

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica
Mestrado em Bioquímica e Fisiologia**

Fucana magnetizada como suporte para imobilização de
enzimas aplicadas na coagulação do leite

Valdeene Albuquerque Jansen da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Co-orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife, 2008

Fucana magnetizada como suporte para imobilização de enzimas aplicadas na coagulação do leite

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado por:

Data:

___ / ___ / ___

Silva, Valdeene Albuquerque Jansen da
Fucana magnetizada como suporte para
imobilização de enzimas aplicadas na coagulação do
leite / Valdeene Albuquerque Jansen da Silva. – Recife:
A Autora, 2008.

54 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e
Fisiologia) – UFPE. CCB

1. Bioquímica 2. Enzimas 3. Polissacarídeo
4. Leite I. Título

577.1	CDU (2 ^a . Ed.)	UFPE
574.192	CDD (22 ^a . Ed.)	CCB – 2008 –067

254

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Valdeene Albuquerque Jansen da Silva**, realizada em 28 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 09:30 horas, do dia vinte e oito de fevereiro de 2008, foi aberto, na Sala de aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Valdeene Albuquerque Jansen da Silva**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva fez a apresentação da aluna, de sua orientadora Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva, de seus co-orientadores Professores Doutores Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares e José Luiz de Lima Filho, bem como da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Nicácio Henrique da Silva, na qualidade de Presidente, do Depto. de Bioquímica/UFPE, Maria de Mascena Dinis Maia, do Depto de Biologia/UFRPE e Valdinete Lins da Silva, do Depto. Engenharia Química/UFPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Fucana Magnetizada como Suporte para Enzimas Imobilizadas Aplicadas na Coagulação do Leite**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em **30 (trinta) minutos**. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Profa. Dra. Maria de Mascena Dinis Maia, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Logo após, o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Valdinete Lins da Silva, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva usou da palavra e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, o Sr. Presidente. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2008.

Nicácio Henrique da Silva
Valdinete Lins da Silva
Maria de Mascena Dinis Maia
José Luiz de Lima Filho

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1.0- Revisão Bibliográfica	1
1.1- Leite	1
1.2- Enzimas	3
1.3- Enzima Coagulante do leite: Quimosina	4
1.3.1- Química da Quimosina	6
1.3.2- Mecanismo de ação	7
1.4- Algas	9
1.5- Polissacarídeo Fucana	10
1.6- Imobilização de Enzimas	13
1.7- Suportes ou Matrizes	15
2.0- OBJETIVOS	17
2.1- Geral	17
2.2- Específicos	17
3.0- Referências Bibliográficas	18
4.0- CAPÍTULO I	23
4.1- Abstract	25
4.2- Introduction	26
4.3- Materials and Methods	28
4.3.1- Materials	28
4.3.2- Extraction and partial purification of sulphated polyssacharides from <i>Sargassum cymosum</i>	28
4.3.3- Determination of neutral sugars in fucan	29
4.3.4- Preparation of fucan-coated magnetite particles	29
4.3.5- Oxidation of fucan-coated magnetite particles	29
4.3.6- Enzyme Immobilization	30
4.3.7- Protein determination	30
4.3.8- Milk-clotting and proteolytic unspecific activities	30
4.3.9- Milk-clotting enzymes immobilized characterization	31
4.4- Results and Discussion	32
4.4.1- Fucan extraction and preparation of fucan-coated magnetite particles	32
4.4.2- Enzyme immobilization	32
4.4.3- Properties of bovine chymosin and bovine recombinant chymosin immobilized	33
4.4.3.1- Optimal Temperature	33
4.4.3.2- Thermal stability	34
4.4.3.3- Influence of CaCl ₂ in milk clotting activity	34
4.4.3.4- Reuse and Storage	35
4.5- Acknowledgements	36
4.6- References	37

5.0- CONCLUSÕES	46
6.0- ANEXOS	47
6.1- Normas para a redação de artigos para a revista “Process Biochemistry”	47
6.2-Trabalhos apresentados em congressos	52

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar e iluminar os meus caminhos em toda a minha vida, me dando saúde, paz, paciência e forças para vencer os desafios da vida.

Agradeço a minha mãe, meu pai e meu irmão que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando em todos os momentos da minha vida e me mostrando sempre o caminho certo a seguir.

Agradeço ao meu esposo Bruno que sempre me apoiou e que nas horas de desânimo me incentivou a continuar e seguir em frente.

A toda a minha família por todo carinho, amizade e amor que sempre me deram.

A minha orientadora Prof^a. Maria da Paz pela paciência, confiança e principalmente pela amizade. Obrigada por tudo que fez por mim nesta etapa importante da minha vida.

Agradeço a minha co-orientadora Prof^a. Maria Taciana que me ensinou muito e desta forma contribuiu bastante para a realização desta pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. José Luiz por ter se disponibilizado a me ajudar todas as vezes que precisei.

Agradeço a Prof^a. Ana Porto por ter contribuído na etapa de produção da enzima.

Aos meus sempre professores e amigos Ana Mendonça e Amâncio, pela confiança que sempre depositaram em mim e pela imensa amizade.

A Benoit por ter me cedido material para a pesquisa, contribuindo muito para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a minha amiga Jackeline Maciel pela imensa paciência, compreensão e por estar sempre ao meu lado me ensinando e ajudando durante todo o meu trabalho.

Aos meus amigos e amigas de turma do mestrado 2006 pelo companheirismo.

A Érica, Dani, Helena e Michelle, companheiras de laboratório, agradeço pela amizade.

Agradeço a Roberto Sá e Elaine pela imensa ajuda na coleta da alga e pelas orientações.

Aos funcionários do LIKA que são responsáveis pelo bom funcionamento dos laboratórios e conseqüentemente das atividades experimentais.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica que sempre que precisamos estiveram lá para ajudar.

A CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídeos de caseína κ , recobrando a superfície da micela.....	2
Figura 2. Estrutura tridimensional da quimosina.....	7
Figura 3. Esquema da ação da quimosina na k-caseína do leite.....	8
Figura 4. Estrutura da fucana proposta por Percival and McDowell (Modelo 1) e por Patankar et al. (Modelo 2).....	12
Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas.....	14

CAPÍTULO I

Fig. 1. Optimal temperature for free (•) and immobilized (▪) bovine chymosin. The skim milk 10% (w/v in water deionized) with 10 mM CaCl_2 and enzyme was incubated over a temperature range of 25°C–80°C for milk-clotting activity determination.....	41
Fig. 2. Optimal temperature for free (•) and immobilized (▪) bovine recombinant chymosin. The skim milk 10% (w/v in water deionized) with 10 mM CaCl_2 and enzyme was incubated over a temperature range of 25°C–80°C for milk-clotting activity determination.....	42
Fig. 3. Thermal stability of free (A) and immobilized (B) bovine chymosin. The thermal stability was determined by pre-incubating the bovine chymosin for 60 minutes in the temperature range of 35–80°C.....	43
Fig. 4. Thermal stability of free (A) and immobilized (B) bovine recombinant chymosin. The thermal stability was determined by pre-incubating the recombinant chymosin for 60 minutes in the temperature range of 35–80°C	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos predominantes de quimosina e coagulantes usados para produção de queijos.....	5
--	---

CAPÍTULO I

Table 1. Different concentrations of bovine and recombinant chymosin immobilized. Different concentrations of chymosin were immobilized in fucan-coated magnetite particles for found the higher milk-clotting activity. The immobilization percentage was measured according to Lowry et al. [15].....	40
--	----

Table 2. Influence of CaCl_2 in the optimal temperature for the free and immobilized bovine chymosin and bovine recombinant chymosin. The reaction mixture containing skim milk 10% (w/v in water deionized), in presence of CaCl_2 and in absent CaCl_2 , for assay of milk clotting activity was incubated over a temperature range of 25–80°C.....	45
---	----

RESUMO

O polissacarídeo fucana extraído da alga *Sargassum cymossum* foi magnetizado e posteriormente usado como suporte para imobilização de enzimas coaguladoras do leite. A caracterização básica da enzima imobilizada foi realizada pela determinação da temperatura ótima, estabilidade térmica, influência do cloreto de cálcio na atividade coagulante do leite, re-uso e estocagem. O método de imobilização mostrou-se adequado, apresentando uma retenção em proteína de 80% e 78% para as duas enzimas testadas, quimosina bovina e quimosina bovina recombinante, respectivamente. A atividade coagulante do leite nestes DEIs (Derivados Enzimáticos Imobilizados) foi 11,8 U/mL e 1,33 U/mL, respectivamente para as quimosinas bovina e recombinante. As temperaturas ótimas encontradas foram 60°C (36 U/mL) e 50°C (3,53 U/mL) para as quimosinas bovina e recombinante imobilizadas, respectivamente. Experimentos de estabilidade térmica revelaram que ambas as enzimas imobilizadas foram mais sensíveis à temperatura quando comparadas as enzimas livres. A perda da atividade com relação à enzima livre foi 66,35% para quimosina bovina após 30 minutos a 35° C, e 16,54% para recombinante após 30 minutos a 35° C. A influência do CaCl_2 na atividade coagulante do leite foi comprovada tanto para as enzimas livres quanto para as imobilizadas. Na ausência do cálcio, as enzimas livres perderam 91,85% e 71,43%, respectivamente para a quimosina bovina e recombinante, enquanto que as enzimas imobilizadas não exibiram nenhuma atividade coagulante do leite. Nos testes de reuso foi observada uma perda na atividade de 80% e 60%, respectivamente para as quimosinas bovina e recombinante, após o segundo reuso.

Palavras-chaves: Algas marinhas; *Sargassum cymossum*; Fucana; Enzimas coaguladoras do leite; Suporte magnético; Imobilização.

ABSTRACT

The polysaccharide fucan extracted from the algae *Sargassum cymossum* was magnetized and used as support for milk-clotting enzymes immobilization. The basic characterization of immobilized enzyme was realized by the determination of optimal temperature, thermal stability, the CaCl_2 influence in milk-clotting activity, reuse and storage. The immobilization method showed is adequate, with protein retention of 80% and 78% for two enzymes tested, bovine chymosin and bovine recombinant chymosin, respectively. The milk-clotting activity in these DEIs (derivated enzymatic immobilized) was 11.8 U/ml and 1.33 U/ml, respectively bovine and recombinant chymosin. The optimal temperatures found were 60°C (36 U/mL) and 50°C (3.53 U/mL) for the bovine and recombinant chymosin immobilized, respectively. Thermal stability experiments revealed that both immobilized enzymes were more sensible at temperature when compared to the free enzymes. The lost activity in relation a free enzymes was 66.35% for chymosin after 30 minutes at 35° C, and approximately 16.54% for recombinant after 30 minutes at 35° C. The CaCl_2 influence in milk-clotting activity was comprowed because of loss activity in both free and immobilized enzymes tested in absent of CaCl_2 . The free enzymes loss activity of 91.85% and 71.43%, respectively, bovine and recombinant chymosin while immobilized enzymes not exhibited milk-clotting activity. The bovine and recombinant chymosin immobilized showed a loss of 80% and 60 %, respectively, after the second reuse.

