contra polipeptídios (μmoles Phe min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)
CPA solúvel	47,0 (100,0%)	42,2 (100,0%)
CPA-glutaraldeído	42,8 (91,1%)	26,8 (63,5%)
CPA-glioxil-48h	19,7 (41,9%)	17,8 (42,2%)

No caso do derivado CPA-glutaraldeído, o comportamento foi bem diferente. As atividades específicas correspondiam a 63,5% e 91,1% das atividades medidas com a enzima solúvel, respectivamente com substrato de alta massa molecular e baixa massa molecular. Neste derivado, portanto, havia indicação de impedimento estérico, ou seja, as moléculas de enzima imobilizada poderiam estar ligadas ao suporte com diferentes orientações, e para algumas delas, substratos de alta massa molecular não poderiam acessar o sítio ativo.

4.1.10.3 – Eficiência do derivado CPA-glioxil-48h na hidrólise de substrato macromolecular a alta temperatura

Para a comparação da eficiência do derivado CPA-glioxil-48h (derivado mais estável), a altas temperaturas, com relação à da enzima solúvel, mistura de polipeptídios 1% (p/v) foi hidrolisada a 55°C e 60°C (pH 7,0), por 8 horas, usando-se uma baixa relação enzima/substrato (5 e 1 U_{H-PHE}/g de proteínas, respectivamente para 55 e 60°C).

A Figura 4.19 (A) e (B) mostra a maior especificidade da CPA pelos aminoácidos aromáticos Tyr, Phe e Trp, os quais foram liberados em maiores quantidades, tanto por CPA solúvel como CPA-glioxil; no entanto, outros aminoácidos (Leu, Met, Ser, Val e Ileu) foram liberados, porém em menor quantidade. Esses resultados estão de acordo com a especificidade da CPA encontrada na literatura (Amber, 1972 e Pedroche *et al.*, 2002).

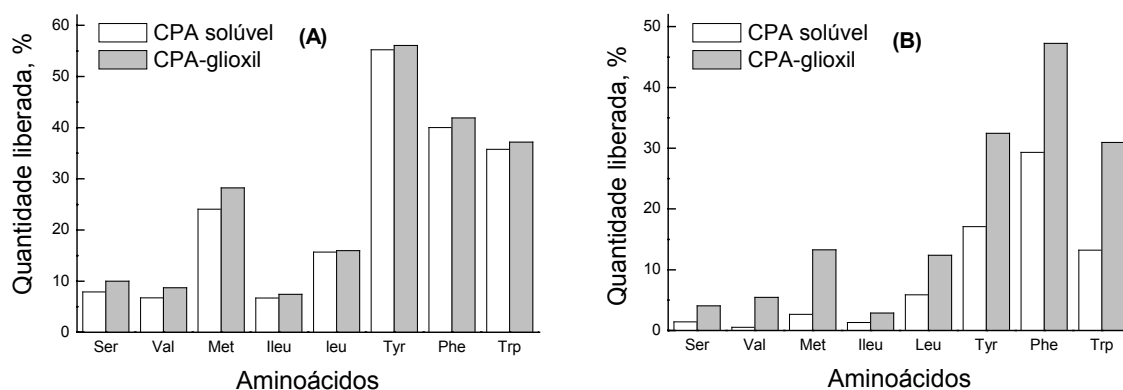


Figure 4.19 - Aminoácidos liberados pela hidrólise de polipeptídios catalisada por CPA solúvel e imobilizada, após 8 horas de reação a pH 7,0 e (A) 55°C, E/S igual a 5 U_{H-PHE}/g e (B) 60°C, E/S igual a 1 U_{H-PHE}/g. Substrato: proteínas do soro de queijo sequencialmente hidrolisadas com tripsina e quimotripsina imobilizadas (DH total de 7%) a 55°C, pH 8,0 e E/S igual a 1/50. A quantidade liberada de 100% refere-se à quantidade total de cada aminoácido presente nas proteínas do soro (Tabela 2.3).

A 55°C, tanto CPA solúvel como CPA-glioxil apresentaram similar eficiência – CPA-glioxil-48h hidrolisou 8,41 g de aminoácidos por 100 g de proteínas (DH de 7,3%) e CPA solúvel hidrolisou 8,97 g de aminoácidos por 100 g de proteínas (DH de 7,8%). Ambas hidrolisaram em média 45% do total de Tyr, Phe e Trp que teoricamente poderia estar

presente nas proteínas do soro (Tabela 2.3). Entretanto, a 60°C, a quantidade de aminoácidos liberados por CPA-glioxil (7,49 g de aminoácidos por 100 g de proteínas, DH de 6,5%) foi cerca de duas vezes maior que aquela liberada por CPA solúvel (3,31 g de aminoácidos por 100 g de proteínas, DH de 2,9%). O derivado CPA-glioxil pôde liberar aproximadamente 50% da quantidade teórica de Phe, enquanto CPA solúvel liberou aproximadamente 30%. Lara (1997) obteve uma liberação de 77% de Phe hidrolisando proteínas do soro de leite com dois complexos enzimáticos (pancreatina e Proteomix®) a 37°C, pH entre 7 e 8 e 27 horas de reação. No entanto, Lara (1997) observou uma liberação total de aminoácidos de 19%, enquanto neste trabalho foi observada uma liberação de somente 6,5% de aminoácidos. Após a separação dos aminoácidos livres, o hidrolisado preparado a 60°C, pH 7,0 e 8 horas de reação, hidrolisando proteínas do soro de queijo com CPA imobilizada em glioxil-agarose-6% terá maior valor nutricional que aquele preparado por Lara (1997).

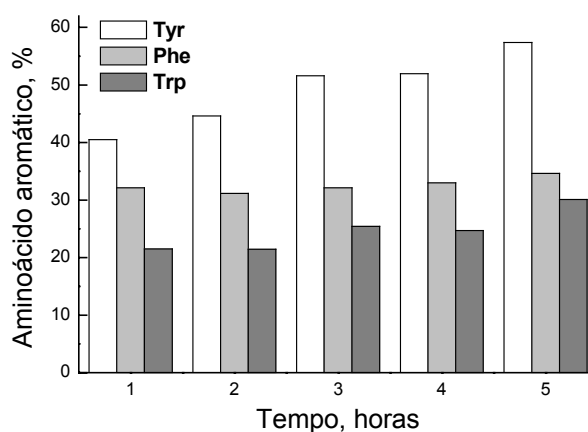


Figura 4.20 - Aminoácidos aromáticos liberados pela hidrólise de polipeptídios, catalisada por CPA-glioxil a 45°C, pH 7,0, E/S igual a 20 U/g de proteínas. Substrato: proteínas do soro de queijo seqüencialmente hidrolisadas com tripsina e quimotripsina imobilizadas (DH total de 7%) a 55°C, pH 8,0 e E/S igual a 1/50. Após 5 horas a quantidade total de aminoácidos liberados (Ser, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe e Trp) era de 8,58 g de aminoácidos/100 g de proteínas (DH de 7,4%). 100% refere-se à quantidade total de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas do soro (Tabela 2.3).

A Figura 4.20 mostra que na hidrólise de polipeptídios catalisada por CPA-glioxil a 45°C (pH 7,0), usando alta relação enzima/substrato (20 U_{H-PHE}/g de proteínas), a quantidade liberada de Tyr variava ligeiramente com tempo, enquanto as quantidades de Phe e Trp eram praticamente constantes. Após 5 horas, a quantidade de aminoácidos liberados era

aproximadamente igual àquela obtida a 55°C com 8 horas de reação (56% de Tyr, 42% de Phe e 37% de Trp). Este resultado mostrou que a hidrólise catalisada por CPA havia quase atingido seu ponto final, ou seja, a quantidade de resíduos aromáticos carboxi-terminais, produzida pela ação seqüencial de tripsina e quimotripsina (DH total de 7%) sobre as proteínas do soro, havia sido eficientemente liberada pela CPA imobilizada. Desta forma, a hidrólise seqüencial de proteínas, catalisada pelas proteases imobilizadas tripsina, quimotripsina e CPA viabiliza a preparação de hidrolisados protéicos com baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos. Entretanto, as proteólises catalisadas por tripsina e quimotripsina devem ser conduzidas de tal forma a obter-se graus de hidrólises maiores, se um produto final completamente livre de aminoácidos aromáticos é desejado.

4.2 – Imobilização e Estabilização de Alcalase® em Suportes Glioxil-Agarose

4.2.1 – Influência da carga enzimática no rendimento de imobilização e na retenção de atividade

Inicialmente, Alcalase® foi imobilizada em glioxil-agarose-6% (com 70 $\mu\text{eqv/mL}$ de suporte), a 20°C, pH 10,05. Duas cargas enzimáticas foram oferecidas: alta carga - 66 $U_{\text{BAEE/mL}}$ de suporte (23 mg de proteína/mL suporte, medida pelo método de Bradford) e baixa carga - 7,3 $U_{\text{BAEE/mL}}$ de suporte (2,5 mg/mL).

A primeira dificuldade encontrada com esta protease foi a baixa velocidade de imobilização (Figura 4.21). Após 5 horas de reação, ainda havia em solução aproximadamente 50% da atividade inicial oferecida (rendimento de imobilização de 50%), tanto para baixa carga como para alta carga. A Alcalase® é uma preparação enzimática com subtilisina como principal componente ativo, contendo também proteínas pequenas como impurezas, que podem competir com a enzima pelos grupos aldeídos do suporte. A concentração de proteínas da preparação enzimática era de 32 mg/mL (medida pelo método de Bradford) e 140 mg/mL (medida pelo método de Lowry), portanto, 108 mg/mL referia-se a prováveis proteínas de baixa massa molecular (abaixo de 5 kDa). Além disso, a solução enzimática comercial contém agentes estabilizantes (monopropileno glicol ou glicerol, de acordo com a Novo Nordisk) que protegem a enzima contra autólise ou inativação. Estes compostos, mesmo não possuindo grupos aminos livres que poderiam formar ligações covalentes com o suporte, podem se

adsorver fortemente a ele, bloqueando centros ativos possíveis de ligação com a enzima. De fato, ao final da imobilização, mesmo após lavagem excessiva com água e tampão fosfato 100 mM, o suporte adquiria uma leve coloração marrom, característica da solução enzimática comercial.

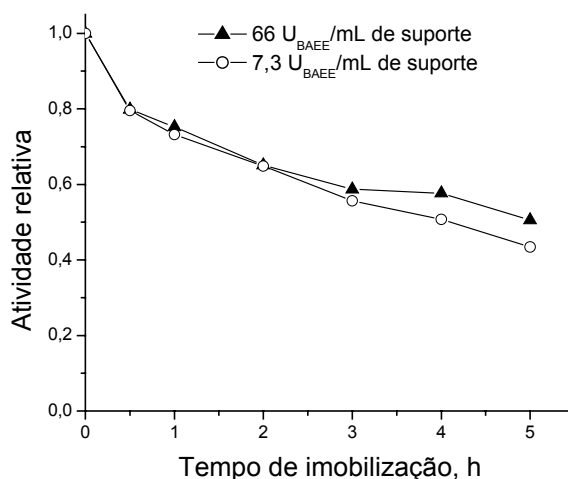


Figura 4.21 – Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de Alcalase® em suporte glioxil-agarose-6% (com 70 μ eqv de aldeídos/mL de suporte), a 20°C, pH 10,05, (\blacktriangle) 66 U_{BAEE}/mL de suporte e (O) 7,3 U_{BAEE}/mL de suporte. A atividade inicial do sobrenadante da suspensão de imobilização foi considerada igual à unidade.

O grande ponto positivo foi que a retenção de atividade para o derivado com baixa carga foi de 96,4%, após redução com borohidreto de sódio. A retenção de atividade para a enzima imobilizada com alta carga foi de 34,3%, após redução com borohidreto de sódio. Nesse caso, como os derivados com baixa e alta carga foram preparados nas mesmas condições, a redução na atividade catalítica medida na enzima imobilizada com alta carga deveu-se, provavelmente, a resistência difusional intrapartícula.

As atividades proteolíticas dos derivados de Alcalase®, baixa e alta carga, foram medidas em pHstato a 50°C, pH 8,0, com solução de caseína 4% (p/v) como substrato. Caseína (massa molecular de aproximadamente 30 kDa) foi escolhida como substrato modelo por ser comestível, ter composição bem conhecida e ser usualmente utilizada como substrato para testes de digestão por proteases. A reação foi mantida a pH constante pela adição de NaOH 0,5 N e as velocidades iniciais (expressas como miliequivalentes de ligações peptídicas

hidrolisadas por min) foram calculadas com o auxílio da equação 3.9. Segundo Adler-Nissen (1986) $1/\alpha$ (para 50°C, pH 8,0) é igual a 1,13. O volume do reator era de 25 mL (1 g de proteína) em todos os ensaios.

A Figura 4.22 mostra que as velocidades de reação aumentaram linearmente com a carga enzimática no reator, para ambos os derivados, indicando que em todos os casos havia saturação da enzima pelo substrato e que todas as velocidade medidas eram realmente as velocidades iniciais da reação. A atividade proteolítica medida com o derivado de baixa carga foi 3,3 vezes maior que aquela medida com o derivado com alta carga, indicando resistência difusional, como já constatado utilizando-se substrato de baixa massa molecular. A redução na atividade proteolítica (3,3 vezes) foi aproximadamente igual à relação entre A_{TI} e A_{EI} (3,0 vezes), medidas com BAEE como substrato, para o derivado de alta carga. Conclui-se portanto, que para os ensaios de inativação térmica e cinética enzimática teria-se que trabalhar com baixa carga enzimática (< 2 mg de proteína/mL de suporte) para evitar que uma estabilização aparente mascare os resultados.

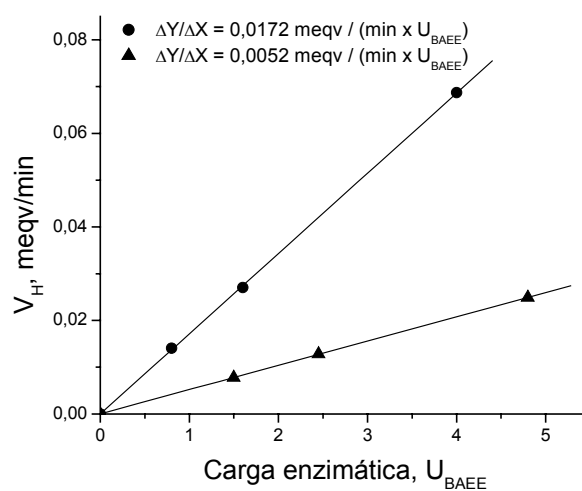


Figura 4.22 – Velocidades iniciais de hidrólise (V_H) de caseína em função da carga enzimática no reator (U_{BAEE}) a 50°C (pH 8,0), 25 mL de caseína 40 g/L (1 g de proteína) para derivados com (•) baixa carga (A_{EI} de 4 U_{BAEE} /mL de suporte) e (▲) alta carga (A_{TI} de 33 U_{BAEE} /mL de suporte e A_{EI} de 11 U_{BAEE} /mL de suporte).

4.2.2 – Estabilidade térmica e ao pH alcalino de Alcalase® solúvel e imobilizada

Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-glioxil (baixa carga) foram inativados a 60°C, pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM). As meias-vidas, calculadas a partir do modelo de inativação (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais (Figura 4.23) são listadas na Tabela 4.8. Observa-se que a enzima imobilizada era 3,6 vezes mais estável que a enzima solúvel. O modelo de inativação térmica da enzima solúvel seguiu cinética de 1ª ordem, com a atividade catalítica rapidamente levada a zero (em aproximadamente 1,5 h). A enzima imobilizada mostrou ter uma fração mais estável, que desativava mais lentamente, tendo ainda uma atividade residual de 15,2% após 6 horas de incubação a 60°C.

Tabela 4.8 – Meia vida ($t_{1/2}$) a 60°C (pH 8,0) de Alcalase® solúvel e Alcalase®-glioxil agarose-6% (baixa carga) com 70 μeqv de grupos aldeídos por mililitro de suporte.

Derivado	^a R _{EI} (%)	$k_1 \pm \sigma$ (h ⁻¹)	$\alpha_1 \pm \sigma$	$t_{1/2}$ (min)	Fator de estabilização
Alcalase® solúvel	-	$2,384 \pm 0,058$	0	17,4	1
Alcalase®-glioxil – 70 $\mu\text{eqv/mL}$	96,4	$0,858 \pm 0,138$	$0,152 \pm 0,036$	62,3	3,6

^aRetenção de atividade da enzima imobilizada.

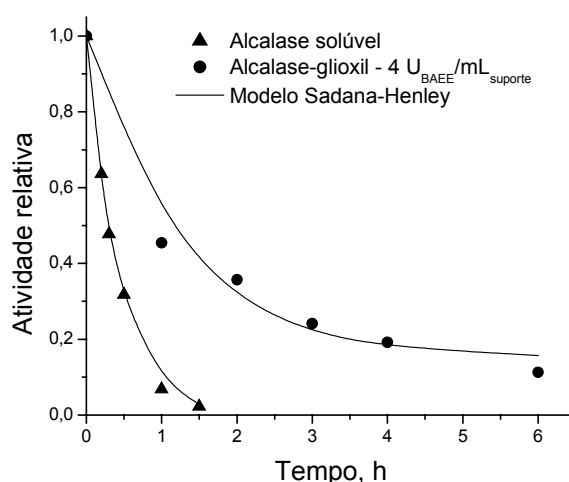


Figura 4.23 – Inativação térmica (60°C, pH 8,0) de Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-glioxil (baixa carga). A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

Solução de enzima solúvel e suspensão de derivado Alcalase®-gloxil, preparadas em tampão bicarbonato de sódio 50 mM (pH 11,0) foram incubadas a 25°C. As constantes do modelo de inativação Sadana-Henley, ajustado aos dados experimentais (Figura 4.24), para a enzima solúvel foram $k_1 = (0,208 \pm 0,021) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0$ e para a enzima imobilizada $k_1 = (0,019 \pm 0,009) \text{ h}^{-1}$ e $\alpha_1 = 0,416 \pm 0,137$. As meias vidas, calculadas pela equação 3.8, de 3,3 e 102,1 h, respectivamente para enzima solúvel e imobilizada, mostraram uma estabilização da enzima imobilizada de 30,9 vezes.

É importante dizer que a enzima solúvel, além de conter estabilizantes, é uma protease apropriada para uso em detergentes com moderada alcalinidade. Portanto, não era esperada uma estabilização extraordinária ao pH alcalino. A baixa estabilidade térmica da enzima imobilizada pode ser aparente, devido à presença de agentes estabilizantes na solução enzimática comercial que protegem a enzima contra a inativação, prejudicando a interpretação dos resultados. Portanto, seria necessário a eliminação desses estabilizantes (por exemplo, por diálise) para se obter a real estabilização promovida pela imobilização da enzima por ligações covalentes multipontuais.

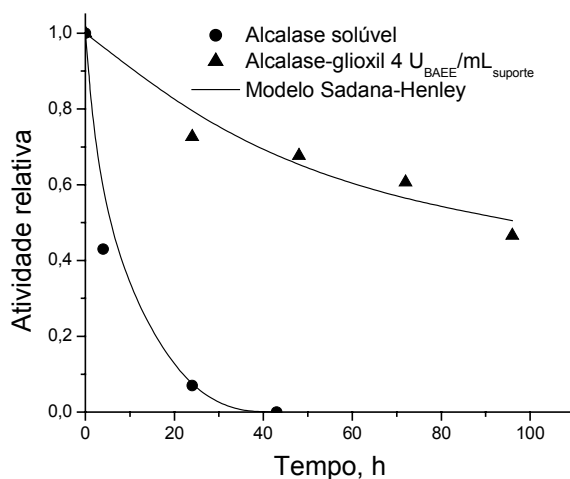


Figura 4.24 – Estabilidade a 25°C e pH 11,0 de Alcalase® solúvel e Alcalase®-gloxil 70 µeqv/mL de suporte (baixa carga). A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

4.2.3 – Diálise de preparação enzimática comercial Alcalase®

A diálise da preparação enzimática comercial Alcalase® teve por objetivo eliminar impurezas (proteínas pequenas) e preservantes, a fim de se comparar a estabilidade térmica da enzima imobilizada (livre de preservantes) com a enzima solúvel nas mesmas condições.

Uma solução enzimática, contendo aproximadamente 17 U_{BAEE}/mL, foi dialisada por 6 dias a 4°C contra tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 8,0) usando membrana de celulose (Viskase Co. Ltd.) com massa molecular de corte de 14 kDa e 35 mm de diâmetro interno. Após a diálise, a solução enzimática tinha uma atividade enzimática de 4 U_{BAEE}/mL. A grande perda de atividade deveu-se provavelmente a autólise da enzima (uma endoprotease), devido à eliminação de preservantes.

Soluções enzimáticas de Alcalase®, dialisada e não dialisada, preparadas em tampão fosfato 50 mM (pH 8,0), foram incubadas a 55°C e as atividades residuais foram medidas a 25°C (pH 7,6) utilizando-se BAEE como substrato. O valor do parâmetro k_1 do modelo de inativação (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais (Figura 4.25) foram de $0,499 \pm 0,06 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$, para a enzima dialisada, e $0,116 \pm 0,04 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$, para a enzima não dialisada. O valor do parâmetro α_1 foi igual a zero, tanto para a enzima dialisada como para a não dialisada, indicando inativação térmica com cinética de 1ª ordem. As meias-vidas, calculadas pela equação 3.8, para a enzima solúvel dialisada e não dialisada foram de 1,4 e 6,0 horas, respectivamente, mostrando que a enzima na presença de preservantes era 4,3 vezes mais estável. Portanto, seria incorreto comparar a estabilidade da enzima imobilizada (sem preservantes) com uma enzima solúvel protegida. Assim, todos os fatores de estabilidade (razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e a meia-vida da enzima solúvel) foram calculados com relação à enzima solúvel dialisada.

Imobilizações de Alcalase®, dialisada e não dialisada, em glioxil-agarose-6% contendo 75 µeqv de aldeídos / mL de suporte, a 20°C, pH 10,05, mostraram (Figura 4.26) que em ambos os casos não houve fixação total de atividade no suporte. Tanto enzima dialisada como não dialisada tiveram praticamente o mesmo rendimento de imobilização (em média 65%) e a mesma retenção de atividade na enzima imobilizada (em média 90%). Concluiu-se que impurezas ou preservantes não retardavam a imobilização de Alcalase®. O rendimento de imobilização de Alcalase® em suporte glioxil-agarose-6% não era de 100% provavelmente por haver uma fração de proteína que imobilizava muito lentamente, devido a um baixo número de resíduos de lisinas por molécula de proteína. Essa fração poderia ser

baixa em termos de concentração protéica, mas significativa em termos de atividade enzimática. De fato, eletroforese SDS-PAGE da preparação comercial (Figura 4.27) revelou duas bandas que poderiam ser duas enzimas com diferentes especificidades.

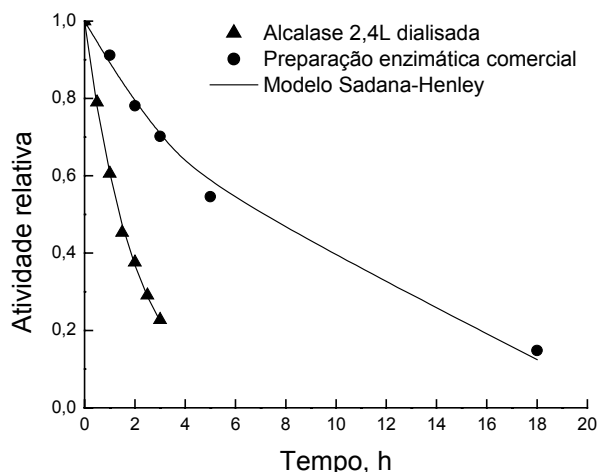


Figura 4.25 - Inativação térmica de Alcalase® solúvel, (▲) dialisada e (●) não dialisada, a 55°C, pH 8,0 (tampão fosfato 50 mM). (—) Modelo de inativação térmica (equação 3.8) ajustado aos dados experimentais. A atividade inicial da solução de inativação foi considerada igual à unidade.

