

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM BIOTECNOLOGIA
ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE EM *Bacillus megaterium* sp.
DSM 32

Rafaela Ramalho Guerra

Porto Alegre, 2016.

RAFAELA RAMALHO GUERRA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE TRANSGLUTAMINASE EM *Bacillus megaterium* sp.
DSM 32

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Charley Christian Staats
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Herz
Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFRGS

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Departamento de Tecnologia de Alimentos - UFRGS

Porto Alegre, 2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul . O trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fazer chegar a lugares que nunca pensei alcançar; por ter me capacitado e dado sabedoria para concluir os trabalhos a mim impostos. Por me dar a oportunidade de estudar em uma universidade federal e por me sustentar em todos os anos de graduação.

A meus pais Ana e Paulo, que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar fazendo o possível e o impossível para me dar tudo o que eu precisava.

A meus irmãos Lucas e Eduardo que tornaram meus dias mais alegres durante a caminhada e me ajudaram, sempre que possível, em minhas dúvidas e dificuldades.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub por aceitar orientar este trabalho e prover todo o necessário para que ele fosse realizado, auxiliando sempre que necessário.

À Lovaine Duarte, doutoranda do laboratório 206, que me ensinou muito mais do que testes enzimáticos, mas contribuiu com minha capacidade de raciocínio lógico e ajudou a vencer meus medos e inseguranças. Uma pessoa maravilhosa que Deus colocou na minha vida e que estará sempre em meu coração. Um exemplo de profissional e pessoa.

Ao professor Plinho Francisco Herz do ICTA-UFRGS pela permissão a usar seu laboratório.

Aos amigos do laboratório 212 e 216 do ICTA pelo convívio e ajuda sempre que possível. Em especial à Natália Guilherme Graebin, que me ensinou a montar os biorreatores; à Sabrina que sempre esteve disponível para tirar minhas dúvidas; e ao Paulo Roberto Dall Cortivo, que tornou meus dias mais alegres criando apelidos para todos no laboratório.

Aos alunos do laboratório 210, em especial à Jéssie da Natividade Schöffler, por ter disponibilizado o programa Origin 8.6.

Aos meus professores da graduação, que contribuíram para expandir meu conhecimento intelectual e científico.

À minha prima Ariadne, que sempre acreditou em mim e me encorajou com palavras de incentivo quando eu pensei em desistir.

À minha avó Araci, que me ensinou a ter fé e sempre pediu a Deus um anjo “bem sabido” para me acompanhar nas provas. Saudades eternas!

À minha tia Roselaine, que nunca deixou de orar e acreditar nos planos de Deus na minha vida.

Aos amigos, que permitiram que esta caminhada fosse mais leve e alegre, oferecendo seu apoio e amizade.

Aos demais, que de alguma forma contribuíram com este trabalho, deixo minha gratidão.

“For the Lord gives wisdom; out of his mouth
come knowledge and reason.”

Proverbs 2:6

“Porquanto é o SENHOR quem concede
sabedoria, e da sua boca procedem a
inteligência e o discernimento.”

Provérbios 2:6

RESUMO

Transglutaminase (EC 2.3.2.13) faz parte da família de enzimas que catalisam ligações cruzadas entre grupos carboxiamida de resíduos glutamina, que atuam como doadores acil, e uma variedade de aminas primárias, incluindo o grupo amino de lisinas.

Levando em consideração a sua importância na indústria de alimentos, é significativo a descoberta de novas fontes de transglutaminase, principalmente a transglutaminase microbiana, que não depende do íon Ca^{2+} para seu funcionamento.

No presente trabalho estudou-se o *Bacillus megaterium* como sendo uma possível fonte de transglutaminase. O microrganismo foi submetido a diferentes meios de cultivo e posteriormente a processo fermentativo em biorreator em estado submerso.