Keywords: Sea algae; *Sargassum cymossum*; Fucan; Milk-clotting enzymes; Magnetic support; Immobilization.

1.0- Revisão Bibliográfica

1.1- Leite

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos (Sgarbieri, 2005). O leite bovino, e possivelmente, o leite de outras espécies contêm destacadamente dois diferentes grupos de proteínas, as paracaseínas e as proteínas de soro do leite (não caseína) (Mohanty et al., 1999).

As caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfatos ligados a serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Como resultado, as caseínas são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite (Sgarbieri, 2005).

As caseínas representam cerca de 80% das proteínas do leite e consistem de quatro principais tipos, alfa S1, alfa S2, beta (β), e kappa (κ) na razão de 40:10:35:12. Todas são fosforiladas. Por causa do alto conteúdo de fosfato, alfa S1, alfa S2 e β -caseína ligam-se fortemente ao cálcio e precipitam, enquanto a κ -caseína a qual tem somente um resíduo de fosfato, não se liga ao cálcio fortemente e apresenta-se solúvel a alta concentração de cálcio. A κ -caseína também reage hidrofobicamente com alfa S1, alfa S2, e β -caseína e pode estabilizar 10 vezes a carga das caseínas sensíveis ao cálcio contra a precipitação pela formação de grossos agregados coloidais. A caseína κ mostra-se mais hidrofílica apesar de

apresentar apenas um radical fosforilserina, por possuir carboidrato na molécula (glicopeptídio), caracterizando-se como uma P-glicoproteína (Sgarbieri, 2005).

No leite, mais que 95% das caseínas existem naturalmente como largas partículas coloidais ou micelas (Mohanty et al., 1999). Estas apresentam em suas estruturas as caseínas α S1, α S2 e β , em sua parte central, e a caseína κ , que se distribui em parte no corpo da micela e em parte na superfície, conferindo-lhe estabilidade físico-química. As unidades estruturais da micela (submicelas) são unidas pela presença de fosfato de cálcio coloidal (Sgarbieri, 2005).

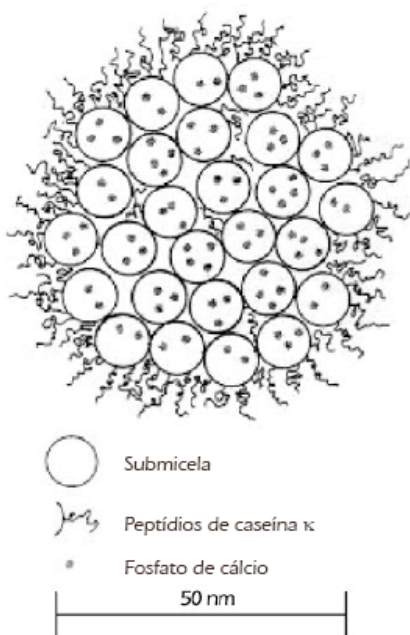


Figura 1. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de cálcio e os peptídeos de caseína κ , recobrando a superfície da micela.
Ref. Sgarbieri, 2005

A coagulação do leite é a etapa fundamental para a elaboração de queijos. Para isso, normalmente, faz-se uso de enzimas coagulantes, que, dependendo de sua origem, apresentam composições enzimáticas diferenciadas, tanto em quantidade (proporção das

enzimas), quanto em qualidade (tipo de enzima) (Neelakantan et al., 1999 & Vasconcelos et al., 2004).

1.2- Enzimas

As enzimas desempenham a função de catalisar as reações químicas nos organismos vivos e proporcionam imensas oportunidades para a indústria realizar a conversão biocatalítica de forma eficiente e econômica. Muitas enzimas encontram-se disponíveis no mercado para numerosas aplicações industriais em diversos setores (agrícola, químico, farmacêutico, alimentos, têxtil, etc) (Beilen & Li, 2002). Com exceção de alguns RNAs (ribozimas) que são catalisadores durante seu próprio processamento, todas as enzimas são proteínas, as quais aumentam a velocidade de uma reação por um fator de 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada. Elas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Entre as diferentes espécies de enzimas as proteases têm recebido especial atenção (Xi et al., 2005), compondo o mais importante grupo de enzimas e representando perto de 60% da venda total de enzimas, desde que são usados em detergentes, cerveja, alimentos, couro e indústrias de laticínios (Merheb et al., 2007).

As proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e são classificadas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas e as endopeptidases, nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (Rao et al., 1998). As endopeptidases ou proteinases podem ainda ser divididas segundo seu mecanismo de ação

em: serino-, cisteino-, metalo- e aspartato protease. Os nomes indicam uma das regiões catalíticas no sítio ativo da enzima (Whitaker, 1994).

O uso de quimosina, como uma enzima endógena, na produção de queijo é talvez a maior aplicação de enzimas na área alimentícia. Nos últimos anos, proteinases têm encontrado aplicações adicionais na tecnologia de laticínios, como por exemplo em acelerar a maturação do queijo, na modificação de propriedades funcionais e na preparação de produtos dietéticos (Neelakantan et al., 1999).

1.3- Enzima Coagulante do leite: Quimosina

Quimosina (EC 3.4.23.4), peptidase ácida prevalente no abomaso de ruminantes recém-nascidos, pertence a uma ampla classe de aspartil endopeptidase. A quimosina bovina é a enzima preferida no processo de fabricação de queijo, visto que, apresenta alta especificidade para κ -caseína, baixa atividade proteolítica geral, especialmente em relação às proteínas do leite, e sua atividade ótima é encontrada em condições suavemente ácidas (Kappeler et al., 2006). Entretanto, devido à alta produção mundial de queijo, a redução no fornecimento de quimosina bovina e o aumento do preço, numerosas tentativas têm sido realizadas para substituir a quimosina bovina por outras proteases coagulantes de leite (Cavalcanti et al., 2004).

Vários animais, plantas e microorganismos têm sido sugeridos como fontes de enzimas coagulantes de leite (Cavalcanti et al., 2004). As enzimas extraídas destas fontes podem ser usadas isoladamente ou misturadas entre si. Esta mistura pode proporcionar, entre outros efeitos, um ajuste da taxa de proteólise durante a maturação, a um nível desejado (Vasconcelos et al., 2004).

Tabela 01. Tipos predominantes de quimosina e coagulantes usados para produção de queijos.

Grupo	Fonte	Exemplos de nomes	Componentes. enzimáticos
Animal	Estômago bovino	Quimosina de bezerro, quimosina de bovino adulto	Quimosina A e B, pepsina (A) e gastricinina
		Pasta de quimosina	a mesma acima com lipase
	Estômago de ovino	Quimosina de cordeiros e ovinos	Quimosina e pepsina
	Estômago de caprino	Quimosina de cabra	Quimosina e pepsina
	Estômago de porco	Coagulante porcino	Pepsina A, e pepsina B,
Microbiano	<i>Rhizomucor miehei</i>	Coagulante miehei tipo L, TL e XL	Proteinase aspártica <i>Rhizomucor miehei</i>
	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Coagulante pusillus	Proteinase aspártica <i>Rhizomucor pusillus</i>
	<i>Cryphonectria parasitica</i>	Coagulante parasítico	Proteinase aspártica <i>Cryphonectria parasitica</i>
FPC	<i>Aspergillus niger</i>	Chymax TM	Quimosina B
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxiren TM	Quimosina B
Vegetais	<i>Cynara cardunculus</i>	Cardoon	Cyprosina 1, 2 e 3 e ou cardosina A e B

Abreviações : FPC - quimosina produzida por fermentação. ChymaxTM, MaxirenTM : nomes comerciais. Cardoon: não está disponível comercialmente. (Soares, M. T. V. Dissertação, 2001)

Um número de bactérias e fungos tem sido sugerido como potenciais fontes para substituir a quimosina. A indústria de laticínio agora usa extensivamente coagulante microbiano produzido por fontes fúngicas, especialmente *Mucor pusillus*, *Mucor meihei*, *Aspergillus oryzae* e *Irpis lctis* (Mohanty et al., 1999 & Vasconcelos et al., 2004). Os

coagulantes microbianos são atualmente utilizados em cerca de 1/3 de toda a produção mundial de queijo (Neelakantan et al, 1999 & Vasconcelos et al., 2004).

Estudos relataram a produção de quimosina recombinante em diferentes microorganismos (Kumar et al., 2006). Avanços no entendimento da genética dos eucarióticos têm levado a produção de quimosina animal em uma variedade de microorganismos através da engenharia genética. O gene da quimosina tem sido clonado com sucesso e expressado usando um número de plasmídios ou vetores de plasmídios modificados e organismos hospedeiros como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus spp*, células do rim de hamster bebês, e assim em diante. Diversas formas de quimosina têm sido expressadas, incluindo preproquimosina, met-proquimosina, e met-quimosina como proteínas heterogêneas produzidas em *E. coli*. Quimosina recombinante tem sido usada para produzir uma variedade de queijos que são de características parecidas (comparáveis) àqueles produzidos por quimosina bovina. (Mohanty et al., 1999).

1.3.1- Química da Quimosina:

A Quimosina é sintetizada *in vivo* como pré- proquimosina, a qual é caracterizada como uma proteína de 365 aminoácidos. Esta enzima é secretada em uma forma inativa chamada pró-quimosina, com peso molecular de 40,78 Da que no estágio inativo é mantido pelo pró-peptídeo n-terminal. Em pH ácido, ocorre uma ativação autocatalítica da quimosina (peso molecular de 35,60 Da, 323 aminoácidos, observados no pH em torno de 5,0) ou pseudoquimosina (337 aminoácidos, observados no pH em torno de 2). Ambos quimosina e pseudoquimosina possuem atividade coagulante do leite, sendo duas formas

alélicas naturais da quimosina de bezerro designadas quimosina A e B, respectivamente. Estas formas diferem por um único resíduo de aminoácido, um aspartato por uma glicina na posição 244 (Mohanty et al., 1999).