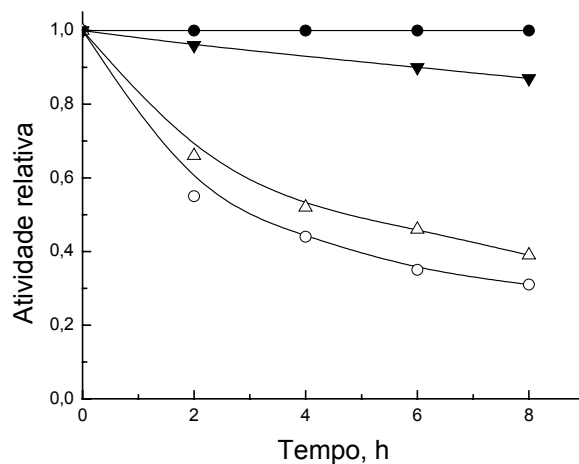


Figura 4.26 – Acompanhamento de atividade enzimática no sobrenadante da suspensão de imobilização de Alcalase® (20°C, pH 10,05) em glioxil-agarose-6% contendo 75 µeqv de aldeído/mL de suporte. (▼) Controle da enzima solúvel não dialisada, (●) controle da enzima solúvel dialisada, (○) sobrenadante da imobilização da enzima não dialisada e (△) sobrenadante da imobilização da enzima dialisada. Carga oferecida: 2,2 U_{BAAE}/mL de suporte. Atividade relativa igual à unidade refere-se às atividades inicialmente medidas.

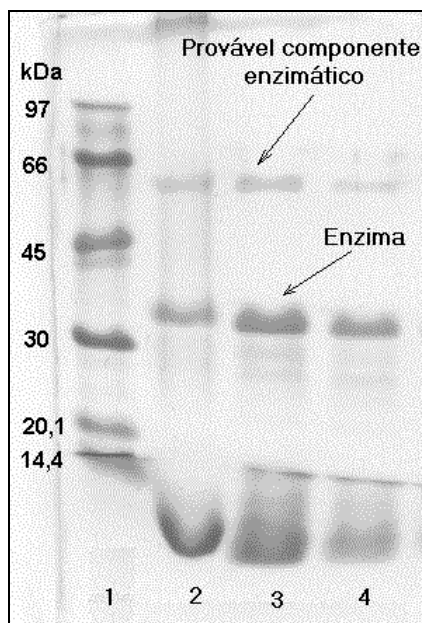


Figura 4.27 – Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15% com 0,1% SDS) da preparação enzimática Alcalase®: pista 1 - padrões de massas moleculares; pistas 2, 3 e 4 - preparação enzimática Alcalase®, sendo aplicados 28, 56 e 42 µg de proteína, respectivamente. O tempo de corrida foi de 1 h e 35 min a 20 mA por placa.

Mesmo não havendo fixação total de proteína foi possível preparar derivados carregados, pois como mostra a Figura 4.21 o rendimento de imobilização independe da carga enzimática inicialmente oferecida. Oferecendo 66,1 U_{BAEE}/mL de suporte foi possível imobilizar após 5 horas de reação (a 20°C, pH 10,05) 32,7 U_{BAEE}/mL de suporte (R_I de 50,5%), medindo-se na enzima imobilizada 11,2 U_{BAEE}/mL de suporte (R_{EI} de 34,3%). Oferecendo 30,7 U_{BAEE}/mL de suporte foi imobilizada após 28 horas de reação (a 20°C, pH 10,05) 21,0 U_{BAEE}/mL de suporte (R_I de 68,4%), medindo-se na enzima imobilizada 9,4 U_{BAEE}/mL de suporte (R_{EI} de 44,8%). Contudo, a utilização de suportes com maior concentração de grupos aldeídos (por exemplo 210 µeqv/mL para glioxil-agarose-10%) e temperatura mais alta (por exemplo, 25°C), além de possibilitar imobilizações mais rápidas e preparação de derivados mais carregados, pode contribuir para uma melhor estabilização térmica da enzima, pois um estado vibracional maior da molécula de proteína pode levar a um maior número de alinhamentos corretos, favorecendo intensa interação enzima-suporte. Embora esse suporte possua poros menores em relação ao suporte glioxil-agarose-6%, isso não implicará resistência difusional severa na hidrólise de substratos protéicos, pois o substrato a ser utilizado com este biocatalisador será polipeptídios com massa molecular

abaixo de 5 kDa (proteínas do soro previamente hidrolisadas sequencialmente por tripsina, quimotripsina e CPA).

4.2.4 – Imobilização controle de Alcalase® a 25°C, pH 10,05

Alcalase® foi imobilizada em glioxil-agarose-10% (210 μeqv de aldeídos/mL de suporte) a 25°C, pH 10,05. A carga oferecida foi de 15 mg de proteína/mL de suporte (1024 U_{BANE} /mL de suporte ou 43 U_{BAEE} /mL de suporte). O curso da imobilização foi acompanhado medindo-se o desaparecimento de proteína (medida pelo método de Bradford) e atividade enzimática (Unidades BANE). A Figura 4.28 mostra que o desaparecimento de atividade do sobrenadante está intrinsecamente relacionado com o desaparecimento de proteínas. No final de 113 horas havia sido imobilizado 12,8 mg de proteína/mL de suporte (R_I de 85,3%, em base protéica) e 940,7 U_{BANE} /mL de suporte (R_I de 91,9%). Na preparação de novos derivados Alcalase®-glioxil-agarose-10% foram utilizadas baixas cargas (< 0,20 mg de proteína/mL de suporte) e as imobilizações foram rápidas (< 1 h) e completas (R_I de 100%), como poderão ser vistas no decorrer da apresentação dos resultados.

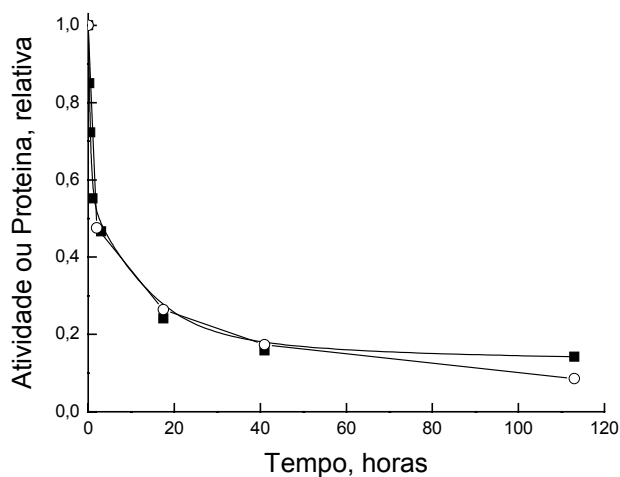


Figura 4.28 - Acompanhamento de atividade enzimática e proteínas no sobrenadante da imobilização de Alcalase® em glioxil-agarose-10% (210 μeqv /mL) a 25°C, pH 10,05. (■) proteína medida pelo método Bradford e (○) atividade enzimática medida a 25°C, pH 7,0, usando Boc-Ala-ONp como substrato. Carga enzimática oferecida: 15 mg de proteína/mL de suporte (1024 U_{BANE} /mL).

Embora seja procedimento padrão acompanhar o curso da imobilização medindo-se a concentração de proteína no sobrenadante, neste trabalho adotou-se como padrão acompanhar a atividade enzimática tanto do sobrenadante como da suspensão total (sobrenadante e suporte), permitindo, em imobilizações com prolongado tempo de contato enzima-suporte, verificar o quanto a enzima estava se desativando pela formação adicional de ligações covalentes com o suporte.

4.2.5 – Comparação de diferentes derivados preparados com curto tempo de contato enzima-suporte – mudança de protocolos de ativação

Alcalase® foi imobilizada em suportes glioxil-agarose-10%, glutaraldeído-agarose-6% e CNBr-agarose-4% (suporte comercial) com curto tempo de contato enzima-suporte (1 hora). Todos os derivados foram preparados na ausência de inibidor competitivo, pois Alcalase® imobilizada retém sua atividade catalítica praticamente inalterada, e a 25°C para acelerar a imobilização da enzima. Derivados Alcalase®-glutaraldeído e Alcalase®-CNBr agarose foram preparados em pH 7,0 e 7,5, respectivamente, devido a alta reatividade destes suportes em pH próximo da neutralidade. Derivados Alcalase® glioxil-agarose necessitam incubação em pH alcalino, pois requerem que os grupos amino dos resíduos de lisina da molécula de enzima estejam desprotonados e, portanto, foram preparadas em pH 10,05. Um derivado preparado usando glioxil-agarose com baixa concentração de grupos aldeídos (20 µeqv/mL) e curto tempo de contato (1 h) foi usado como derivado de referência para comparação da estabilização da enzima neste tipo de suporte e nos outros preparados com reagentes de ativação convencionais (glutaraldeído e CNBr).

Para a imobilização em suporte com baixa ativação (20 µeqv/mL) foi oferecida uma carga enzimática 35 vezes maior que aquela usada na preparação dos outros derivados (10 U_{BANE}/mL de suporte) para produzir um derivado com atividade mensurável. O rendimento de imobilização foi de 3%, pois a baixa concentração de grupos aldeídos não favorece rápidas velocidades de imobilização e nem intensa interação enzima-suporte. No entanto, a retenção de atividade foi alta (85% da atividade imobilizada). Para as imobilizações em suportes com alta ativação (75 e 210 µeqv/mL) a velocidade de imobilização foi alta (nenhuma atividade foi constatada no sobrenadante após 30 minutos de reação, portanto, rendimento de imobilização de 100%) e as retenções de atividade foram de 47% (para o derivado Alcalase®-CNBr), 75% (para o derivado Alcalase®-glutaraldeído) e 88% (para o derivado Alcalase®-glioxil).

Possivelmente, distorção da estrutura da enzima, promovida pelas ligações enzima-suporte ou orientação incorreta da enzima, bloqueando o sítio ativo, causaram os decréscimos na atividade catalítica da enzima imobilizada.

Enzima solúvel dialisada e imobilizada nos diferentes suportes foram inativadas a 50°C, pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM). A Figura 4.29 mostra o ajuste do modelo Sadana-Henley (equação 3.8) aos dados experimentais de inativação térmica. Pode-se notar que o modelo ajustou-se significativamente bem aos dados experimentais. O modelo, com cinética de inativação de 1ª ordem, ajustou-se melhor aos dados de inativação térmica da enzima solúvel dialisada.

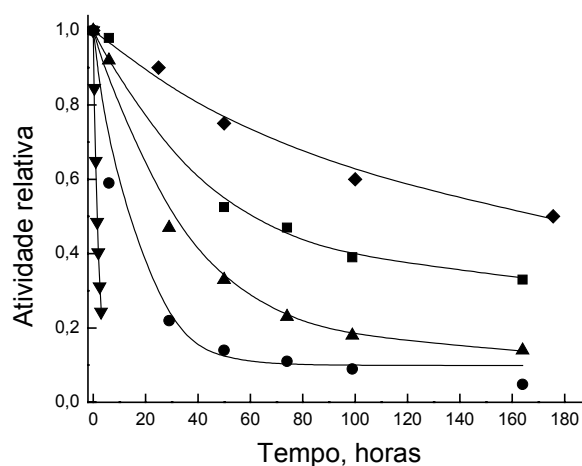


Figura 4.29 - Inativação térmica (50°C e pH 8,0) de (▼) Alcalase® solúvel dialisada, (●) Alcalase®-glutaraldeído, (▲) Alcalase®-CNBr, (■) Alcalase®-glioxil (com 20 µeqv/mL) e (◆) Alcalase®-glioxil (com 210 µeqv/mL). Derivados preparados com 1 h de reação enzima-suporte a 25°C. Curvas obtidas pelo ajuste do modelo de Sadana-Henley (equação 3.8) aos dados experimentais de inativação térmica. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

Os parâmetros do modelo (k_1 e α_1) e as meias-vidas calculadas a partir da equação 3.8 são mostrados na Tabela 4.9. Os resultados mostraram que Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose com baixa concentração de grupos aldeídos foi mais estável que aquela imobilizada sobre CNBr-agarose (2,1 vezes) e glutaraldeído-agarose (6,1 vezes). Além disso, Alcalase® imobilizada sobre glioxil-agarose com alta ativação (210 µeqv/mL) e curto tempo de contato enzima-suporte (1 hora) mostrou-se 2,7 vezes mais estável que aquela imobilizada sobre glioxil-agarose com baixa ativação (20 µeqv/mL).

Tabela 4.9 – Retenções de atividade (R_{EI}) e meias-vidas^a a 50°C (pH 8,0) de Alcalase® solúvel dialisada e imobilizada sobre diferentes suportes.

Biocatalisador	R_{EI} (%)	$k_1 \pm \sigma$ (h ⁻¹)	$\alpha_1 \pm \sigma$	Meia-Vida (h)	Estabilização
Solúvel dialisada	-	0,456 ± 0,013	0	1,52	1
Alcalase®-glutaraldeído	75	0,082 ± 0,011	0,099 ± 0,021	9,87	6,5
Alcalase®-CNBr	47	0,030 ± 0,003	0,132 ± 0,026	28,60	18,8
Alcalase®-glicoxil com baixa ativação	85	0,022 ± 0,002	0,317 ± 0,019	59,86	39,4
Alcalase®-glicoxil com alta ativação	88	0,010 ± 0,002	0,380 ± 0,068	164,22	108,0

^aCalculadas pela equação 3.8 (modelo de inativação térmica) com os parâmetros k_1 e α_1 tabelados.

Enquanto Alcalase® imobilizada em glicoxil-agarose-10% com 210 µeqv/mL era 108 vezes mais estável que a enzima solúvel, Alcalase® imobilizada em glutaraldeído-agarose era somente 6,5 vezes mais estável. Pode-se observar também que não somente a constante aparente de inativação de 1ª ordem, k_1 , foi menor para o melhor derivado (8,2 e 3,0 vezes menor, respectivamente comparado com as dos derivados Alcalase®-glutaraldeído e Alcalase®-CNBr), como também exibiu uma maior atividade residual (α_1 3,8 e 2,9 vezes maior que aquele para Alcalase®-glutaraldeído e Alcalase®-CNBr, respectivamente) no tempo ensaiado. Portanto, suporte glicoxil-agarose, ativado com alta concentração de grupos ativos (210 µeqv/mL), pode exercer um importante efeito estabilizante na molécula de enzima imobilizada, devido à possibilidade de formação de ligações multipontuais com o suporte. Contudo, pode ser necessário tempo de contato prolongado enzima-suporte, pois o alinhamento correto entre os grupos reativos do suporte e da superfície da enzima é lento.

4.2.6 – Influência do tempo de contato enzima insolubilizada-suporte ativado

Enzima e suporte ativado foram mantidos a 25°C (pH 10,05) por 1 a 96 horas, para fomentar a formação de ligações covalentes multipontuais. A Figura 4.30 mostra um decréscimo da retenção de atividade da enzima imobilizada com o tempo de imobilização, de 90% (para 1 hora de reação) para 60% (para 96 horas de reação), enquanto a atividade da enzima solúvel permanece constante. Portanto, toda perda de atividade pode ser associada a uma progressiva inativação da enzima imobilizada causada por distorção da estrutura,

promovida pelas múltiplas ligações formadas entre enzima e suporte. Após redução com borohidreto de sódio eram observadas perdas da ordem de somente 2 a 6%.

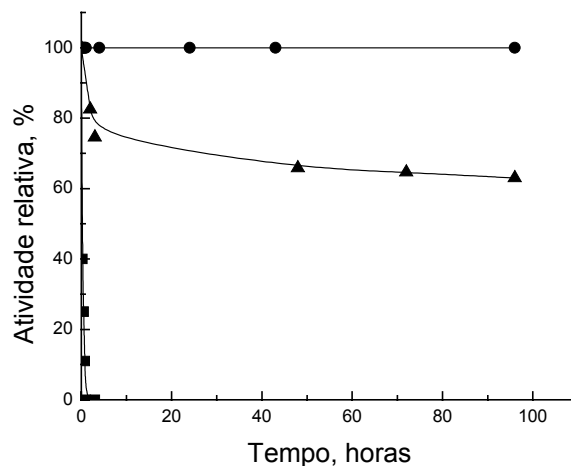


Figura 4.30 – Acompanhamento da atividade enzimática durante a imobilização de Alcalase® em glioxil-agarose-10% altamente ativado (210 $\mu\text{eqv/mL}$). Carga enzimática inicial 9,5 $U_{\text{BANE/mL}}$ de suporte (tomada como 100%), 25°C, pH 10,05. (●) Controle, (▲) suspensão total (sobrenadante e suporte) e (■) sobrenadante.

A partir das meias-vidas (Tabela 4.10), calculadas pela equação 3.8 ajustada aos dados experimentais de inativação térmica, a 63°C e pH 8,0 (Figura 4.31), é possível verificar que a estabilização da enzima imobilizada, em relação à enzima solúvel dialisada, variou de 104,4 vezes (para o derivado com 1 hora) para 514,6 vezes (para o derivado com 96 horas). Os fatores de estabilização foram calculados multiplicando as estabilizações dos derivados Alcalase®-glioxil (alta ativação) em relação ao derivado de referência (Alcalase®-glioxil - baixa ativação) pela estabilização deste derivado em relação à enzima solúvel dialisada (39,4 vezes), determinada a 50°C, pH 8,0 (Tabela 4.9). Este procedimento foi possível porque as estabilizações a 50°C e 63°C do derivado Alcalase®-glioxil-1h em relação ao derivado de referência eram aproximadamente iguais (2,7 e 2,6 vezes, respectivamente).

A Tabela 4.11 mostra que o componente lisina diminuiu de 7,1% (para o hidrolisado ácido de Alcalase® solúvel) para 4,4% (para o hidrolisado ácido do derivado Alcalase®-glioxil-96h), portanto, aproximadamente 40% dos resíduos de lisina da preparação comercial Alcalase® envolveram-se nas ligações covalentes enzima-suporte, podendo-se explicar o aumento na estabilidade da enzima imobilizada pela formação de ligações covalentes multipontuais.

Tabela 4.10 – Meias-vidas^a ($t_{1/2}$) a 63°C (pH 8,0) de derivados de Alcalase® preparados com 1 a 96 horas de reação a 25°C, pH 10,05, usando como suporte glioxil-agarose-10% com 210 μeq de grupos aldeídos por mililitro de suporte.

Derivado	Ativação do suporte / tempo de reação	$k_1 \pm \sigma$ (h^{-1})	$\alpha_1 \pm \sigma$	Meia-Vida (h)	Fator de Estabilização ^b
Referência	Baixa / 1 h	$0,423 \pm 0,037$	$0,059 \pm 0,022$	1,79	39,4
Alcalase®-glioxil-1h	Alta / 1 h	$0,181 \pm 0,024$	$0,133 \pm 0,075$	4,75	104,4
Alcalase®-glioxil-3h	Alta / 3 h	$0,150 \pm 0,021$	$0,157 \pm 0,041$	5,99	132,0
Alcalase®-glioxil-8h	Alta / 8 h	$0,098 \pm 0,006$	$0,172 \pm 0,018$	9,45	208,0
Alcalase®-glioxil-24h	Alta / 24 h	$0,071 \pm 0,006$	$0,190 \pm 0,032$	13,53	297,9
Alcalase®-glioxil-96h	Alta / 96 h	$0,067 \pm 0,008$	$0,368 \pm 0,033$	23,37	514,6

^aCalculadas pela equação 3.8 (modelo de inativação) com os parâmetros k_1 e α_1 tabelados.

^bCalculado como: ($t_{1/2}$ derivado / $t_{1/2}$ referência) x 39,4 (estabilização do derivado de referência a 50°C).

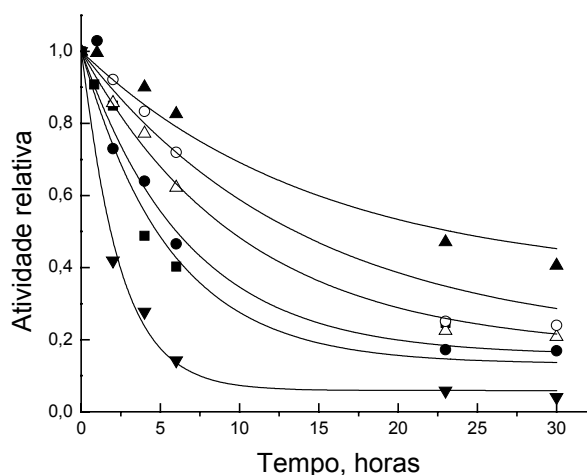


Figura 4.31 - Inativação térmica a 63°C e pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM) de (▼) Alcalase®-glioxil – baixa ativação (derivado de referência) e derivados preparados sobre glioxil-agarose com alta concentração de grupos aldeídos (210 $\mu\text{eq}/\text{mL}$) por (■) 1 hora, (●) 3 horas, (Δ) 8 horas, (O) 24 horas e (▲) 96 horas. As curvas foram obtidas pelo ajuste do modelo Sadana-Henley aos dados experimentais. A atividade inicial da suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

Tabela 4.11 - Conteúdo molar (%) de alguns aminoácidos de hidrolisados de Alcalase® solúvel e derivado Alcalase®-gloxil-96 h. Hidrólise por 24 horas em HCl 6 M, 105°C e análise de aminoácidos em analisador automático LKB 3201.

Aminoácido	Alcalase® solúvel	Gloxil-Alcalase®
Ser	14,0	14,5
His	3,5	3,2
Val	11,7	11,3
Leu	9,7	9,9
Lys	7,1	4,4

Assim, definiu-se as condições ótimas de imobilização de Alcalase® como sendo: suporte gloxil-agarose-10% com 210 µeqv aldeído / mL de suporte, 25°C, pH 10,05 (tampão bicarbonato 100 mM), $V_{\text{SUPORTE}}/V_{\text{SUSPENSÃO}}$ igual a 1/5, 96 horas de reação na ausência de inibidor competitivo, redução com borohidreto de sódio (1 mg/mL, 25°C, pH 10,05, 30 minutos de reação, $V_{\text{SUPORTE}}/V_{\text{SUSPENSÃO}}$ igual a 1/10) na ausência de inibidor competitivo.

4.2.7 – Hidrólise de caseína com Alcalase® solúvel e Alcalase®-gloxil-96h

Primeiramente verificou-se a influência da temperatura na hidrólise de um substrato protéico (nesse caso, caseína), catalisada por Alcalase® solúvel e pelo derivado Alcalase®-gloxil mais estável (Alcalase®-gloxil-96h). As velocidades iniciais de hidrólise foram determinadas em várias temperaturas, de 40 a 90°C (pH 8,0), usando caseína 0,1% (p/v) como substrato. Uma relação enzima/substrato igual a 80 U_{BANE}/g de caseína foi mantida constante em todos os ensaios. A Figura 4.32 mostra que o derivado estabilizado teve velocidade de hidrólise máxima a uma temperatura 10°C acima daquela obtida para a enzima solúvel, além de apresentar a 90°C uma velocidade de hidrólise aproximadamente 6 vezes maior que a obtida para a enzima solúvel. Diferentemente do observado para a CPA, as reações de hidrólises catalisadas por Alcalase®, solúvel e imobilizada, apresentaram praticamente a mesma energia de ativação (Figura 4.33), mostrando que o deslocamento da temperatura ótima aparente deveu-se exclusivamente à maior rigidez da molécula de enzima imobilizada, que se inativa mais lentamente.

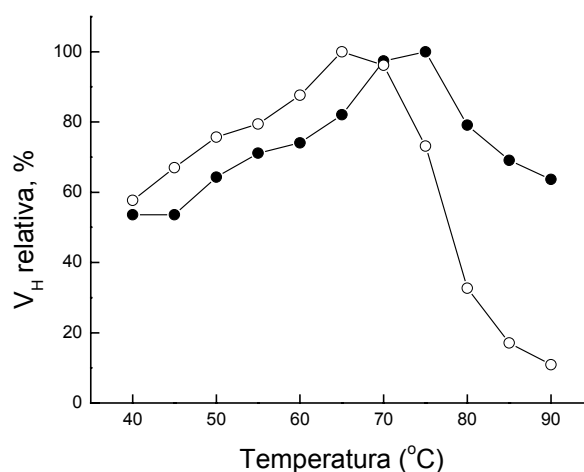


Figura 4.32 – Velocidades iniciais de hidrólise (calculadas usando a equação 3.9) catalisadas por (○) Alcalase® solúvel e (●) Alcalase®-glixil-96h, medidas com caseína 0,1% (p/v), pH 8,0, E/S igual a 80 U_{BANE}/g de caseína. Velocidade relativa foi definida como a razão entre a velocidade inicial de hidrólise medida a uma determinada temperatura e a velocidade inicial de hidrólise máxima.