O meio que apresentou melhor atividade de transglutaminase foi o meio amido acrescido de 2% de proteína de soja. O processo fermentativo em biorreator teve suas variáveis, como pH, temperatura, aeração e pO_2 controlados para aumentar a eficiência de produção da enzima, resultando em uma atividade máxima de 0,0432 U/mL, no tempo de 288h do experimento.

A atividade de transglutaminase, durante o experimento, foi relacionada com a quantidade de proteína total, concentração de açúcar redutor, concentração de amido, atividade de protease e biomassa.

As próximas etapas deste trabalho envolvem a tentativa de purificação da proteína e identificação do peptídeo por espectrometria de massas. Busca do gene correspondente, clonagem e superexpressão do mesmo. Otimização do meio de cultura, avaliando quais as melhores fontes de carbono, nitrogênio e sais, e por fim, caracterização da enzima, como pH ótimo, temperatura e inibição por metais.

Palavras-chave: transglutaminase microbiana, *Bacillus megaterium*.

ABSTRACT

Transglutaminase (EC 2.3.2.13) is part of the family of enzymes that catalyze cross-linkages between carboxamide groups of glutamine residues, which act as acyl donors, and a variety of primary amines, including the amino group of lysines.

Taking into account its importance in the food industry, the discovery of new sources of transglutaminase, especially microbial transglutaminase, which does not depend on the Ca²⁺ ion for its functioning, is significant.

In the present work, *Bacillus megaterium* was studied as being a possible source of transglutaminase. The microorganism was submitted to different media and then to the fermentation process in a submerged bioreactor.

The Growing medium which showed the best transglutaminase activity was the starch medium plus 2% soy protein. The fermentation process in bioreactor had its variables such as pH, temperature, aeration and pO₂ controlled to increase the enzyme production efficiency, resulting in a maximum activity of 0.0432 U/ mL, in the 288h time of the experiment.

The transglutaminase activity during the experiment was related to the amount of total protein, reducing sugar concentration, starch concentration, protease activity and biomass.

The next steps of this work involve the attempt of purification of the protein and identification of the peptide by mass spectrometry. Search of the corresponding gene, cloning and overexpression of the same. Optimization of the culture medium, evaluating the best sources of carbon, nitrogen and salts, and finally, characterization of the enzyme, such as optimum pH, temperature and inhibition by metals.

Key words: microbial transglutaminase, *Bacillus megaterium*.

LISTA DE ABREVIACOES

mTG Transglutaminase microbiana (*microbial transglutaminase*)

aTG Transglutaminase animal (*animal transglutaminase*)

TGase Transglutaminase

pH Potencial hidrogeniônico

rpm Rotação por minuto

CBZ-gln-gly Carbobenzoxi-glutaminil-glicinil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações catalisadas por mTG	16
Figura 2. Fator XIII de coagulação	17
Figura 3. Estrutura e mecanismo da transglutaminase microbiana	20
Figura 4. Aplicações da transglutaminase microbiana	22
Figura 5. Esquema do experimento inicial	29
Figura 6. Esquema do experimento em biorreator	29
Figura 7. Biorreator de 2L modelo BIOSAT B plus marca Sartorius Stedim	30
Figura 8. Atividade de transglutaminase nos diferentes meios	35
Figura 9. Relação entre atividade de transglutaminase e degradação dos nutrientes do meio decultura.....	36
Figura 10. Relação entre a atividade de transglutaminase e atividade de protease	37
Figura 11. Relação entre a quantidade de proteína total e a atividade de transglutaminase	38
Figura 12. Biomassa e atividade de transglutaminase	39
Figura 13. <i>Bacillus megaterium</i>	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características bioquímicas de algumas transglutaminases microbianas	18
Tabela 2. Atividade de transglutaminase nos diferentes meios	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Transglutaminases	15
2.1.1 Definição e características	15
2.1.2 Transglutaminase animal	16
2.1.3 Transglutaminase microbiana	18
2.2 Utilização de transglutaminase na Indústria	20
2.3 Bacillus megaterium sp. DSM 32	22
2.4 Fermentação em estado submerso e estado sólido	23
3 JUSTIFICATIVA	25
4 OBJETIVO	26
4.1 Objetivo Geral	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Microrganismos	27
5.2 Instrumentação e equipamentos	27
5.3 Meios de cultivo para testes primários	27
5.4 Condições de cultivo	28
4.5 Biorreator	30
4.6 Determinações analíticas	30
4.6.1 Determinação da atividade de transglutaminase	30
4.6.2 Quantificação de proteínas solúveis	31
4.6.3 Determinação da atividade proteolítica	31
4.6.4 Determinação de amido	32
4.6.5 Dosagem de açúcares redutores	32
4.7 Biomassa	32
4.8 Análise gráfica	32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Testes preliminares.....	33
5.2 Cultivo em biorreator.....	34
6 CONCLUSÃO.....	41
7 PERSPECTIVAS.....	42
8 REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

