



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM
MEMBRANAS PRODUZIDAS
POR *ZOOGLOEA* sp.**

ANA HELENA MÉLO CAVALCANTE

**Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior**

Recife, 2005

ANA HELENA MÉLO CAVALCANTE

**IMOBILIZAÇÃO DE TRIPSINA EM MEMBRANAS PRODUZIDAS
POR *ZOOGLAEA* sp.**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade
Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre.**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria
das Graças Carneiro da Cunha
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz
Bezerra de Carvalho Júnior**

**RECIFE
2005**

Cavalcante, Ana Helena Mélo
Imobilização de tripsina em membranas
produzidas por *Zoogloea* sp. / Ana Helena Mélo
Cavalcante. – Recife : O Autor, 2005.
viii, 42 folhas : il., fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB, Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Bioquímica – Biotecnologia. 2. Protease –
Tripsina – Imobilização. 3. Bactéria *Zoogloea* sp. –
Melaço de cana-de-açúcar – Produção de
exopolissacarídeo celulósico – Utilização médico-
cirúrgica. I. Título.

577.114.7
572.566

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

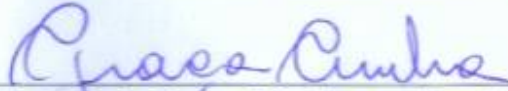
UFPE
BC2005-201

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

Orientador:

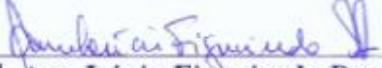
Dr^a. Maria das Graças Carneiro da Cunha



(Universidade Federal de Pernambuco)

Examinadores:

1. Examinador



Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

2. Examinador



Dr^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

3. Examinador



Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Data da aprovação: 28 / 02 / 2005

Dedico esta pesquisa a Todos aqueles
que, em algum momento das suas vidas,
enfrentaram a dureza do trabalho, no
corte da cana de açúcar.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, pela confiança, orientação criteriosa e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho, pelo estímulo e orientação competente.

À Coordenadora do Curso de Mestrado em Bioquímica, Profa. Dra. Vera Menezes, pelo incentivo e atenção.

Ao Professor Dr. José Luiz de Lima Filho, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pelo incentivo à pesquisa, permitindo a realização dos experimentos.

A todos os Colegas e Funcionários do LIKA e, de forma especial, a Givanildo Oliveira, Ian Porto e Diego Buarque pela paciência, disponibilidade, carinho e amizade.

Ao Presidente da Autarquia Educacional de Belo Jardim, à Diretoria da Faculdade de Formação de Professores de Belo Jardim e do Colégio de Aplicação de Belo Jardim, pela oportunidade e pelo suporte financeiro.

Ao Professor e Colega José Vieira da Costa pelo incentivo, respeito e amizade sincera.

A todos os meus Alunos do curso de Biologia da Faculdade de Formação de Professores de Belo Jardim e do Colégio de Aplicação de Belo Jardim, pela confiança e incentivo.

Às minhas Avós Helena, cuja morte tão prematura modificou o destino de toda uma família, e Marcionila, cuja personalidade tão marcante influenciou minhas atitudes e decisões.

Ao meu Pai Ricardo, que me mostrou o mundo mágico dos livros, e à minha Mãe Etelvina, que me ensinou a importância da disciplina.

Ao meu Irmão Francisco, pela confiança e atenção durante a realização de toda a pesquisa.

À minha Nora Nilda pela atenção e carinho.

Ao meu Marido René, pelo carinho, compreensão e paciência durante todo o tempo de solidão.

Aos meus Filhos Manoel Henrique e Rafaella que, cada um a seu modo, me motivaram a continuar nesta jornada.

À minha Neta Júlia, na esperança de que o meu esforço lhe sirva como exemplo.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA **Albumina de soro bovino**

BAPNA **N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida**

DEAE **Dietilaminoetil**

LAFEPE **Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco**

PVA **Álcool polivinílico**

LISTA DE TABELAS

	Página
01	
Suportes sólidos propostos para imobilização de biomoléculas	08
02	
Monossacarídeos presentes na fração solúvel da membrana polissacarídica produzida pela bactéria <i>Zoogloea</i> sp.	15

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURA	iv
LISTA DE TABELAS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. Imobilização enzimática	05
2.2 Proteases	10
2.3 Biopolímeros	12
2.3.1. Biopolímeros microbianos	13
3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO	17
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo geral	20
4.2. Objetivos específicos	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
6. ARTIGO	29
7. CONCLUSÕES	40
8. ANEXOS	42

RESUMO

Tripsina (E.C. 3.4.21.4) foi imobilizada covalentemente em membranas de exopolissacarídeo celulósico produzido pela *Zoogloea* sp. em melaço de cana de açúcar. Grupos carbonila foram introduzidos na matriz através da oxidação com metaperiodato de sódio e a enzima foi imobilizada diretamente e através de albumina de soro bovino (BSA) como espaçador. A retenção de atividade na tripsina-membrana e na tripsina-BSA-membrana foi, respectivamente, 37,2% e 9,16% da atividade específica da enzima nativa atuando no benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida. Não foi observado decréscimo de atividade em ambos os preparados após sete reutilizações assim como eles mostraram ter mais estabilidade térmica do que a enzima nativa. A tripsina-BSA-membrana apresentou a mesma atividade inicial (99%) após 54 dias de estocagem em solução tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 a 4°C, mas a tripsina-membrana perdeu 15% de sua atividade. Além disso, procedimento similar em que as preparações foram reusadas a cada nove dias mostraram que a tripsina-BSA-membrana novamente foi mais estável (decreceu 31% em atividade) do que a tripsina-membrana (decreceu 69%). Estes resultados demonstraram que esta matriz celulósica pode ser usada para imobilização de tripsina e que a presença de BSA como braço apresentou uma matriz mais adequada.

Palavras Chaves: Imobilização, Tripsina, Membrana polissacarídica, *Zoogloea* sp.

ABSTRACT

Trypsin (E.C. 3.4.21.4) was covalently immobilized onto a membrane of a cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. in sugarcane molasses. Carbonyl groups were introduced into the matrix by sodium metaperiodate oxidation and the enzyme was immobilized either directly or through bovine serum albumin (BSA) as a spacer. The trypsin-membrane and trypsin-BSA-membrane retained, respectively, 37,2% and 9,16% of the specific activity of the native enzyme acting on benzoil-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPNA). No activity decrease was observed in both preparations after seven reutilizations as well as they showed to be more thermal stable than the native enzyme. The trypsin-BSA-membrane presented the same initial activity (99%) after 54 days stored in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 buffer at 4°C but the trypsin-membrane lost 15% of activity. Furthermore, the trypsin-BSA-membrane lost 31% of activity after reuse at nine days interval during 54 days of storage at 4°C whereas the trypsin-membrane lost 69% of activity under the same conditions. These results demonstrated that this cellulosic matrix can be used for trypsin immobilization and the presence of BSA as an arm improved the derivative performance.

Key words: Trypsin – immobilization - cellulosic exopolysaccharide - *Zoogloea* sp.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A imobilização de biocatalisadores consiste em seu confinamento a uma região restrita, garantindo a retenção da atividade catalítica e da sua estabilidade, assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida e contínua. Esta metodologia tem sido aplicada a uma vasta gama de biocatalisadores, abrangendo desde extratos enzimáticos purificados a células inteiras de origem microbiana ou tecidos vegetais ou animais.

Devido a sua versatilidade, esse procedimento tem sido utilizado em ensaios laboratoriais, aplicações médicas (por exemplo, biossensores) e para a produção em grande escala de antibióticos semi-sintéticos, de aminoácidos, entre outros.

A imobilização de enzimas isoladas resulta na obtenção de níveis elevados de atividade catalítica por unidade mássica ou molar, especificidade elevada e limitação de reações secundárias. A obtenção de extratos enzimáticos puros é, regra geral, bastante laboriosa e dispendiosa. Todavia, e tendo em consideração a sua estrutura química relativamente simples, em comparação com organelas ou células inteiras, extratos enzimáticos total ou parcialmente purificados têm sido o alvo preferencial dos estudos envolvendo biocatalisadores imobilizados. Enzimas puras têm sido imobilizadas para aplicação em biossensores ou na produção de compostos de elevado valor acrescentado, por exemplo, compostos quirais. A imobilização de extratos enzimáticos tem conhecida aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentar (Fernandes et al., 2003).

No entanto, apesar de todos os avanços, ainda é tímida a participação dos biocatalisadores na indústria. Otimizar a sua utilização repetida e contínua pode ser o caminho para reduzir os custos e aumentar a (Isgrove et al., 2001).

Segundo Saudagar & Singhal (2004), as condições ótimas de imobilização encontradas para algumas biomoléculas em determinados suportes não podem ser aplicadas de forma

indeterminada. Assim, são necessárias pesquisas para se encontrarem as melhores condições e características em cada suporte.