Figura 2. Estrutura tridimensional da quimosina

Fonte: [http://www.dwb.unl.edu/teacher/NSF/C08/C08 links/ www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1g1cms.pdb](http://www.dwb.unl.edu/teacher/NSF/C08/C08%20links/www.fst.rdg.ac.uk/courses/fs560/topic1/t1g1cms.pdb)

1.3.2- Mecanismo de ação:

A coagulação do leite é o primeiro passo na produção de queijo. Enquanto a coagulação pode ser induzida por vários caminhos, nenhum pode ser comparado com a ação específica da quimosina (Cavalcanti et al., 2004). A coagulação do leite é um processo que ocorre em dois estágios: a fase primária (estágio proteolítico) envolve a produção enzimática da paracaseína (insolúvel) e glicomacropéptídeos (solúvel); a fase secundária (estágio de coagulação ou fase de agregação micelar) envolve a precipitação ou coagulação da paracaseína pelo cálcio em temperaturas maiores que 20°C. O estágio proteolítico é essencialmente completo antes do início da coagulação (Fox, 1988).

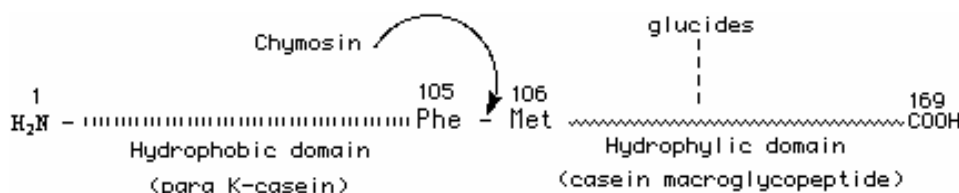


Figura 3- Esquema da ação da quimosina na k-caseína do leite.

Fonte: www.ufv.br/dbg/trab2002/OUTROS/DVS002.htm

A ligação Phe 105- Met 106 da κ -caseína (κ -CN) é o sítio proteolítico primário da quimosina. A liberação do macropeptídeo κ -caseína causa desestabilização das micelas de caseína, resultando na coagulação. O componente para- κ -caseína insolúvel é retido no coágulo enquanto o macropeptídeo hidrofílico é liberado na fase solúvel (Reid et al., 1997). Fatores como concentração de enzima, temperatura, pH e concentração de Ca^{2+} influenciam diretamente na coagulação do leite (Nájera et al., 2003).

Mesmo com todas as vantagens as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise. Uma das soluções é a utilização de uma matriz (ou suporte) na qual a enzima possa ser ligada. Essa enzima imobilizada apresenta grandes vantagens em relação à enzima nativa no aspecto de melhorarem a estabilidade e de serem mais facilmente removidas do meio de reação (Xi et al., 2005). Polissacarídeos podem revestir partículas magnéticas, podendo desta forma ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas. As algas marinhas apresentam uma alta variedade e quantidade

de polissacarídeos, como por exemplo, as algas *Phaeophyceae* que produzem polissacarídeos neutros (xilose e celulose) e polissacarídeos ácidos (fucana e ácido algínico) (Kloareg e Quatrano, 1988).

1.4- Algas

As algas vivem em ambientes aquáticos e geralmente são consideradas vegetais inferiores, por apresentarem uma menor diferenciação celular em relação aos vegetais terrestres. Com base na natureza de seus pigmentos as algas são classificadas como *Chlorophyceae* - algas verdes; *Rhodophyceae* - algas vermelhas; e como *Phaeophyceae* - algas marrons (Joly, 1977).

O uso das algas marinhas em diversas áreas, como nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos, levaram o estudo de seus constituintes. Estes vegetais marinhos sintetizam lipídeos e proteínas características, possuem sais minerais e altos teores de polissacarídeos, alguns destes, apresentando grande semelhança com os sintetizados pelos vegetais terrestres, tais como amido e a celulose, entretanto, outros polissacarídeos são bastante diferenciados e variam de acordo com a espécie da alga (Raven et al., 1978).

As algas marinhas apresentam uma grande variedade e quantidade de polissacarídeos em comparação com outros vegetais. Dentre as algas, as *Phaeophyceae* foram as que atingiram o maior desenvolvimento morfológico e estrutural (Round, 1983). Esta classe produz polissacarídeos ácidos que são classificados em não sulfatados (ácido algínico) e sulfatados (fucana). Em relação aos polissacarídeos sulfatados das

Phaeophyceae, as fucanas destacam-se por apresentar diversas atividades biológicas (Yoon et al., 2007).

1.5- Polissacarídeo Fucana

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média até alta massa molecular. Os polissacarídeos, também chamados de glicanos, diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas e nos tipos de ligação que os unem, no comprimento de suas cadeias e no grau de ramificação destas. São classificados em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos quando contêm um único ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas, respectivamente (Lehninger et al., 2002 & Voet et al., 2000).

Essas macromoléculas naturais, presentes em quase todos os organismos vivos, exercem várias funções: fazem parte da estrutura das paredes celulares de plantas superiores ou algas marinhas (celulose, hemicelulose, pectina) ou de animais (quitina, mucopolissacarídeos); são reservas metabólicas de plantas (amido, dextranas, frutanas) e de animais (glicogênio); agem como substâncias protetoras de plantas, devido a sua capacidade de reter grandes quantidades de água, o que faz com que os processos enzimáticos não sejam interrompidos mesmo em condições de desidratação (Imrie & Tilbury, 1972; Brock & Madigan, 1991).

As fucanas são polissacarídeos ácidos sulfatados solúveis em água que ocorrem como principal constituinte de algas marrons (Araújo et al., 2004 & Yoon et al., 2007). Elas são obtidas em grande quantidade e estão entre os polissacarídeos sulfatados mais abundantes encontrados na natureza (Yoon et al., 2007). A fucana também pode ser obtida de equinodermos marinhos, da parede do corpo de pepino marinho *L. grisea* e da gema do

ovo de diversas espécies de filhotes marinhos. Estudos mostraram que o polissacarídeo fucana obtido de plantas tem uma estrutura mais complexa que os de equinodermos (Mulloy et al., 2000).

Desde a primeira descrição da fucana extraída de algas, esses polissacarídeos têm sido testados para atividades biológicas em diferentes sistemas de mamíferos. Os estudos demonstraram que as fucanas de algas apresentam atividades antiviral, anti-úlceras e anti-adesiva, anticoagulante, anti-inflamatória e propriedades antiproliferativa e antitumoral (Rocha et al., 2001). São inibidores de células musculares lisas e proliferação de fibroblastos e podem bloquear a fertilização em várias espécies (Rocha et al., 2001). As atividades biológicas da fucana têm sido determinadas pelo seu alto grau de sulfatação, embora estas atividades dependam das estruturas e do peso molecular (Zvyagintseva et al., 2003).

As fucanas constituem um grupo bastante heterogêneo de carboidratos e de acordo com sua composição são classificadas em homofucanas constituídas apenas de L-fucose, e heterofucanas constituídas de L-fucose e outros açúcares como xilose, galactose, glicose, manose, ácido urônico bem como sulfato, possuindo a L-fucose como açúcar predominante (Percival & McDowell, 1967). As estruturas dessas fucanas variam entre as espécies e às vezes entre diferentes partes da planta. A complexidade na estrutura desses compostos ocorre devido às muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato (Rocha et al., 2004). A composição química de diferentes polissacarídeos pode variar também de acordo com o método de extração. Dessa forma, cada nova fucana purificada é um composto único com características estruturais únicas e assim uma nova droga potencial (Rocha et al., 2001).

Na literatura, vários autores propuseram estruturas para a fucana. Percival e McDowell (1967) propuseram uma estrutura ramificada α -(1 $\rightarrow$ 2)-L-fucose, e Patankar et al. (1993) uma estrutura ramificada com α -(1 $\rightarrow$ 3)-L-fucose (Figura 4). De acordo com mais autores (Nishino et al., 1989 & Nishino et al., 1991), os grupos sulfatos são ligados principalmente à posição 4 de resíduos de fucose (Chevolot et al., 1999).

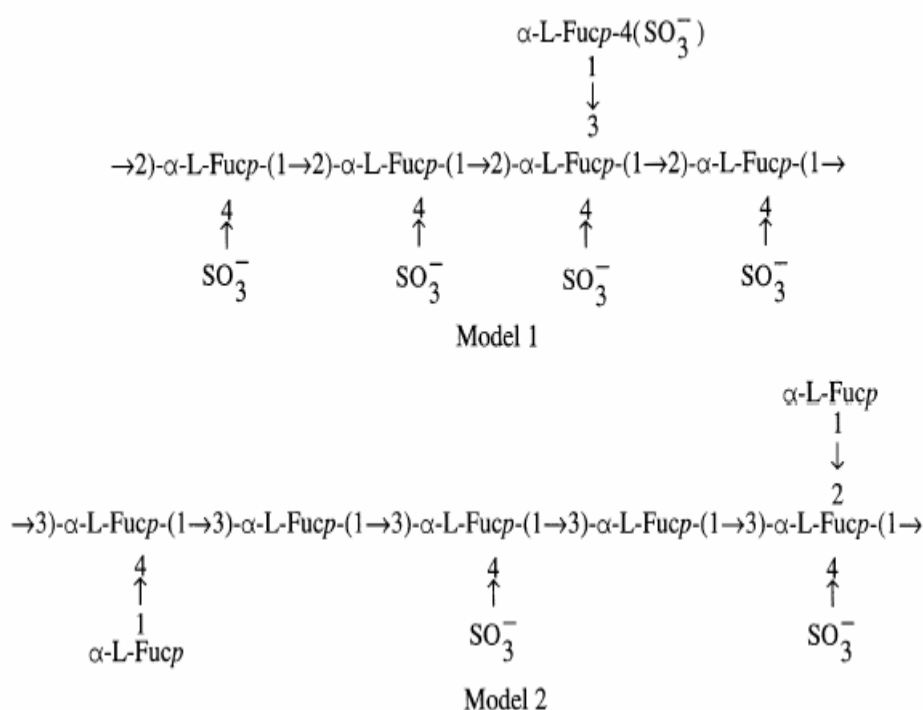


Figura 4. Estrutura da fucana proposta por Percival e McDowell (Modelo 1) e por Patankar et al. (Modelo 2).
Ref. Chevolot et al., 1999

O polissacarídeo fucana contém em sua estrutura grupos funcionais disponíveis para ligar moléculas biologicamente ativas, podendo desta forma ser utilizado como suporte para imobilização (Araújo et al., 2004).

1.6- Imobilização de Enzimas

Imobilização é um termo geral utilizado para descrever a retenção de um catalisador biologicamente ativo dentro de um sistema reator ou analítico. O biocatalisador (uma única enzima, uma mistura de enzimas ou enzimas contidas dentro de uma célula viva) está confinado dentro ou sobre a matriz. A imobilização proporciona um complexo insolúvel em um meio especializado dentro do qual fluidos podem passar facilmente, transformando substrato em produto numa reação enzimática controlada e facilitando a remoção do catalisador e produto (Hermanson et al., 1992).