A transglutaminase (EC.2.3.13) é uma enzima capaz de catalisar diversas reações, como a reticulação de proteínas, incorporação de poliaminas em proteínas e a desamidação de glutaminas ligadas a proteínas. Devido a isso, a transglutaminase tem sido amplamente utilizada no processamento industrial, especialmente no processamento de alimentos para melhorar as propriedades funcionais de diversas proteínas, incluindo proteínas da carne, soja, amendoim e proteínas do leite (LIU et al., 2016).

A transglutaminase é amplamente distribuída em diversos organismos, incluindo plantas, mamíferos e microrganismos. Entre as transglutaminases, a transglutaminase microbiana se torna vantajosa por não depender de Ca^{2+} , por apresentar um menor peso molecular e uma ampla especificidade pelo substrato (LORAND; GRAHAM, 2003; RICKERT et al., 2015).

Neste trabalho, o microrganismo utilizado para a produção de transglutaminase foi o *Bacillus megaterium* microrganismo GRAS (Generally Recognized As Safe), que também é utilizado na área industrial por ser capaz de produzir uma variedade de proteínas que podem ser utilizadas em vários setores, por exemplo, a produção de penicilinas sintéticas, baseada na penicilina amidase de bactérias; glicose desidrogenase, utilizada em testes de glicose; β -amilases, que são utilizadas na indústria alimentícia e proteases neutras utilizadas na indústria têxtil (VARY et al., 2007).

Além do substrato, os processos metabólicos dos microrganismos são influenciados pelas condições de cultivo, tais como temperatura, teor de umidade, aeração, concentração do inóculo e período de incubação. Estas condições variam amplamente de espécie para espécie de microrganismo e podem ser manipuladas através de cultivo em biorreator (PANDIAN et al., 2010).

A fermentação, etapa na qual o microrganismo transforma a matéria-prima em produto, pode ocorrer em biorreatores, que são equipamentos onde as condições do processo podem ser monitoradas/controladas, como: tempo, temperatura, velocidade de agitação, vazão de gases, pH, oxigênio dissolvido, entre outros. O controle e manipulação dessas condições durante o processo de fermentação podem levar a um maior rendimento do produto de interesse (REGULY, 2000).

O processo de fermentação pode ser de dois tipos: a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido ou semissólido. A fermentação submersa ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. Já a fermentação em estado sólido ou semissólido ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos (FAZENDA et al., 2008; PANDEY et al., 2000).