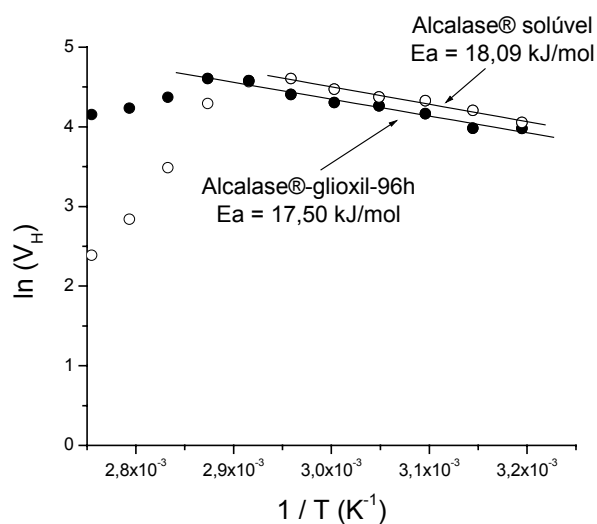


Figura 4.33 – Gráfico de Arrhenius de temperatura e velocidade de hidrólise de caseína, catalisada por (○) Alcalase® solúvel e (●) derivado Alcalase®-glixil-96h. A energia de ativação (E_a) foi calculada multiplicando-se a tangente do trecho linear da curva pela constante dos gases ($R = 8,3$ J/mol/K).

Hidrolisou-se caseína 1% e 0,2% (p/v) a moderada temperatura (45°C) e alta temperatura (80°C), com Alcalase® solúvel, Alcalase®-glioxil-96h com 6,3 U_{BANE}/mL de suporte (baixa carga) e Alcalase®-glioxil-96h com 114 U_{BANE}/mL de suporte (alta carga), e comparou-se os produtos gerados pela hidrólise por cromatografia de exclusão de tamanho. As reações, realizadas em pHstato, eram iniciadas pela adição de quantidades de enzima solúvel ou imobilizada de forma a darem as mesmas velocidades iniciais (em todos os ensaios a relação U_{BANE}(imobilizada)/U_{BANE}(solúvel) era igual a 6). A Figura 4.34 (A) e (B) e 4.35 (A) e (B) mostram a variação do grau de hidrólise (calculado pela equação 3.10) com o tempo de reação, para enzima solúvel e imobilizada, a 45 e 80°C.

A 80°C, os graus de hidrólises obtidos com a enzima imobilizada (baixa e alta carga) eram aproximadamente duas vezes maiores que aqueles obtidos com a enzima solúvel, conseqüência da maior estabilidade da enzima imobilizada. A 45°C, os graus de hidrólises tanto para enzima solúvel como para enzima imobilizada (baixa e alta carga) foram aproximadamente iguais. Nesse caso, a inativação da enzima solúvel não foi suficiente para influenciar a sua atividade proteolítica de maneira significativa. Entretanto, ensaio de inativação térmica a 45°C, pH 8,0 (Figura 4.36) mostrou que enquanto a enzima solúvel (comercial não dialisada) perdeu 50% de sua atividade inicial em aproximadamente 22 horas, a enzima imobilizada (derivado Alcalase®-glioxil-96h, baixa carga) reteve aproximadamente 90% de sua atividade inicial após aproximadamente 20 dias. Dessa forma, do ponto de vista operacional, a enzima imobilizada é melhor que a enzima solúvel.

As Tabelas 4.12 e 4.13 mostram a distribuição de massa molecular dos peptídios gerados pelas hidrólises de caseína 1% (p/v) e 0,2%, respectivamente, catalisada por Alcalase® solúvel e imobilizada (alta e baixa carga). A fração de peptídios com massa molecular abaixo de 1672 Da, produzida a moderada temperatura (45°C), usando tanto enzima solúvel como enzima imobilizada, era em média 59% (base mássica), quando caseína 1% foi usada, e em média 28% (base mássica), quando caseína 0,2% foi usada. Entretanto, a 80°C a fração abaixo de 1672 Da, produzida por Alcalase® imobilizada, era 3,0 vezes (caseína 1%) e 2,0 vezes (caseína 0,2%) maior que aquelas produzidas por Alcalase® solúvel. Além disso, a fração com peptídios com massa molecular maior que 5 kDa era 3,2 vezes (caseína 1%) e 1,6 vezes (caseína 0,2%) maior quando enzima solúvel era usada ao invés de enzima imobilizada. Portanto, a alta estabilidade do derivado Alcalase®-glioxil-96h (baixa e alta carga) permitiu sua utilização a alta temperatura com excelente desempenho.

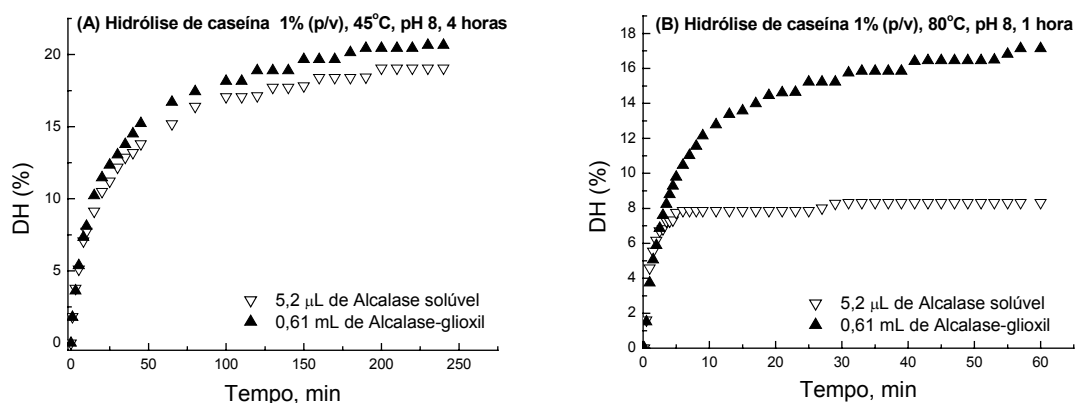


Figura 4.34 – Curvas de hidrólises de caseína 1% (p/v) catalisadas por (▽) Alcalase® solúvel e (▲) Alcalase®-glioxil-96h com 114 U_{BANE}/mL de suporte. (A) 45°C, pH 8,0, velocidade inicial de 91,5 $\mu eqv/min$; (B) 80°C, pH 8, velocidade inicial de 412,6 $\mu eqv/min$. Experimentos realizados em pHstato, modelo Titrino, com agitação magnética e controle de pH (pela adição de NaOH 150 mM) e temperatura.

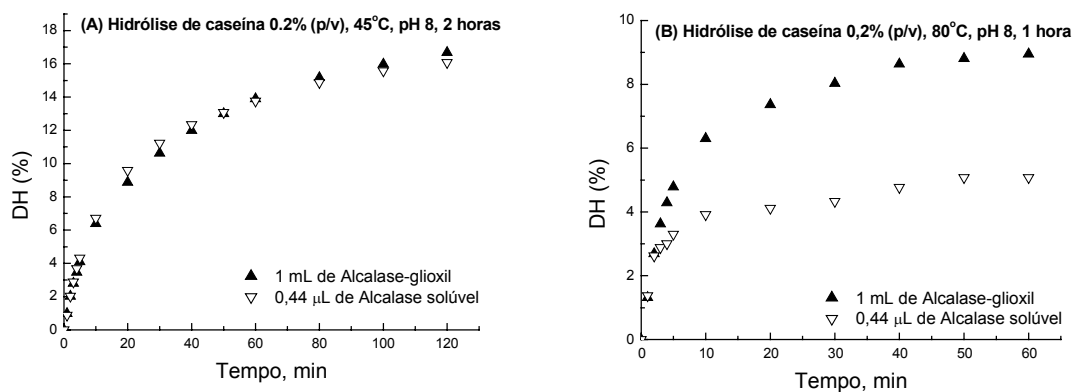


Figura 4.35 – Curvas de hidrólises de caseína 0,2% (p/v) catalisadas por (▽) Alcalase® solúvel e (▲) Alcalase®-glioxil-96h com 6,3 U_{BANE}/mL de suporte. (A) 45°C, pH 8,0, velocidade inicial de 77,1 $\mu eqv/min$; (B) 80°C, pH 8, velocidade inicial de 114,9 $\mu eqv/min$. Experimentos realizados em pHstato, modelo Titrino, com agitação magnética e controle de pH (pela adição de NaOH 20 mM) e temperatura.

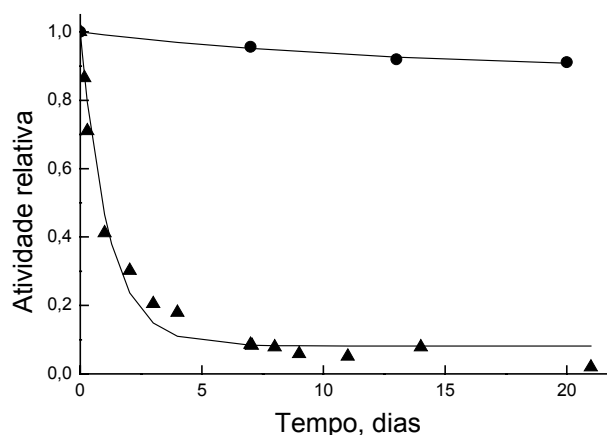


Figura 4.36 – Inativação térmica de (▲) Alcalase® solúvel (não dialisada) e (●) Alcalase®-glixil-96h (baixa carga), a 45°C, pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM). Atividades residuais medidas a 25°C, pH 7,0, com Boc-Ala-ONp como substrato. Parâmetros do modelo de inativação (equação 3.8) ajustado aos experimentais para enzima solúvel: $k_1 = 0,871 \pm 0,090$ dias⁻¹ e $\alpha_1 = 0,082 \pm 0,017$, e para enzima imobilizada: $k_1 = 0,077 \pm 0,029$ dias⁻¹ e $\alpha_1 = 0,883 \pm 0,024$. A atividade inicial da solução ou suspensão de inativação foi considerada igual à unidade.

Tabela 4.12 – Distribuição de massa molecular de peptídios gerados após hidrólise de caseína 1% (p/v) com Alcalase® solúvel e Alcalase®-glixil-96h (alta carga) a 45 e 80°C, pH 8,0. Os hidrolisados de caseína foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho.

MM (Da)	% (mássica) de peptídios			
	45°C, 4 horas		80°C, 1 hora	
	Alcalase® solúvel	Alcalase®-glixil	Alcalase® solúvel	Alcalase®-glixil
> 5000	0	6,5	50,6	15,8
5000-1672	43,3	33,1	41,1	58,8
1672-1046,7	47,6	50,0	2,3	12,9
1046,7-555,6	4,4	4,8	3,4	7,5
< 555,6	4,7	5,7	2,6	4,9

MM – massas moleculares de proteínas e peptídios padrões.

Tabela 4.13 – Distribuição de massa molecular de peptídios gerados após hidrólise de caseína 0,2% (p/v) com Alcalase® solúvel e Alcalase®-glixil-96h (baixa carga) a 45 e 80°C, pH 8,0. Hidrolisados de caseína foram fracionados por cromatografia de exclusão de tamanho.

MM (Da)	% (mássica) de peptídios			
	45°C, 2 horas		80°C, 1 hora	
	Alcalase® solúvel	Alcalase®-glixil	Alcalase® solúvel	Alcalase®-glixil
> 5000	11,7	21,1	71,6	43,7
5000-1672	61,1	50,8	22,4	44,3
1672-1046,7	13,6	13,2	6,0	3,1
1046,7-555,6	3,1	4,6	0,0	1,8
< 555,6	10,6	10,4	0,0	7,1

MM – massas moleculares de proteínas e peptídios padrões.

Finalmente, visando a utilização do derivado Alcalase®-glixil-96h (derivado mais estável) na hidrólise de peptídios produzidos pela ação de tripsina, quimotripsina e CPA sobre as proteínas do soro de queijo, comparou-se os graus de hidrólise de caseína 0,2% obtidos com 1 hora de reação nas temperaturas de 45 a 80°C. A Figura 4.37 mostra uma temperatura ótima de hidrólise em torno de 55°C. Entretanto, para os próximos ensaios utilizaremos 50°C, pois nesta temperatura, além de já não se ter problemas de contaminação microbiana do meio reacional, o DH era aproximadamente 90% daquele obtido a 55°C.

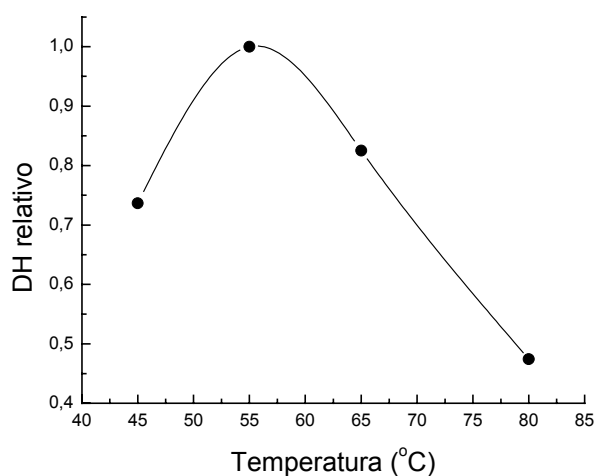


Figura 4.37 – Hidrólise de caseína 0,2 % (p/v) catalisada por Alcalase®-glixil-96h com 6,3 U_{BANE}/mL de suporte (baixa carga). Condições experimentais: pH 8,0 (controlado pela adição de NaOH 20 mM), E/S = 158 U_{BANE}/g de proteína, 1 hora de reação.

A influência do pH na velocidade de hidrólise de proteínas, catalisada por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-6%, já havia sido estudada por Sousa Jr. (2003). Sousa Jr., que estudava o controle do pH na hidrólise de proteínas, encontrou uma velocidade máxima de hidrólise, a 50°C, no pH em torno de 10. Derivados Alcalase®-glioxil puderam ser utilizados repetidas vezes em ensaios de longa duração (6 horas) a 50°C e pH 10, sem perda significativa de atividade. Portanto, neste trabalho, para ter-se segurança contra perdas de atividade por inativação da enzima quanto ao pH na temperatura de 50°C, selecionou-se o pH 9,5 para as hidrólises de polipeptídios catalisadas por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-10%. Neste pH, a velocidade de hidrólise era duas vezes superior à velocidade no pH 8,0 e correspondia a 90% da velocidade inicial máxima, medida no pH 10.

4.3 – Estudo Cinético da Hidrólise de Resíduos Carboxi-Terminais Catalisada por CPA Imobilizada em Glioxil-Agarose-6%

4.3.1 – Modelo cinético proposto

A cinética da hidrólise de resíduos carboxi-terminais, catalisada por CPA, é muito complexa, tendo um grande número de complexos presentes simultaneamente. Num dado momento, a enzima pode estar livre; ligada com inibidores competitivos (por exemplo, Tyr e Phe); ligada com o peptídeo contendo Tyr, Phe, Trp ou outros possíveis resíduos que ela também ataca (Val, Met, Ileu, Leu, entre outros). Um modelo mecanístico que previsse a liberação de cada aminoácido individualmente tornaria-se muito complexo, pois teria que se levar em consideração, separadamente, todos esses complexos presentes. Dessa forma, o modelo dependeria de um número grande de parâmetros, tornando-se intratável matematicamente. Optou-se, portanto, em se trabalhar com um modelo representado em termos de ligações peptídicas carboxi-terminais, que não leva em consideração a natureza do resíduo de aminoácido carboxi-terminal a ser liberado pela enzima. O modelo proposto considera tanto inibição pelo substrato como inibição pelo produto, como será discutido a seguir. Assim, obtém-se o seguinte modelo cinético do tipo Michaelis-Menten:

$$V_N = \frac{k \times E \times N}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + N \left(1 + \frac{N}{K_S}\right)} \quad (4.1)$$

onde: V_N é a velocidade de hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, em milimol de ligações peptídicas hidrolisadas por minuto por grama de biocatalisador ($\text{mmol}/\text{min}/\text{g}_{\text{cat}}$) ou por litro de reator ($\text{mmol}/\text{min}/\text{L}$); N é a concentração molar de ligações peptídicas carboxi-terminais disponibilizadas pela ação seqüencial de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro de queijo (mmol/L); I é a concentração molar do inibidor (mmol/L); k ($\text{mmol}/\text{min}/U_{\text{H-PHE}}$), K_M (mmol/L), K_S (mmol/L) e K_I (mmol/L) são os parâmetros do modelo cinético; e E é a concentração de enzima, em $U_{\text{H-PHE}}/\text{g}_{\text{cat}}$ ou $U_{\text{H-PHE}}/\text{L}$ de reator.

A concentração inicial de ligações peptídicas hidrolisáveis (N_0 , em mmol/L), disponibilizadas pela ação seqüencial de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro de queijo, era dada pela equação 4.2:

$$N_0 = C_H \times h_{\text{tot}} \times (\text{DH}_{\text{TOTAL}} - \text{DH}_{\text{INICIAL}}) \div 100 \quad (4.2)$$

onde: C_H é a concentração do hidrolisado de proteínas do soro de queijo, em g/L ; h_{tot} é o número total de ligações peptídicas nas proteínas do soro (8,8 meqv/g de proteína ou mmol/g de proteína); DH_{TOTAL} é o grau de hidrólise máximo das proteínas do soro de queijo, neste caso, obtido por ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e CPA; e $\text{DH}_{\text{INICIAL}}$ é o grau de hidrólise inicial das proteínas do soro de queijo, neste caso, obtido por ação seqüencial de tripsina e quimotripsina.

Foi verificado experimentalmente que após ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e CPA, sobre as proteínas do soro de queijo, era possível se obter um grau de hidrólise de aproximadamente 20%, em concordância com o obtido por Lara (1997). Graus de hidrólise maiores (até 37,5%) podem ser obtidos, no entanto, com hidrólises máximas com tripsina e quimotripsina e tempo prolongado (acima de 8 horas) de reação com CPA (Pedroche *et al.*, 2002). Nas condições usadas neste trabalho (DH de 7% com tripsina e quimotripsina, e 5 horas de reação com CPA), 20% foi um bom valor a ser considerado, tendo sido adotado.

Para a determinação da concentração de inibidor I foi considerado que a cada ligação peptídica quebrada, um inibidor era gerado (resíduo de aminoácido liberado, ou seja, o produto da reação). Assim, a concentração de inibidor I era igual a $N_0 - N$ (concentração de ligações peptídicas carboxi-terminais hidrolisadas).

A estimativa dos parâmetros V_{\max} ($k \times E$), K_M e K_S por convergência iterativa (método de Levenberg-Marquardt) gerava conjuntos de valores com desvios padrões da mesma ordem de grandeza dos parâmetros estimados, isto, devido à alta correlação entre eles. Optou-se assim pela busca direta dos parâmetros cinéticos, onde a cada conjunto de parâmetros testados obtinha-se as curvas $V_{N_0} \times N_0$, usando-se o programa Origin, versão 6.1. A busca era finalizada quando se obtinha curvas visualmente ajustadas aos dados experimentais. Na estimativa de K_I , utilizando-se dados de ensaios em batelada de longa duração com diferentes concentrações iniciais de substrato, utilizou-se um programa que faz uso do método de Marquardt, para estimativa do parâmetro, e o método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem, para integração da equação diferencial. A avaliação da qualidade do ajuste era feita verificando se as concentrações de produto, em função do tempo, calculadas pelo modelo, acompanhavam a tendência daquelas determinadas experimentalmente e, se o desvio padrão do parâmetro era baixo em relação ao valor estimado.

4.3.2 – Preparação do substrato

Tipicamente, proteínas do soro de queijo 5% (p/v) eram hidrolisadas sequencialmente, a 55°C (pH 8,0), com tripsina e quimotripsina imobilizadas em glioxil-agarose-6% (carga enzimática de 10 mg de proteína/mL de suporte), para a obtenção de um grau de hidrólise total de 7% (2% com tripsina e 5% com quimotripsina). O grau de hidrólise (calculado pela equação 3.10) era controlado pelo consumo de base necessária para manter o pH do meio reacional constante. Exemplificando, 350 mL de soro de queijo 4,6% (p/v), era hidrolisado com tripsina, numa razão enzima/substrato de 1/90 (186 mg de enzima e 16,1 g de proteínas). Após aproximadamente 40 min (consumo de 2,58 mL de NaOH 1 M), o produto era hidrolisado com quimotripsina, numa razão enzima/substrato de 1/70 (222 mg de enzima e 15,4 g de proteínas). Após aproximadamente 1,5 h (consumo de 6,2 mL de NaOH 1 M) o produto obtido tinha o grau de hidrólise (calculado usando-se $1/\alpha$ igual a 1,0984) desejado (DH de 7%).

A concentração final do hidrolisado (mistura de polipeptídios) era determinada pelo método de Kjeldahl e a distribuição de massa molecular por cromatografia de exclusão de tamanho. Em média, hidrolisados com DH de 7% eram formados por aproximadamente 50% de polipeptídios com massa molecular abaixo de 5 kDa (Tabela 4.14) e continha apenas

pequena quantidade de alguns aminoácidos em solução (menos de 0,6 g/100 g de proteínas), sendo His o aminoácido em maior quantidade (aproximadamente 0,25 g/100 g de proteínas).

Tabela 4.14 - Distribuição de massa molecular (por SE-HPLC) de polipeptídios obtidos por ação seqüencial de tripsina (DH de 2%) e quimotripsina (DH de 5%) sobre as proteínas do soro de queijo concentrado. Padrões: insulina (MM 5000 Da), neurotensina (MM 1672 Da), angiotensina II (MM 1002,2 Da) e leucina encefalina (MM 555,6 Da).

Distribuição de Tamanho em Da	MM média estimada para a faixa, em Da	Composição média $\pm \sigma$ (%)
MM > 5000 ^a	13618	48,5 \pm 2,0
1672 < MM < 5000	3336	25,6 \pm 3,4
1000 < MM < 1672	1336	12,1 \pm 2,8
555,6 < MM < 1000	778	7,1 \pm 0,9
MM < 555,6	344	6,7 \pm 1,3

^aA fração com MM > 5 kDa era formada por 11,5% de polipeptídios com MM de 66 kDa (SAB), 27,6% com MM de 18,3 kDa (β -Lg) e 9,4% com MM entre 14 (α -La) e 5 kDa (insulina).

4.3.3 – Seleção da concentração de enzima

Vinte e cinco mililitros de hidrolisado de proteínas do soro de queijo (DH de 7%) 0,5% (p/v) foram hidrolisados com CPA-glioxil-48h (contendo aproximadamente 1,0 mg de proteína/mL de suporte e uma atividade recuperada de 34,29 U_{H-PHE} / g de suporte) por 1 hora, a 45°C (pH 7,0), e com diferentes concentrações de enzima (diferentes relações enzima/substrato, E/S). Amostras de 0,5 mL do meio reacional (produto, substrato não convertido e enzima) eram coletadas em diferentes intervalos de tempo e misturadas imediatamente em 0,5 mL de TCA 2,4 M, para desativação da enzima e precipitação das proteínas, para análise posterior de aminoácidos.

A Figura 4.38 mostra que as velocidades iniciais de hidrólise dos aminoácidos liberados, calculadas a partir dos coeficientes angulares das curvas de concentração de aminoácido (mmol/L) em função do tempo (min), variam linearmente com a concentração de enzima para toda a faixa estudada. Dessa forma, as velocidades iniciais não sofreram interferências devidas, por exemplo, à inibição da enzima pelo produto e/ou substrato,

inativação da enzima, ou outros fatores; ou seja, as velocidades calculadas eram realmente as velocidades iniciais da reação, condição essa onde apenas a concentração de substrato vai influenciar na velocidade da reação.

Assim, escolheu-se trabalhar com uma relação E/S de até 5 U_{H-PHE}/g , nos ensaios de V_{N_0} em função de N_0 , e de até 20 U_{H-PHE}/g , nas hidrólises em batelada de longa duração.