A imobilização de enzimas e componentes biológicos tem grande importância devido a sua ampla variedade de aplicações nas indústrias de alimento, farmacêutica e também suas aplicações biomédicas (Bryjak & Kolarz, 1998; Chellapandian, 1998; Malmsten et al., 1999; Villalonga et al, 2000). A aplicação de enzimas imobilizadas é, em comparação com sua forma solúvel, muito vantajosa (Oliveira & Vieira, 2006).

Desde a segunda metade do século XX, numerosas tentativas têm sido dedicadas ao desenvolvimento de enzimas imobilizadas insolúveis para várias aplicações. Há diversos benefícios de usar preferencialmente enzimas imobilizadas: primeiro, a reutilização de biocatalisador heterogêneo com o objetivo de reduzir o custo de produção pela reutilização eficiente e controle do processo; segundo, como processo analítico estável e reutilizável para aplicações analíticas e médicas; terceiro, como adsorventes para purificação de proteínas e enzimas; quarto, como ferramenta fundamental para fase sólida da química de proteína; quinta, como microaparelhos efetivos para liberação controlada de drogas de

proteínas (Cao, 2005). Essas vantagens dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização (Oliveira & Vieira, 2006).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações enzimáticas. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 5 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia et al., 2004).

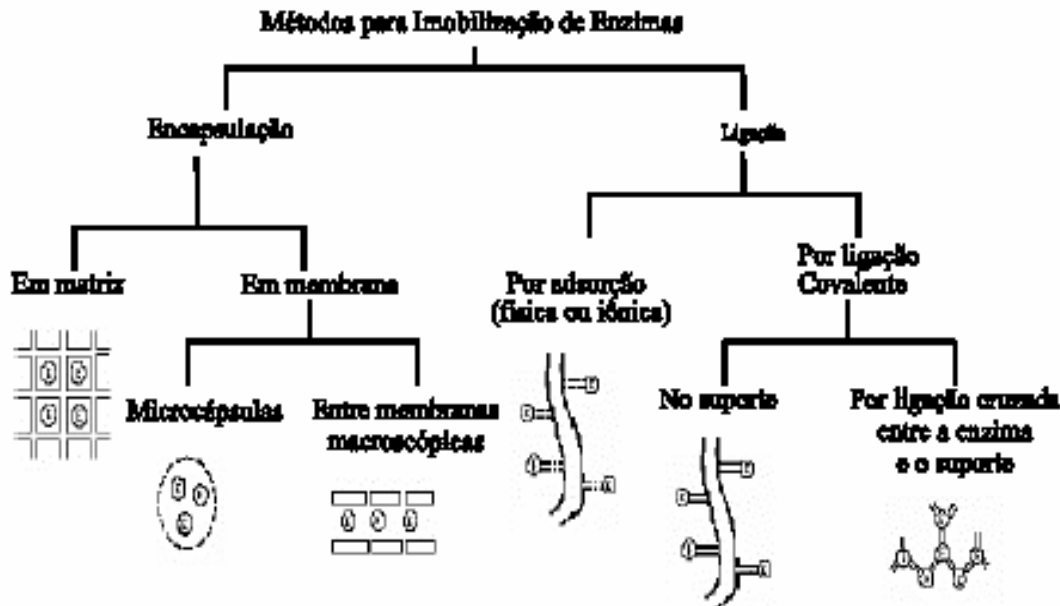


Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas.
Ref. Dalla-Vecchia et al., 2004.

O método da ligação química covalente cruzada é muito utilizado e baseia-se na formação de ligações covalentes entre as moléculas da enzima e/ou do suporte inerte com reagentes funcionais. O glutaraldeído, em função de suas propriedades bifuncionais, tem sido um dos reagentes mais empregados na imobilização de enzimas, devido à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte sólido, conferindo à enzima maior estabilidade. No entanto, há relatos na literatura da utilização de vários reagentes no processo de imobilização, entre eles, diazobenzidina, carbodiimida, ácidos bisdiazobenzidínico, triclortriazina (Oliveira & Vieira, 2006).

1.7- Suportes ou Matrizes

Um suporte ou matriz é qualquer material que um ligante bioespecífico pode ser ligado. A escolha da melhor matriz para uma determinada aplicação implicará no uso eficiente e otimizado da mesma (Hermanson et al., 1992). Fluidos magnéticos, ou ferrofluidos como tem sido naturalmente chamados, consistem principalmente de partículas de óxido de ferro de tamanho nano (Fe_2O_3 ou Fe_3O_4), as quais são suspensas em carregadores líquidos (Sayed et al., 2004). Essa cobertura, em geral, é biocompatível (tal como dextrana, PEG, etc), ou possui grupos ativos que podem ser conjugados a biomoléculas tais como proteínas e enzimas (Ma et al., 2003; Yamaura et al., 2004).

O suporte pode ter efeito crítico na estabilidade da enzima e na eficiência da enzima imobilizada, embora seja difícil prever antecipadamente qual suporte deve ser mais apropriado para uma enzima particular. As mais importantes solicitações para um suporte são que este deve ser insolúvel em água, ter uma alta capacidade de ligar à enzima, ser quimicamente inerte e estável (Worsfold, 1995).

De acordo com o tipo os suportes podem ser classificados em três categorias: biopolímeros hidrofílicos baseados em polissacarídeos naturais como agarose, dextrana e celulose; polímeros sintéticos orgânicos lipofílicos como poliacrilamida, poliestireno e nylon; e materiais inorgânicos assim como óxido de ferro (Worsfold, 1995).

Nos últimos anos, o progresso tem sido realizado em desenvolvimento de tecnologias nos campos de microsporos magnéticos, nanosporos magnéticos e ferrofluidos. Técnicas baseadas na utilização de suportes magnéticos na fase sólida têm encontrado aplicações em numerosos campos biológicos, diagnósticos, direcionamento de drogas, biologia molecular, isolamento e purificação de células, radioimunoensaio, agentes causadores de hipertermia para terapia de câncer e purificação de ácidos nucleicos (Saiyed et al., 2004).

A aplicação de enzimas em sua forma nativa, em diversas áreas, nem sempre é adequada e ótima (Bílková et al., 2002). A ligação dessas enzimas a matrizes sólidas é uma modificação vantajosa de sua aplicação nas biociências e procedimentos diagnósticos especiais (Bílková et al., 2002; Španová et al., 2003). E a utilização dessas matrizes magnetizadas oferece ainda grandes vantagens, principalmente, em relação à facilidade dos procedimentos operacionais.

2.0-OBJETIVOS

2.1-Geral:

Extrair o polissacarídeo fucana de alga marinha, utilizá-lo como suporte magnético para imobilizar proteases coaguladoras do leite e verificar a ação destas sobre a coagulação do leite.

2.2-Específicos:

- Extração e purificação parcial de polissacarídeos da alga marinha *Sargassum cymosum*.
- Determinar o conteúdo de açúcares totais presentes no polímero obtido.
- Magnetizar e oxidar com periodato de sódio o polissacarídeo obtido na *Sargassum cymosum*.
- Imobilizar enzimas coaguladoras do leite no polissacarídeo ativado.
- Determinar atividade proteolítica da enzima solúvel e imobilizada.

3.0-Referências Bibliográficas

ARAUJO, P. M.; OLIVEIRA, G. B.; CORDULA C. R.; LEITE, E. L.; CARVALHO JR., L. B.; SILVA, M. P. C. Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37, 301-305, 2004.

BEILEN, J. B. V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 338-344, 2002.

BÍLKOVÁ, Z.; SLOVÁKOVÁ, M.; LYČKA, A.; HORAK, D.; LENFELD, J.; TURKOVA, J.; CHURACEK, J. Oriented immobilization of galactose oxidase to bead and magnetic bead cellulose and poly(HEMA-co-EDMA) and magnetic poly(HEMA-co-EDMA) microspheres. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 770, 25-34, 2002.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of Microorganisms**, 6th ed., Prentice-Hall, Old Tappan, N.J., 1991.

BRYJAK, J.; KOLARZ, B. N. Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry**, 33, 4, 409-417, 1998.

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, 9, 217-226, 2005.

CAVALCANTI, M. T. H.; TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiosis sp.* **Bioresource Technology** 93, 29-35, 2004.

CHELLAPANDIAN, M. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. **Process Biochemistry**, 33, 169-173, 1998.

CHEVOLOT, L.; FOUCALT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, 319, 154-165, 1999.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, 27, 4, 623-630, 2004.

FOX, P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 10, 522–535, 1988.

HERMANSON, G.T.; MALLIA, A. K.; SMITH, P. K. The matrix. In: **Immobilized Affinity Ligand Techniques**. New York: Academic Press, cap. 1, 1-6, 1992.

IMRIE, F. K. E.; TILBURY, R. H. Polysaccharides in sugar cane and its products. **Sugar Technology Reviews**, 1, 291-361, 1972.

JOLY, A. B., **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo; Cia Editora Nacional, 1977.

KAPPELER, S. R.; VAN DEN BRINK, H. J. M.; RAHBK-NIELSEN, H.; FARAH, Z.; PUHAN, Z.; HANSEN, E. B.; JOHANSEN, E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 342, 647–654, 2006.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology**, 26:259-315, 1988.

KUMAR, A.; SHARMA, J.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, 145, 108-113, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. C. **Lehninger Princípios de Bioquímica**, 3ª Edição, Sarvier Editora de Livros Médicos, São Paulo- SP, 2002.

MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H.; ZHANG, H.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, 212, 219-226, 2003.

MALMSTEN, M.; XING, K.; LJUNGLÖF, A. Confocal microscopy studies of trypsin immobilization on porous glycidyl methacrylate beads. **Journal of Colloid and Interface Science**, 220, 436-442, 1999.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine. **Food Chemistry** 104, 127–131, 2007.

MOHANTY, A. K.; MUKHOPADHYAY, U. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. **Biotechnology Advances** 17, 205–217, 1999.

MULLOY, B.; MOURA, P. A. S.; GRAY, E. Structure: function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, 77, 123–135, 2000.

NÁJERA, A. I.; RENOBABLES, M.; BARRONA, L. J. R. Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. **Food Chemistry** 80, 345–352, 2003.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Dairy Microbiology Division**, 1999.

NISHINO, T.; YOKOYAMA, G.; DOBASHI, K.; FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. **Carbohydrate Research**, 186: 119–129, 1989.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; HIYOHARA, H.; YAMADA, H. **Carbohydrate Research**, 211: 77–90, 1991.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de Imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, 29, No. 5, 932–939, 2006.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. **Journal Biology Chemistry**, 268, 21770–21776, 1993.