Dependendo do processo o produto pode ser encontrado dentro da célula ou fora dela. Esta diferença modifica totalmente os tratamentos finais do produto, que visam sua recuperação. Para os intracelulares, há a necessidade de rompimento da célula o que dificulta e onera o processo de recuperação/separação do produto (BORZANI et al., 1975).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transglutaminases

2.1.1 Definição e características

Transglutaminase, ou proteína-glutamina γ -glutamil transferase (EC 2.3.2.13), é uma proteína pertencente a uma família de enzimas que catalisam reações de acil-transferência, deamidações e ligações cruzadas intra- e intermoleculares entre proteínas e peptídeos (GRIFFIN; CASADIO; BERGAMINI, 2002; STROP, 2014). Os grupos γ -carboxiamida dos resíduos de glutamina de uma cadeia polipeptídica atuam como acil-doadores. Já os acil-aceptores podem ser os grupos ϵ -amino de resíduos de lisina de uma cadeia peptídica, uma lisina livre ou outras aminas primárias. Na ausência destas, até mesmo a água pode servir como acil-aceptor, ocorrendo neste caso a desamidação (GASPAR, A.L.C.; GÓES-FAVONI, S.P., 2014).

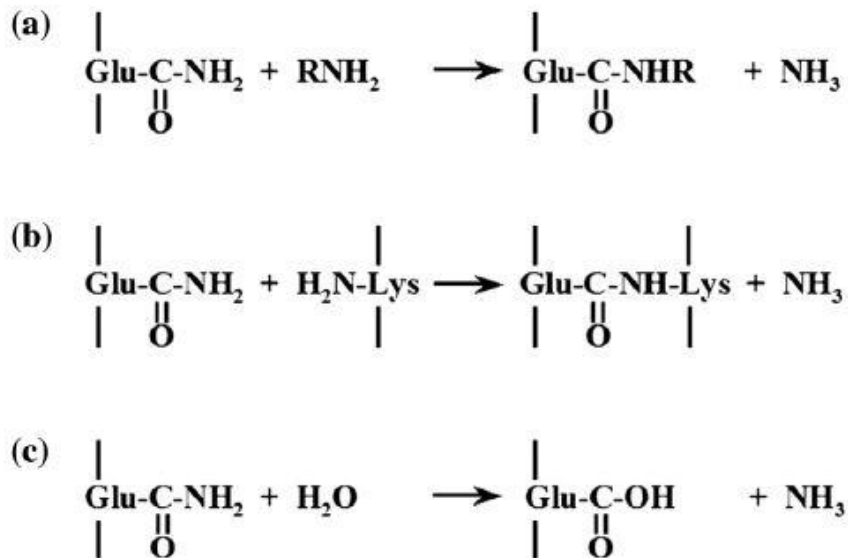
Quando o acil-aceptor é a amina terminal de um resíduo de lisina pertencente a um substrato proteico, o resultado da reação é a formação de ligações cruzadas entre cadeias proteicas (reação de polimerização), conseqüentemente alterando diversas propriedades físicas das proteínas. A ligação formada é chamada de ϵ -(γ -glutamil) lisina (**Fig.1**). Quando a reação ocorre com lisina livre ou outras aminas primárias o resultado da reação é a incorporação de aminas nas cadeias proteicas, com conseqüente alteração da hidrofobicidade da superfície. Já, devido à reação de desamidação, ocorre um aumento no número de resíduos carboxílicos, o que resulta na alteração da carga da proteína (FOLK & FINLAYSON, 1977).

Transglutaminases (TGases) foram descobertas em 1957, através da verificação da atividade de incorporação de aminas de baixo peso molecular em proteínas no fígado de porquinho-da-índia (MYCEK et al., 1959; KLOCK C.; KHOSLA C., 2012). Desde então, esta enzima tem sido encontrada em uma grande quantidade de organismos, exercendo as mais diversas funções (LORAND; GRAHAM, 2003; RICKERT et al., 2015).

As funções fisiológicas das TGases isoladas dessas diversas fontes estão envolvidas em inúmeras reações, como a participação no processo de coagulação sanguínea em mamíferos, em que ocorre a formação de ligações cruzadas entre

proteínas catalisadas pelo fator XIII, uma forma ativa da TGase no plasma (CHUNG et al., 1974) e em plantas, onde catalisam reações de formação do citoesqueleto e da parede celular (SERAFINI-FRACASSINI et al., 1995).