Várias propostas de imobilização de biomoléculas têm sido sugeridas nos últimos anos: imobilização de tripsina e β -glucosidase em nylon (Isgrove et al., 2001); imobilização de tripsina em copolímero acrílico (Bryjak & Kolarz, 1997); imobilização de lipase em membrana de quitosana (Amorim et al., 2003); imobilização de lipase em diferentes membranas poliméricas (Carneiro-da-Cunha et al., 1999; 2002), entre inúmeras outras.

A relevância da busca de novas propostas de imobilização reside no fato de que, nenhuma matriz é perfeita para todas as aplicações (Hermanson et al., 1992).

De entre as diferentes matrizes utilizadas para a imobilização de biocatalisadores, destacam-se os polímeros orgânicos. A preferência por este tipo de suporte deriva da sua adaptabilidade a diferentes métodos de imobilização (Fernandes et al., 2003).

Um exopolissacarídeo em forma de membrana produzido pela bactéria *Zoogloea* sp., em mosto de melaço de cana de açúcar, foi selecionado para ser o objeto de estudo neste trabalho, visando a sua utilização como suporte para imobilização de tripsina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos que tornam possíveis as reações químicas do metabolismo de todos os organismos vivos (Beilen & Li, 2002). São biomoléculas bastante sensíveis à ação de fatores externos tais como temperatura, pH, presença de detergentes, entre outros, os quais podem alterar sua estrutura tridimensional e causar a perda de atividade catalítica. Devido à alta sensibilidade, à impossibilidade de reuso e dos custos elevados, a aplicação industrial de enzimas solúveis em larga escala é bastante limitada (Sotiropoulou et al., 2004). Assim, a imobilização em suportes poliméricos insolúveis se apresenta como o método mais atrativo para reutilização e estabilização enzimática (Vishwanath et al., 1995). Com estas características, os biosistemas imobilizados apresentam uma grande vantagem sobre os sistemas solúveis devido à expressiva redução dos custos nos processos industriais (Kennedy et al., 1989).

Entre os fatores determinantes para o sucesso de uma imobilização eficiente estão a escolha do suporte e o método de imobilização (Desai et al., 2004).

O suporte é o componente estrutural cuja função é auxiliar na separação e no reuso do catalisador, assim como facilitar o controle do processo. A sua função estrutural está relacionada com a sua natureza física e química (Cao et al., 2003). Os suportes adequados à imobilização enzimática devem possuir determinadas características tais como estabilidade química e mecânica, disponibilidade, presença de grupos funcionais para ativação, viabilidade econômica (Hermanson et al., 1992); caráter hidrofílico, insolubilidade, regenerabilidade (Rosevear et al., 1987), além de resistência contra ataque microbiano (Juang et al., 2001).

Os suportes podem ser classificados, de acordo com sua composição química, em orgânicos (a exemplo de agarose, celulose, amido e dextranas) ou inorgânicos como a sílica coloidal, vidro poroso, partículas de vidro, betonita, hidroxiapatita e alumina (Rosevear et al., 1987). Também podem ser classificados em naturais e sintéticos. Exemplos de suportes naturais são a agarose, um polímero de galactose, e a celulose, um polímero de glicose (1,4 β -D-glucana). A celulose apresenta fibras que resistem a diversos solventes, a condições desnaturantes e à oxidação moderada. É um material disponível comercialmente, viável do

ponto de vista econômico e tem um grande potencial para as mais variadas aplicações. Os suportes sintéticos são produzidos pela polimerização de monômeros, ou, em alguns casos, pela combinação de materiais naturais, como a agarose, e monômeros sintéticos, como os derivados de acrilamida, metacrilato e poliestireno. Estes suportes apresentam grande estabilidade física e química, e podem ser facilmente adquiridos (Hermanson et al., 1992).

Nesses biosistemas imobilizados, a enzima é o componente funcional que converte o substrato de interesse no produto desejado. Na prática, as funções catalíticas tais como atividade, seletividade, especificidade com o substrato, produtividade e rendimento são selecionadas com o objetivo de reduzir o número de reações laterais, e obter uma maior tolerância às variações estruturais do substrato, alta produtividade, rendimento e durabilidade do catalisador (Cao et al., 2003).

Definido o suporte, o passo seguinte é a escolha do método de imobilização da enzima, que pode ser físico ou químico e variar em complexidade e eficiência (Panzavolta et al., 2004).

As metodologias utilizadas em imobilização podem ser agrupadas em quatro grandes classes: adsorção; enclausuramento em uma matriz semi-permeável ou no interior de polímeros; reações cruzadas, através do uso de reagentes bifuncionais ou multifuncionais; e ligação covalente a suportes poliméricos, via grupamentos químicos (Powell, 1990).

Os métodos existentes para a imobilização de biocatalisadores em suporte sólido dividem-se em duas grandes categorias: a ligação na superfície e a oclusão em matrizes porosas. No primeiro caso, o biocatalisador é retido à superfície sólida mediante interações estabelecidas entre a matriz e o biocatalisador. Uma vasta gama de interações, abrangendo desde forças de van der Waals a ligações covalentes, pode ser responsável pela retenção do biocatalisador na matriz. Embora algumas destas interações se possam estabelecer entre o biocatalisador e a superfície não modificada da matriz, a versatilidade e efetividade da imobilização superficial podem ser incrementadas mediante a utilização de suportes sintéticos ou através de modificações químicas introduzidas na matriz, por reação com agentes bifuncionais (glutaraldeído, carbodiimida) ou óxidos de metais de transição (óxidos de titânio e de zircônio), as quais permitem a formação de ligações covalentes (Fernandes et al. 2003).

A adsorção é o método físico mais antigo para a imobilização de biocatalisadores e preferido por ser o mais simples e menos desnaturante. Apesar do baixo custo e da

simplicidade do processo, esta técnica apresenta uma grande desvantagem: a fragilidade das forças de ligação adsorptivas, estabelecidas através de interações do tipo de van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas ou de ligações de hidrogênio (Bonnet et al., 2003).

No método químico ocorre a formação de ligações covalentes, muito mais fortes e mais estáveis do que as interações físicas que acontecem na adsorção (Wang & Jin, 2004). Este processo é o mais atrativo para a estabilização, o reuso e a recuperação de enzimas (Bryjak & Kolarz, 1997). Este método envolve o estabelecimento de ligações entre os resíduos dos aminoácidos da proteína e grupos reativos do suporte. O grande número de processos existentes visando à ativação da superfície e a formação de ligações covalentes permite a sua aplicação a uma vasta gama de sistemas sem remoção da enzima imobilizada (Fernandes et al., 2003).

Na formação das ligações covalentes entre a enzima e a matriz de imobilização não deve haver envolvimento dos aminoácidos do centro ativo, nem alterações significativas quanto à conformação nativa da proteína e à sua flexibilidade. Assim, a metodologia de imobilização inclui processos de ativação em etapas múltiplas. Ainda que dez aminoácidos distintos possam ser utilizados, em princípio, para a formação de ligações covalentes, a maioria dos métodos privilegia o estabelecimento das mesmas com os grupos amino (da *Lisina* e da *Arginina*), carboxílico (do *Aspartato* e do *Glutamato*), hidroxílico (da *Serina* e da *Treonina*), tiol (da *Cisteína*) e fenol (da *Tirosina*) (Fernandes et al., 2003).

A utilização de resinas de troca iônica, por exemplo, DEAE-celulose, DEAE-Sephadex, Amberlites, como suporte de imobilização de biocatalisadores permite o estabelecimento de ligações iônicas entre a matriz e o biocatalisador. A força deste tipo de interação situa-se entre a adsorção física e a ligação covalente, caracterizando-se por limitações e vantagens idênticas à adsorção física, podendo ocorrer dessorção do biocatalisador na presença de meios reacionais com força iônica elevada ou em que se registrem variações significativas de pH (Fernandes et al., 2003).

Na imobilização por oclusão, a solidificação de uma suspensão contendo o biocatalisador é induzida por meios químicos ou físicos. Deste processo resulta a formação de um gel insolúvel em água, no interior do qual fica retido o biocatalisador numa forma ativa. A formação do gel pode ser provocada pela presença de cátions multivalentes, por ação da

Cavalcante, A. H. M.

temperatura, por polimerização devida a reações (foto)químicas ou por precipitação (Fernandes et al., 2003).

Nos últimos cinco anos o Grupo de Pesquisa “Proteínas Imobilizadas”, do Departamento de Bioquímica e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, desenvolveu pesquisas com diversas biomoléculas imobilizadas em diferentes suportes (Tabela 1).

Tabela 1: Suportes sólidos propostos para imobilização de biomoléculas.

SUPORTE	BIOMOLÉCULA IMOBILIZADA	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
Dacron	Antígeno (SWAP) de <i>Schistosoma Mansonii</i>	Montenegro et al., 1999
	Albumina do Soro Humano	Pinheiro et al., 1999
Papel de filtro plastificado com PVA* – glutaraldeído	Antígeno de <i>Yersinia pestis</i>	Barbosa et al., 2000
Compósito de polianilina e Dacron	Antígeno de <i>Yersinia pestis</i>	Coelho et al., 2001a
Compósito de polisiloxano e PVA	Antígeno de <i>Yersinia pestis</i>	Barros et al., 2002

* - PVA – álcool polivinílico

A conexão entre o suporte e a enzima pode ser obtida por ligação direta entre os componentes ou por meio de uma molécula intercalada de comprimentos diferentes, o chamado espaçador ou braço extensor (Nouami et al., 2001).