PERCIVAL, E.G.V.; MC. DOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **London: Academic press**, 219, 1967.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. P.; GHATGE, S. M.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, 62, 3, 597–635, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & CURTIS, H., **Biologia Vegetal**, 2º Edição. Rio de Janeiro, RJ; Editora Guanabara Dois S.A., 1978.

REID, J. R.; COOLBEAR, T.; AYERS, J. S.; COOLBEAR, K. P. The Action of Chymosin on K-Casein and its Macropeptide: Effect of pH and Analysis of Products of Secondary Hydrolysis. **International Dairy Journal** 7, 559-569, 1997.

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ K. C. S. ; LEITE, E. L.. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, 16, 1-2, 2004.

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C. M.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Anti-adhesive fucan Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 34, 621-626, 2001.

ROUND, F. E., **Biologia das Algas**, 2º Edição. Rio de Janeiro, RJ; Editora Guanabara Dois S.A., 1983.

SAIYED, Z. M.; TELANG, S. D.; RAMCHAND, C. N. Application of Magnetic Techniques in the fields of Drug Discovery and Biomedicine. **Business Briefing: Future Drug Discovery**, 2004.

SGARBIERI, V. C. Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. **Brasilian Journal of Food Technology**, 8, 1, 43-56, 2005.

SOARES, M. T. V. Produção, caracterização e purificação parcial de proteases coagulantes do leite produzidas por *Nocardiosis sp.* **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

ŠPANOVÁ, A.; RITTICH, B.; HORAK, D.; LENFELD, J.; PRODELALOVA, J.; SUCIKOVA, J.; STRUMCOVA, S. Immunomagnetic separation and detection of *Salmonella* cells using newly designed carriers. **Journal of Chromatography A**, 1009, 215-221, 2003.

VASCONCELOS, M. P.; ARAÚJO, K. G. L.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Effect of pH of milk clotting and different coagulants on yield of mass in cheese production. **Revista Brasileira Agrociência**, 10, 4, 499-502, 2004.

VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L.; GÓMEZ, L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 10, 483-490, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, Porto Alegre: Artes Médicas Sul, cap. 4, 2000.

WHITAKER, J. R. The proteolytic enzymes. In: **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2nd ed., v. 61, 19, 469-498, 1994.

WORSFOLD, P. J. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 67, 4, 597-600, 1995.

XI, F.; WU, J.; JIA, Z.; LIN, X. Preparation and characterization of trypsin immobilized on sílica gel supported macroporous chitosan bead. **Process Biochemistry**, 40, 2833-2840, 2005.

YMAURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C.; MACÊDO, M.A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 279, 210-217, 2004.

YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURA, P. A. S. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate Research** 342, 2326-2330, 2007.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; CHIZHO, A. O.; KRUPNOVA, T. N.; SUNDUKOVA, E. V.; ISAKOV, V. V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 294, 1-13, 2003.

4.0- CAPÍTULO I:

Fucan magnetized as support for enzyme immobilization applied in milk-clotting

Trabalho a ser submetido ao periódico
PROCESS BIOCHEMISTRY

Fucan magnetized as support for enzyme immobilization applied in milk-clotting

Valdeene A. J. Silva^{ab*}, Jackeline C. Maciel^{ab}, Maria Taciana Holanda Cavalcanti^a,
José Luiz L. Filho^{ab}, Maria da Paz C. Silva^{ab}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami; ^bDepartamento de Bioquímica,
Universidade Federal de Pernambuco.

Corresponding author:

Valdeene Albuquerque Jansen da Silva

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, 50670-910 Recife, PE, Brazil

Phone/Fax: +55-81-21268485

E-mail: valdeene@hotmail.com

4.1- Abstract

Fucan from the algae *Sargassum cymossum* was magnetized and utilized as support for covalent immobilized enzyme applied in milk-clotting. The protein retention of bovine and recombinant chymosin was 80% and 78%, respectively. The milk-clotting activity in these DEIs (Derivated Enzymatic Immobilized) was 11.8 U/mL for bovine chymosin and 1.33 U/mL for recombinant chymosin, and the optimal temperatures were 60°C (36 U/mL) and 50°C (3.53 U/mL) for the chymosin, bovine and recombinant immobilized, respectively. The thermal stability experiments (30 minutes, 35°C) revealed the lost activity of 66.35% for immobilized chymosin and 16.54% for immobilized recombinant. The CaCl₂ influence in milk-clotting activity was demonstrated, both free enzymes in absent of CaCl₂, exhibited considerable reduction on activity 91.85% and 71.43% for bovine and recombinant chymosin, respectively; while immobilized enzymes not exhibited any milk-clotting activity. In addition, the bovine and recombinant chymosin immobilized showed a activity reduction of 80% and 60 %, respectively, after the second reuse.

Keywords: Sea algae; *Sargassum cymossum*; Fucan; Milk-clotting enzymes; Magnetic support; Immobilization.

4.2- Introduction

The bovine milk, and possibly, other species milk contain two different groups of proteins, paracasein and milk serum proteins (non-casein) [1]. The casein fractions are phosphoproteins, which in their natural form appear as colloidal particles (micelles) formed by α S1, α S2 and β -casein in the core, and κ -casein distributed partly in the micelle mass and partly at its surface, being responsible for the physicochemical stability of the micelle [2]. Milk coagulation is a basic step in cheese manufacturing, which may be induced in many ways, however none can be compared to the specification action of chymosin [3]. The bovine chymosin, an aspartyl protease extracted from the abomasum of suckling calves is secreted in its natural form as an inactive precursor, prochymosin, which is irreversibly converted into active chymosin through limited proteolysis. This enzyme possesses a high milk-clotting activity with a low unespecific proteolytic activity and this makes chymosin particularly suitable for the manufacture of cheese [1, 4]. In recent years, various methods for enzymes immobilization have been developed, especially the construction of enzyme reactors and enzyme electrodes or biosensors. The methods and supports employed for enzyme immobilization are chosen to ensure the highest retention of enzyme activity, stability and durability [5]. Magnetic materials as matrices for enzyme immobilization have been extensively used because the advantages of water insoluble enzymatic derivatives are combined by their ease removal from the reaction mixture by a magnetic field. The magnetite particles Fe_3O_4 prepared by co-precipitating Fe^{2+} and Fe^{3+} are the far most used [6]. Polysaccharides can be used for coating these magnetic particles, however can be an alternative as a support for enzymes immobilization. The sea algae has high variety and quantity of polysaccharides, such as, the *Phaeophyceae* algae that produce neutral

polysaccharides (laminarin, xylan and cellulose) and acid polysaccharides (fucan and alginic acid) [7]. Fucan is a sulphated acid polysaccharide [8], water-soluble and that occur as the major constituent of brown algae. They are obtained in large quantities and are among the most abundant sulfated polysaccharides found in nature [9]. The aim of this work was to immobilized enzymes for milk-clotting, using fucan from *Sargassum cymossum*, coating magnetite particles and utilize itt as a support. On this new composite were carried out several analysis, such as, optimal temperature, thermal stability, the CaCl_2 influence in milk-clotting activity, reuse and storage.

4.3- Materials and Methods

4.3.1- Materials

The algae from *Sargassum cymosum* was collected in the south coast of Recife, Pernambuco, Brazil. Bovine chymosin (Sigma), Liquid Coagulant Comercial (recombinant chymosin produced by *Aspergillus niger* var. *awamori*), Skim-milk (Nestlé Co., Brazil), Sodium Periodate (Carlo Erba), Sodium Borohydride (Sigma), Ferric Chloride Hexahydrate (Merck), Ferrous Chloride Tetrahydrate (Merck), Ammonium Hydroxide (Vetec Chemical). All other reagents were of analytical grade.

4.3.2- Extraction and partial purification of sulphated polyssacharides from *Sargassum cymosum*

The dried pulverized algae (50g) was treating two times with 100 mL of acetone under stirring during 12 hours to remove pigments and lipids from the material. After this, the acetone was decanted and the residue placed at 45°C under aeration to obtain the Ketonic powder. The solution 0.15M NaCl (100mL) was adding to the ketonic powder and pH was adjusted to 8.0 with NaOH. The proteolysis of this ketonic powder was carrying out by papain enzyme (15 mg/g of ketonic powder) and the mixture was incubated at 45°C overnight. The supernatant was colleted by centrifugation at 10,000xg for 10 minutes and dried in lyophilizer Multi-Tainer (FTS Systems, INC).

4.3.3- Determination of neutral sugars in fucan

The content of sugars was determined by using phenol sulphuric acid, described by Dubois et al. [10]. The sugar concentration was determined in mg/mL by glucose standard curve and the absorbance was taking at 490nm. The following experiments were carrying out in duplicate.

4.3.4- Preparation of fucan-coated magnetite particles

Aqueous suspension of magnetic particles was prepared by co-precipitation of Fe(III) and Fe(II) in the presence of NH_4OH and polysaccharide [11]. The molar ration used of this suspension was 1.1 M : 0.6 M, respectively Fe^{+3} and Fe^{+2} . The 1% fucan suspension in distilled water (50 mL) was then mixed at 10 mL of the iron mixture solution as described above. A NH_4OH solution was added dropwise to the iron-fucan mixture to raise the pH to 11.0 with vigorous stirring, after this, the mixture was heated at $85 \pm 3^\circ\text{C}$ for 30 min under stirring. The magnetic particles were thoroughly washed with distilled water. The material was dried and kept at room temperature (25°C).

4.3.5- Oxidation of fucan-coated magnetite particles

Fucan-coated magnetite particles (20 mg) and sodium periodate (20 mg) were mixed in 3 mL distilled water [12]. The mixture obtained was constantly stirred in the dark at room temperature for 7 h. Oxidized coated magnetite was separated from the sodium periodate using a magnetic field (0.6 T) and washed with 10mM Sodium Citrate buffer pH 5.0 (1 mL, 10 times).

4.3.6- Enzyme Immobilization

Oxidized coated magnetites (20 mg) were incubated with different protein concentrations for two enzymes tested. The bovine chymosin concentrations were 200µg/mL, 400µg/mL, 700µg/mL and 1mg/mL, while that for bovine recombinant chymosin were 1mg/mL, 1.5 mg/mL, 2mg/mL, 2.5mg/mL and 3mg/mL. The immobilization was carried out by 16 h at 4°C under mild stirring. The supernatant was removed using a magnetic field (0.6 T) and kept at 4°C for protein determination. After this, a 0.03 M NaBH₄ solution (1 mL) was added and slightly mixed for 2 h at 4°C. Then the solution of NaBH₄ was collected under magnetic field and magnetic particles were washed with 10mM Sodium Citrate buffer pH 5.0 (1.0 mL, 5 times) and kept at 4°C in this buffer.