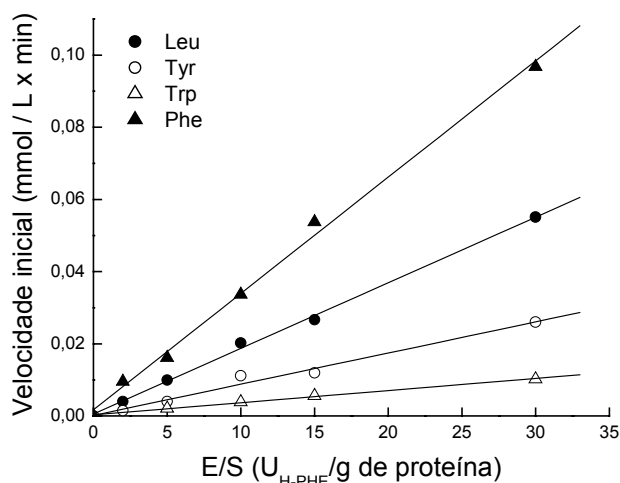


Figura 4.38 -Velocidades iniciais de hidrólise de resíduos carboxi-terminais, a partir de polipeptídios 0,5% (p/v), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C (pH 7,0), para diferentes E/S no meio reacional (25 mL).

4.3.4 – Determinação dos parâmetros cinéticos V_{max} , K_M e K_S

Hidrolisado de proteínas do soro de queijo (20,5 mL), nas concentrações de 5 a 38 g/L, era termostatisado a 45°C e o pH ajustado em 7,0 com HCl 1 M. Uma amostra de 0,5 mL era coletada e misturada em 0,5 mL de TCA 2,4 M, centrifugada e diluída em tampão citrato de sódio (pH 2,2) para posterior análise de aminoácidos por cromatografia de troca iônica (coluna Shim-Pack Amino-Na). A reação era iniciada pela adição de 0,0147 g de glioxil-CPA-48h (34,29 U_{H-PHE}/g de suporte). A concentração final de enzima, E, para todas as concentrações de substrato era de 25 U_{H-PHE}/L de reator (E/S variando de 0,66 a 5 U_{H-PHE}/g). O pH ao longo da reação se mantinha constante sem a necessidade de adição de base ou ácido. Amostras de 200 μL eram coletadas durante 30 min para diferentes tempos de reação e

misturadas imediatamente em 200 μL de TCA 2,4 M para inativação da enzima, centrifugadas e diluídas em tampão citrato de sódio (pH 2,2) para análise de aminoácidos.

As velocidades iniciais de liberação de aminoácidos, expressas em milimol de ligações peptídicas carboxi-terminais hidrolisadas por min por grama de biocatalisador (Tabela 4.15), calculadas a partir das tangentes das curvas mostradas na Figura 4.39, foram usadas para a estimativa de k , K_M e K_S . Na Figura 4.39, C_{cat} é a concentração de biocatalisador no reator (massa de biocatalisador em gramas por volume de reator em litros) e a concentração de ligações peptídicas hidrolisadas (N_0 -N) foi determinada por análise de aminoácidos, correspondendo à concentração total de aminoácidos liberados, em mmol/L.

Tabela 4.15 – Velocidades iniciais de hidrólise de resíduos carboxi-terminais (V_{N_0}), a 45°C (pH 7,0), catalisada por CPA-glioxil-48h (25 $U_{\text{H-PHE}}/\text{L}$ de reator), em função das concentrações iniciais de ligações peptídicas carboxi-terminais disponíveis, N_0 .

Concentração do hidrolisado de proteínas do soro de queijo (C_H), DH de 7% (g/L)	Concentração inicial de ligações peptídicas carboxi-terminais, N_0 (mmol/L) ^a	V_{N_0} (mmol/min/g _{cat}) x 10 ³
5	5,7	10,5
10	11,4	26,1
15	17,2	29,0
20	22,9	32,4
25	28,6	32,9
30	34,3	28,3
38	43,5	24,8

^aValores calculados pela equação 4.2, com DH_{TOTAL} de 20% e DH_{INICIAL} de 7%.

A Figura 4.40 mostra o ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato (equação 4.1 com $I = 0$), com $k = 2,78 \times 10^{-3}$ mmol/(min x $U_{\text{H-PHE}}$), $K_M = 22$ mmol/L e $K_S = 20$ mmol/L obtidos por busca direta. Pode-se observar que o modelo ajustou-se satisfatoriamente aos dados experimentais de $V_{N_0} \times N_0$. Além disso, o valor de K_M de 2,50 mM de polipeptídios¹⁴, concorda suficientemente bem com a ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura (Tabela 4.16) para diferentes sistemas enzima-substrato, pH e temperatura.

¹⁴ A partir da Tabela 4.14 a massa molecular média do hidrolisado de proteínas do soro de queijo é $(13618 \times 0,485 + 3336 \times 0,256 + 1336 \times 0,121 + 778 \times 0,071 + 344 \times 0,067) \approx 7.700$ g/mol. Usando a equação 4.2 K_M (em g/L) é igual a $22 / [8,8 \times (20 - 7)/100] \approx 19,23$ g/L. Portanto, o valor K_M expresso em milimolar de polipeptídios será $19,23 \times 1000 / 7700 \approx 2,5$ mM.

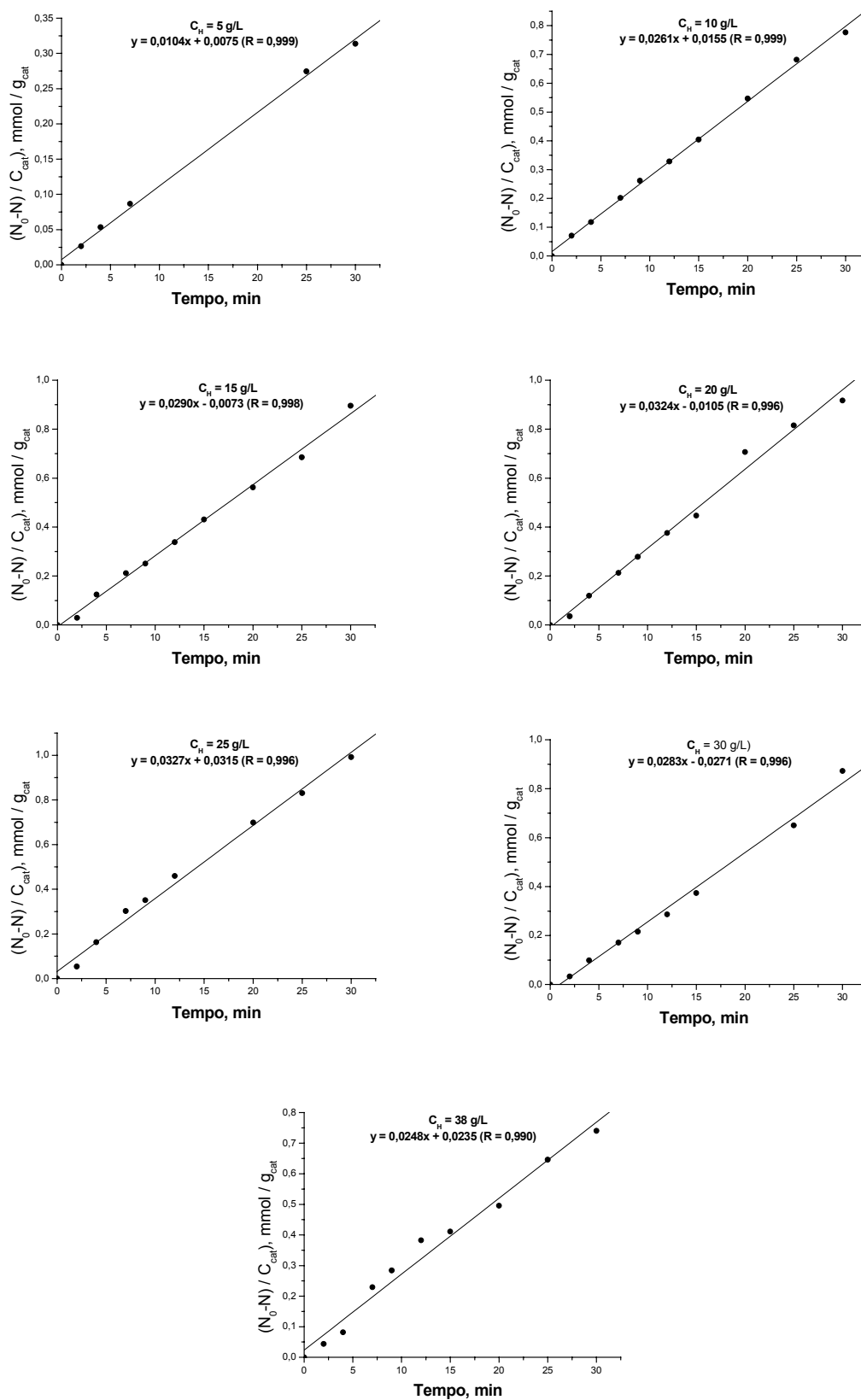


Figura 4.39 – Hidrólises de ligações peptídicas carboxi-terminais a 45°C (pH 7,0), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga), em função da concentração inicial do hidrolisado, C_H (5 a 38 g/L), para uma concentração fixa de enzima no reator (25 U_{H-PHE}/L).

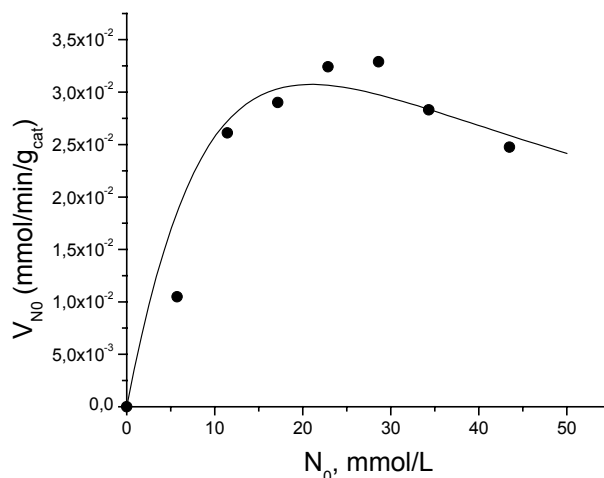


Figura 4.40 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C, pH 7 e 25 U_{H-PHE}/L . (●) Velocidades medidas experimentalmente e (—) velocidades previstas pelo modelo ajustado por busca direta dos parâmetros (equação 4.1 com $I = 0$).

4.3.5 – Determinação do parâmetro cinético K_I

Ensaio em batelada de longa duração foram realizados para a estimativa de K_I . Cem mililitros de solução de polipeptídios de 1, 2 e 4% (p/v) e 36 mililitros de solução de polipeptídios 7,5% (p/v) foram hidrolisados a 45°C (pH 7,0) com CPA-glioxil-48h, contendo 15,7 U_{H-PHE}/g de suporte. A reação era iniciada pela adição de 1,25 gramas da enzima imobilizada (19,6 U_{H-PHE}), obtendo-se relações E/S de 20, 10, 5,0 e 7,4 U_{H-PHE}/g , respectivamente para as concentrações de substrato utilizadas. Amostras de 0,5 mililitro eram coletadas durante 5 horas, em diferentes intervalos de tempo, para análise de aminoácidos.

Ensaio em batelada de longa duração também foram realizados utilizando-se glioxil-CPA-48h alta carga (aproximadamente 148 U_{H-PHE}/g de suporte) para verificar se havia ou não resistência difusional intrapartícula. Nessas hidrólises, 40 mililitros de solução de polipeptídios (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), nas concentrações de 10, 20 e 40 g/L, eram hidrolisados com aproximadamente 8 U_{H-PHE} (0,0533 g de enzima imobilizada). A relação E/S variou de 5 a 20 U_{H-PHE}/g , sempre dentro da região linear determinada (Figura 4.38).

A Figura 4.41 mostra, para um ensaio em batelada de longa duração, que as concentrações previstas pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato eram significativamente maiores que as concentrações medidas experimentalmente, sugerindo que a reação de hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, catalisada por CPA-glioxil-48h, poderia ser inibida pelo produto da reação (aminoácidos liberados); de fato, já se sabia que pelo menos Tyr e Phe eram inibidores competitivos de CPA.

Tabela 4.16 - Parâmetros cinéticos de reações de hidrólises catalisadas por CPA.

Enzima	Substrato	K_M (mM)	k em s^{-1}	Fonte	T e pH	Referência
CPA solúvel	Hipuril-L-Phe	1,07	n.d.	Pâncreas bovino	25°C, pH 7,5	Vértesi <i>et al.</i> , 1999
CPA-Akrilex C	Hipuril-L-Phe	1,65	n.d.			
CPA solúvel	Hipuril-L-fenil-lático	0,053	424	n.d.	25°C, pH 7,5	Whitaker <i>et al.</i> , 1966
	Hipuril-L-Phe	1,91	118			
	Benziloxicarbonil-glicil-L-Phe	5,83	106			
CPA acetilada	Benziloxicarbonil-glicil-L-Phe	89,1	n.d.			
CPA-glutaraldeído	N-carbobenzoxiglicil-L-Phe	19,2	n.d.	Pâncreas caprino	50°C, pH 6	Dua <i>et al.</i> , 1985
CPA solúvel	N-carbobenzoxiglicil-L-Phe	28,0	n.d.			
CPA solúvel	N-carbobenzoxiglicil-L-Phe	20,0	235,5 ^a	Pâncreas suíno	25°C, pH 7,5	Koide <i>et al.</i> , 1981
CPA solúvel	Hipuril-L-Phe	1,75	13	Pâncreas bovino	25°C, pH 7,5	Folk e Schirmer, 1963
	N-carbobenzoxiglicil-L-Phe	16,6	195			
	Hipuril-L-Phe	4,7	91,5	Pâncreas suíno		
CPA solúvel	Hipuril-L-Phe	0,84	139	n.d.	25°C, pH 7,5	Sebastian <i>et al.</i> , 1996
	N-benzoil-glicil-glicil-L-Phe	0,70	18,8			
	N-acetil-glicil-L-Phe	4,91	35			
CPA solúvel	Hipuril-L-Phe	0,93	1,96 ^b	Pâncreas bovino	25°C, pH 7,5	
CPA-glioxil agarose 6%	Polipeptídios com resíduos Thr, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe e Trp carboxi-terminais	2,50	2,78 ^b	Pâncreas bovino	45°C, pH 7	Este trabalho

^aUnidades = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

^bUnidades = $\mu\text{mol}/\text{min}/U_{\text{H-PHE}}$

n.d. – não determinado

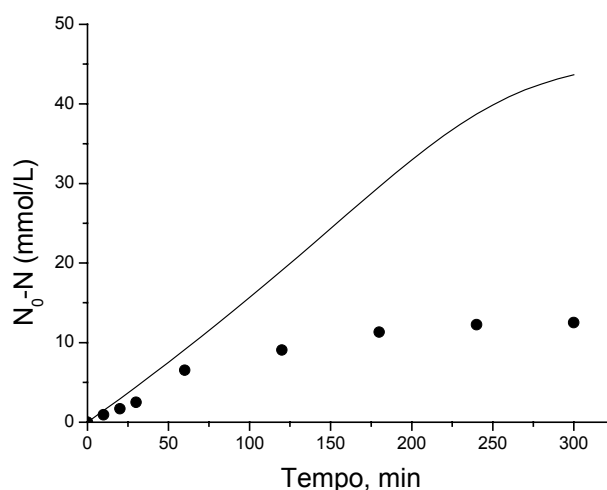


Figura 4.41 – Hidrólise em batelada de longa duração de solução de polipeptídios 40 g/L (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisada por CPA-glioxil-48h (baixa carga) a 45°C, pH 7,0, E/S de 5 U_{H-PHE}/g . (•) Concentrações de ligações peptídicas hidrolisadas medidas experimentalmente e (—) concentrações previstas pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato, com k igual a $2,78 \times 10^{-3}$ mmol/min/ U_{H-PHE} ; K_M igual a 22 mmol/L; K_S igual a 20 mmol/L.

O modelo cinético proposto (equação 4.1) foi ajustado aos dados experimentais e o parâmetro K_I estimado pelo método de Marquardt. As Figuras 4.42 (hidrólises em batelada usando enzima com baixa carga) e 4.43 (hidrólises em batelada usando enzima com alta carga) mostram que o modelo ajustou-se satisfatoriamente aos dados experimentais, ou seja, as concentrações previstas pelo modelo concordaram razoavelmente bem com as experimentais, além disso, os desvios padrões dos valores estimados de K_I eram baixos: aproximadamente 13% e 9%, respectivamente para bateladas utilizando-se CPA-glioxil baixa carga e alta carga.

Observa-se na Tabela 4.17 que os valores de K_I , estimados para uma mesma concentração inicial de substrato, utilizando-se CPA-glioxil baixa e alta carga, eram aproximadamente iguais. Além disso, as concentrações de produto ao longo do tempo, para hidrólises com mesmo N_0 e E/S, estavam muito próximas (Figura 4.44), mostrando que não havia resistência difusional intrapartícula nas hidrólises catalisadas pela enzima imobilizada, com alta carga, em glioxil-agarose-6%.

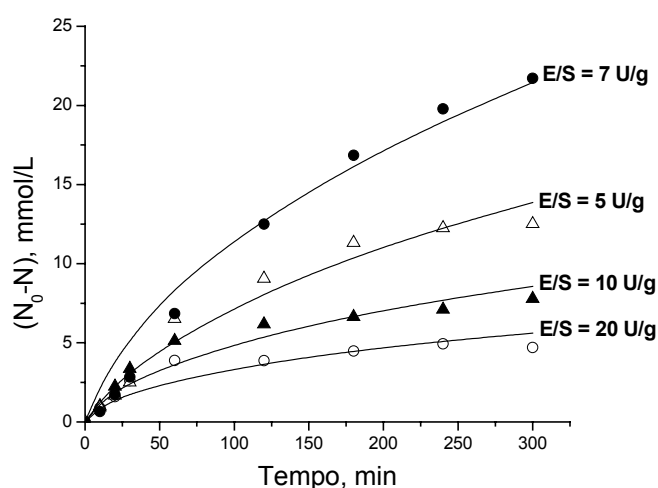


Figura 4.42 – Hidrólises em batelada de longa duração de solução de polipeptídios (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisadas por CPA-glioxil-48h com 15,7 U_{H-PHE}/g de suporte (baixa carga), a 45°C e pH 7,0. (●) $N_0 = 85,6$ mmol/L; (△) $N_0 = 45,8$ mmol/L; (▲) $N_0 = 22,9$ mmol/L; (○) $N_0 = 11,4$ mmol/L; (—) Modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto (equação 4.1) ajustado aos dados experimentais.

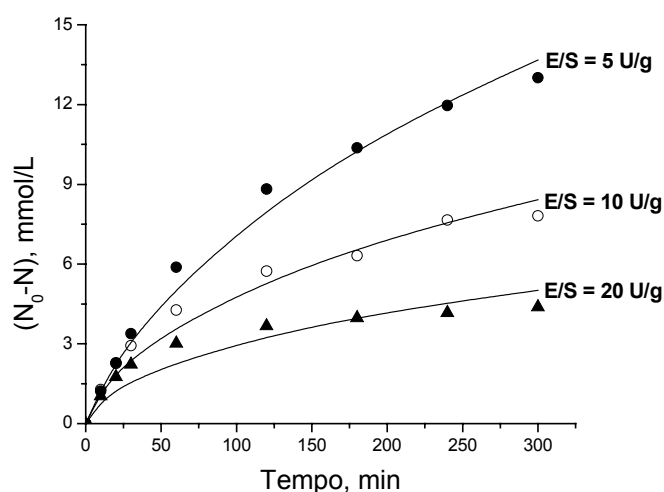


Figura 4.43 – Hidrólises em batelada de longa duração de solução de polipeptídios (hidrolisado de proteínas do soro de queijo, DH de 7%), catalisadas por CPA-glioxil-48h com 148 U_{H-PHE}/g de suporte (alta carga), a 45°C e pH 7,0. (●) $N_0 = 45,8$ mmol/L; (○) $N_0 = 22,9$ mmol/L; (▲) $N_0 = 11,4$ mmol/L; (—) Modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto (equação 4.1) ajustado aos dados experimentais.

Tabela 4.17 – Valores de K_I , em mmol de ligações peptídicas/L, estimados para a cinética de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto ajustada a hidrólise de ligações peptídicas carboxi-terminais, catalisada por CPA-glioxil baixa e alta carga, a 45°C e pH 7.

N_0 (mmol/L)	E/S ($U_{H-PHE/g}$)	$K_I \pm \sigma$ (CPA baixa carga)	$K_I \pm \sigma$ (CPA alta carga)
11,4	20	$0,33 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,04$
22,9	10	$0,35 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,03$
45,8	5	$0,51 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,03$
85,6	7	$0,21 \pm 0,02$	n.d.

n.d. – não determinado

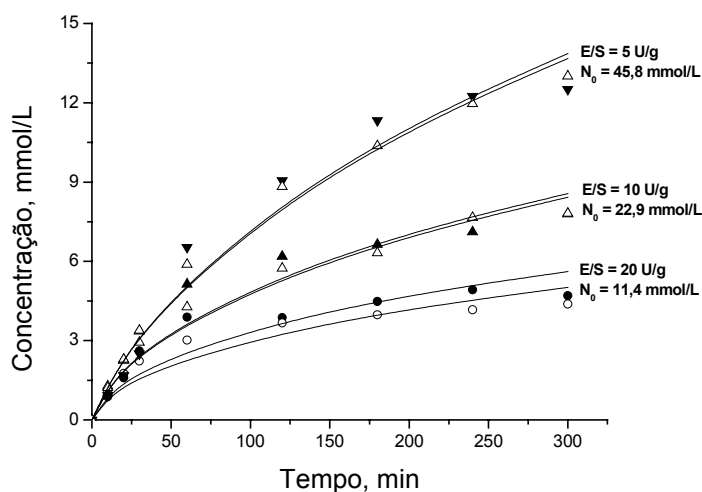


Figura 4.44 – Liberação de aminoácidos (Thr/Asn, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe e Trp) catalisada por CPA-glioxil-baixa carga (símbolos fechados) e CPA-glioxil-alta carga (símbolos abertos), a 45°C, pH 7,0. (—) Concentração total de aminoácidos predita pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto.

O parâmetro K_I teve um desvio de aproximadamente 32% em relação ao valor médio ($0,35 \pm 0,11$ mmol de ligações peptídicas/L), o qual pode ser considerado relativamente baixo dado à complexidade do sistema, o qual se tentou explicar por um modelo simplificado. Além disso, o valor médio encontrado, expresso em milimolar de polipeptídios ($K_I = 0,04$ mM), concorda bem com valores encontrados na literatura (Tabela 4.18). A complexidade do

sistema já era sabida, uma vez que há diferentes substratos possíveis para a enzima, com diferentes afinidades, o mesmo acontecendo com os inibidores presentes. Assim, um modelo mecanístico teria que levar em conta cada resíduo carboxi-terminal como um diferente substrato e cada aminoácido liberado com um poder inibitório diferenciado. Além disso, a afinidade de substratos e inibidores pela enzima ainda pode depender também da massa molecular da cadeia, já que o substrato é uma mistura de polipeptídios de diferentes massas moleculares. Contudo, a tentativa de se levar em conta todos os complexos enzimáticos que devem realmente estar presentes no sistema, conduziria a uma equação contendo um enorme número de parâmetros, de difícil uso e aplicação restrita (Gonçalves *et al.*, 2002). O fato é que esse modelo simplificado ajustou-se bem aos pontos experimentais, foi validado e, portanto, explicou razoavelmente o complexo sistema reacional utilizado. Uma vez que foi validado em faixa de concentrações de uso industrial, poderia ser perfeitamente utilizado para simulações dentro desta faixa e controle do processo, numa visão do ponto de vista da engenharia.

Tabela 4.18 – Valores de K_I para diferentes sistemas substrato-enzima-inibidor.