Diversas áreas do conhecimento científico estão envolvidas na tecnologia enzimática. Atualmente, a engenharia genética, a bioinformática e o conhecimento cada vez maior e mais detalhado da biologia contribuem para aumentar a eficiência e a economia dos processos já existentes, permitindo novas e variadas aplicações para biosistemas imobilizados. Uma interessante aplicação desta tecnologia envolve simultaneamente o setor agrícola, a indústria química e a farmacêutica (Beilen & Li, 2002).

As biomoléculas imobilizadas são mais estáveis e podem ser usadas como catalisadores em diversas transformações bioquímicas, permitindo o uso contínuo ou reuso e a

separação dos produtos solúveis da reação e do substrato que não reagiu, o que previne contaminação e simplifica o trabalho. Cerca de 134 processos de biotransformação foram desenvolvidos em escala industrial. Este número ainda é bastante modesto apesar das intensas pesquisas, o que pode ser atribuído às várias limitações da biocatálise, como, por exemplo, a disponibilidade da enzima e a estabilidade operacional (Won et al., 2004).

As interações específicas entre um ligante de afinidade e uma molécula alvo são uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de uma ampla variedade de ensaios capazes de avaliar virtualmente qualquer substância em biossensores. Estes aparelhos podem ser utilizados nas mais diversas áreas como, por exemplo, em diagnósticos, no monitoramento do meio ambiente e no controle de resíduos. Para detectar estas interações, o biossensor necessita de um transdutor eletrônico, que percebe as discretas modificações químicas que ocorrem entre o ligante imobilizado e sua biomolécula específica, e modifica parâmetros elétricos, térmicos ou ópticos (Hermanson et al., 1992). Os modernos sensores oferecem cada vez mais confiança, sensibilidade e estabilidade, além de apresentar facilidade no manuseio, miniaturização prática e produção em massa com baixo custo. O objetivo dos novos projetos de pesquisa nesta área é aumentar a sensibilidade e a estabilidade da enzima no biossensor nas mais variadas condições (Bucur et al., 2004).

Os biossensores com urease imobilizada avaliam o teor de uréia no sangue (Lakard et al., 2004), e os biossensores que medem a quantidade de L-lactato são usados em medicina desportiva para determinar as condições físicas de atletas e animais de raça (Patel et al., 2000). Inseticidas organofosfatados atuam como inibidores da acetilcolinesterase, uma biomolécula que desempenha um importante papel na função nervosa. Os biossensores baseados nesta interação detectam baixas concentrações deste tipo de pesticida (Bonnet et al., 2003).

No entanto, a mais comum de todas as técnicas baseada na interação específica entre um ligante imobilizado e a molécula alvo talvez seja a cromatografia de afinidade que permite isolar e purificar uma determinada substância contida em uma mistura complexa, detectar macromoléculas com finalidades analíticas, remover contaminantes indesejáveis e promover catálise enzimática. O uso desta técnica reduz o número de procedimentos e diminui significativamente os custos (Hermanson et al., 1992).

2.2. PROTEASES

As proteases são enzimas que catalisam as reações de hidrólise das ligações peptídicas. Apresentam uma grande diversidade de ação, são fisiologicamente essenciais para os organismos vivos e estão presentes em animais, vegetais e microorganismos, podendo ser divididas em dois grandes grupos: endopeptidases e exopeptidases (Rao et al., 1998).

As exopeptidases atuam próximo às extremidades das cadeias polipeptídicas e podem ser classificadas como amino ou carboxipeptidases, relacionando o seu sítio de ação à extremidade N- ou C- terminal, respectivamente. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serino, metalo e cisteíno-carboxipeptidases, enquanto que as aminopeptidases, em função do número de resíduos de aminoácidos removidos, são classificadas em aminopeptidases (um resíduo), aminodipeptidases (dois resíduos) ou aminotripeptidases (três resíduos). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e são subdivididas em 4 grupos: serino-protease, asparto-protease, cisteíno-protease e metalo-protease dependendo da natureza do grupo funcional do sítio ativo. A ação destas proteases causa modificações seletivas nas proteínas, tal como a ativação de formas zimogênicas de enzimas (Barret, 1994).

As enzimas proteolíticas se destacam pelo papel importante que desempenham em pesquisas, em sua utilização nas mais variadas aplicações comerciais e em sua participação em diversos processos industriais (Safarík & Safaríková, 2001). Cerca de 50% das enzimas industriais são proteases (Guizani et al., 1991; De Vecchi & Coppes, 1996) e, entre elas, 60% são de origem microbiana (Haki & Rakshit, 2003).

As proteases têm um grande potencial de aplicação na formulação de detergentes e na indústria de couro devido à necessidade de tecnologias que possam preservar o meio ambiente (Rao et al., 1998), dispensando a necessidade do uso de reagentes tóxicos (Thangam & Rajkumar, 2002).

A diversidade e especificidade das proteases possibilitam o seu uso no desenvolvimento de agentes terapêuticos. Podem ser empregadas no tratamento de feridas e queimaduras, e, quando são administradas por via oral, produzem um efeito anti-inflamatório e aceleram o processo de cura (Thangam & Rajkumar, 2002).

Atualmente, novas técnicas de engenharia genética tornam possível a obtenção de proteases estáveis em altas temperaturas, em diferentes valores de pH e na presença de detergentes e também permitem compreender melhor a relação que existe entre a função e a estrutura da enzima (Rao et al., 1998).

Na indústria de alimentos o emprego de proteases é o preferido, ao invés de métodos químicos, para alterar a solubilidade, melhorar a textura e remover sabores e aromas indesejáveis (Kumar & Gupta, 1997). As proteases são empregadas nos processos de fermentação, na produção de gelatina hidrolisada e na fabricação de leite de soja. Também são usadas na clarificação de sucos, devido o desenvolvimento de sedimentos indesejáveis durante a estocagem devido à alta concentração de proteínas solúveis neles contidos (Dawes et al., 1994). Na fabricação de pães, as proteases hidrolisam o glúten, produzindo uma massa macia; na produção de queijo, são empregadas para a maturação e obtenção da textura e do sabor desejados e, na indústria de carne, são utilizadas para amaciamento e acondicionamento (Donaghy & Mackay, 1993). As proteases também encontram aplicação na redução ou eliminação de aminoácidos aromáticos em alimentos. Produtos livres de fenilalanina, por exemplo, podem ser ingeridos por pacientes com fenilcetonúria, prevenindo os efeitos prejudiciais deste aminoácido no cérebro desses pacientes (Tardioli et al., 2003).

Em mamíferos, as proteases digestivas do pâncreas são produzidas sob a forma de zimogênios, que são ativadas no lúmen do intestino pela ação da enteroquinase, uma protease que quebra uma ligação peptídica específica no tripsinogênio, transformando-o em tripsina ativa. Em seguida, as moléculas de enteroquinase e as de tripsina recém ativadas dão início a um efeito cascata, responsável pela ativação de outros tripsinogênios e outros zimogênios como o quimiotripsinogênio, procarboxipeptidase, proelastase e profosforilase (Brody, 1994).

A tripsina (E.C. 3.4.21.4) é uma serino protease que hidrolisa ligações peptídicas do lado carboxílico de resíduos de aminoácidos carregados positivamente dentro da proteína. A tripsina, assim como outras enzimas digestivas, atua como mediadora entre a ingestão de alimentos e a assimilação de nutrientes, de vital importância no metabolismo (Sainz et al., 2004).

2.3 BIOPOLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas formadas pela união de várias moléculas menores. Alguns dos mais populares polímeros são de origem sintética. Estes incluem nylon, poliestireno, TeflonTM e poliuretanos. Existem também os polímeros de origem natural, como os polissacarídeos, proteínas, polinucleotídeos e a borracha natural.

Uma das grandes diferenças entre eles é a velocidade de degradação no meio ambiente. Os polímeros sintéticos degradam-se lentamente, ao contrário dos polímeros biológicos onde este fenômeno ocorre com muito mais rapidez, característica de extrema importância em um mundo cada vez mais ameaçado pela poluição e preocupado com as questões ambientais (Hasirci et al., 2001).

Os polímeros contendo carboidratos, naturais ou sintéticos, podem ser usados em ensaios para reconhecimento ou purificação de lectinas; em suportes para cromatografia de afinidade para isolar proteínas com especificidade para diferentes resíduos de açúcar; em sistemas de liberação de drogas; em bioimplantes; em lentes de contato, etc. Estes polímeros também são um instrumento importante na elucidação do papel biológico dos carboidratos (Varma et al., 2004).

Os biopolímeros são produzidos por várias espécies de sistemas biológicos e algumas vezes apresentam diferentes grupos funcionais que possibilitam a ocorrência das mais diversas interações químicas. Alguns biopolímeros possuem importantes características como resistência à degradação e estabilidade em largas faixas de temperatura e pH. Sua estrutura química e características especiais lhes conferem a chance de ter as mais variadas aplicações (Khachatoorian et al., 2003).