4.3.7- Protein determination

The Lowry method [13] was applied to determine the amount of soluble protein and the amount protein retained (immobilized protein). The protein concentration was determined in mg/mL by BSA standard curve and the absorbance was carried out at 750 nm.

4.3.8- Milk-clotting and proteolytic unspecific activities

The milk-clotting activity was assayed at 35°C as described by Arima et al. [14]. Skim milk 10% (w/v in deionized water) containing 10 mM CaCl₂ was used as substrate. The milk-clotting activity unity (CAU) was defined as an enzyme quantity capable of clotting 1 mL substract in 40 minutes at 35 ° C. The proteolytic activity was assayed at 25°C as described

by Leighton et al. [15] using azocasein (1% w/v) prepared in 10 mM Sodium Citrate pH 5.0. The activity was determined in U/mL and the absorbance was carried out at 440nm.

4.3.9- Milk-clotting enzymes immobilized characterization

For determination of optimal temperature, the reaction mixture containing skim milk 10% (w/v in water deionized) with 10 mM CaCl_2 and enzyme immobilized was incubated over a temperature range of 25–80°C. The thermal stability was determined by pre-incubation of the enzyme in the range of 35–80°C and the incubation time samples varied between 0 to 60 min. After incubation, the residual milk-clotting activity was determined. The reuse of milk-clotting enzymes immobilized on magnetic fucan was also studied. The derivative was also stored at 4°C for 15 days and at time intervals its residual milk-clotting activity was established.

4.4- Results and Discussion

4.4.1- *Fucan extraction and preparation of fucan-coated magnetite particles*

In this work, the fucan from *Sargassum cymosum* was used for magnetite particles coat, and tested as support for milk-clotting enzymes immobilization. The yield extraction of total sugar was the 6.76 mg/mL with 0.13 mg/mL of total protein.

The use magnetic support can facilitates a quick recuperation and easy handling of the conjugate (support-enzyme) [16, 17]. Fucan magnetized was synthesized using the magnetite as magnetic material, because of its low cost, simple preparation, biocompatible and no-toxicity [18-20]. The final product from the co-precipitation process was dense, black and magnetic. A yield of fucan was obtaining applying this magnetization method.

4.4.2- *Enzyme immobilization*

The immobilization method for milk-clotting enzymes on fucan magnetized involved covalent bound, yielding 80% and 78% protein immobilized, respectively for bovine chymosin and bovine recombinant chymosin (Table 1). Using bovine chymosin, the best milk-clotting activity was achieved with 11.88 U/mL, while for bovine recombinant chymosin was 1.33 U/mL.

4.4.3- Properties of bovine chymosin and bovine recombinant chymosin immobilized

4.4.3.1- Optimal Temperature

The free bovine chymosin showed a range of optimal temperature between 35°–70°C, while for the immobilized the optimal temperature encountered was around 60°C (Figure 1). The Figure 2 shows the results obtained for free and immobilized bovine recombinant chymosin, being the optimal temperature for the free 70°C and 50°C for the immobilized. According to these results, bovine and bovine recombinant chymosin, after immobilization process, were more thermolabile than the free ones, both enzymes decrease their milk-clotting activity at 70°C, showing a decline of 60% for bovine chymosin and 100% for bovine recombinant chymosin. These results are in agreement with Kappeler et al. [4], that studied the characterization of free camel recombinant chymosin expressed in *Aspergillus niger*. They showed that the enzymes were more stable at temperatures between 40°C and 55°C and no residual clotting activity was detected for either enzyme when incubated at temperatures higher than 55°C.

Mohanty et al., [1] studied the free buffalo chymosin and observed that this enzyme was stable up to 55°C and at 60°C the relative milk-clotting activity was 50%. Kumar et al., [21] when studied the free goat chymosin, observed that the optimal temperature was 65°C and that this enzyme showed decrease in activity of 20% approximately, after 15 minutes at 55°C, being considered stable between 30°C-55°C. These results were similar with this work.

4.4.3.2- Thermal stability

In figures 3 – 6 are showing the thermal stability of the free and immobilized enzymes. The free bovine chymosin was stable for 60 minutes at 35°C, while the immobilized showed a decrease of 73.41% after 60 minutes at the same temperature and an inactivation at 60°C for free and immobilized bovine chymosin. The free bovine recombinant enzyme was stable for 60 minutes at 35°C and 50°C, shown a loss activity of 25% at 40°C, while the immobilized showed a decrease of 21.81% after 60 minutes at 35°C and decrease of 42.11% after 60 minutes at 40°C. The inactivation was observed at 60°C for the free and 50°C for the bovine recombinant chymosin immobilized. According with these results, we found that the bovine recombinant chymosin, expressed in *Aspergillus niger*, was more stable than the native bovine chymosin in both cases free and immobilized.

According to Kalogeris et al. [22] and Merheb et al. [23] thermophiles fungi produce hydrolases with important characteristics, such as higher thermostability, optimal activity at higher temperatures and high rates of hydrolysis. In addition, Kappeler et al. [4], that studied the characterization of free camel recombinant chymosin expressed in *Aspergillus niger*. They observed that this free enzyme was stable in a temperature range of between 5°C to 40°C after 12 hours.

4.4.3.3- Influence of CaCl_2 in milk clotting activity

The Figures 7-10 shows the results obtained for the influence of CaCl_2 in the milk-clotting activity in different temperatures. In absent of CaCl_2 , both free enzymes, bovine chymosin and bovine recombinant chymosin, exhibited considerable activity loss, 91.85% and 71.43%, respectively, while immobilized enzymes did not exhibited milk-clotting activity. According with Mohanty et al. [1], the action of chymosin is dependent on the addition of

calcium in the system. When calcium is absent, the para- κ -casein fraction, which by itself is insoluble, interacts with calcium sensitive caseins to keep from precipitating. When calcium ions are present, the calcium sensitive caseinate fraction along with insoluble para- κ -casein fraction forms a clot.

4.4.3.4- Reuse and Storage

The reuse of bovine and recombinant chymosin immobilized on magnetic fucan was also studied. The immobilized bovine and recombinant chymosin on fucan-coated magnetite showed a loss of activity of 80% and 60%, respectively after 2 uses. After 3 reuses, recombinant chymosin lost its milk-clotting activity. The storage experiment shown the same result.

These results of reuse and storage are agreement with Voutsinas and Nakai [24], all enzyme-carrier preparations exhibited high initial activity on exposure to milk. However, deactivation rates were high. The main reason for rapid deactivation appeared to be loss of enzyme from the carriers as soluble activity was detected in most enzyme-carrier preparations. Enzyme loss activity was from physical desorption of enzyme from the carriers as well as from the relatively rapid leakage of the ligand from the carrier. Other possible reason for the rapid inactivation may be denaturation of the enzyme because of certain conformational changes on the enzyme. Such changes could be from a steady increase in the number of attachment points, with a resulting increase in binding stability, as the molecule experiences free motion. A multipoint attachment may impose a strain on the conformation with subsequent loss of activity [24].

4.5- Acknowledgements

This work was supported by CAPES and FACEPE (Brazil) and Japan International Cooperation Agency (JICA). The authors thank Professor Benoit very much for help.

4.6- References

- [1] Mohant AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK. Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances* 1999; 17: 205–217.
- [2] Sgarbieri VC. Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins. *Brasilian Journal of Food Technology* 2005; 8 (1): 43-56.
- [3] Cavalcanti MTH, Teixeira MFS, Lima Filho JL, Porto ALF. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiopsis* sp. *Bioresource Technology* 2004; 93: 29–35.
- [4] Kappeler SR, Van den Brink HJM, Rahbek-Nielsen H, Farah Z, Puhon Z, Hansen EB, Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 342: 647 – 654.
- [5] Wu J, Luan M, Zhao J. Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads. *International Journal of Biological Macromolecules* 2006; 39:185–191.
- [6] Amaral IPG, Cunha MGC, Carvalho Jr. LB, Bezerra RS. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. *Process Biochemistry* 2006; 41: 1213–1216.
- [7] Kloareg B, Quatrano RS. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology* 1988; 26:259-315.

- [8] Percival EGV, Mc Dowell RH. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. London: Academic press 1967; 219.
- [9] Yoon SJ, Pyun YR, Hwang JK, Moura PAS. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II dependent anticoagulant activity. *Carbohydrate Research* 2007; 342: 2326–2330.
- [10] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Olorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 1956; 28: 350-356.
- [11] Carneiro Leão AMA, Oliveira EA, Carvalho Jr LB. Immobilization of protein on ferromagnetic dacton. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1991; 32: 53-58.
- [12] Vina I, Karsakevich A, Bekers M. Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001; 11: 551-558.
- [13] Lowry OH., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Journal of Biology Chemistry* 1951; 193-265.
- [14] Arima K, Yu J, Iwasaki S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. *Methods in Enzymology* 1970; 19: 446–459.
- [15] Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, 1973; 76: 103-122.

- [16] Denkbaz EB, Kiliçay E, Birlikseven C, Öztürk E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers* 2002; 50: 225–232.
- [17] Tanyolaç D, Özduval AR. Preparation of low-cost magnetic nitrocellulose microbeads. *Reactive & Functional Polymers* 2000; 45: 235-242.
- [18] Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005; 26: 3995–4021.
- [19] Huber DL. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 2005; 1: 482–501.
- [20] Horák D, Petrovský E, Kapicka A, Frederichs T. Synthesis and characterization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2007; 311: 500–506.
- [21] Kumar A, Sharma J, Mohanty AK, Grover S, Batish VK. Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*) 2006; 145: 108 – 113.
- [22] Kalogeris E, Christakopoulos P, Katapodis P, Alexiou A, Vlachou S, Kekos D, et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, 2003; 38: 1099–1104.
- [23] Merheb CW, Cabral H, Gomes E, Silva R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 2007; 104: 127–131.
- [24] Voutsinas LP, Nakai S. Coagulation of Skim Milk with Proteases Immobilized on Hydrophobic Carriers. *J Dairy Sci.* 1983; 66: 694-70.3

Table 1. Different concentrations of bovine and recombinant chymosin immobilized. Different concentrations of chymosin were immobilized in fucan-coated magnetite particles for found the higher milk-clotting activity. The immobilization percentage was measured according to Lowry et al. [15].