Substrato	Inibidor	K_I (mM)	Tipo de competição	Referência
CbzGlyGly-L-Phe	Cbz-Gly	29	Competitiva	Aud e Valle, 1970
Bz-GlyGly-L-Phe	Gly-Tyr	0,1	Competitiva	
CbzGlyGly-L-Phe	Ácido fenilacético	0,73	Não competitiva	
Hipuril-L-Phe	3-benzoilpropanoil-L-Phe	0,13	Competitivo	Sebastian <i>et al.</i> , 1996
	N-(trans-Stirilacetil)-L-Phe	0,06	Acompetitiva	
Hipuril-L-Phe	L-fenilalanina	4,0	Competitiva	Este trabalho
	L-tirosina	1,5	Competitiva	
Polipeptídios com Y resíduos C-terminais	Resíduos Y liberados	0,04	Competitiva	

Y – resíduos de Thr/Asn, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe ou Trp.

A Figura 4.45 mostra as concentrações médias relativas dos aminoácidos liberados por ação de glioxil-CPA-48h (baixa e alta carga) sobre as proteínas do soro de queijo (10, 20, 40 e 75 g/L) previamente hidrolisadas com tripsina e quimotripsina, a 45°C, pH 7,0. O acúmulo dos aminoácidos no meio reacional com o tempo de reação, com exceção de Phe, pôde ser bem representado por uma função hiperbólica:

$$\frac{C_{AA}}{C_{TOTAL}} = \frac{P_1 t}{P_2 + t} \quad (4.3)$$

onde: C_{AA} é a concentração, em mmol/L, do aminoácido liberado (Tyr, Phe, Trp, ou outro); P_1 e P_2 são os parâmetros da função ajustada (Tabela 4.19); t é o tempo de hidrólise em min; e C_{TOTAL} é a concentração, em mmol/L, do total de aminoácidos liberados (Thr/Asn, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe e Trp).

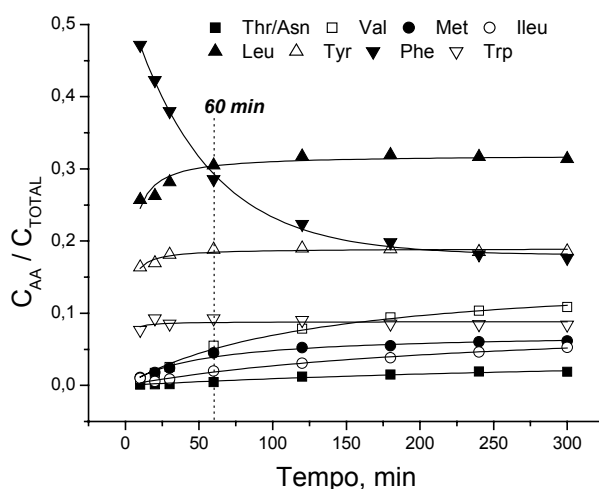


Figura 4.45 – Concentrações médias relativas (N° ensaios = 7) de aminoácidos liberados por ação de CPA sobre proteínas do soro de queijo previamente hidrolisado com tripsina e quimotripsina, a 45°C , pH 7,0. C_{AA} é a concentração (mM) de um determinado aminoácido (Thr/Asn, Val, Met, Ileu, Leu, Tyr, Phe ou Trp) e C_{TOTAL} é a concentração total (mM) dos aminoácidos liberados.

Como a velocidade de liberação de Phe é maior, este aminoácido é acumulado mais rapidamente no estágio inicial da reação; entretanto, sua concentração relativa decresce exponencialmente com o tempo de hidrólise. Assim, o acúmulo deste aminoácido no meio reacional pôde ser representado por um decaimento exponencial de 1^{a} ordem:

$$\frac{C_{AA}}{C_{TOTAL}} = 0,18 + 0,35 \times \exp\left(-\frac{t}{52,6}\right) \quad (4.4)$$

Tabela 4.19 – Constantes da função ajustada (equação 4.3) aos dados de concentrações relativas de aminoácidos em função do tempo de hidrólise, a 45°C (pH 7,0) catalisada por CPA-glioxil-48h.

Aminoácido	$(P_1 \pm \sigma) \times 10^3$	$(P_2 \pm \sigma)$
Thr/Asn	51 ± 17	445 ± 223
Val	159 ± 9	128 ± 17
Met	73 ± 3	52 ± 8
Ileu	95 ± 16	248 ± 75
Leu	319 ± 5	$3,0 \pm 0,5$
Tyr	189 ± 2	$2,0 \pm 0,3$
Trp	88 ± 3	$0,9 \pm 0,8$

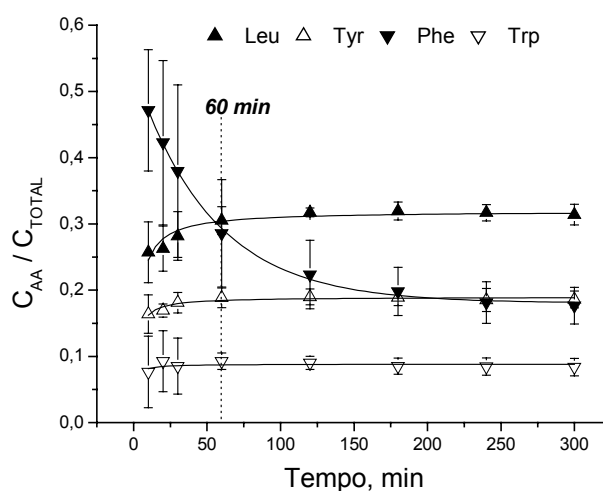


Figura 4.46 – Concentrações médias relativas de aminoácidos liberados por ação de CPA-glioxil-48h, a 45°C, pH 7,0, sobre proteínas do soro de queijo (10 a 75 g/L) previamente hidrolisado com tripsina e quimotripsina (DH de 7%). As barras representam os desvios em relação às médias das concentrações relativas de sete ensaios.

Vê-se que de posse do modelo cinético ajustado, Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto ($k = 2,78 \times 10^{-3}$ mmol/min/ U_{H-PHE} , $K_M = 22$ mmol/L, $K_S = 20$ mmol/L e K_I de 0,35 mmol/L), e das equações 4.3 e 4.4, é possível a estimativa da concentração de cada aminoácido de interesse, num dado tempo de hidrólise. Na primeira hora de reação tem-se maior oscilação em torno da média (Figura 4.46), pois, as concentrações dos aminoácidos em solução são baixas, induzindo a maiores erros experimentais, entretanto, após 1 hora de

reação as medidas de concentrações de aminoácidos, independentemente da concentração inicial de substrato, são muito reprodutivas, podendo-se ter um grau elevado de precisão nas concentrações relativas estimadas. Portanto, como uma hora de reação é um tempo muito curto para a hidrólise total dos resíduos carboxi-terminais aromáticos (de especial interesse neste trabalho), disponibilizados pela ação prévia de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro, as funções obtidas são de grande utilidade na estimativa do total de aminoácidos aromáticos hidrolisados pela carboxipeptidase A.

4.4 – Estudo Cinético da Hidrólise de polipeptídios Catalisada por Alcalase® Imobilizada em Glioxil-Agarose-10%

4.4.1 – Modelo cinético

De acordo com Svendsen (1976) e Adler-Nissen (1986), é geralmente aceito que para serina-proteases, como a Alcalase®, agindo sobre ligações peptídicas, o modelo clássico de Michaelis-Menten é obedecido. Por outro lado, tem sido aceito que na hidrólise de proteínas, catalisada por Alcalase®, os produtos da reação, ou seja, os peptídios que são continuamente formados inibem competitivamente a reação de hidrólise (Broudrant e Cheftel, 1976; Márquez-Moreno e Fernández-Cuadrado, 1993). Adler-Nissen (1986) relatou esta inibição pelo produto, explicando que na reação de degradação hidrolítica de uma cadeia polipeptídica (reação A, Figura 4.47) não somente a água, mas também grupos aminos livres poderiam reagir como agentes nucleofílicos, por meio dos quais reações de transpeptização (reação B, Figura 4.47) poderiam ocorrer. Assim, pode haver inibição competitiva entre H_2O e H_2N^- , e embora a reação de hidrólise seja favorecida pela alta concentração de água, o ataque nucleofílico por H_2N^- freqüentemente procede muitas vezes mais rápido. Isso significa que a transpeptização é de considerável importância na prática (Adler-Nissen, 1986).

Souza Jr. *et al.* (no prelo-b), estudando a cinética da hidrólise das proteínas do soro *in natura*, catalisada por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-6%, verificaram que o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva pelo produto representava bem os resultados obtidos em termos de grau de hidrólise em função do tempo de reação. Nesse modelo, a concentração de substrato era considerada em termos do número de ligações peptídicas a serem quebradas, N (mmol/L). Para a obtenção da concentração de inibidor, considerou-se que para cada ligação peptídica quebrada (N_0-N) uma concentração igual de

inibidor ($I = N_0 - N$) era gerada, onde os terminais amino dos peptídios gerados se ligariam à enzima, inibindo-a. O modelo cinético ajustado era representado pela equação 4.5:

$$V_N = \frac{k \times E \times N}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + N} \quad (4.5)$$

onde: V_N é a velocidade de hidrólise de ligações peptídicas (em mmol/min/g_{cat} ou mmol/min/L de reator); N é a concentração molar de ligações peptídicas no substrato que podem ser hidrolisadas pela Alcalase® (em mmol/L); I é a concentração molar do inibidor (mmol/L); k (em mmol/min/U_{BAEE}), K_M (em mmol/L) e K_I (em mmol/L) são os parâmetros do modelo cinético; E é a concentração de enzima no reator (em U_{BAEE}/g_{cat} ou U_{BAEE}/L de reator).

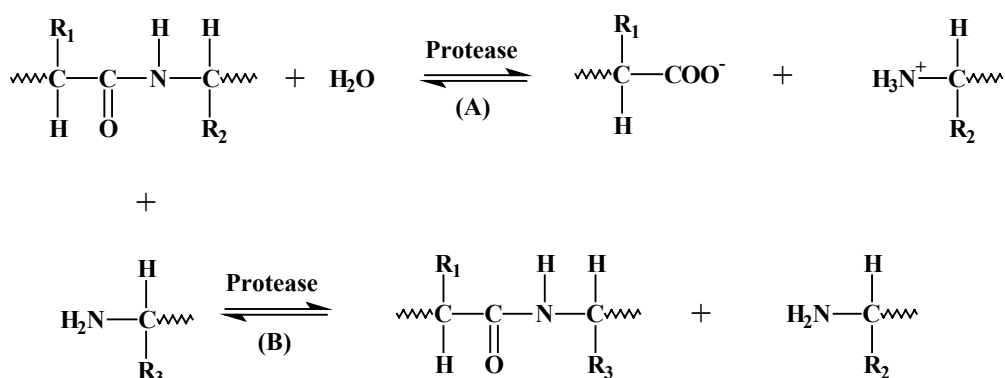


Figura 4.47 - Reações de (A) degradação hidrolítica e (B) transpeptização de uma cadeia polipeptídica, mostrando a competição entre a água e o grupo amino livre pelo ataque nucleofílico (Adler-Nissen, 1986).

Neste trabalho, tentou-se ajustar o modelo proposto (equação 4.5) à cinética de hidrólise de polipeptídios (produto da ação de tripsina, quimotripsina e CPA sobre as proteínas do soro de queijo) catalisada por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-10%. Algumas modificações foram introduzidas e serão discutidas à medida que se fizer necessário.

A estimativa dos parâmetros do modelo (V_{max} e K_M) fez-se pelo programa Origin, versão 6.1, que utiliza o método de convergência iterativa Levenberg-Marquardt com 0,95 de confiança. Na estimativa de K_I e na validação do modelo para ensaios em batelada de longa duração, utilizou-se um programa que utiliza o método de Marquardt, para estimativa do

parâmetro, e o método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem, para integração da equação diferencial. A avaliação da qualidade dos ajustes era feita verificando se as velocidades previstas pelo modelo acompanhavam ou mesmo se sobrepunham aos valores experimentais e se os desvios padrões dos parâmetros eram baixos em relação aos valores estimados.

4.4.2 – Seleção da concentração de enzima

Como discutido anteriormente, pretendendo-se ajustar um modelo de Michaelis-Menten, faz-se necessário trabalhar com uma concentração de enzima numa região tal que a velocidade inicial da reação varie linearmente com a concentração da enzima, para uma concentração de substrato fixa. Assim, foram feitos experimentos para localizar a faixa de linearidade e selecionar a concentração de enzima no reator a ser usada.

O substrato era uma solução de polipeptídios e aminoácidos livres 19 g/L (determinada pelo método Kjeldahl), obtida pela hidrólise sequencial de proteínas do soro de queijo com tripsina-glioxil-24h (55°C, pH 8,0, E/S = 1/140, DH de 2%), quimotripsina-glioxil-24h (55°C, pH 8,0, E/S = 1/190, DH de 5%) e, CPA-glioxil-48h com 24 U_{H-PHE}/mL de suporte (45°C, pH 7,0, 25 U_{H-PHE}/L de reator, DH de 2,9%, calculado pela equação 3.11 com M_{AL} igual a 3,35 gramas de aminoácidos por 100 gramas de proteína). Aproximadamente 50% dos polipeptídios tinham massa molecular menor que 5 kDa (Tabela 4.20) e em relação ao total de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas do soro (Tabela 2.3) 18,5% de Tyr, 13,8% de Phe e 14,8% de Trp tinham sido liberados, conforme mostra a Figura 4.48.

Tabela 4.20 - Distribuição de massa molecular (MM) de polipeptídios obtido por ação sequencial de tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 2,9%) sobre proteínas do soro de queijo 19 g/L.

Distribuição de Tamanho ^a	Composição média ± σ. (%)
MM > 5000	50,60 ± 1,19
1672 < MM < 5000	20,82 ± 0,83
1000 < MM < 1672	13,80 ± 0,35
555,6 < MM < 1000	5,79 ± 0,21
MM < 555,6	8,99 ± 0,99

^aPadrões: insulina (MM 5 kDa), neurotensina (MM 1,67 kDa), angiotensina II (MM 1 kDa) e leucina Encefalina (MM 0,56 kDa).

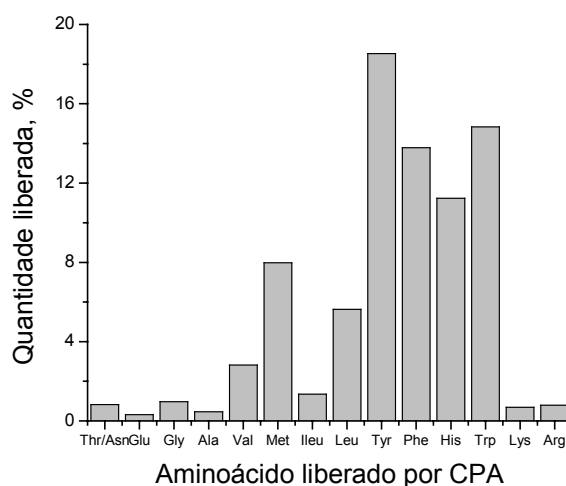


Figura 4.48 - Aminoácidos liberados pela ação de CPA-glioxil-48h (45°C, pH 7,0 e DH de 2,9%) sobre polipeptídios - proteínas do soro hidrolisadas seqüencialmente com tripsina (DH de 2%) e com quimotripsina (DH de 5%) a 55°C, pH 8. A quantidade total de cada aminoácido presente nas proteínas do soro (Tabela 2.3) refere-se a 100%.

Vinte mililitros de solução de polipeptídios e aminoácidos livres foram hidrolisados com Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga) por 10 minutos a 50°C, em pHstato, sendo o pH controlado em 9,5 pela adição de NaOH 40 mM. Para cada concentração de enzima no reator, a partir do volume de NaOH consumido, calculava-se as velocidades iniciais de hidrólise (V_H) usando-se a equação 3.9. A Figura 4.49 mostra a relação entre E/S (U_{BANE}/g proteína) e V_H (em meqv/min). A linearidade da curva mostra que para qualquer concentração de enzima escolhida na faixa estudada, o modelo de Michaelis-Menten poderá ser aplicado. A partir desses resultados, foi escolhida para os ensaios cinéticos uma concentração de enzima no reator de 400 U_{BANE}/L ($\approx 20 U_{BAEE}/L$), suficientemente alta para se ter liberação de produto em curto tempo de reação e mensurável com boa precisão experimental.

4.4.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos k , K_M e K_I

4.4.3.1 – Preparação do substrato

Os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto (equação 4.5) foram determinados usando como substrato proteínas do soro de queijo hidrolisadas seqüencialmente por tripsina-glioxil-24h (55°C, pH 8, E/S de 1/180, DH de 2%),

quimotripsina-glioxil-24h (55°C, pH 8, E/S de 1/200, DH de 5%) e CPA-glioxil-48h com 24 U_{H-PHE}/mL de suporte (45°C, pH 7, E/S de 20 U_{H-PHE}/g de proteína, 8 horas de reação para se obter DH de 7%, calculado pela equação 3.11 com M_{AL} igual a 8,2 gramas de aminoácidos por 100 gramas de proteínas). O produto final, com 41 g/L, era composto por polipeptídios (47,7% com massa molecular menor que 5 kDa, conforme mostra a Tabela 4.21) e aminoácidos livres. Em relação ao total de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas do soro (Tabela 2.3), 42,8% de Tyr, 29,0% de Phe e 32,2% de Trp tinham sido liberados, conforme mostra a Figura 4.50.

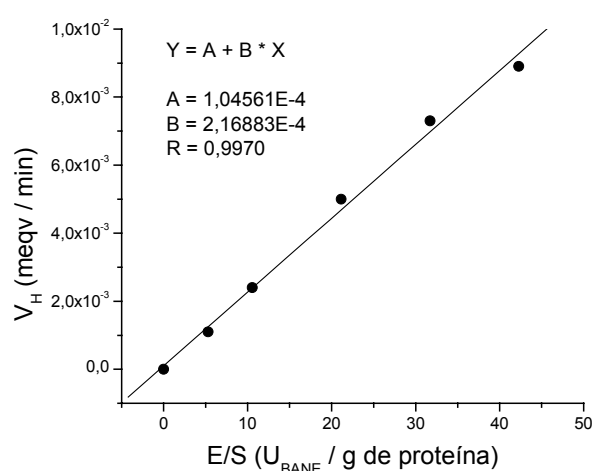


Figura 4.49 - Velocidades iniciais de hidrólises de polipeptídios, catalisadas por Alcalase®-glioxil-96h contendo 5,5 U_{BANE} /mL suporte (baixa carga), a 50°C, pH 9,5. Substrato: Hidrolisado tripsina (DH 2%) - quimotripsina (DH 5%) - CPA (DH 2,9%) de proteínas do soro de queijo 19 g/L.

Tabela 4.21 - Distribuição de tamanho de polipeptídios gerado pela hidrólise de proteínas do soro de queijo com tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 7%).

Distribuição de Tamanho ^a	Composição média $\pm \sigma$ (%)
MM > 5000	52,29 \pm 1,80
1672 < MM < 5000	20,52 \pm 1,77
1000 < MM < 1672	14,35 \pm 1,35
555,6 < MM < 1000	4,64 \pm 0,44
MM < 555,6	8,22 \pm 0,88

^aPadrões: insulina (MM 5000 Da), neurotensina (MM 1672 Da), angiotensina II (MM 1002,2 Da) e leucina encefalina (MM 555,6 Da).

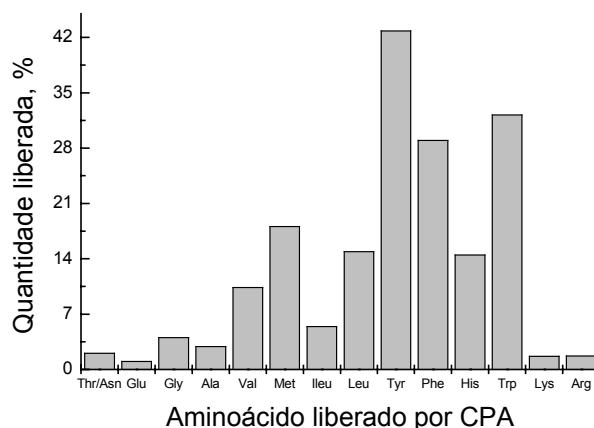


Figura 4.50 – Aminoácidos liberados pela ação de CPA-glioxil-48h (45°C, pH 7,0, E/S igual a 850 U_{H-PHE}/L de reator e DH de 7,0%) sobre polipeptídios - proteínas do soro hidrolisadas seqüencialmente com tripsina (DH de 2%) e com quimotripsina (DH de 5%) a 55°C, pH 8. A quantidade total de cada aminoácido presente nas proteínas do soro (Tabela 2.3) refere-se a 100%.

Nos ensaios para determinação de k e K_M , tipicamente, 20 mililitros da mistura de polipeptídios e aminoácidos livres (5 a 41 g/L) eram hidrolisados a 50°C (pH 9,5), em pHstato, por 15 min, usando NaOH 40 mM para controle do pH, sendo a reação iniciada pela adição de 0,15 gramas de Alcalase®-glioxil-96h¹⁵, dando uma concentração de enzima no reator de 20 U_{BAEE}/L. Nos ensaios para determinação de K_I e validação do modelo cinético, 20 mililitros da mistura de polipeptídios e aminoácidos livres, 10 e 41 g/L, eram hidrolisados a 50°C (pH 9,5) por 4 horas em pHstato, usando-se NaOH 200 mM para controle de pH, sendo a reação iniciada pela adição de 0,15 e 0,62 gramas de Alcalase®-glioxil-96h, respectivamente (razão E/S de 2,0 U_{BAEE}/g de proteína).

Para fins de comparação, foram determinados também os parâmetros cinéticos k e K_M para a enzima solúvel. Nos ensaios, 15 mililitros da mistura de polipeptídios e aminoácidos livres (5 a 20 g/L) eram hidrolisados a 50°C (pH 9,5) em pHstato por 15 min, usando NaOH 40 mM para controle do pH. A reação era iniciada pela adição de 0,23 mililitros de uma solução de Alcalase® solúvel 1,76 U_{BAEE}/mL. A solução enzimática foi preparada em água deionizada para evitar algum efeito tamponante no meio reacional.

¹⁵ Alcalase®-glioxil-96h continha 1,34 mg de proteína/mL de suporte e uma atividade recuperada de 2,68 U_{BAEE}/g de suporte.

4.4.3.2 – Estimativa de k e K_M

Como discutido anteriormente, o modelo cinético proposto requer o conhecimento da concentração de ligações peptídicas a serem quebradas pela Alcalase®. Como o substrato é o produto da ação seqüencial de tripsina, quimotripsina e CPA, a concentração de ligações peptídicas a serem quebradas será reduzida de um valor igual à soma dos graus de hidrólises obtidos com as endoproteases. É importante dizer que as ligações peptídicas quebradas pela CPA (exoprotease) não reduzem a concentração de ligações peptídicas para ação da Alcalase® (endoprotease). Ensaio de longa duração (6 a 8 h) mostraram que era possível se chegar a um grau de hidrólise máximo (DH_{TOTAL}) de aproximadamente 30% (após a ação das três endoproteases). Acima desse valor, já começava a ocorrer escurecimento do meio reacional, devido provavelmente a reação de Maillard. Optou-se dessa forma hidrolisar as proteínas do soro de queijo com um grau máximo de 30%. Para o substrato selecionado para esse estudo, o grau inicial de hidrólise ($DH_{INICIAL}$) era de 7% (DH de 2% com tripsina e 5% com quimotripsina).

As velocidades iniciais de hidrólise, expressas em milimol de ligações peptídicas hidrolisadas por min por grama de biocatalisador (Tabela 4.22), calculadas a partir das tangentes das curvas mostradas na Figura 4.51, foram usadas para a estimativa de k e K_M .

Tabela 4.22 – Velocidades iniciais de hidrólise (V_{N0}) a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (20 U_{BAEE}/L de reator), em função das concentrações iniciais de ligações peptídicas disponíveis, N_0 .

Concentração do hidrolisado de proteínas do soro de queijo (C_H), DH de 7% (g/L)	Concentração inicial de ligações peptídicas hidrolisáveis, N_0 (mmol/L) ^a	V_{N0} (mmol/min/g _{cat}) x 10 ³
5	10,1	27,2
10	20,2	34,8
15	30,4	40,5
20	40,5	42,5
30	60,7	45,1
41	83,7	45,4

^aValores calculados pela equação 4.2, com DH_{TOTAL} de 30% e $DH_{INICIAL}$ de 7%.