Figura1. Reações catalisadas por mTG.



Fonte: (YOKOYAMA et al., 2004). (a) reação de acil-transferência; (b) ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina, resultando em ligações ϵ -(γ -glutamil) lisina; (c) deamidação.

2.1.2 Transglutaminase animal

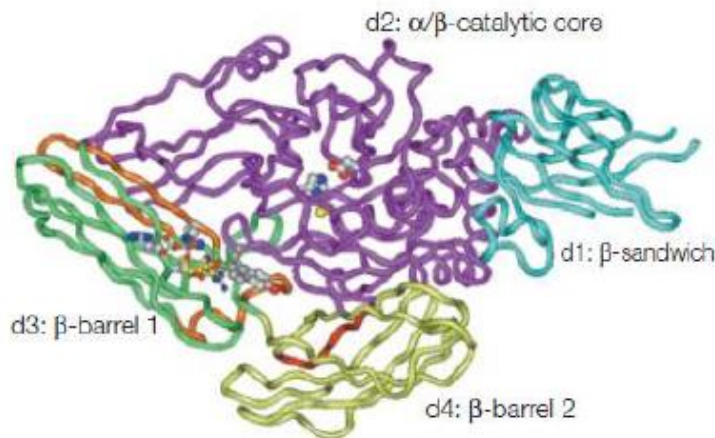
Para fins de aplicação tecnológica, até o final da década de 80, as mais estudadas foram as TGases de fígado de porquinho da índia (MOTOKI & NIO, 1983) e do fator XIII da coagulação bovina (KURTH, 1983). Mas as transglutaminases extraídas de mamíferos, mostraram-se inviáveis para aplicação industrial em larga escala, tendo em vista a produção limitada e a dificuldade de purificação (ZHU et al., 1995).

As transglutaminases animais (aTG) são dependentes do íon Ca^{2+} , possuem uma massa molecular entre 65 a 300 KDa (CHEN; MEHTA, 1999) e são encontradas como monômeros ou multímeros (MUSZBEK et al., 2011).

Entre as principais transglutaminases encontradas em animais pode-se citar o fator XIII de coagulação sanguínea (LORAND, 2001; PANVEL STROP, 2014), e a proteína transglutaminase 2 (TG2), presente em humanos e cujas funções incluem o acometimento da célula à apoptose (CHEN; MEHTA, 1999; RICKERT et al., 2016) e a inibição da adipogênese (MYNENI; MELINO; KAARTINEN, 2015).

A estrutura do fator XIII está representada na **(Fig. 2)**, compreendendo quatro domínios: um domínio beta-sanduiche na extremidade amino, um domínio catalítico e dois domínios em forma de barril, barris 1 e 2, na extremidade carbóxi da proteína (YEE et al., 1994).

Figura 2 - Fator XIII de coagulação.



Fonte: (LORAND; GRAHAM, 2003). Figura mostrando uma transglutaminase eucariótica com estrutura de seus domínios conhecida. Em azul está localizado o domínio β-sanduiche; em roxo está o centro catalítico composto por alfa-hélices e folhas-beta; em verde e amarelo estão os barris-beta 1 e 2, respectivamente.

Outra transglutaminase conhecida é a transglutaminase 2 (TG2), que possui peso molecular de 78kDa e também é dependente de cálcio, como todas as transglutaminases de mamíferos. Essa enzima catalisa modificações pós-traducionais de resíduos de glutamina na superfície dos seus substratos proteicos. A TG2 é abundantemente expressa em diversos órgãos, incluindo, por exemplo, o fígado, o coração, o intestino e células sanguíneas, como os eritrócitos. Pode ser encontrada intra ou extracelular, no citosol, na mitocôndria e no núcleo. Pensa-se que ela pode ser direcionada ao exterior da célula através de um complexo com β1-integrina via endossomas, pois não possui em sua sequência um peptídeo sinal. Na matriz

extracelular, a TG2 se liga firmemente à fibronectina moldando a matriz e promovendo aderência celular e motilidade, além disso está envolvida na patogênese da doença celíaca (DORNELIUS KLÖCK., 2012; STROP., 2014).