Enzymes	Concentrations	Milk Clotting Activity (U/mL)	Immobilization Percentage (%)
Bovine chymosin	200ug	0	40.7
	400ug	0	57.7
	700ug	0	65
	1mg	11.88	80
Bovine recombinant chymosin	1.0mg	1.00	66.65
	1.5mg	1.00	63.275
	2.0mg	1.16	62.275
	2.5mg	1.33	78.045
	3.0mg	0.8	72.69

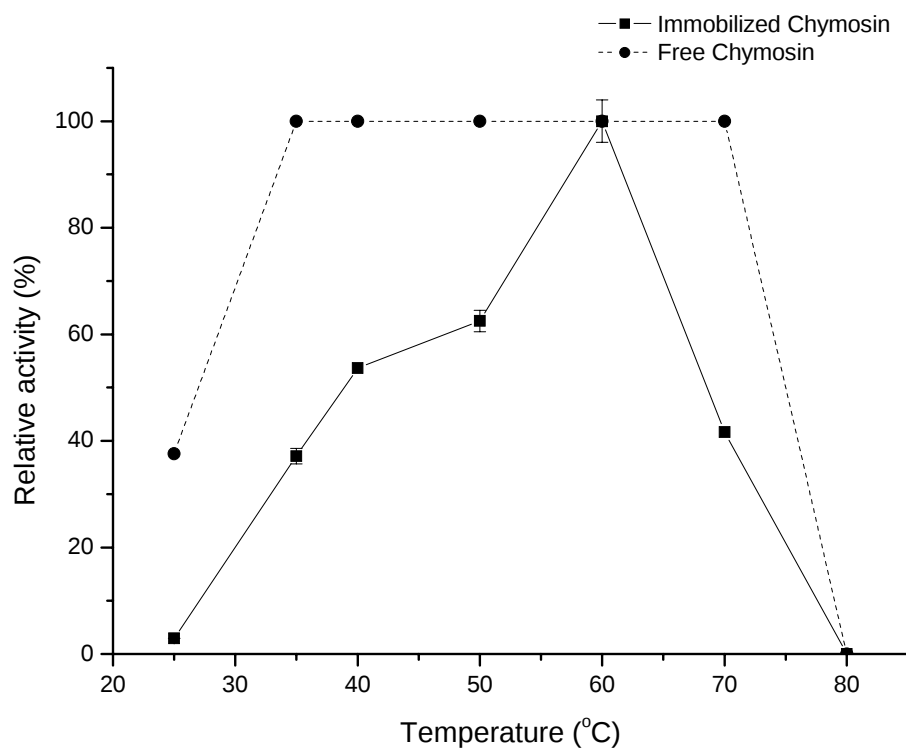


Fig. 1. Optimal temperature for free (•) and immobilized (▪) bovine chymosin. The skim milk 10% (w/v in water deionized) with 10 mM CaCl_2 and enzyme was incubated over a temperature range of 25°C–80°C for milk-clotting activity determination.

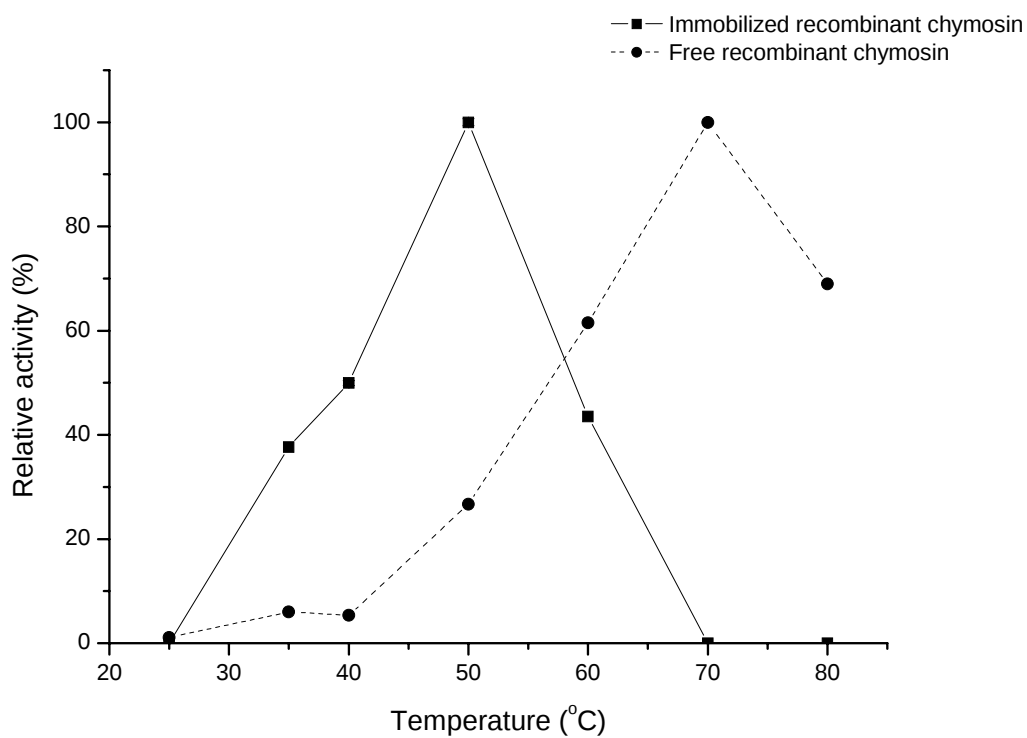


Fig. 2. Optimal temperature for free (•) and immobilized (▪) bovine recombinant chymosin. The skim milk 10% (w/v in water deionized) with 10 mM CaCl_2 and enzyme was incubated over a temperature range of 25°C–80°C for milk-clotting activity determination.

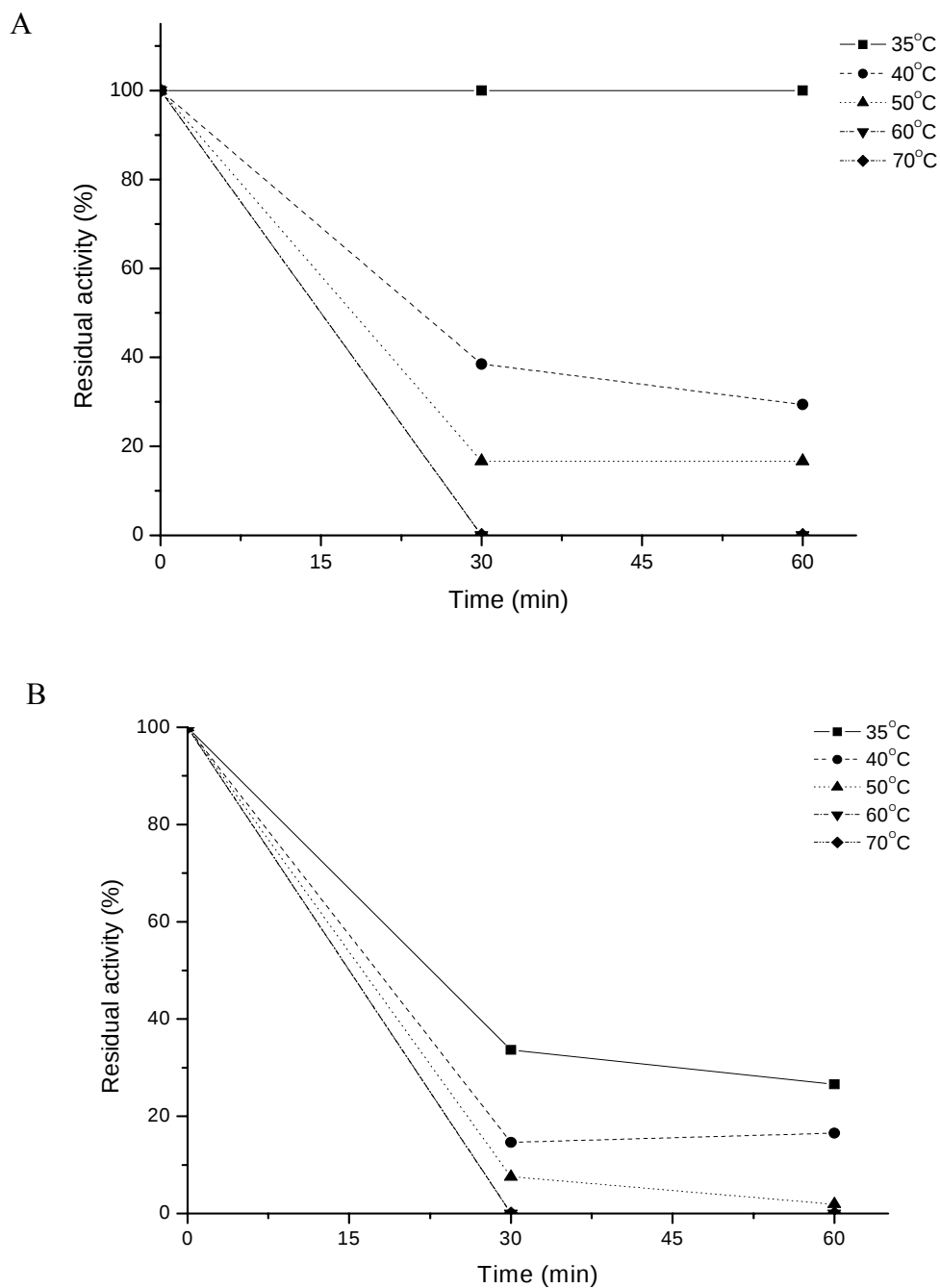


Fig. 3. Thermal stability of free (A) and immobilized (B) bovine chymosin. The thermal stability was determined by pre-incubating the bovine chymosin for 60 minutes in the temperature range of 35–80°C.