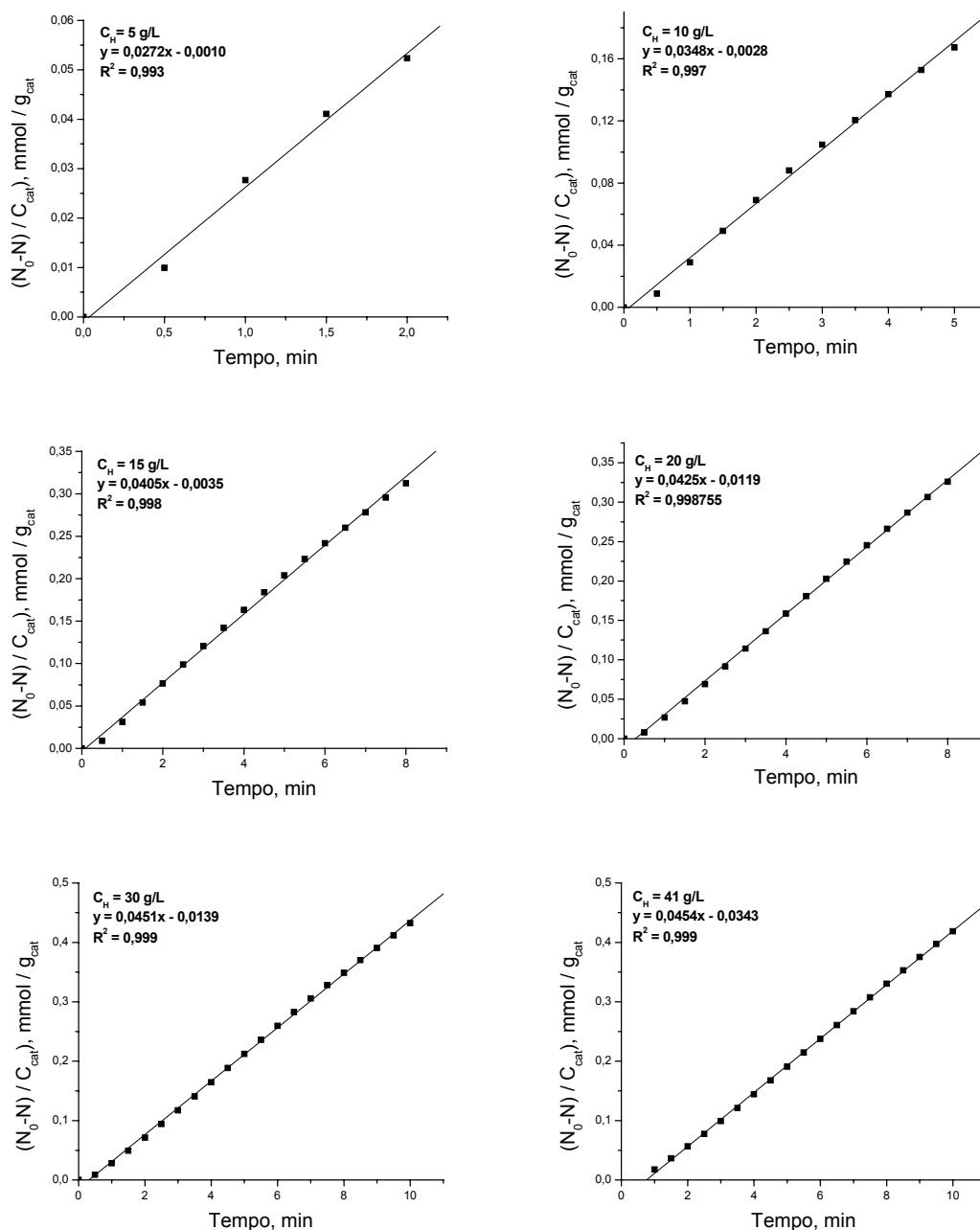


Figura 4.51 – Hidrólises de ligações peptídicas a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), em função da concentração inicial do hidrolisado, C_H (5-41 g/L), para uma concentração fixa de enzima no reator (20 U_{BAEE}/L). C_{cat} é a concentração do biocatalisador no reator (massa de biocatalisador em gramas por volume de reator em litros). $N_0 - N$ é a concentração de ligações peptídicas hidrolisadas (mmol/L), calculada como $B \times N_b \times 1/\alpha \times C_H \div MP$.

Na estimativa dos parâmetros cinéticos, V_{\max} ($k \times E$) e K_M , do modelo clássico de Michaelis-Menten, ajustado aos dados de $V_{N_0} \times N_0$ (Figura 4.52), usou-se como valores iniciais os obtidos a partir da linearização dos dados usando o método de Leneaweaver-Burk (K_M de 9,1 mmol/L e V_{\max} de 0,05 mmol / min \times g_{cat}). Pode-se observar na Figura 4.52 que as velocidades preditas pelo modelo acompanham ou até se sobrepõem aos valores experimentais e, além disso, os desvios padrões dos parâmetros foram baixos (menores que 7%). Assim, os parâmetros estimados foram: $K_M = 8,9 \pm 0,6$ mmol/L, $V_{\max} = 0,051 \pm 0,001$ mmol/(min \times g_{cat}) e, por conseguinte, $k = (V_{\max}/E) = 0,02$ mmol/(min U_{BAEE}), com E de 2,68 $U_{\text{BAEE}}/g_{\text{cat}}$.

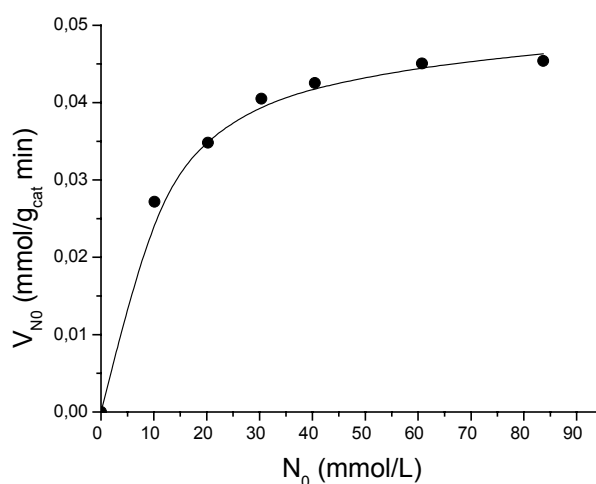


Figura 4.52 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais de velocidade inicial de hidrólise de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glixil-96h (baixa carga) a 50°C, pH 9,5 e 20 U_{BAEE}/L . (●) Velocidades medidas experimentalmente e (—) velocidades preditas pelo modelo ajustado usando o método de convergência iterativa Levenberg-Marquardt.

Como o substrato era uma mistura de polipeptídios contendo grupos aminos livres, que inibem a reação de hidrólise, algum efeito inibitório, inevitavelmente, foi incorporado ao parâmetro K_M , sendo o valor determinado aparente, ou seja, $K_M^{\text{ap}} = K_M \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)$. Este efeito inibitório, presente no início da reação, provoca uma diminuição de K_M^{ap} , como já verificado por Adler-Nissen (1986). Este verificou que na hidrólise catalisada por Alcalase® solúvel, usando caseína com um grau de hidrólise de aproximadamente 10%, ao invés de caseína não

hidrolisada, o valor de K_M^{ap} diminuía aproximadamente 5 vezes. Quando se comparou o valor de K_M^{ap} , obtido neste trabalho, com o valor obtido por Sousa Jr. *et al.*, no prelo-b (K_M de 53 mmol/L, obtido na hidrólise de proteínas inteiras do soro com Alcalase®-glioxil-6%), também se observou uma redução no valor do parâmetro, aproximadamente 6 vezes. Além disso, comparando o valor de K_M^{ap} com os encontrados na literatura (Tabela 4.23), para hidrólises de diferentes proteínas, catalisadas por Alcalase®, observa-se que a ordem de grandeza do valor encontrado neste trabalho concorda suficientemente bem.

Tabela 4.23 - Parâmetros cinéticos de reações de hidrólise catalisada por Alcalase®

Enzima	Substrato	K_M (g/L)	k (V_{max}/E) (s^{-1})	Condições experimentais	Referência
Alcalase® solúvel	Caseína	0,78	0,0036	50°C, pH 8	Ferreira <i>et al.</i> , 2002
Alcalase®- glutaraldeído-silica	Caseína	0,63	0,0048		
Alcalase®-glioxil agarose 6%	Proteínas do soro	13 a 26	0,022 – 0,069 ^a	50°C, pH 6 - 11	Souza Jr. <i>et al.</i> (no prelo-b)
Alcalase® solúvel	Caseína	3,6	0,86	50°C, pH 8	Mannhein e Cheryan, 1990
Alcalase® solúvel	Hidrolisado de proteínas da soja	6,0	n.d.	50°C, pH 8	Adler-Nissen, 1986 Obs: Alguns valores de K_M foram obtidos por outros autores e são revisados por Adler-Nissen.
	Caseína	5,0	n.d.		
	Proteínas da soja	9,0	n.d.		
	Proteínas da soja	15,0	n.d.	60°C, pH 8	
	Proteínas da soja	12,0	n.d.	50°C, pH 10	
	Gelatina	5,0	n.d.	30°C, pH 8	
	Caseína	1 a 2	n.d.	30°C, pH 8	
Alcalase®-glioxil agarose 10%	Hidrolisado de proteínas do soro	4,4 ^b	0,02 ^a	50°C, pH 9,5	Este trabalho
Alcalase® solúvel	Hidrolisado de proteínas do soro	1,4 ^b	0,03 ^a		

^aUnidade expressa em mmol/L/ U_{BAEE} .

^bA conversão das unidades de K_M foi feita usando a equação 4.2, fazendo $C_H = K_M$ em g/L e $N_0 = K_M$ em mmol/L.

n.d. – não determinado.

A Figura 4.53 mostra o ajuste do modelo aos dados de $V_{N_0} \times N_0$ para a enzima solúvel. O processo iterativo foi inicializado com valores obtidos pelo método de Leneaweaver-Burk (K_M de 2,9 mmol/L e V_{max} de 0,05 mmol / min x mL), obtendo-se $K_M = 2,8 \pm 0,4$ mmol / L; $V_{max} = 0,054 \pm 0,002$ mmol / (min x mL) e $k = (V_{max}/E) = 0,03$ mmol/(min U_{BAEE}), onde E é igual a 1,76 U_{BAEE}/mL . Pode-se observar na Figura 4.53 que as velocidades previstas pelo modelo concordaram bem com as experimentais e, além disso, os desvios padrões dos

parâmetros foram baixos (15 e 4%, respectivamente para K_M e V_{max}). O valor de K_M concordou muito bem com os valores encontrados na literatura, como pode ser visto na Tabela 4.23.

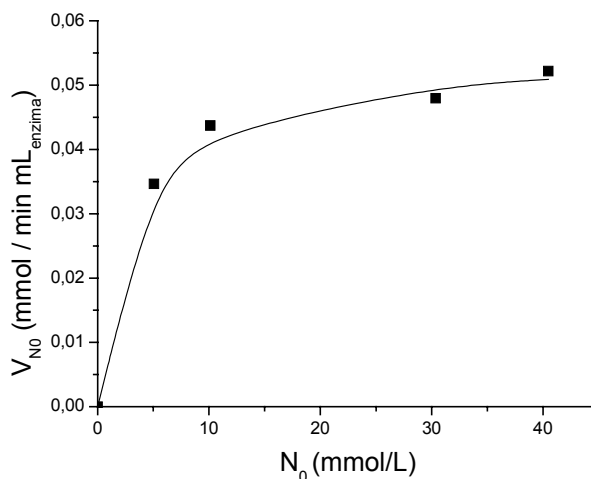


Figura 4.53 - Ajuste do modelo de Michaelis-Menten para a hidrólise de polipeptídeos catalisada por Alcalase® solúvel (27 U_{BAEE}/L) a 50°C, pH 9,5. (●) Velocidades medidas experimentalmente e (—) velocidades previstas pelo modelo cinético ajustado usando o método de convergência iterativa Levenberg-Marquardt.

É perfeitamente razoável que os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada diferenciem-se daqueles obtidos para a enzima solúvel, devido a efeitos inerentes à própria imobilização da enzima, como por exemplo, efeitos de partição (a concentração do substrato próximo à enzima imobilizada pode ser diferente da concentração em solução, devido às propriedades físico-químicas do suporte), efeitos conformacionais e/ou difusivos, embora alguns deles possam ser descartados, pois as moléculas que sofreram mudanças conformacionais durante o processo de imobilização e desativaram-se não foram consideradas, pois se trabalhou sempre em termos de moléculas ativas; as moléculas de enzima estavam corretamente orientadas sobre a superfície do suporte, pois nenhum impedimento estérico foi verificado na hidrólise de caseína; e trabalhou-se sempre com derivados com baixa carga e intensa agitação, para se minimizar resistência de transferência de massa externa e intrapartícula. De fato, o fator de efetividade da enzima imobilizada (η_I), calculado de acordo com Blanck e Clark (1997), era igual à unidade, independentemente da concentração adimensional do substrato ($\beta = N_0/K_M$), pois o módulo de Thiele observável, Φ , era suficientemente pequeno ($< 0,07$).

4.4.3.3 – Estimativa de K_I

O modelo clássico de Michaelis-Menten (sem inibição) foi ajustado para ensaios em batelada de longa duração, sendo observado que as taxas de reação previstas pelo modelo eram notavelmente maiores que aquelas realmente medidas. Fazia-se necessário realmente incorporar o efeito de inibição no modelo como já discutido anteriormente.

Na estimativa de K_I , usando o modelo de Michaelis-Menten com inibição (equação 4.5) e os parâmetros cinéticos V_{\max} e K_M^{ap} estimados, a concentração inicial de inibidor (I_0), foi considerada igual a zero, pois, provavelmente, seu efeito já havia sido incorporado no parâmetro K_M (obtido por ajuste de velocidades iniciais).

A Figura 4.54 mostra duas hidrólises de polipeptídios em batelada de longa duração (4 e 6 horas) a 50°C (pH 9,5) com Alcalase®-glixil-96h. Um dos ensaios (6h, N_0 igual a 84 mmol/L) foi usado para o ajuste de K_I e o outro ensaio (4h, N_0 igual a 20 mmol/L) foi usado para a validação do modelo. Note que em ambos os casos há uma excelente concordância entre os valores previstos pelo modelo (equação 4.5) e os dados experimentais, além do desvio padrão do parâmetro $K_I = 0,56 \pm 0,01$ mmol/L ser aproximadamente 2%.

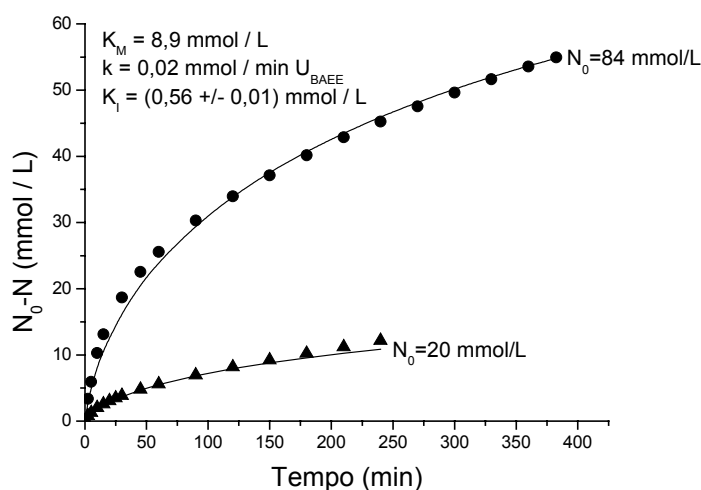


Figura 4.54 - Hidrólise em batelada de polipeptídios a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glixil-96h (baixa carga), com E/S igual a 2 U_{BAEE}/g proteína. Concentração inicial do substrato: (●) N_0 igual a 84 mmol/L e (▲) N_0 igual a 20 mmol/L. As curvas (—) são os valores previstos pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, usando-se $K_M = 8,9$ mmol/L, $k = 0,02$ mmol/min/ U_{BAEE} e $K_I = 0,56$ mmol/L.

Apresenta-se na Tabela 4.24 a distribuição de massa molecular do produto final da ação das quatro proteases sobre as proteínas do soro de queijo, com um grau de hidrólise total de 29% (22% com endoproteases e 7% com exoprotease). O produto final era composto por peptídios, aproximadamente 70% (p/p) com massa molecular abaixo de 1672 Da, e aminoácidos livres, aproximadamente 9,5% (p/p). Foram liberados 35% do total de aminoácidos aromáticos (aproximadamente 47% de Tyr, 30% de Phe e 30% de Trp) presentes nas proteínas do soro. Desejando-se obter um produto final isento de aminoácidos aromáticos, as proteólises catalisadas por tripsina, quimotripsina e CPA devem ser conduzidas a graus de hidrólises maiores, como já comentado anteriormente, para que quimotripsina disponibilize todos os resíduos aromáticos carboxi-terminais para a ação da exoprotease CPA.

Tabela 4.24 - Distribuição de massa molecular do produto final da hidrólise de proteínas do soro de queijo 5% (p/v), DH de 29%, catalisada seqüencialmente por glioxil-tripsina-24h^a, glioxil-quimotripsina-24h^b, CPA-glioxil-48h^c e Alcalase®-glioxil-96h^d.

Distribuição de Tamanho ^e	Composição mássica (%)
MM > 5000	10,60
1672 < MM < 5000	21,94
1000 < MM < 1672	49,22
555,6 < MM < 1000	6,11
MM < 555,6	12,14

^aCondições: 55°C, pH 8,0, E/S = 1/180, DH de 2%. ^bCondições: 55°C, pH 8,0, E/S = 1/200, DH de 5%.

^cCondições: 45°C, pH 7,0, E/S = 19 U_{H-PHE}/g, DH de 7%. ^dCondições: 50°C, pH 9,5, E/S = 2 U_{BAAE}/g.

^ePadrões: insulina (MM 5000 Da), neurotensina (MM 1672 Da), angiotensina II (MM 1002,2 Da) e leucina encefalina (MM 555,6 Da).

Finalmente, tentou-se validar o modelo a uma hidrólise em batelada de longa duração, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h, onde se utilizou como substrato um hidrolisado de proteínas do soro de queijo obtido por ação de tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 2,9%). Pode-se observar na Figura 4.55 que as velocidades previstas pelo modelo eram significativamente menores que aquelas observadas experimentalmente. A divergência entre valores previstos e experimentais deveu-se ao fato da hidrólise ser menos inibida inicialmente, pois embora o grau de hidrólise total obtido com endoproteases fosse igual (DH de 7%), a concentração de aminoácidos em solução, neste caso, era menor que

naquele onde se ajustou os parâmetros V_{\max} , K_M e K_I (DH com CPA era de 7%). Além disso, o modelo obtido era de aplicabilidade restrita, pois como já foi comentado anteriormente, K_M também varia com o grau de hidrólise inicial (quanto maior o grau de hidrólise inicial, menor o valor de K_M). Viu-se assim que a obtenção de um modelo cinético geral para hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro com diferentes graus iniciais de hidrólise e diferentes concentrações iniciais de aminoácidos em solução), catalisada por Alcalase®-glioxil, requeria um estudo da variação dos parâmetros (V_{\max} , K_M e K_I) com o grau de hidrólise, obtendo-se o modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, onde os parâmetros cinéticos seriam funções do grau de hidrólise inicial.

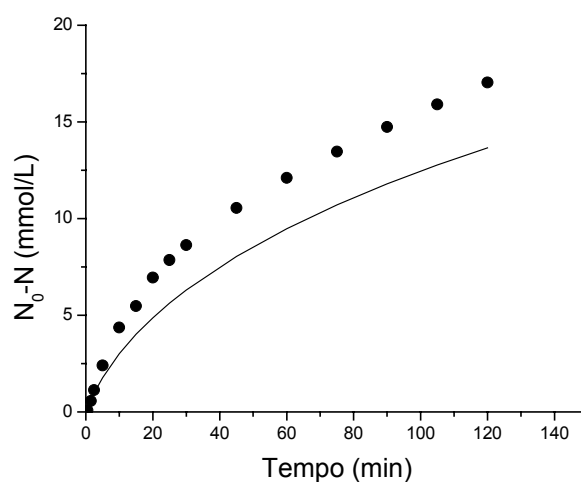


Figura 4.55 - Hidrólise em batelada de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga), a 50°C (pH 9,5), N_0 igual a 38 mmol/L, E/S igual a 1,6 U_{BAEE}/g de proteína, $DH_{INICIAL}$ igual a 9,9%. (●) Concentrações medidas experimentalmente e (—) valores preditos pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto (K_M de 8,9 mmol/L, k de 0,02 mmol/ (min x U_{BAEE}) e K_I de 0,56 mmol/L).

4.4.4 – Estudo da variação dos parâmetros cinéticos V_{\max} , K_M e K_I com o grau de hidrólise inicial ($DH_{INICIAL}$)

Para a obtenção dos parâmetros cinéticos em função do grau de hidrólise inicial foram preparados hidrolisados, em pHstato, de proteínas do soro de queijo, com graus de hidrólise de 2 a 20%, usando-se tripsina-glioxil-24h (10 mg/mL de suporte), quimotripsina-glioxil-24h (10 mg/mL de suporte) e, Alcalase®-glioxil-96h (3 U_{BAEE}/mL de suporte), para graus de hidrólise (por exemplo > 15%) onde tripsina e quimotripsina não eram suficientes. As

condições de temperatura, pH e razão enzima/substrato eram de: 55°C, pH 8, E/S de 1/50 (para hidrólises com tripsina e quimotripsina) e 50°C (pH 9,5), E/S de 4 U_{BAEE}/g de proteína (para hidrólises com Alcalase®). Para a obtenção dos graus iniciais de hidrólise desejados, proteínas do soro de queijo foram hidrolisadas com tripsina (para DH de 2 e 5%); seqüencialmente com tripsina e quimotripsina (para DH de 7%); mistura (1:1) tripsina/quimotripsina (para DH de 10 e 15%); e seqüencialmente com mistura (1:1) tripsina/quimotripsina e Alcalase® (para DH de 15 e 20%).

As velocidades iniciais de hidrólise (mmol/min/g_{cat}), para diferentes concentrações de substrato (2,5 a 40 g/L), foram medidas a 50°C (pH 9,5), usando-se 20 U_{BAEE}/L de reator, 10 minutos de reação e NaOH 40 mM para controle do pH. As concentrações molares de ligações peptídicas, N₀, para cada substrato em particular eram determinadas pela equação 4.2, onde DH_{TOTAL} era igual a 30% e DH_{INICIAL} variava de 2 a 20%. Ensaio em batelada com 4 horas de reação, para estimativa de K_i, foram realizados em pH_{stato}, a 50°C (pH 9,5), com E/S de 2 ou 4 U_{BAEE}/g de proteína e NaOH 200 mM para controle do pH.

Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_M, estimados pelo método de convergência iterativa de Levenberg-Marquardt com 0,95 de confiança, são mostrados na Tabela 4.25. O coeficiente de correlação dos parâmetros (dependência) era em média 0,77 e para qualquer estimativa inicial os valores convergiam para os mesmos pares K_M-V_{max}. Os desvios padrões dos parâmetros foram baixos, em média menores que 12% para K_M e 3% para V_{max}. E ainda, havia uma excelente concordância entre os valores preditos pelo modelo clássico de Michaelis-Menten e os dados experimentais de V_{N0} x N₀, como pode ser visto na Figura 4.56.

Tabela 4.25 – Parâmetros cinéticos do modelo clássico de Michaelis-Menten estimados para a hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro hidrolisadas com diferentes DH_{INICIAL}), catalisada por Alcalase®-glixil-96h (baixa carga) a 50°C (pH 9,5) e E/S de 20 U_{BAEE}/L.