Uma tecnologia inovadora que pode contribuir para a solução permanente do grave problema de contaminação do subsolo utiliza os biopolímeros em barreiras de isolamento que encapsulam agentes poluentes como metais e outros biopolímeros (Day et al., 1999).

Os polissacarídeos são moléculas de alta massa molecular, resultantes da condensação de centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos. Denominam-se homopolissacarídeos, quando são formados por um único tipo de monossacarídeo, e heteropolissacarídeos, quando apresentam dois ou mais tipos de monossacarídeos. A sua estrutura pode ser linear ou ramificada, e, algumas vezes, cíclica. Com tanta variedade de

Cavalcante, A. H. M.

composição e estrutura, alguns polissacarídeos podem apresentar algumas propriedades interessantes, como, por exemplo, participar no processo de recuperação de ferimentos (Lloyd et al., 1997).

Os polissacarídeos e os seus derivados destacam-se cada vez mais por causa de seus benefícios ao meio ambiente, de sua grande versatilidade, e o número quase infinito de possíveis aplicações na: indústria têxtil e de papel, indústria de alimentos e cosméticos, bem como, indústria química e farmacêutica (Geresh et al. 2000).

Na área médica, os polissacarídeos podem ser usados na fabricação de cápsulas biodegradáveis que atuam como sistemas de liberação controlada de drogas no organismo; em material para sutura; na substituição de tecidos e em implantes diversos. O emprego de polissacarídeos em embalagens para alimentos, sacos para lixo e embalagens de uma maneira geral, tem sido uma alternativa ecologicamente correta e muito valorizada nos dias atuais (Van de Velde & Kiekens, 2001).

Essas interessantes biomoléculas e suas propriedades estruturais, físico-químicas e funcionais com alto potencial de exploração tem estimulado a pesquisa nas mais diversas áreas.

2.3.1. BIOPOLÍMEROS MICROBIANOS

Muitos microorganismos têm a habilidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares que podem ser excretados como polímeros solúveis ou insolúveis (Sutherland, 1990). Esses polissacarídeos podem atuar como proteção contra o estresse ambiental, auxiliar na fixação em superfícies ou funcionar como reserva de nutrientes (Fraysse et al., 2003).

Kay e colaboradores (1993) enfatizam que esses exopolissacarídeos são, na sua maioria, compostos atóxicos, biodegradáveis e produzidos extracelularmente por microorganismos não patogênicos a partir de fermentações em batelada com eficiência próxima a 50% na conversão do substrato.

Segundo Sutherland (1990), a síntese dos polímeros microbianos apresenta alto grau de regularidade, uma vez que está isenta de flutuações de ordem climática ou sazonal, fato raro de ocorrer nos polissacarídeos obtidos a partir de outras fontes. Além disto, os

exopolissacarídeos microbianos podem ser produzidos em grandes quantidades e purificados de uma maneira relativamente simples, o que não acontece com os polissacarídeos de outras procedências (Lee et al., 2001). As bactérias do gênero *Acetobacter* produzem uma celulose considerada quimicamente pura porque não contém resíduos de lignina e outras impurezas que normalmente ocorrem na celulose de origem vegetal (Masaoka et al., 1993).

Outros fatores provocam o interesse no isolamento, na identificação e na busca de aplicações para os polissacarídeos microbianos. Por exemplo, a celulose bacteriana apresenta propriedades diferentes de outras formas de celulose, entre as quais se destacam a alta cristalinidade, a resistência à tensão e ao corte, o alto grau de polimerização e a grande hidrofiliidade, características que podem ser interessantes em aplicações biotecnológicas (Yamanaka & Watanabe, 1994).

Alguns polissacarídeos microbianos têm sido utilizados como suportes de imobilização tais como a quitosana sintetizada pelo *Syncephalastrum racemosum* para imobilização de lipase (Amorim et al., 2003), e a curdlana, produzido por *Agrobacterium radiobacter*, também para imobilização de lipase (Saudagar & Singhal, 2004).

Com o uso de técnicas avançadas de controle genético e o conhecimento cada vez maior das rotas biossintéticas efetuadas pelos microorganismos, novos materiais poliméricos poderão ser sintetizados para as mais diversas finalidades (Lopes & Andrade, 1995).

O exopolissacarídeo sintetizado pela bactéria *Zoogloea ramigera* 115 (ATCC 25935), conhecido como zooglan, tem um papel importante em processos de purificação de água e possui uma rara afinidade com íons metálicos incluindo Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb e Zn, provavelmente por causa da presença de grupos carregados negativamente em sua estrutura (Guillouet et al., 1999).

As membranas polissacarídicas sintetizadas pela bactéria *Zoogloea* sp., em mosto de melaço de cana de açúcar, apresentaram 88% de solubilidade em ácido trifluoracético e diversos monossacarídeos em sua composição (Tabela 2). Análises de metilação mostraram 2,3,6-tri-O-metil hexitol (74,7%) e 2,3-di-O-metil hexitol (17,7%). A hidrólise enzimática do polissacarídeo com uma celulase confirmou a presença de resíduos (1→4)-β-D-glucopiranosil (Paterson-Beedle et al., 2000).

Através do método de calorimetria diferencial exploratória (DSC), a biomembrana apresentou uma temperatura de fusão cristalina bem definida (118°C), propriedade que indica a relativa pureza do material (Argôlo, 2002).

Tabela 2: Monossacarídeos presentes na fração solúvel da membrana polissacarídica produzida pela bactéria *Zoogloea* sp.

MONOSSACARÍDEOS	TOTAL (%, p/p)
Fucose	0,01
Arabinose	0,37
Galactose	0,13
Glucose	87,57
Xilose	8,58
Manose	0,82
Ribose	1,68
Ácido glicurônico	0,83

Os resultados dos testes de tração mecânica realizados na empresa Petroflex Indústria e Comércio S/A revelaram um material com estabilidade mecânica, elástico e que não se desintegra fisicamente com facilidade, propriedades que, do ponto de vista físico, viabilizam o seu emprego como suporte para imobilização de biomoléculas.

A partir deste exopolissacarídeo estão sendo produzidos fios de sutura para aplicação em cirurgia geral (Depósito de Patente MU 8402142-0) e um gel para múltiplas aplicações na área médica (Depósito de Patente PI 0301912-8). Esta biomembrana apresenta propriedades inibidoras do crescimento bacteriano (Coelho et al., 2001b), e tem sido indicada como curativo no tratamento de feridas infectadas. Ela também pode vir a ser usada como reforço da parede abdominal; em correção cirúrgica de hérnias; como remendos em lesões vasculares arteriais e venosas, no átrio, no ventrículo e nas válvulas cardíacas; em lesões do trato gastrointestinal, do esôfago, do estômago, do intestino delgado e do colo retal; em reparos de lesões

Cavalcante, A. H. M.

cutâneas no tratamento de queimaduras; em plástica de lesões timpânicas e de ligamentos de tendões, etc (Depósito de Patente PI 0206132-5).

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

É cada vez maior o interesse da biotecnologia na imobilização de proteínas em diferentes suportes para as mais diversas aplicações. O exopolissacarídeo natural produzido pela bactéria *Zoogloea* sp., em forma de membrana, a partir do melaço da cana de açúcar, matéria prima abundante em nossa região, faz com que este trabalho venha a contribuir no desenvolvimento de uma nova aplicação para esta membrana polissacarídica como matriz para imobilização.

A confirmação desta pesquisa permitirá separações e purificações de uma dada biomolécula de seu extrato bruto, assim como poderá servir para a construção de biosensores e matrizes para imunoensaios, entre outras aplicações. Novos horizontes podem se apresentar para a enzimologia como ciência aplicada através da otimização de metodologias com o propósito de se obter um derivado insolúvel que possua características funcionais que mais se aproximem daquelas apresentadas pelas enzimas nativas.

Além do emprego como matriz para imobilização de biomoléculas, estudos experimentais estão sendo desenvolvidos com este material no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no tratamento de animais portadores de perdas cutâneas; no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco nas áreas de Medicina Clínica e Experimental. Os resultados têm revelado um grande potencial deste exopolissacarídeo para uso nas diversas sub-áreas da cirurgia. A Estação Experimental de Cana-de-Açúcar – UFRPE, o Grupo de Pesquisas Biopolímero de Cana-de-Açúcar – UFPE e o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE já firmaram uma parceria para a instalação de uma Biofábrica, cuja finalidade é viabilizar a produção industrial, aplicação e comercialização dos diferentes Modelos de Utilidade do biopolímero dentre os quais membranas, fios de sutura cirúrgica e gel.

Todos esses projetos têm impacto na formação de recursos humanos, em inovação tecnológica e no setor produtivo de transformação com grande potencialidade de agregar valor a um produto abundante e de baixo custo, o melaço da cana de açúcar, e contribuir para o crescimento econômico regional da indústria do açúcar. Além disto, estes projetos são capazes de gerar recursos financeiros com a redução da importação de similares e promover a fixação de pessoal especializado.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- Imobilizar covalentemente a tripsina de porco na membrana polissacarídica produzida pela bactéria *Zoogloea* sp., em meio de melaço da cana-de-açúcar.