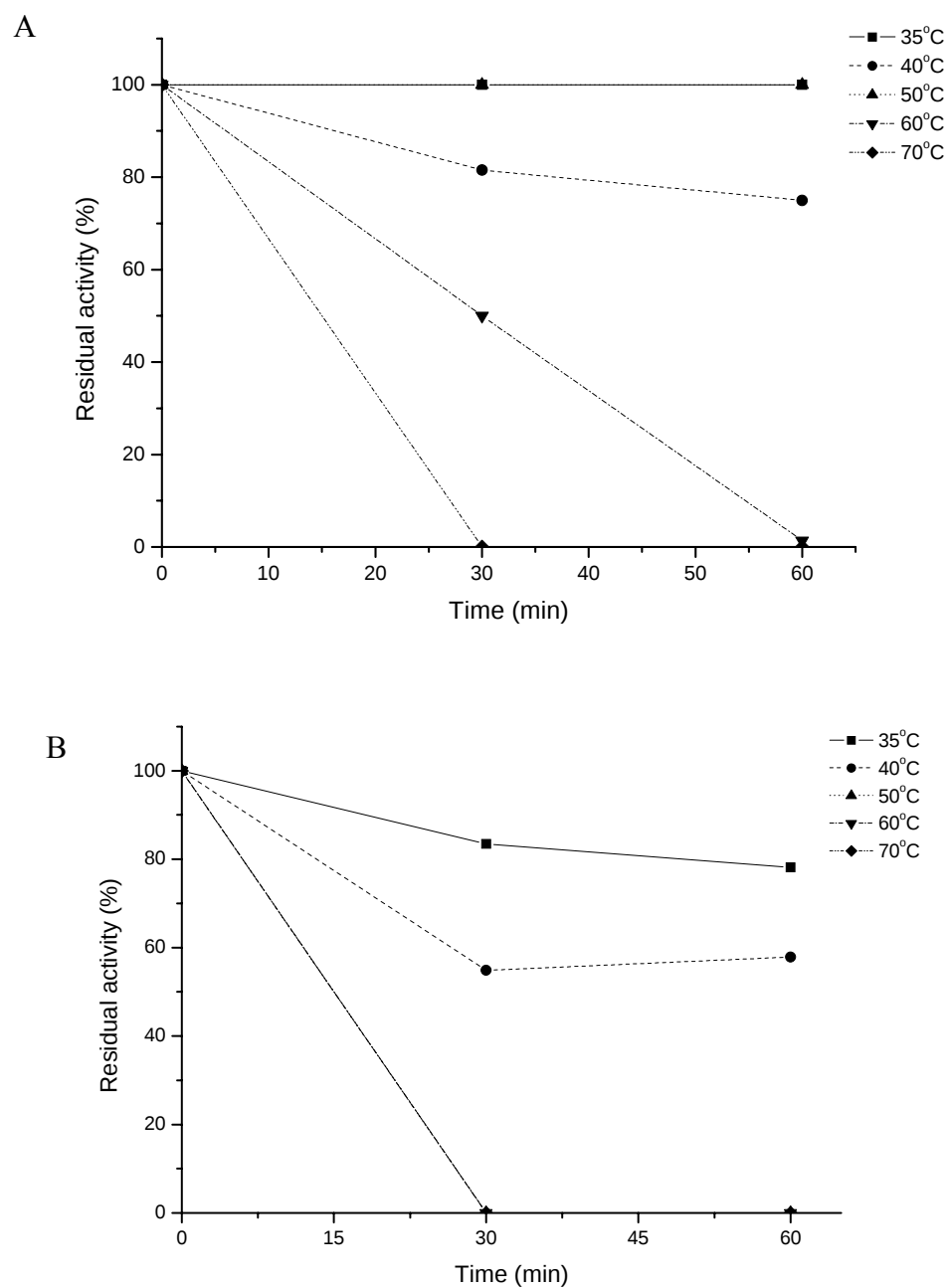


Fig. 4. Thermal stability of free (A) and immobilized (B) bovine recombinant chymosin. The thermal stability was determined by pre-incubating the recombinant chymosin for 60 minutes in the temperature range of 35–80°C.

Table 2. Influence of CaCl_2 in the optimal temperature for the free and immobilized bovine chymosin and bovine recombinant chymosin. The reaction mixture containing skim milk 10% (w/v in water deionized), in presence of CaCl_2 and in absent CaCl_2 , for assay of milk clotting activity was incubated over a temperature range of 25–80°C.

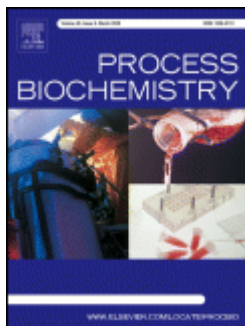
Tempe- ratures	Milk-clotting activity (U/mL)							
	Free bovine chymosin		Immobilized bovine chymosin		Free bovine recombinant chymosin		Immobilized bovine recombinant chymosin	
	Presence of CaCl_2	Absent of CaCl_2	Presence of CaCl_2	Absent of CaCl_2	Presence of CaCl_2	Absent of CaCl_2	Presence of CaCl_2	Absent of CaCl_2
25°C	300,75	0	0,94	0	5,33	0,80	0	0
35°C	800	2,10	11,89	0	30,07	10	1,33	0
40°C	800	5	17,17	0	26,66	26,66	1,77	0
50°C	800	23,33	20,00	0	133,33	103,45	3,54	0
60°C	800	56,52	32,00	0	307,60	142,85	1,54	0
70°C	800	65,24	13,33	0	500	142,85	0	0
80°C	0	0	0	0	344,80	0	0	0

5.0- CONCLUSÕES

- O método de imobilização mostrou uma alta retenção em proteína de 80% e 78% para quimosina bovina e quimosina bovina recombinante;
- As quimosinas livres foram mais termoestáveis para temperaturas mais altas quando comparadas as imobilizadas;
- Na estabilidade térmica, a quimosina bovina recombinante (livre e imobilizada) foi mais estável que a quimosina bovina;
- O cloreto de cálcio é importante para a coagulação;
- No experimento de reuso, as quimosinas bovina e recombinante imobilizadas perderam 80% e 60%, respectivamente, após o segundo uso;
- A estocagem apresentou resultado semelhante ao reuso.

6.0- ANEXOS

6.1- Normas para a redação de artigos para a revista “Process Biochemistry”



Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work

has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press. Format and type of manuscripts Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications AND WEBSITE ADDRESSES should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

- [4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. 10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.
- [5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.
- [6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. Jpn. Patent. JP 05260-966. 92.03.24.
- [7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.
- [8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing :

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre-and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services

offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on

the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Process Biochemistry has no page charges.

6.2-Trabalhos apresentados em congressos

Resumo apresentado na SBBq 2007

UTILIZATION OF FUCAN-MAGNETITE COMPOSITES FOR IMMOBILIZATION OF MILK CLOTTING ENZYMES

Silva, V.A.J.; Maciel, J.C.; Filho, J.L.L.; Silva, M.P.C.

**Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de
Bioquímica, UFPE, PE, Brazil.**

Fucans are sulfated polysaccharides that possess pharmacological properties such as anticoagulant, anti-tumor, anti-viral and anti-adhesive activities. In this work fucan was extracted from *Sargassum cymosum* brown algae and magnetite particles were synthesized with this polysaccharide. A periodate oxidation method was used to activate the magnetic fucan. Oxidated fucan-magnetite composites were utilized as support for enzyme immobilization. The enzyme used for immobilization on this support was milk clotting enzyme constituted of chymosin and pepsin mixture. After extraction of fucan, the concentration of total sugar was determined by phenol-sulfuric acid method that showed 6.76 mg/mL of sugar. 0.5g of fucan was used for magnetization. Fucan-magnetite composites were attracted by introducing in a magnetic field of 6000 Oe. The activity of enzyme immobilized on magnetic fucan was estimated using 1% azocasein as substrate. The activity of immobilized enzyme was 2.2 U/mL and the activity of free enzyme was 1.17 U/mL. Therefore, it can be suggested that the polysaccharides fucan are good support for milk clotting enzyme immobilization.

Supported by: **FACEPE, CAPES, UFPE and JICA**

Key words: sulfated fucan, immobilization, milk clotting enzymes.

Resumo apresentado na FESBE 2007

PURIFICAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE COAGULANTE DE QUIMOSINA DE FONTE MICROBIANA (HA-LA)

SILVA, V.A.J.; MACIEL, J.C**.; SOARES, M.T.C.V.; LIMA FILHO, J.L.; SILVA, M.P.C.**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI (LIKA), UFPE, PE, BRASIL.

Objetivo: O trabalho tem por objetivo realizar a purificação parcial do coagulante líquido HA-LA® e analisar esta atividade coagulante em diferentes frações.

Métodos e Resultados:

Inicialmente, a solução enzimática foi precipitada com sulfato de amônio até atingir uma saturação de 20%. O precipitado foi removido por centrifugação (11.200xg por 15 minutos a 4°C). A quantidade de sulfato de amônio foi aumentada até a saturação de 100%, onde em cada passo foi adicionado 20% de sulfato de amônio, o precipitado foi coletado por centrifugação (11.200xg por 15 minutos a 4°C). As frações obtidas com 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100% de sulfato de amônio foram identificadas como P1, P2, P3, P4, P5, respectivamente. Após a centrifugação os sobrenadantes foram armazenados e os precipitados dissolvidos em tampão citrato 10mM (pH 6,0). Tanto o precipitado como o sobrenadante de cada fração foram dializados contra o tampão citrato 10mM por 48 horas com trocas sucessivas. A atividade coagulante do leite de cada fração foi realizada a 35°C como descrito por Meth. in Enz. 19:446, 1970. Leite desnatado 10% (p/v em água deionizada) contendo cloreto de cálcio 10mM foi usado como substrato. Todas as frações apresentaram atividade coagulante, formando o coágulo em menos de 1 minuto. Porém os precipitados das frações P4 e P5 foram os que formaram o coágulo com maior rapidez (15 segundos).

Conclusões:

Com base nestes resultados conclui-se que a purificação parcial do coagulante líquido HA-LA produziu frações mais puras e que dentre estas o precipitado das frações P4 e P5 apresentaram um maior poder coagulante.

Apoio Financeiro: FACEPE, CAPES, UFPE, JICA

Resumo apresentado na FESBE 2007

**INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE ENZIMAS
COAGULADORAS DO LEITE**

SILVA, V.A.J.; MACIEL, J.C.**; LIMA FILHO, J.L.; SILVA, M.P.C.**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA
KEIZO ASAMI (LIKA), UFPE, PE, BRASIL.**

Objetivo: Verificar o efeito do pH do meio na atividade proteolítica de enzima coaguladora do leite extraída do estômago de bezerro.

Métodos e Resultados:

Para realizar as curvas de pH foram utilizados dois substratos sendo um alcalino (azocaseína 1%) e um ácido (azoalbumina 1%). A faixa de pH compreendeu valores de 1 a 8, sendo utilizados três tampões: tampão ácido clorídrico cloreto de potássio para pH 1,0 e 2,0; tampão citrato para pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; e tampão fosfato para pH 7,0; 8,0. De acordo com os resultados não foram observadas diferenças significativas de atividade enzimática para os diferentes substratos. Com relação ao pH foi observado que nos pH abaixo de 4,0 a atividade relativa apresentou um rendimento menor que 20%. No pH 5 houve um aumento desta atividade, mas o pH 6 foi o que apresentou a maior atividade relativa (100%). Nos pH 7,0 e 8,0 foi observado um decréscimo da atividade para menos de 60%. Com base nestes resultados, observa-se que a atividade proteolítica da enzima pode ser realizada tanto com o substrato azocaseína como com a azoalbumina, e que o melhor pH foi 6,0.

Conclusões:

A atividade da enzima não foi, portanto, dependente do tipo de substrato utilizado, mas variou de acordo com o pH confirmando a importância do efeito do pH do meio sobre a atividade enzimática.

Apoio Financeiro: FACEPE, CAPES, UFPE, JICA