DH (%)	V _{max} ± σ (mmol/min/g _{cat})	K _M ± σ (mmol/L)	E (U _{BAEE} /g _{cat})	k (mmol/min/U _{BAEE})
2	0,0569 ± 0,0019	13,7 ± 1,5	1,97	0,029
5	0,0682 ± 0,0016	9,1 ± 0,9	2,68	0,025
7	0,0459 ± 0,0006	8,0 ± 0,6	1,97	0,023
10	0,0427 ± 0,0011	5,5 ± 1,0	2,68	0,016
15	0,0207 ± 0,0004	4,9 ± 0,4	2,39	0,009
20	0,0097 ± 0,0005	4,0 ± 0,8	2,15	0,005

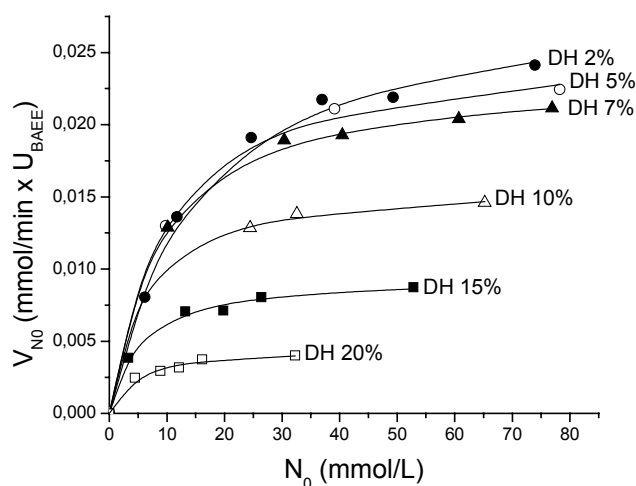


Figura 4.56 – Velocidades iniciais de hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro hidrolisadas com diferentes graus de hidrólise) a 50°C (pH 9,5), E/S de 20 U_{BAEE}/L de reator, catalisada por Alcalase®-glixil-96h (baixa carga).

Pode-se observar na Figura 4.56 que as velocidades iniciais de hidrólise, para uma mesma concentração de substrato, N_0 , diminuem com o aumento do grau de hidrólise inicial do substrato. Este fenômeno pode estar associado ao fato de que à medida que se aumenta o grau de hidrólise, maior será o número de resíduos hidrofóbicos carboxi-terminais (disponibilizados pela ação de quimotripsina) e estes, provavelmente, favorecem a reação de transpeptização, inibindo a reação de hidrólise. Outra possível explicação é o fato de que com o aumento do grau de hidrólise, como tripsina e quimotripsina contêm exoproteases como impurezas, maior será a concentração de aminoácidos em solução, que são inibidores da reação de hidrólise por conterem grupos aminos livres.

Pondo-se em um gráfico K_M e k em função do grau de hidrólise (Figura 4.57), observa-se que K_M varia com o DH de acordo com um decaimento exponencial de 1ª ordem e k de acordo com um decaimento linear. Assim, as correlações desses parâmetros com o grau de hidrólise inicial são:

$$K_M = 3,9 + 14,5 \times \exp\left(\frac{-DH}{5,1}\right) \quad (4.6)$$

$$k = 3,2 \times 10^{-2} - 1,4 \times 10^{-3} \times DH \quad (4.7)$$

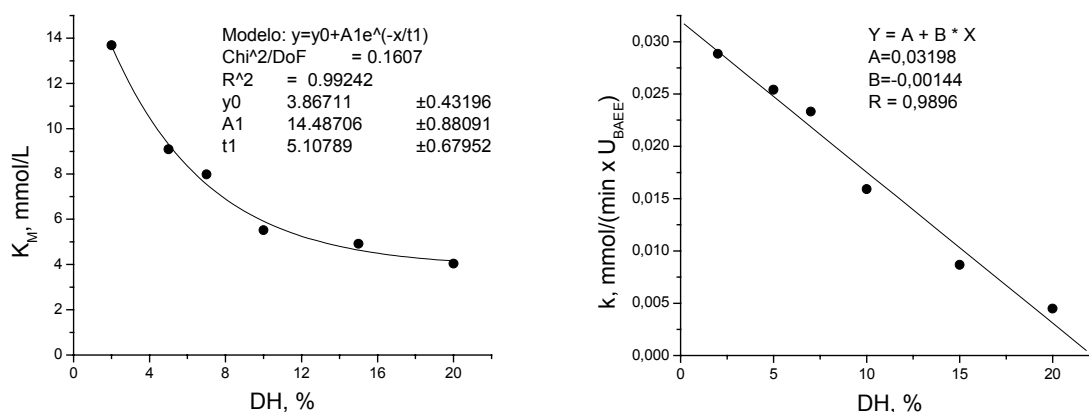


Figura 4.57 – Variação de K_M e k com o grau de hidrólise inicial do substrato (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e quimotripsina).

A Tabela 4.26 lista os valores estimados de K_I , obtidos pelo ajuste do modelo proposto (equação 4.5) aos dados experimentais de ensaios em batelada de longa duração (4 horas), usando-se os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} listados na Tabela 4.25, os quais foram estimados para cada grau de hidrólise inicial estudado.

Tabela 4.26 – Valores estimados de K_I ajustando-se o modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição pelo produto (equação 4.5) aos dados experimentais de hidrólises (em batelada) de polipeptídios (proteínas do soro com diferentes DH) a 50°C (pH 9,5), catalisadas por Alcalase®-glioxil-96h.

DH (%)	N_0 (mmol/L)	$K_I \pm \sigma$ (mmol/L)
2	106,0	1,56 ± 0,04
5	19,6	1,15 ± 0,06
5	78,2	0,95 ± 0,04
7	76,9	0,83 ± 0,02
10	16,3	0,58 ± 0,04
10	65,2	0,46 ± 0,01
15	45,6	0,46 ± 0,03
15	11,4	0,31 ± 0,04
20	32,3	0,17 ± 0,02
20	8,1	0,21 ± 0,04

Os desvios padrões dos valores estimados de K_1 , para os diferentes graus iniciais de hidrólises (Tabela 4.26), eram em média menores que 7% e havia uma boa concordância entre os valores preditos pelo modelo ajustado e os dados experimentais de concentrações de ligações peptídicas quebradas (N_0-N) em função do tempo (Figura 4.58). Diferenças maiores observadas entre valor predito e valor experimental, para graus de hidrólises maiores (por exemplo, 20%), devem a erros experimentais em virtude de medir-se velocidades de hidrólises muito baixas. No entanto, o desvio padrão do parâmetro era menor que 18%.

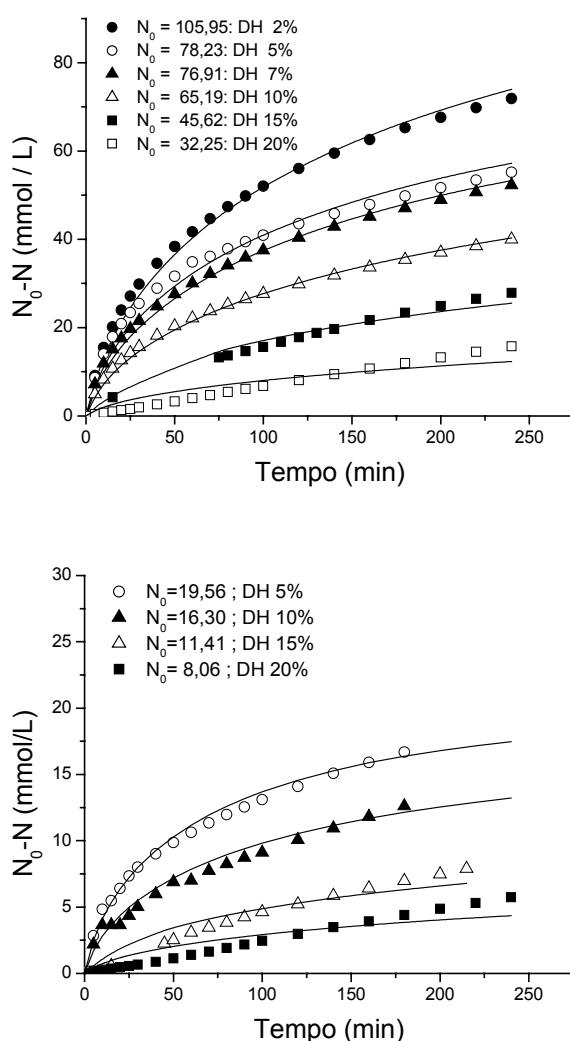


Figura 4.58 - Hidrólises em batelada de polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e/ou quimotripsina com diferentes graus de hidrólise) a 50°C (pH 9,5), catalisada por Alcalase®-glioxil-96h (baixa carga). Símbolos referem-se aos pontos experimentais (diferentes concentrações iniciais de ligações peptídicas) e linhas contínuas referem-se aos valores preditos pelo modelo ajustado (equação 4.5).

A Figura 4.59 mostra que K_I varia exponencialmente (decaimento de 1ª ordem) com o grau de hidrólise inicial, tendo sido ajustada a seguinte equação:

$$K_I = 1,1 \times 10^{-1} + 1,9 \times \exp\left(\frac{-DH}{7,6}\right) \quad (4.8)$$

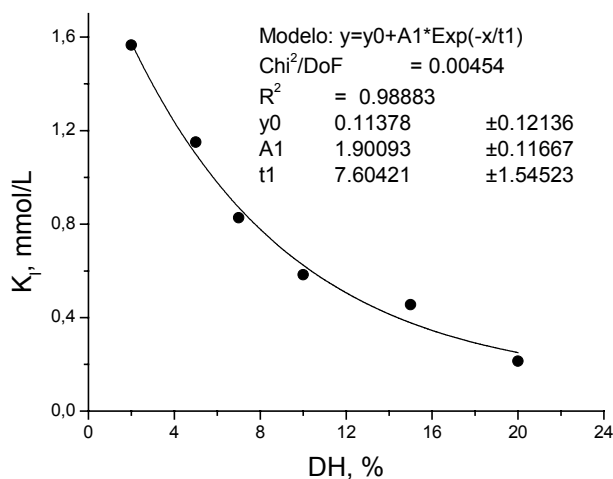


Figura 4.59 – Variação de K_I com o grau de hidrólise inicial do substrato (proteínas do soro de queijo hidrolisadas por tripsina e quimotripsina).

Finalmente, foram realizadas hidrólises em batelada de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h, na situação de interesse, ou seja, com substrato preparado a partir da hidrólise seqüencial de proteínas do soro de queijo com tripsina, quimotripsina e CPA. Dois dos substratos foram preparados hidrolisando proteínas do soro de queijo com tripsina (DH de 2%), quimotripsina (DH de 5%) e CPA (DH de 2,9% e 7,08%) e o outro, hidrolisando proteínas do soro com tripsina (DH de 0,81%), quimotripsina (DH de 7,3%) e CPA (9,98%). A Figura 4.60 mostra a validação do modelo cinético (equação 4.5) com os parâmetros calculados pelas equações 4.6 a 4.8. Na determinação dos parâmetros k e K_M usou-se os graus de hidrólises com endoproteases (tripsina e quimotripsina) e na determinação de K_I usou-se os graus de hidrólises totais (DH com tripsina, quimotripsina e CPA), pois os aminoácidos em solução eram inibidores da reação, devendo ser considerados nas hidrólises em batelada de longa duração. Pode-se observar na Figura 4.60 que há uma excelente concordância entre valores preditos pelo modelo e valores experimentais. Concluindo, a cinética inerente (ausência de efeitos difusivos) da hidrólise de polipeptídios (50°C, pH 9,5), catalisada por

Alcalase®-glioxil agarose-10% (baixa carga), segue modelo de Michaelis-Menten com inibição pelo produto, com os parâmetros cinéticos variando com o grau de hidrólise inicial do substrato.

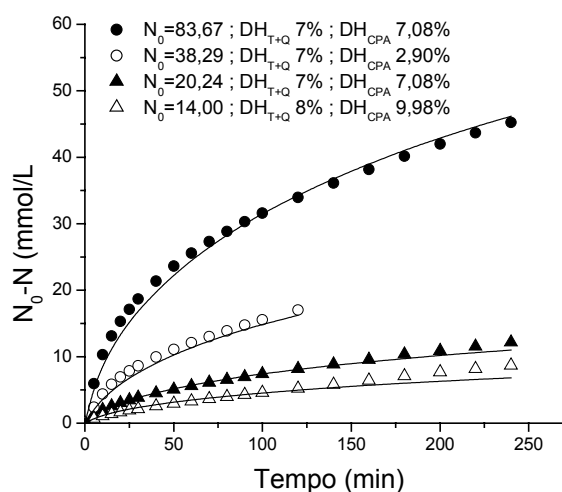


Figura 4.60 – Hidrólises em batelada de polipeptídeos (proteínas do soro de queijo hidrolisadas com diferentes valores de DH) a 50°C (pH 9,5), E/S de 2 U_{BAEE}/g de proteínas, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h. Parâmetros cinéticos utilizados: (●) e (▲) $K_M = 7,58$, $k = 0,02$, $K_I = 0,41$; (○) $K_M = 7,58$, $k = 0,02$, $K_I = 0,63$ e (△) $K_M = 6,86$, $k = 0,02$, $K_I = 0,29$.

4.4.5 – Estimativa do fator de efetividade - hidrólise com enzima alta carga

Proteínas do soro de queijo foram hidrolisadas sequencialmente por tripsina-glioxil-24h e quimotripsina-glioxil-24h (55°C, pH 8,0, E/S de 1/80, DH_{TOTAL} de 7%) e CPA-glioxil-48h com 11 U_{H-PHE}/mL de suporte (45°C, pH 7,0, 200 U_{H-PHE}/L de reator, DH de 5,3). A concentração final dos polipeptídeos ($\approx 50\%$ com $MM < 5$ kDa) e aminoácidos livres era de 3% (p/v), sendo que aproximadamente 0,2% (p/v) eram aminoácidos em solução, dos quais, aproximadamente 76% referia-se a Leu, Tyr, Phe, His e Trp.

Um volume de 30 mililitros do produto final (mistura de polipeptídeos e aminoácidos livres), nas concentrações de 10, 20 e 30 g/L (N_0 calculado pela equação 4.2, com DH_{TOTAL} 30% e $DH_{INICIAL}$ de 7%), foi hidrolisado, em pHstato, com Alcalase®-glioxil-96h-alta carga (13 mg de proteína/mL de suporte, com 32 U_{BAEE}/mL de suporte recuperada), a 50°C (pH 9,5), E/S de 2 U_{BAEE}/g de proteína, 4 horas de reação e NaOH 200 mM para controle do pH.

Para um dos ensaios (N_0 de 60,7 mmol/L), os dados de (N_0-N) em função do tempo foram usados para estimativa do fator de efetividade, η_i ¹⁶ (medida numérica da influência da resistência à transferência de massa intrapartícula sobre a velocidade da reação observada) da enzima imobilizada, usando-se a cinética inerente (ausência de efeitos difusivos) da hidrólise de polipeptídios, catalisada por Alcalase® imobilizada em glioxil-agarose-10% (baixa carga), determinada neste trabalho. Os outros ensaios foram usados para a validação do fator de efetividade estimado. Resultados mostraram (Figura 4.61) uma excelente concordância entre valores preditos e experimentais, além do desvio padrão do parâmetro estimado ter sido menor que 2%. Assim, o fator de efetividade (η_i) estimado era igual a $0,494 \pm 0,008$. O sistema reacional mostrou-se assim limitado pela resistência à difusão dos polipeptídios no suporte glioxil-agarose-10%.

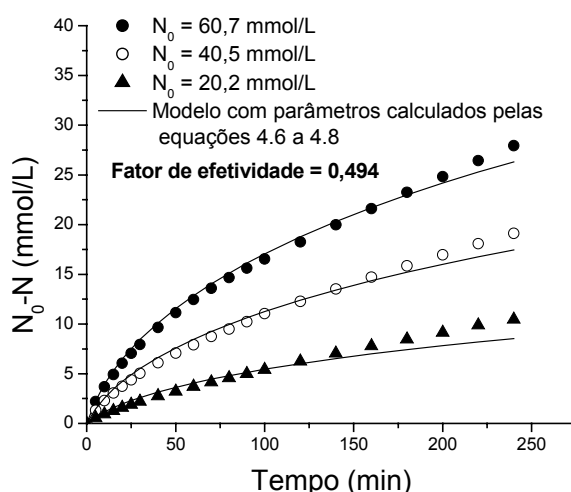


Figura 4.61 – Hidrólises em batelada de polipeptídios (proteínas do soro com $DH_{INICIAL}$ de 7% e DH_{CPA} de 5,3%) a 50°C (pH 9,5), E/S de 2 U_{BAEE}/g , catalisada por Alcalase®-glioxil-96h com 45,7 U_{BAEE}/g de suporte (alta carga). Parâmetros cinéticos inerentes utilizados: K_M igual a 7,58 mmol/L (para DH de 7%); k igual a 0,02 mmol/min/ U_{BAEE} (para DH de 7%) e K_I igual a 0,49 mmol/L (para DH de 12,3%).

¹⁶ O fator de efetividade (η_i) foi definido como a razão entre a velocidade medida experimentalmente e a velocidade calculada pelo modelo (equação 4.5).

5 - CONCLUSÕES

O processo proposto - hidrólises sequenciais e controladas das proteínas do soro de queijo, catalisadas por tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase A (CPA) e Alcalase®, immobilizadas em glioxil-agarose – visando à obtenção de preparados compostos por peptídios de baixa massa molecular, com baixo teor de aminoácidos aromáticos, mostrou-se eficiente. Para o grau de hidrólise inicial adotado (proteínas do soro de queijo hidrolisadas sequencialmente por tripsina e quimotripsina, com um grau de hidrólise total de 7%), CPA immobilizada foi capaz de liberar de 35 a 45% da concentração total dos aminoácidos aromáticos Tyr, Phe e Trp presentes nas proteínas do soro. A remoção de Phe, aminoácido de particular interesse neste trabalho, variou de 30 a 50%, dependendo da temperatura de operação.

O produto final da hidrólise de polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas previamente com tripsina e quimotripsina, a 55°C, pH 8, DH de 7%) com as duas proteases, nas condições de temperatura e pH escolhidas em função da maior estabilidade das proteases immobilizadas (pH 7,0 e 45°C, para CPA; pH 9,5 e 50°C, para Alcalase®) tinha um grau de hidrólise total de 29% e era composto basicamente por peptídeos de baixa massa molecular (aproximadamente 70%, p/p, com massa molecular abaixo de 1.672 Da) e aminoácidos livres (aproximadamente 9,5%, p/p). Nas condições escolhidas, as concentrações máximas de aminoácidos aromáticos liberados pelo derivado CPA-glioxil-48h foram de aproximadamente 56% (para Tyr), 35% (para Phe) e 30% (para Trp), em relação à concentração total presente nas proteínas do soro.

Hidrólises em bateladas de longa duração a 45 e 55°C, variando-se a carga enzimática no reator, mostraram que o derivado de CPA mais estável (CPA-glioxil-48h) foi capaz de liberar todos os resíduos aromáticos carboxi-terminais disponibilizados pela quimotripsina. Assim, desejando-se um produto livre ou no mínimo com baixo conteúdo de aminoácidos aromáticos (Phe particularmente) é necessário estudar-se a influência dos graus de hidrólises prévios com tripsina e quimotripsina, para que esta última disponibilize para a CPA todos os resíduos aromáticos presentes nas proteínas do soro.

A seguir, serão apresentadas as principais conclusões obtidas com relação à imobilização e estabilização das proteases CPA e Alcalase® e com relação ao estudo cinético das hidrólises de polipeptídios catalisadas pelas proteases immobilizadas e estabilizadas.

5.1 – Imobilização e Estabilização de Carboxipeptidase A

As condições ótimas de imobilização e estabilização encontradas para carboxipeptidase A foram obtidas utilizando-se agarose-6% ativada com grupos glioxil (75 μeqv de grupos aldeídos / mL de suporte) como suporte, 25°C, pH 10,05, 48 horas de reação, redução com borohidreto de sódio, por 30 min, na presença de 10 mM de tirosina. Nessas condições, a enzima imobilizada reteve 42% da atividade inicial e mostrou-se 213,4 vezes mais estável que a enzima solúvel. Essa alta estabilidade do derivado CPA-glioxil-48h era devida à alta rigidez da molécula de enzima imobilizada, promovida pela formação de ligações covalentes multipontuais enzima-suporte (entre 4 e 5 ligações por molécula de enzima). A maior estabilidade da enzima imobilizada foi verificada em pH de neutro a alcalino, devido, provavelmente, à coordenação do íon zinco no sítio ativo com dois resíduos de histidina que conduzia à menor estabilização da enzima em valores ácidos de pH.

As moléculas de CPA imobilizadas estavam corretamente orientadas na superfície do suporte, pois na hidrólise de substrato de alta massa molecular (polipeptídios obtidos por ação prévia de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro de queijo) não se detectou a presença de impedimentos estéricos. Além disso, não foi verificada a presença de efeitos de partição de íons H^+ em suportes glioxil-agarose, pois tanto enzima solúvel como enzima imobilizada apresentaram atividades catalíticas máximas no pH 7,5. Contudo, a alta estabilidade do derivado CPA-glioxil-48h permitiu um deslocamento de 20°C na temperatura de máxima velocidade de hidrólise: de 50°C (para a enzima solúvel) para 70°C (para a enzima imobilizada).

A 55°C, tanto CPA solúvel como CPA imobilizada liberaram aproximadamente 45% do total de aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas do soro e disponibilizados por ação seqüencial de tripsina e quimotripsina; no entanto, a 60°C o derivado mais estável (CPA-glioxil-48h) foi capaz de liberar duas vezes mais aminoácidos aromáticos que a enzima solúvel.

5.2 – Imobilização e Estabilização de Alcalase®

As condições ótimas de imobilização e estabilização encontradas para Alcalase® foram obtidas utilizando-se agarose-10% ativada com grupos glioxil (210 μeqv de grupos

aldeídos por mililitro de suporte) como suporte; 25°C, pH 10,05, 96 horas de imobilização, redução com borohidreto de sódio, por 30 min, na ausência de inibidor competitivo. Nessas condições, a enzima imobilizada reteve 54% da atividade inicialmente oferecida e era 514,6 vezes mais estável que a enzima solúvel dialisada. Assim como verificado para a CPA, a alta estabilidade do derivado Alcalase®-glioxil-96h era devido, provavelmente, à formação de ligações covalentes multipontuais - aproximadamente 40% dos resíduos de lisina se envolveram nas ligações covalentes enzima (amino)-suporte (aldeído).

A partir dos resultados de hidrólises de substrato de alta massa molecular (caseína) constatou-se que as moléculas de enzima imobilizadas estavam corretamente orientadas sobre a superfície do suporte, pois nenhum impedimento estérico foi observado.

A alta estabilidade do derivado mais estável (Alcalase®-glioxil-96h) permitiu que a temperatura de máxima velocidade de hidrólise variasse de 65°C (para a enzima solúvel) para 75°C (para a enzima imobilizada). E ainda, que a 90°C (pH 8,0) a enzima imobilizada ainda retivesse aproximadamente seis vezes mais atividade catalítica do que a enzima solúvel. Em decorrência dessa maior estabilidade, a 80°C foi possível hidrolisar duas vezes mais proteína com Alcalase®-glioxil-96h do que com enzima solúvel.

A 45°C tanto enzima solúvel quanto enzima imobilizada tiveram o mesmo desempenho na hidrólise de proteínas, entretanto, o derivado Alcalase®-glioxil-96h era muito melhor do ponto de vista operacional, pois enquanto a enzima solúvel perdia 50% de sua atividade inicial em aproximadamente 20 horas, a enzima imobilizada ainda retinha aproximadamente 90% da atividade catalítica após aproximadamente 20 dias.

5.3 – Estudo cinético da hidrólise de polipeptídeos catalisada por CPA- e Alcalase®-glioxil agarose

A cinética inerente da hidrólise de polipeptídios (baixa carga de enzima), catalisada por CPA-glioxil-48h (45°C, pH 7), pôde ser adequadamente representada por um modelo cinético do tipo Michaelis-Menten com inibição pelo substrato e produto em termos de ligações peptídicas carboxi-terminais hidrolisáveis, considerando-se uma pequena variação de K_I com a concentração de substrato.

Os parâmetros cinéticos obtidos foram: K_M igual a 2,50 mM, K_S igual a 2,27 mM, k igual a 2,78 μ moles de produto/min/ U_{H-PHE} e K_I médio igual a 0,04 mM. Os valores dos

parâmetros K_M e K_I encontrados neste trabalho concordaram suficientemente bem com a ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura.

Um valor estimado da concentração de cada aminoácido liberado, em particular os aminoácidos aromáticos, de grande interesse neste trabalho, pôde ser representado por modelos empíricos - decaimento exponencial de 1ª ordem para fenilalanina e hiperbólico para Tyr, Trp e outros liberados, tais como, Thr/Asn, Val, Met, Ileu e Leu.