4.2. Objetivos Específicos

- Imobilizar covalentemente a tripsina de porco na biomembrana por via direta;
- Imobilizar covalentemente a tripsina de porco na biomembrana utilizando BSA como braço extensor;
- Avaliar a estabilidade dos derivados enzimáticos imobilizados frente à temperatura e ao tempo;
- Avaliar o reuso dos derivados enzimáticos imobilizados.

Cavalcante, A. H. M.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Cavalcante, A. H. M.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMORIM, R.V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 35-39, 2003.

ARGÔLO, E.J. Avaliação da capacidade biodegradadora de fungos em filmes poliméricos. **Dissertação de Mestrado**, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Departamento de Engenharia Química, Recife, 79 p., 2002.

BARBOSA, G. H. T. S et al. The use of filter paper plasticized with polyvinyl alcohol-glutaraldehyde in ELISA. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 823-827, 2000.

BARRET, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 1-59, 1994.

BARROS, A. E. L. et al. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 459-463, 2002.

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

BONNET, C.; ANDREESCU, S. ; MARTY, J. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, p. 209-211, 2003.

BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. New York: Academic Press, 657 p., 1994.

BRYJAK, J. ; KOLARZ, B.N. Immobilization of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry**, v. 33, N° 4, p. 409-417, 1997.

Cavalcante, A. H. M.

BUCUR, B.; DANET, A. F. ; MARTY, J. Versatile method of cholinesterase immobilization via affinity bonds using Concanavalin A applied to the construction of a screen-printed biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 217-225, 2004.

CAO, L.; LANGEN, L. ; SHELDON, R. A. Immobilized enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion em Biotechnology**, v.14, p. 387-394, 2003.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. et al. Lipase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**, v.13, p. 403-409, 1999.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. et al. Covalent immobilization of lipase on different supports. **Latin American Applied Research**, v. 32, p. 69-72, 2002.

COELHO, R. A. L. et al. Polyaniline-Dacron composite as solid phase in ELISA for Yersinia pestis antibody detection. **Journal of Biomedical Materials Research**, 56(2), p. 257-260, 2001a.

COELHO, M. C. O. C. et al. Biopolímero produzido a partir do melaço da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. In: **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, Setembro, 2001b, v. 17, p. 11-13.

DAWES, H.; STRUEBI, P. ; KEENE, J. Kiwifruit juice clarification using a fungal proteolytic enzyme. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 4, p. 858-861, 1994.

DAY, S. R.; O'HANNESIN, S. F. ; MARSDEN, L. Geotechnical techniques for the construction of reactive barriers. **Journal of Hazardous Materials B67**, p. 285-297, 1999.

DESAI, P. D.; DAVE, A. M. ; DEVI, S. Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 143-150, 2004.

Cavalcante, A. H. M.

DE VECCHI, S. ; COPPES, Z. Marine fish digestive proteases - relevance to food industry and the south-west Atlantic region - a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 20, p. 193-214, 1996.

DONAGHY, J. A. ; MACKAY, A. M. Production and properties of an alkaline proteases by *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 662-66, 1993.

FERNANDES, P.; AIRES-BARROS, M. R. ; CABRAL, J. M. S. Biocatálise Aplicada, 2003, p. 219-246. In: **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**, LIMA, N. ; MOTA, M. Portugal, Ed. Lidel.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F. ; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. **European Journal Biochemistry**, v. 270, p. 1365-1380, 2003.

GERESH, S. ; DAWADI, R.P. ; ARAO, S. M. Chemical modification of biopolymers quaternization of the extracellular polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. **Carbohydrate polymers**, v. 36, p. 75-80, 2000.

GUILLOUET, S. et al. Effects of yeast on the exopolysaccharide, zooglan, produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 51, p. 235-240, 1999.

GUIZANI, N.; ROLLE, R. S.; MARSHALL, M. R. ; WEI, C. I. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98 (B), n. 4, p. 517-521, 1991.

HAKI, G. D. ; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

Cavalcante, A. H. M.

HASIRCI, V. et al. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 135-150, 2001.

HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; SMITH, P. K. **Immobilized Affinity Ligand Techniques**, Academic Press, Inc., New York, 1992.

ISGROVE, F. H. et al. Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 225-232, 2001.

JUANG, R. ; WU, F. ; TSENG, R. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp wastes. **Bioresource Tecnology**, v. 80, p. 187-193, 2001.

KAY, A.; ISHINO, T. ; ARASHIDA, T. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ¹³C-labeled glucose as carbon source. **Carbohydrate Research**, v. 240, p. 153-159, 1993.

KENNEDY, J. F; MELO, E. H. M. ; WHITE, C. A. Immobilized Biosystems in Research and Industry. In: RUSSEL, G. E. (ed). **Technology and Genetic Engineering Reviews**. Newcastle: Intecept, v. 7, p. 297-313, 1989.

KHACHATOORIAN, R.; PETRISOR, I.; KWAN, C. ; YEN, T. F. Biopolymer plugging effect: laboratory-pressurized pumping flow studies. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 38, p. 13-21, 2003.

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.

LAKARD, B. et al. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 1641-1647, 2004.

Cavalcante, A. H. M.

LEE, H. K. et al. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide producing marine bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 661-666, 2001.

LLOYD, L. L. et al. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p.315-322, 1997.

LOPES, L. ; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, N° 703, p. 19-23, 1995.

MASAOKA, S.; OHE, T. ; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, nº 1, p. 18-22, 1993.

MONTENEGRO, S. M. L. et al. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for schistosomiasis diagnosis using Dacron as solid-phase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32 (2), p. 139-143, 1999.

NOUAIMI, M.; MOSCHEL, K. ; BISSWANGER, H. Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. **Enzyme and Microbial Technology**, 29, p. 567-574, 2001.

PANZAVOLTA, F. et al. Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 67-76, 2004.

PATEL, N. G. et al. Fabrication and characterization of disposable type lactase oxidase sensors for dairy products and clinical analysis. **Sensors and Actuators B**, v. 67, p. 134-141, 2000.

PATERSON-BEEDLE, M. et al. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 375-383, 2000.

Cavalcante, A. H. M.

POWELL, L. W. Immobilized biocatalyst technology. In: Fogart W. M. & Kelly C. T. (eds.). **Microbial Enzyme and Biotechnology**. 2 ed. London: Elsevier Science Publishers, p. 369-394, 1990.

PINHEIRO, S. M. B.; CARVALHO JR, L. B. ; CHAVES, M. E. C. The use of ferromagnetic Dacron as solid-phase in chemiluminescent assays. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 919-922, 1999.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbial and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F. ; CABRAL, J. M. S. **Immobilized Enzymes and Cells**. Bristol: Adam Hilger, 248 p., 1987.

SAFARÍK, I. ; SAFARÍKOVÁ, M. Isolation and removal of proteolytic enzymes with magnetic cross-linked erythrocytes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, p. 169-174, 2001.

SAINZ, J. C.; GARCIA-CARREÑO, F. L. ; HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. *Penaeus vannamei* isotrypsin: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 138, p. 155-162, 2004.

SAUDAGAR, P. S. ; SINGHAL, R. S. Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 483-488, 2004.

SOTIROPOULOU, S.; VAMVAKAKI, V. & CHANIOTAKIS, N. A. Stabilization of enzymes in nanoporous materials for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1674-1679, 2004.

Cavalcante, A. H. M.

SUTHERLAND, I. W. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 163, 1990.

TARDIOLI, P. W. et al. Design of new immobilized-stabilized Carboxypeptidase A derivate for production of aromatic free hydrolysates of proteins, **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 565-574, 2003.

THANGAM, E. B. ; RAJKUMAR, G. S. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligene faecalis*, **Biotechnol. Appl. Biochem**, 35, p.149-154, 2002.

VAN DE VELDE, K. ; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polymer Testing**, v. 21, p. 433-442, 2001.

VARMA, A. J.; KENNEDY, J. F. ; GALGALI, P. Syntetic polymers functionalized by carbohydrates: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 429-445, 2004.

VISHWANATH, S. et al. Site-directed and random enzyme immobilization on functionalized membranes: kinetic studies and models. **Journal of Membrane Science**, v. 108, p. 1-13, 1995.

WANG, Z. ; JIN, G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, p. 237-243, 2004.

WON, K. et al. Optimization of lipase entrapment que in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, 2004 [In Press].

YAMANAKA, S. & WATANABE, K. Applications of bacterial cellulose. In R. D. Gilbert, **Cellulose Polymers, Blends and Composites**. (pp. 207-215). Munich: Hanser, 1994.

6. ARTIGO

Cavalcante, A. H. M.

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO
BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL**

**CELLULOSIC EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY
ZOOGLOEA sp. AS A FILM SUPPORT FOR TRYPSIN
IMMOBILIZATION**

Cavalcante, A. H. M.

Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization.

Cavalcante, A. H. M., Carvalho Jr., L. B., Carneiro-da-Cunha, M. G.*

Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50.670-901, Recife, PE, Brazil, Fax: +55.81.21268485.

* Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50.670-420, Recife, PE, Brazil, Fax: +55.81.32718576. E-mail address: mgcc@ufpe.br (M. G. Carneiro-da-Cunha)

Key words: Trypsin – immobilization - cellulosic exopolysaccharide - *Zoogloea* sp.

Abstract

Trypsin (E.C. 3.4.21.4) was covalently immobilized onto a membrane of a cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. in sugarcane molasses. Carbonyl groups were introduced into the matrix by sodium metaperiodate oxidation and the enzyme was immobilized either directly or through bovine serum albumin (BSA) as a spacer. The trypsin-membrane and trypsin-BSA-membrane retained, respectively, 37,2% and 9,16% of the specific activity of the native enzyme acting on benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPNA). No activity decrease was observed in both preparations after seven reutilizations as well as they showed to be more thermal stable than the native enzyme. The trypsin-BSA-membrane presented the same initial activity (99%) after 54 days stored in 0.1M Tris-HCl pH 8.0 buffer at 4°C but the trypsin-membrane lost 15% of activity. Furthermore, the trypsin-BSA-membrane lost 31% of activity after reuse at nine days interval during 54 days of storage at 4°C whereas the trypsin-membrane lost 69% of activity under the same conditions. These results demonstrated that this cellulosic matrix can be used for trypsin immobilization and the presence of BSA as an arm improved the derivative performance.

1. Introduction

An extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea* sp. was isolated from sugarcane molasses as a membrane in an agro-industrial environment in the northeastern region of Brazil [1]. The main monosaccharides present were glucose (87.6%), xylose (8.6%), mannose (0.8%), ribose (1.7%), galactose (0.1%), arabinose (0.4%) and glucuronic acid (0.8%). Enzyme hydrolysis of the polysaccharide with a cellulase confirmed the presence of (1→4)-β-D-glucopyranosyl residues. Potential industrial applications for bacterial cellulose include acoustic diaphragms, artificial skin for use in wound healing processes, filter membranes, ultra strength paper and paper additives [2-3-4]. Some of these polysaccharides are claimed to have an unusually high affinity for metallic ions and for amino acids [5-6]. *Zoogloea ramigera* produces zooglan, a polysaccharide composed of D-glucose, D-galactose and pyruvic acid in an approximate molar ratio of 11:3:1.5 [7]. The polysaccharide produced by *Zoogloea* sp. has been experimentally used as prosthesis (patents PI 0206132-5 and PI 0301912-8) and catgut-like material (patent MU 8402142-0) in dogs.

Here, this extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea* sp. from sugarcane is proposed as a matrix for trypsin immobilization by two procedures: directly to the membrane and through bovine serum albumin (BSA).

2. Materials and Methods

The extracellular polysaccharide membrane (1cm²) kindly donated by the Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, Pernambuco, Brazil, was incubated with 0.25M sodium metaperiodate for 2h at 25°C in dark according to Gil et al. [8]. Afterwards, the membrane containing carbonyl groups were washed ten times with 0.1M Tris-HCl buffer, pH 8.0 (from now on called buffer) and used for porcine trypsin (Sigma; T-4799) covalent immobilization by two procedures (triplicates): directly and indirectly through bovine serum albumin (Sigma; A-7096). Firstly, the enzyme (500µg in 1mL) was incubated with the treated membrane overnight at 4°C. Additional incubation was carried out with 1mL of 0.015M

sodium borohydrate for 2h at 4°C. Washings, (one time) with 1M NaCl and (ten times) with buffer were finally carried out and the trypsin-membrane synthesized was kept at 4°C in buffer until use. Alternatively, bovine serum albumin was previously linked to the membrane as described for the trypsin immobilization. Then, the BSA-membrane was incubated with 2% v/v glutaraldehyde at 25°C for 2h after which ten times washing with the Tris-HCl buffer was performed. Finally, the activated BSA-membrane was incubated with the trypsin (500µg in 1mL) overnight at 4°C, and washed one time with 1M NaCl and ten times with buffer and kept in buffer at 4°C until use.

The enzymatic activity of soluble and immobilized enzyme preparations was carried out using N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) as substrate. The membranes were incubated with 850µL of buffer and 150µL 4mM BAPNA prepared in DMSO. Samples of 200µL were removed at time intervals and introduced into microplates. Thus, the released p-nitroaniline was spectrophotometrically measured at 405nm in ELISA reader (Bio-rad). An enzymatic unit was defined as the amount capable to produce 1µM of p-nitroaniline per min and calculated by the formula $U = [(A \times v) \times 1,000] / 9.1$, where **A** and **v** stand for absorbance and the reaction mixture volume in mL, and 9.1 is the molar absorption coefficient under these circumstances. The thermal stability of the trypsin-membrane and the trypsin-BSA-membrane was investigated by incubating them at temperature ranging from 25°C to 75°C for 15min and after keeping them at 25°C for 20min their activities were established as described above. The supernatants of each washing were collected for protein measurements according to Sedmak & Grossberg [9].

The microphotographs were obtained using a JSM-5600LV Jeol electron microscope.

3. Results and Discussion

Figure 1 shows the scanning micrograph of the cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. that depicts the membranous aspect of the cellulosic material (Figure 1a), its rough surface (Figure 1b) and the presence of fibrous components (Figure 1c).

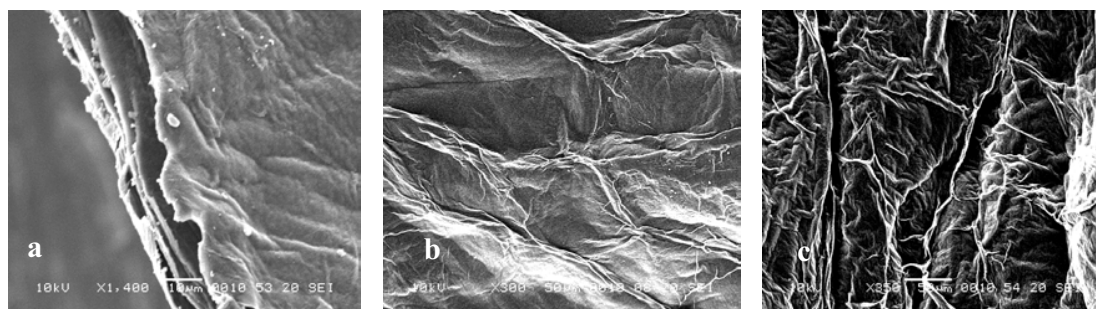


Figure 1. Electron micrographs of the cellulose exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. showing a lateral view at 1.400x (a) and details of its surface at 300x (b) and 350x (c) magnification.

The two procedures of trypsin immobilization onto the cellulose exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. used in this work are chemically shown in Figure 2.

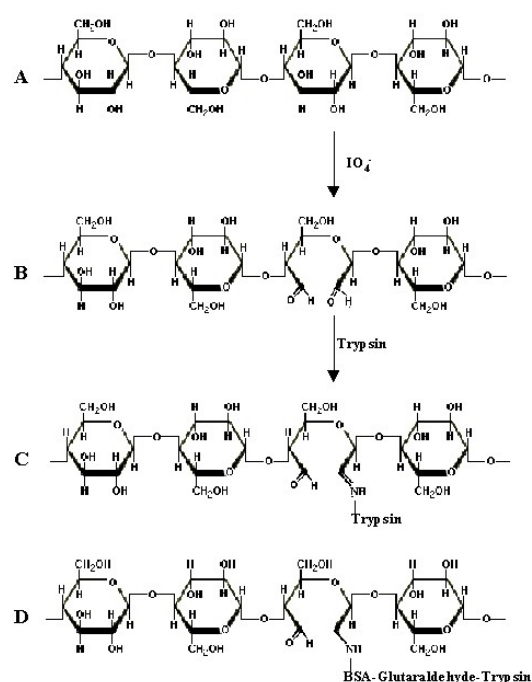


Figure2–Chemical reactions involved in the covalent immobilization of trypsin onto cellulose exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. A→B: carbonyl group introduction; B→C: trypsin immobilization directly; B→D: trypsin immobilization via BSA using glutaraldehyde.

There is a remarkable difference between them because the enzyme is closed to the matrix in the first one and BSA sizing 68 kDa [10] acts as a chemical arm in the second case. The immobilized trypsin degree of freedom and substrate/product diffusion will be affected in each procedure. Figure 3 illustrates these immobilization procedures.

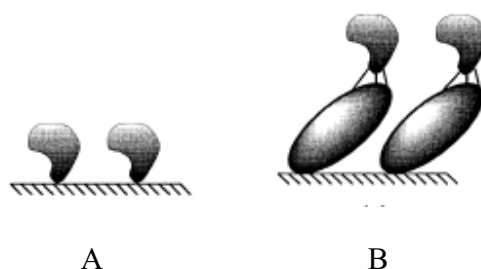


Figure 3 Schematic representation of the immobilization of trypsin on the surface of the support directly (A) and via BSA (B).