A cinética aparente da hidrólise de polipeptídios (ensaios cinéticos realizados com alta carga de enzima) mostrou ser igual à inerente, não havendo, portanto, limitação da velocidade de reação por resistência difusiva dos polipeptídios no suporte glioxil-agarose-6%.

A cinética inerente da hidrólise de polipeptídios, catalisada por Alcalase®-glioxil-96h, pode ser bem representada por uma cinética do tipo Michaelis-Menten com inibição pelo produto em termos de ligações peptídicas hidrolisáveis, considerando-se variação dos parâmetros cinéticos k , K_M e K_I com o grau de hidrólise inicial do substrato.

O valor do parâmetro K_M variou de 1,5 a 5,6 g/L, o de k variou de 0,005 a 0,029 mmol de ligações peptídicas/min/ U_{BAEE} e o de K_I de 0,19 a 0,63 g/L. O valor do parâmetro K_M concordou muito bem com a ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura para diferentes sistemas Alcalase®-substrato.

A cinética aparente da hidrólise de polipeptídios catalisada por Alcalase® (ensaios cinéticos com alta carga de enzima) foi diferente da inerente, com um fator de efetividade de 0,494. O sistema reacional mostrou-se assim limitado pela resistência à difusão dos polipeptídios no suporte glioxil-agarose-10%.

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das dificuldades surgidas ao longo do desenvolvimento deste trabalho e dos resultados obtidos, são sugeridas para eventuais trabalhos futuros as seguintes atividades:

- a) Otimização do processo de preparação de hidrolisados protéicos por ação seqüencial de tripsina, quimotripsina, CPA e Alcalase®.

As duas últimas proteases (CPA e Alcalase®) mostraram-se muito eficientes nas hidrólises de seus substratos. Particularmente a CPA, que é usada no processo para eliminar os aminoácidos aromáticos da cadeia polipeptídica, foi aparentemente capaz de hidrolisar todos os resíduos carboxi-terminais disponibilizados pela quimotripsina. Portanto, seria conveniente um estudo detalhado da influência do grau de hidrólise inicial do substrato (ação prévia de tripsina e quimotripsina sobre as proteínas do soro) na liberação por CPA dos aminoácidos aromáticos, caso se deseje um produto final livre desses aminoácidos, ou pelo menos livre de fenilalanina.

Outra possibilidade seria o desenvolvimento de um processo contínuo de hidrólise com simultânea eliminação dos aminoácidos do meio reacional, pois como verificado neste trabalho, os aminoácidos livres são inibidores competitivos, tanto de CPA (pelo menos Phe e Tyr) como de Alcalase® (todos os aminoácidos em solução, pois possuem grupos aminos livres que são inibidores competitivos da enzima). Poderia-se assim aumentar o rendimento de liberação de aminoácidos aromáticos e obter-se o produto final composto por di e tripeptídios (massa molecular média menor que 500 Da), objetivo do projeto em andamento no DEQ/UFSCar.

E finalmente, realizar as hidrólises com tripsina, quimotripsina e CPA conjuntamente, a uma temperatura e um pH conveniente para três proteases. Com base nas estabilidades dessas três proteases, 50°C e pH 8, parecem condições adequadas a se utilizar. Devido ao conteúdo de impurezas presentes nas preparações comerciais de tripsina e quimotripsina, e a necessidade de tempo de hidrólise prolongado para CPA (entre 5 e 8 horas), provavelmente, serão liberados aminoácidos desnecessariamente, mas não devendo ultrapassar em aproximadamente 15%. De qualquer forma, atingindo-se o objetivo final (mistura de

pequenos peptídeos livres de aminoácidos aromáticos), os aminoácidos eliminados desnecessariamente poderiam, após separação dos hidrofóbicos, ser acrescentados novamente ao hidrolisado. É importante lembrar que caso se deseje um hidrolisado que se destine para fins alimentícios, uma maior remoção de aminoácidos hidrofóbicos (entre eles Val, Leu, Ileu, Phe, Tyr e Trp) poderia conduzir a um hidrolisado com reduzido sabor amargo. Portanto, como quimotripsina e CPA têm especificidades para aminoácidos hidrofóbicos (entre eles aromáticos), a hidrólise das proteínas do soro de queijo com um complexo enzimático, contendo tripsina, quimotripsina e CPA, poderia ser muito vantajosa, do ponto de vista operacional e nutricional.

- b) Influência de inibidores competitivos durante o processo de multi-interação enzima-suporte.

Derivados estabilizados de CPA e Alcalase® puderam ser preparados com tempo prolongado de reação (respectivamente 48 e 96 horas). Nessas condições perdas de atividade da ordem de 58% (para CPA) e 46% (para Alcalase®) foram inevitáveis. Entretanto, as retenções de atividade podem ser melhoradas, conduzindo as reações na presença de inibidores competitivos, desde que não contenham grupos aminos livres ou que estes estejam broqueados. Particularmente para a CPA, tirosina mostrou-se muito eficiente na proteção do sítio ativo da enzima durante o processo de redução com borohidreto de sódio, sendo, portanto, um bom candidato para este fim. A imobilização na presença deste inibidor poderia, no caso da CPA, evitar a provável perda do íon zinco do sítio ativo e essencial para a atividade catalítica da enzima, bem como evitar, que na estrutura rigidificada, o movimento da Tyr²⁴⁸, participante do mecanismo catalítico da CPA, ficasse restringido. Contudo, maior retenção de atividade poderá implicar em menor rigidificação da molécula de enzima e, por conseguinte, menor estabilização. Deverá haver um compromisso entre atividade e estabilidade.

- c) Estudo da influência do zinco na retenção de atividade da CPA imobilizada e na estabilidade a pH ácido.

A perda do íon zinco foi uma das hipóteses para se explicar a redução de atividade durante o processo de multi-interação enzima-suporte. A comprovação desta hipótese, por medida de zinco no sobrenadante da suspensão de imobilização (por absorção atômica, por

exemplo), poderia abrir caminhos para se contornar esse problema. A enzima imobilizada poderia ser incubada a 4°C, sob suave agitação, em solução de íon zinco, preparada em tampão tris-HCl 25 mM (contendo 500 mM de NaCl), acompanhando-se a atividade com o tempo de incubação. Caso a formação de múltiplas ligações enzima-suporte não tenha causado mudanças conformacionais severas no sítio catalítico, mas suficiente para que houvesse perda de íon zinco, sua reposição poderia restaurar a atividade da enzima imobilizada.

A hipótese usada para explicar a menor estabilidade da CPA imobilizada em pH ácido foi também a perda do íon zinco, pois em pH ácido os resíduos de His são os principais responsáveis pela desnaturação da proteína, causando perda irreversível de atividade por precipitação, tratando-se de enzima solúvel. A enzima imobilizada, embora protegida deste fenômeno, pode se inativar por perda de íon zinco, que está coordenado a dois resíduos de His. Assim, a comprovação desta hipótese poderia ser feita, por exemplo, incubando amostras da enzima imobilizada, antes e após a inativação, em solução de 1,10-fenantrolina e analisando-se zinco no sobrenadante por absorção atômica. A concentração de íon zinco no sobrenadante da amostra inicial deveria ser maior, caso realmente haja perda de íon zinco durante a inativação térmica da enzima a pH ácido. Perda de íon zinco poderia ainda ser comprovada analisando zinco diretamente no sobrenadante da inativação.

d) Análise da rigidez da molécula de enzima imobilizada por medida de fluorescência.

A estabilidade de uma proteína está relacionada a sua rigidez. Quanto maior a rigidez, maior será sua estabilidade e, na maioria dos casos, menor será sua atividade. A rigidez da molécula de enzima imobilizada poderia ser verificada medindo-se o volume da molécula de enzima por fluorescência.

Poderia-se assim verificar a estabilização da enzima com o tempo de imobilização, medindo-se o volume da enzima imobilizada. O aumento da estabilidade deveria estar relacionado com o aumento na rigidez e, por conseguinte, com a redução do volume da molécula de enzima imobilizada.

e) A comparação entre enzima solúvel, derivado glutaraldeído-agarose e glioxil-agarose foi baseada na estabilidade térmica e na atividade proteolítica frente a substratos macromoleculares. Esses resultados poderiam ser enriquecidos estimando-se V_{\max} e K_M para

as diferentes formas da enzima, usando-se polipeptídios (proteínas do soro de queijo hidrolisadas previamente por tripsina e quimotripsina) como substrato.

f) Calcular as energias de inativação das enzimas solúvel e imobilizada em glutaraldeído-agarose e glioxil-agarose.

A partir das inativações feitas neste trabalho não foi possível determinar-se com precisão as energias de inativações e, portanto, nem foram apresentados os resultados. No entanto, apenas como curiosidade, estimou-se para a CPA as seguintes energias de inativações: 211 kJ/mol (CPA solúvel), 315 kJ/mol (CPA-glioxil com baixa ativação) e 453 kJ/mol (CPA-glioxil alta ativação). A alta energia de inativação da enzima imobilizada em glioxil-agarose altamente ativado concorda com sua maior estabilidade térmica. Assim, seria interessante a confirmação desses resultados e a determinação da energia de inativação do derivado CPA-glutaraldeído. Estando a energia de inativação relacionada com a rigidez da molécula de enzima imobilizada, promovida pela formação de ligações covalentes multipontuais, seria mais um suporte para sustentar que a técnica de imobilização multipontual é muito adequada na estabilização de enzimas.

g) Explicar o efeito inibitório do tampão fosfato na atividade da CPA

Foi verificado que tampão fosfato inibe a carboxipeptidase A. Poderia ser pensado que essa inibição fosse devido à perda do íon zinco do sítio ativo, induzida pelo fosfato. A comprovação desta hipótese poderia ser feita incubando a enzima imobilizada em tampão fosfato e após sua remoção por filtração, seria incubada em solução de 1,10-fenantrolina, paralelamente com um derivado com sua atividade original. Após um certo período de incubação, adequado para a remoção total do zinco, este metal seria analisado por absorção atômica. Caso fosfato atue no íon zinco, removendo-o do sítio ativo, a concentração do íon no sobrenadante da suspensão do derivado original deveria ser maior.

h) Validar o modelo cinético proposto para a Alcalase® após a separação dos aminoácidos liberados pela CPA. A eliminação desses aminoácidos deveria somente interferir na determinação de K_I , pois na estimativa de K_M e V_{max} não se levou em consideração o grau de hidrólise obtido por CPA (a concentração de ligações peptídicas disponíveis para a Alcalase®, uma endoprotease, não era reduzida pela prévia hidrólise com CPA, uma

exoprotease). Assim, após remoção dos aminoácidos do meio reacional, o modelo deve ser válido, devendo somente K_I ser determinado pela função ajustada usando-se o grau de hidrólise obtido com tripsina e quimotripsina.

i) Incluir testes de análise sensorial para verificar o amargor do hidrolisado final. Dependendo da finalidade a que se destina, e se for verificado sabor amargo, poderia ser utilizada peptidases específicas para a eliminação ou redução do sabor amargo, tais como leucina aminopeptidase, Debitrase™ LL e Debitrase™ DBP20 (aminopeptidases de bacterias produtoras de ácido láctico), e ainda peptidases que removam prolina carboxi-terminal, como, por exemplo, carboxipeptidase Y (CPY). O aminoácido prolina, próximo ao centro da cadeia peptídica, é o maior responsável pelo sabor amargo de hidrolisados. CPY e Debitrase™ (LL ou DBP20) têm sido usadas com sucesso na eliminação de sabor amargo de hidrolisados protéicos (Pawlett e Bruce, 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, R. H.; FREY, P. A.; JENCKS, W. P. *Biochemistry*. New York: Jones and Bartlett Publishers Inc., 1992.

ADACHI, S.; KIMURA, Y.; MURAKAMI, K.; MATSURO, R.; YOKOGOSHI, H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, v. 55, n. 4, p. 925-932, 1991.

ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E. C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using Alcalase: determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 202-207, 1996.

ADLER-NISSEN, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

AMBER, R. P. Carboxypeptidase A and B. *Methods Enzymology*, v. 25 B, p. 261-272, 1972.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*, v. 64, p. 175-183, 1998.

AULD, D. S.; VALLEE, B. L. Kinetics of carboxypeptidase A. II. Inhibitors of the hydrolysis of oligopeptides. *Biochemistry*, v. 9, n. 3, p. 602-609, 1970.

BARBER, A. K.; FISHER, J. R. A mechanism of action for carboxypeptidase A. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 69, n. 10, p. 2970-2974, 1972.

BEYNON R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes - a practical approach*. New York: Oxford University Press Inc., 1989.

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S. *Biochemical engineering*. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 227-232, 1988.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 360-366, 1989.

BLANCO, R. M.; CALVETE, J. J.; GUISÁN, J. M. Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, p. 353-359, 1989.

BOUDRANT, J.; CHEFTEL, C. Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. Continuous experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 18, p. 1735-1749, 1976.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

COLOWICH, S. P.; KAPLAN, N. O. *Methods in enzymology*, v. 19: *Proteolytic enzymes*. New York: Academic Press Inc., 1970.

DUA, R. D.; KUMAR, S.; VASUDEVAN, P. Carboxypeptidase A immobilization on activated styrene-maleic anhydride systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 675-680, 1985.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRÍGUEZ, V.; SANTANA, M. C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 546-550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, N. P. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 366-372, 1995.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; GUISÁN, J. M. The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-

phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 28-33, 1998.

FERREIRA, L.; RAMOS, M. A.; DORDICK, J. S.; GIL, M. H. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 835, p. 1-11, 2002.

FOLK, J. E.; SCHIRMER, E. W. The porcine pancreatic carboxypeptidase A system – 1. Three forms of the active enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 238, n. 12, p. 3884-3894, 1963.

GALVÃO, C. M. A.; GIORDANO, R. L. C. Estudo comparativo da hidrólise do soro de queijo com tripsina e quimotripsina solúveis e imobilizadas multipontualmente em gel de agarose. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 7, 2002, Maringá. *Programação e Resumos ... Maringá: RAF, 2002. p. 55.*

GIORDANO, R. L. C. *Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pelo produto*. 1987. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, USP, São Paulo. 203p.

GODFREY, T. Baking. In: GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial enzymology*. 2.ed. MacMillan Press Ltd., 1996. p. 87-101.

GONÇALVES, L. R. B.; SOUSA JR., R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Enzymatic synthesis of amoxicillin: avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, n. 6, p. 622-631, 2002.

GONSÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

GONSÁLEZ-TELLO, P.; CAMARCHO, F.; JURADO, E.; PÁEZ, M. P.; GUADIX, E. M. Enzymatic hydrolysis of whey proteins II. Molecular-weight range. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 529-532, 1994.

GRIESS, G. A.; MORENO, E. T.; EASOM, R. A.; SERWER, P. The sieving of spheres during agarose gel electrophoresis: quantitation and modeling. *Biopolymers*, v. 28, p. 1475-1484, 1983.

GUISÁN, J. M. Aldeyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose. In: BICKERSTAFF, G. F. (Ed.). *Methods in Biotechnology, v. 1: Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa: Humana Press Inc., 1997. p. 277-288.

GUISÁN, J. M.; BLANCO, R. M. Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose gels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 501, p. 67-72, 1987.

GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, V.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; ALVARO, G. Enzyme stabilization by multipoint attachment to activated pre-existing supports. In: VAN DEN TWEEL, W. J. J.; HARDER, A.; BUITELAAR, R. M. (Eds.). *Stability and stabilization of enzymes: Proceedings of International Symposium held in Maastricht, The Netherlands, 22-25 November 1992*. Amsterdam-New York-Oxford-Tokyo: Elsevier Science Publishers B. V., 1993. p. 55-62.

GUISÁN, J. M.; BASTIDA, A.; CUESTA, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M. Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 38, p. 1144-1152, 1991.

GUPTA, M. N. Thermostabilization of proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 14, p. 1-11, 1991.

HARTMEIER, W. *Immobilized biocatalysts*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1988.

HOSSAIN, M. MD.; STANLEY, R. A. Selective removal of hydrophobic peptides from protein hydrolysates in a continuous supported liquid membrane process. *Separation Science and Technology*, v. 31, n. 10, p. 1443-1462, 1996.

ICHIKAWA, S.; TANAKO, K.; KUROIWA, T.; HIRUTA, T.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Immobilization of chitosanase by multipoint covalent attachment to agar gel support. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 2, p. 201-206, 2002.

KENNEDY, J. F. *Enzyme technology*. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). *Biotechnology*. v. 7a. Weinheim: VCH, 1987.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 29, p. 1-28, 1983.

KOIDE, A.; YOSHIKAWA, M.; KURACHI, K. Crystallization and properties of carboxypeptidase A₁ from porcine pancreas. *Eur. J. Biochem.*, v. 117, p. 383-388, 1981.

KUKMAN, I. L.; ZELENIK-BLATNIK, M.; ABRAN, V. Isolation of low-molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 704, p. 113-120, 1995.

KUMAR, A.; GUPTA, M. N. Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 289-294, 1998.

KUMAR, S.; VASUDEVAN, P.; DUA, R. D. Activity of carboxypeptidase A bound to a modified cellulosic matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 12, p. 107-119, 1986.

LARA, M. G. *Estudo das condições de obtenção de um hidrolisado enzimático de proteínas do soro de leite com baixo teor de fenilalanina*. 1997. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto. 135p.

LARTIGUE, D. J. Basic enzymology. In: MESSING, R. A. (Ed.). *Immobilized enzymes for industrial reactors*. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 11-38.

LENINGHER, A. L. *Bioquímica*. v.1. Componentes Moleculares das Células. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1976.

LENINGHER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1988.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 2, p. 381-386, 1990.

MARQUEZ MORENO, M. C.; FERNANDEZ CUADRADO, V. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, v. 28, p. 481-490, 1993.

MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, v. 1, p. 739-745, 2000.

MICRONAL. *A determinação do nitrogênio de acordo com o método de Kjeldahl*. São Paulo, 1995. p. 2-9.

MONTI, J. C.; JOST, R. Solubilization of cheese whey protein by trypsin and a process to recover the active enzyme from the digest. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, p. 1173-1185, 1978.

MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33. n. 6, p. 341-476, 1993.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. *Química orgânica*. 9.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbernkian, 1990.

MOZHAEV, V. V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Tibtech*, v. 11, p. 88-95, 1993.

MOZHAEV, V. V.; MELIK-NUBAROV, N. S.; SIKSNIS, V.; MARTINEK, K. Strategy for stabilizing enzymes. Part one: increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. *Biocatalysis*, v. 3, p. 179-187, 1990.

MOZHAEV, V. V.; SIKSNIS, V. A.; TORCHILIN, V. P.; MARTINEK, K. Operational stability of copolymerized enzymes at elevated temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p. 1937-1945, 1983.

NITESCU, I.; CUMMING, R. H.; ROWELL, F. J. Suitability of chromogenic substrates for Alcalase detection for inclusion in an aerosol monitoring system. *Ann. Occup. Hyg.*, v. 40, n. 4, p. 361-370, 1996.

NOVO NORDISK A/S. Alcalase. *Enzyme business*, B-259e-GB 2000, p. 1-3, jan. 1994.

OTTE, J.; ZAKORA, M.; QVIST, K. B.; OLSEN, C. E.; BARKHOLT, V. Hydrolysis of bovine β -lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides. *Int. Dairy Journal*, v. 7, p. 835-848, 1997.

PAWLETT, D.; BRUCE, G. Debittering of protein hydrolysates. In: GODFREY, T.; WEST, S. (Eds.). *Industrial enzymology*. 2.ed. London: MacMillan Press Ltd, 1996. p. 177-186.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-CALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 711-718, 2002.

PEREA, A.; UGALDE, U.; RODRIGUEZ, I.; SERRA, J. L. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 418-423, 1993.

PEREIRA, G. H. A. *Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil*. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 78p.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Soro de leite – obtenção, características e aproveitamento: revisão. *Semina: Ci. Agr.*, v. 13, n. 1, p. 92-96, 1992.

REDDY, I. M.; KELLA, N. K. D.; KINSELLA, J. E. Structural and conformational basis of the resistance of β -lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 36, p. 737-741, 1988.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional do soro láctico. *Indústria de Laticínios*, p. 67-69, maio/jun. 1997.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 717-723, 1987.

SEBASTIAN, J. F.; LIANG, G.; JABARIN, A.; THOMAS, K.; BONNIE WU, H. Effect of enzyme-substrate interactions away from the reaction site on carboxypeptidase A catalysis. *Bioorganic Chemistry*, v. 24, p. 290-303, 1996.

SCHMIDT, D.G.; POLL, J.K. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy Journal*, v. 45, p. 225-240, 1991.

SHUI-TEIN, C.; SHU-CHYONG, H.; AIH-JING, C.; SHIH-HSIUNG, W.; KUNG-TSUNG, W. Industrial protease "Alcalase" as a catalyst in organic synthesis: resolution of natural and unnatural amino acids. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 39, p. 91-99, 1992.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M., YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.*, v. 42, p. 2783-2789, 1994.

SOUSA JR., R.; RESENDE, M. M.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Hybrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by Alcalase immobilized in agarose gel particles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, NO PRELO (a).

SOUSA JR., R.; LOPES, G. P.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; ALMEIDA, P. I. F.; GIORDANO, R. C. Kinetic model for whey protein hydrolysis carried out by Alcalase multi-punctually immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, NO PRELO (b).

SOUSA JR., R. Inteligência computacional aplicada à automação da hidrólise enzimática de soro de queijo em reator contínuo. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 231p.

STANFORD, P. A.; BAIRD, J. *Molecular Biology, v. 2: The polysaccharides*. Orlando: Academic Press, 1983.

STRYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1991.

SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. *Int. Dairy Journal*, v. 8, p. 819-827, 1998.

SOBRAL, K. C. A.; RODRIGUEZ, R. M. O.; OLIVEIRA, R. D.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Immobilization of cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus firmus* in commercial chitosan. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 44, p. 383-386, 2002.

SOBRAL, K. A.; RODRIGUEZ, R. O.; OLIVEIRA, R. D.; OLIVO, J. E.; MORAES, F. F. de; ZANIN, G. M. Evaluation of supports and methods for immobilization of enzyme cyclodextringlycosyltransferase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105-108, p. 809-819, 2003.

SUCKLING, K. E. Mechanisms of Enzyme Catalysis. In: BULL, A.; DALTON, H. (Eds.). *Comprehensive biotechnology*. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1985. v. 1, p. 539-551.

SVENDSEN, I. Chemical modifications of the subtilisins with special reference to the binding of large substrates. A review. *Carlsberg Res. Commun.*, v. 41, p. 237-291, 1976.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, v. 68, p. 147-152, 2000.

TARDIOLI, P. W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 565-574, 2003a.

TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 352-360, 2003b.

TOOGOOD, H. S.; TAYLOR, J. N.; BROWN, R. C.; TAYLOR, S. J. C.; MACCAGUE, R.; LITTLECHILD, A. Immobilization of the thermostable L-aminoacylase from *Thermococcus litoralis* to generate a reusable industrial biocatalyst. *Biocat. Biotransf.*, v. 20, p. 241-249, 2002.

UNILIVRE. *Impactos da liberalização comercial sobre a qualidade ambiental – países em desenvolvimento*. Disponível em: <<http://www.unilivre.org.br/boletimunilivre/folhatec02.htm>>. Acesso em 28 jun. 2003. p. 1-7.

VÉRTESI, A.; SIMON, L. M.; KISS, I.; SZAJÁNI, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 73-79, 1999.

VOET, D.; VOET, J. *Biochemistry*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

VOGEL, A. I. *Análise inorgânica quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981.

VOLKIN, D. B.; KLIBANOV, A. M. Minimizing protein inactivation. In: CREIGHTON, T. E. (Ed.). *Protein function – a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1989. p. 1-24.

WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. (Eds.). *Comprehensive biotechnology*. Oxford: Pergamon Press Ltd., 1985. v. 3, p. 789-817.

WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WHITAKER, J. R.; MENDER, F.; BENDER, M. L. The kinetics of some carboxypeptidase A and acetylcarboxypeptidase A catalyzed hydrolyses. *Biochemistry*, v. 5, n. 1, p. 386-392, 1966.