Table 1 summarizes the specific activities retention presented by both procedures and compares with those reported by Nouaimi et al. [11] immobilizing trypsin on hydrophobic polyester directly and via BSA. Higher amount of trypsin was fixed onto the *Zoogloea* polysaccharide via BSA ($80.86 \pm 4.63 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) than directly ($51.63 \pm 5.09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). These results are in accordance to those reported by Nouaimi et al. [11], namely, higher amounts of immobilized trypsin via BSA ($38.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) than directly ($23.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). As far as the trypsin activity of the immobilized trypsin onto *Zoogloea* exopolysaccharide is concerned the direct immobilization showed higher specific activity ($11.14 \pm 0.036 \text{ U}/\text{mg}$; $57.50 \text{ U}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$) than via BSA ($2.73 \pm 0.19 \text{ U}/\text{mg}$; $22.10 \text{ U}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$), equivalent, respectively, to 37,2% and 9,16% of that estimated for the free enzyme. These results are in opposition of those reported by Nouaimi et al. [11] working with polyester who reported more specific activity retention for the enzyme immobilized via BSA ($3.93 \text{ U}/\text{mg}$; $15.00 \text{ U}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$) than that directly ($1.27 \text{ U}/\text{mg}$; $2.94 \text{ U}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$). These authors also used other spacers (PEG-diamine, aldehyde dextran and amino dextran) and the highest activity values were obtained with the BSA spacer. Finally, it is important to register that the incubation of trypsin with *Zoogloea* cellulosic polysaccharide, not oxidized by sodium metaperiodate, yielded a preparation without enzymatic activity.

Table 1 – Trypsin and BSA immobilized onto *Zoogloea* sp. cellulosic exopolysaccharide and polyester membranes

Trypsin derivatives	BSA loading $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Trypsin loading $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Specific activities U/mg	Activities $\text{U}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$	Reference
Direct	-	51.63 ± 5.09	11.14 ± 0.36	57.50	This work
Via BSA	12.20 ± 3.03	80.86 ± 4.63	2.73 ± 0.19	22.10	This work
Polyester directly	-	23.12	1.27	2.94	Nouaimi et al. (2001)
Polyester via BSA	-	38.17	3.93	15.00	Nouaimi et al. (2001)

Seven reuses of the trypsin-membrane and trypsin-BSA-membrane preparations retained $99.36 \pm 1.08\%$ and $99.94 \pm 0.50\%$ of their initial activities, respectively. Therefore, both preparations showed the great advantage of immobilized enzymes, namely, to be reused without loss of activity. However, the shelf life of these derivatives shown in Figure 4 showed to be different.

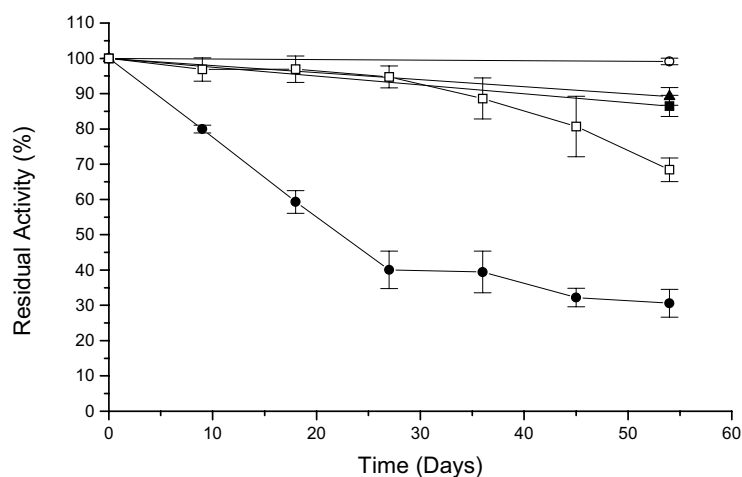


Figure 4. Shelf life of trypsin immobilized onto cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. Samples of free trypsin (▲) and directly immobilized (■) or via BSA (□) were stored at 4°C in the buffer and had their activities established after 54 days. Meanwhile samples of direct immobilized trypsin (●) and via BSA (○) were reused every 9 days until the 54th day. Activities are related to that at the first day (100%).

The trypsin-BSA-membrane retained 99.12% of the initial activity when stored for 54 days in buffer at 4°C whereas the trypsin-membrane and the free enzyme retained 86.5% and 89.17%, respectively. Furthermore, when during these 54 days of storage the immobilized enzymes derivatives were reused the trypsin-membrane lost about 70% of the initial activity whereas the trypsin-BSA-membrane decreased approximately 30%.

The thermal stabilities of the derivatives are depicted in Figure 5. There was no significant difference between them but they showed to be more thermal resistant than the free enzyme in the temperature range 45-65°C.

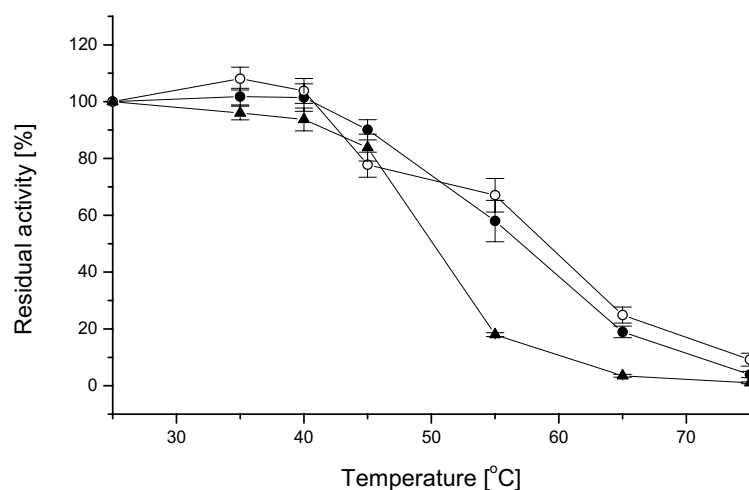


Figure 5 Thermal stability of trypsin immobilized onto cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. Free trypsin (▲) and directly immobilized (●) and via BSA (○) were incubated at indicated temperatures for 15 min and after 25°C equilibration their activities were established using BAPNA as substrate and expressed related to the activity at 25°C incubation (100%).

The results presented above have shown that enzymes like trypsin can be immobilized successfully onto a membrane of cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. either directly or via BSA and stability is improved compared with the free enzyme. Both derivatives were reused seven times without loss of activity. Surprisingly, the direct immobilization yielded a preparation with higher specific activity retention. Probably, steric

Cavalcante, A. H. M.

hindrance impaired the immobilized enzyme via BSA due to protein overloading since this derivative fixed higher amount of trypsin compared to the direct procedure. However, the BSA arm between the enzyme and the cellulosic support provided to the preparation a better shelf life performance. Therefore, the cellulosic exopolysaccharide easily produced by *Zoogloea* sp. in sugarcane molasses fermentation has an additional application, namely, matrix for protein immobilization, besides its actual use as surgical material.

Acknowledgements

Authors thank to M.Sc. Francisco D. Melo for the kindly donation of the extracellular polysaccharide membrane and FACEPE/CNPq and JICA for financial support.

References

- [1] Paterson-Beedle, M.; Kennedy, J. F.; Melo, F. A. D.; Lloyd, L.L. & Medeiros, V. A. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydrate Polymers*, 43, p. 375-383, 2000.
- [2] Takai, M. Bacterial cellulose. In R. D. Gilbert, *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, p. 233-240. Munich: Hanser, 1994.
- [3] Yamanaka, S. & Watanabe, K. Applications of bacterial cellulose. In R. D. Gilbert, *Cellulosic Polymers, Blends and Composites*, p. 207-215. Munich: Hanser, 1994.
- [4] Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M., Mitsunashi, S., Nishi, Y. & Uryu, M. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal Material Science*, 24, p. 3141-3145, 1989.
- [5] Geddie, J. L. & Sutherland, I. W. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, p. 467-472, 1993.
- [6] Sutherland, I. W. *Biotechnology of microbial exopolysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- [7] Ikeda, F., Shuto, H., Saito, T., Fukui, T. & Tomita, K. An extracellular polysaccharide

Cavalcante, A. H. M.

produced by *Zoogloea ramigera* 115. *European Journal of Biochemistry*, v. 123, p. 437-445, 1982.

- [8] Gil, M. H.; Piedade, A. P.; Alegret, S.; Alonso, J.; Martinez-Fàbregas, E. & Orellana, A. Covalent binding of urease on ammonium-selective potentiometric membrane. *Biosensors Bioelectronics*, v. 7, p. 645-652, 1992.
- [9] Sedmak, J.J. & Grossberg, S. E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie® brilliant blue. *Analytical Biochemistry*, v. 79, p. 544-552, 1977.
- [10] Hirayama, K. Akashi, S., Furuya, M. & Fukuhara, K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v. 173, p. 639, 1990.
- [11] Nouaimi, M.; Moschel, K. & Bisswanger, H. Immobilization of trypsin on polyester via different spacers. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p. 567-574, 2001.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que:

- A tripsina foi imobilizada covalentemente na membrana celulósica produzida pela *Zoogloea* sp. tanto por via direta quanto por albumina bovina sérica como braço espaçador;
- A estabilidade térmica da enzima em ambos os derivados, tripsina-membrana e tripsina-BSA-membrana, mostrou-se superior a da enzima solúvel;
- Ambos os derivados após sete re-utilizações sucessivas não apresentam perda de atividade;
- A tripsina-membrana rendeu uma preparação com maior retenção de atividade específica quando comparada com a imobilizada via BSA;
- O derivado tripsina-BSA-membrana apresentou maior estabilidade quando armazenado por 54 dias e quando re-utilizado a cada nove dias pelo mesmo período e,
- Portanto, a membrana celulósica produzida por via fermentativa pela *Zoogloea* sp., se apresenta como um novo suporte, com grande potencialidade, para imobilização de enzimas.

8. ANEXOS

Guide for Authors

Submission of Papers

Papers for Biochemical Engineering Journal should be submitted to one of the Editors: Professor C Webb or Professor H Unno.

Addresses of the Editors may be found on the inside cover of the journal.

Submission of a manuscript implies it is not being simultaneously considered for publication elsewhere and that the authors have obtained the necessary authority for publication.

All papers will be independently refereed.

Types of Contribution

Original papers - these should be complete & authoritative accounts of work which has a special significance and must be presented clearly and concisely.

Review articles - these will normally be commissioned by one of the Editors. Prospective authors of a review article should consult with one of the Editors to check the suitability of their topic & material before submitting their review.

Short communications - will be accepted for the early communication of important and original advances. Such accounts may be of a preliminary nature but should always be complete and should not exceed the equivalent of 3000 words, including figures and tables.

Letters to the editors - Letters commenting on work published in the journal should be sent to one of the Editors.

The journal will also publish *Book reviews*.

Language

All papers submitted to the journal should be written in good English. Authors for whom English is not their native language are encouraged to have their paper checked before submission for grammar and clarity. Authors in Japan please note: upon request, Elsevier Science Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Science Japan, 1-9-15, Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan. Tel: (03) 5561 5032; Fax: (03) 5561 5045.

Manuscript Preparation

Four copies should be provided in double-space typing on numbered pages of uniform size with a wide margin to the left.

Correspondence address

The name, complete postal address, telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should be given on the first page of the manuscript.

Abstract

A brief summary (50-200 words) of the contents and conclusions of the paper and an indication of the relevance of new material should be included at the beginning of the paper.

References

These should be indicated by numerals in square brackets, introduced consecutively in the text and must be listed at the end of the paper in numerical order. Journal titles should be abbreviated according to the chemical Abstracts Service Source Index, 1970 edition, and supplements. The abbreviated titles should be followed by the volume number, year (in parentheses) and page numbers.

Equations

These should be numbered (1), (2) etc.

Illustrations

All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as Figure(s) and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text.

All illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line drawings: Good quality printouts on white paper produced in black ink are required. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied, in triplicate, as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Colour figures can be accepted at the discretion of the Editors. Authors will be expected to contribute towards the cost of colour printing.

Units

The use of SI units is preferred.

Referees

When submitting a paper authors may suggest up to 3 referees, supplying the full name and address in each case. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.

Accepted articles on disk

The final and accepted text should be submitted on a 3.5 in diskette (in addition to a hard copy with original figures). Double density (DD) or high density (HD) diskettes formatted for MS-DOS or Apple Macintosh compatibility are acceptable, but must be formatted to their capacity before the files are copied on to them. The files should be saved in the native format of the word processing program used. Most popular wordprocessor file formats are acceptable. It is essential that the name and version of the word processing program, type of computer on which the text was prepared, and format OF the text files are clearly indicated.

Copyright Transfer

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Science Ltd to protect the copyrighted material for the authors, without the author relinquishing his/her proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of a similar nature, and translations. It also includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any material for which copyright already exists.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first named author if no corresponding author is identified of multi-authored papers) and should be returned within 48 hours of receipt. Corrections should be restricted to typesetting errors; any others may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, since the inclusion of late corrections cannot be guaranteed.

Offprints

Cavalcante, A. H. M.

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

Page charges

There are no page charges.

Author Services

All questions arising after the acceptance of manuscripts, especially those relating to proofs, should be directed to: Elsevier Science Ireland Ltd, Bay 15K, Shannon Industrial Estate, Shannon, Co. Clare, Eire. Tel: +353 (61) 471 944, Fax: +353 (61) 472 144. Authors can also keep a track of the progress of their accepted article through our OASIS system on the Internet. For information on an article go to the Internet page: [OASIS](http://www.elsevier.com) and key in the corresponding author's name and the Elsevier reference number. The full and complete Instructions to Authors can be found on the World Wide Web: access under <http://www.elsevier.com>.

Keywords: 6 keywords should be provided to facilitate indexing and on-line searching. At least 4 of these keywords should be chosen from the list of recommended keywords listed below

- Absorption
- Acetic Acid
- Acetobacter
- Activity Coefficients
- Adsorption
- Aeration
- Aerobic Processes
- Affinity
- Aggregation
- Agitation
- Airlift Bioreactors
- Algae
- Amino Acids
- Amphiphilic Materials
- Amylase
- Anaerobic Processes
- Animal Cell Culture
- Antibiotic
- Aqueous Two Phase
- Artificial Enzymes
- Artificial Intelligence
- Auxotroph
- Axial Dispersion
- Baculovirus
- Batch Processing
- Beer
- Biocatalysis
- Bioconversion
- Biodegradation

- Biodesulfurization
- Biofilms
- Biofilters
- Biogas
- Biokinetics
- Biomedical
- Biomimetics
- Biophysical Chemistry
- Bioprocess Design
- Bioprocess Monitoring
- Bioreactions
- Bioreactors
- Bioremediation
- Biosensors
- Bioseparations
- Biosorption
- Biosynthesis
- Biotransformations
- Brewing
- Bubble Columns
- Bubbles
- Cell Disruption
- Cellulase
- Cellulose
- Cereals
- Chaperonins
- Chemoautotrophes
- Chiral Systems C
- Chromatography
- Citric Acid
- Control
- Dextran
- Diffusion
- Diffusion-Reaction
- Dissolved oxygen
- DNA
- Downstream Processing
- Dynamic Modelling
- Dynamic Simulation
- Enantioseparation
- Environmental preservation
- Enzyme Activity
- Enzyme Biocatalysis
- Enzyme Bioreactors
- Enzyme Deactivation
- Enzyme Production
- Enzyme Technology

- Enzymes
- Ethanol
- Expert Systems
- Extraction Kinetics
- Fed-Batch Culture
- Fermentation
- Filamentous Bacteria
- Filamentous Fungi
- Filtration
- Fixed-Bed Bioreactors
- Fluid Mechanics
- Fluidization
- Fluidized Bed Bioreactors
- Food Engineering
- Fructose
- Fuzzy Logic
- Gas Hold-Up
- Gas-Liquid Mass Transfer
- Genetic Stability
- Global Environment
- Glucoamylase
- Glucose
- Glycerol
- Grain Processing
- Growth Kinetics
- Heat Transfer
- Heterogeneous Biocatalysis
- Heterogeneous Reaction
- Heterotrophes
- Hollow Fibres
- Hybridoma Cultures
- Hydrocyclones
- Image Analysis
- Immobilisation
- Immobilised Cells
- Immobilised Enzymes
- Immunoassay
- Insect Cell Culture
- Instrumentation
- Integrated Processing
- Jet Loop Bioreactors
- Kinetic Parameters
- Lactic Acid
- Lactose
- Large Scale Cultivation
- Lignin
- Lipase

- Liquid Membranes
- Liquid-Liquid Extraction
- Lysine
- Malt
- Mass Transfer
- Membrane Bioreactors
- Mesophiles
- Metabolite Over Production
- Microalgae
- Microbial Growth
- Microcarriers
- Microemulsions
- Micromixing
- Microporous Membranes
- Mixing
- Modelling
- Molecular Imprinting
- Monoclonal Antibodies
- Moving Bed Bioreactors
- Multiphase Bioreactors
- NADH Neural Networks
- Newtonian Fluids
- Non-Newtonian Fluids
- Optimisation
- Oxygen Transfer
- Packed Bed Bioreactors
- Penicillin
- Peptone
- Perfluorocarbon
- Pervaporation
- Physiology
- Plant Cell Bioreactors
- Plant Cell Culture
- Polyclonal Antibodies
- Polypeptides
- Power Consumption
- Process Integration
- Product Inhibition
- Production Kinetics
- Protease
- Protein
- Protein Denaturation
- Protein Recovery
- Proteolysis
- Purification
- Recombinant DNA
- Refolding

Cavalcante, A. H. M.

- Reverse Micelles
- Rheology
- RNA Scale-Up
- Scale-Down
- Sensors
- Separation
- Solid-State Fermentation
- Starch
- Sterilisation
- Streptomycin
- Submerged Culture
- Substrate Inhibition
- Sucrose
- Thermophiles
- Tissue Cell Culture
- Tomography
- Transesterification
- Trickle Beds
- Ultrafiltration
- Viability
- Viscosity
- Waste Treatment
- Waste-Water Treatment
- Water Activity
- Whey
- Xanthan Gum
- Yeast
- Zeolites ----- <