2.1.3 Transglutaminase microbiana

A transglutaminase microbiana (mTG) foi primeiramente descrita em *Streptovercillium mobaraense* (ANDO et al., 1989), sendo posteriormente identificada em outras espécies do mesmo gênero e também em espécies do gênero *Bacillus* e *Streptomyces* (NAGY; SZAKACS, 2008). As características de alguns microrganismos conhecidos como produtores de transglutaminase estão representados na **(Tabela 1)**. Estes, podem ter a sua atividade alterada pelo aumento de temperatura ou concentrações de sais no meio, como a presença de KCl e NaCl, que aumentam a atividade e a presença de CaCl₂ que reduz a atividade (KUTMEYER et al., 2005).

Tabela 1 - Características bioquímicas de algumas transglutaminases microbianas.

Microrganismo	pH ótimo de atividade	Temperatura ótima de atividade °C	Referência
<i>Stremitovercillium mobareense</i>	6,5 - 7	28 - 32	(MEIYING et al., 2002)
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	6 - 7	37 – 45	(CUI, et al., 2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	8,2	60	(SUSUKI, et al., 2000)
<i>Bacillus circulans</i>	7	47	(SOARES, et al., 2003)

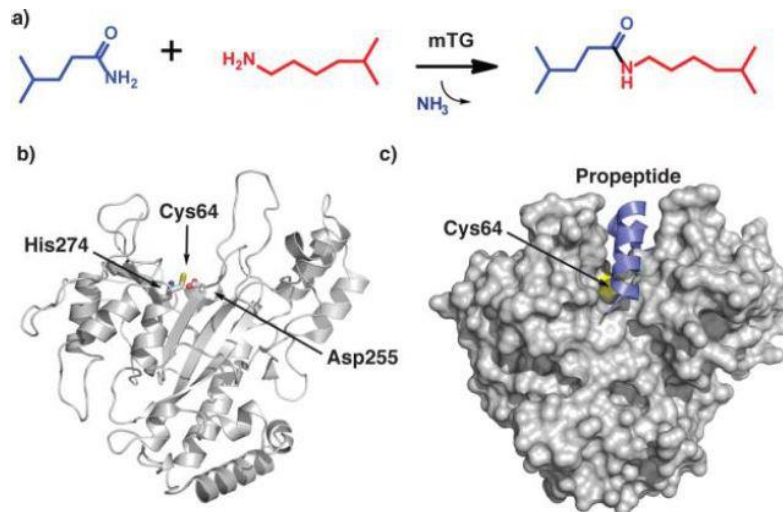
Diferentemente da transglutaminase encontrada em eucariotos, a reação catalisada pela transglutaminase microbiana não depende do íon Ca²⁺. A reação de acil-transferência ocorre pela interação da cadeia lateral de glutamina (doador de acilo) e a amina primária (acceptora de acilo) na presença da mTG, liberando uma molécula de amoníaco, resultando em uma ligação cruzada entre as cadeias laterais

(Fig. 3a). É exclusivamente monomérica e sua tríade catalítica contém resíduos de cisteína, histidina e asparagina ou aspartato (KASHIWAGI et al., 2002; STROP., 2014).

A principal função desta enzima em microrganismos é a de auxiliar na reticulação das proteínas dos endosporos, uma vez que esta foi detectada durante a esporulação de *Bacillus subtilis* (KOBAYASHI et al., 1996; RAGKOUSI; SETLOW., 2004; ZILHÃO et al., 2005), embora outras funções, como a de atuar como um fator de virulência (YU et al., 2015), venham sendo descobertas.

A mTG de *S.mobaraense* foi a primeira a ter sua estrutura tridimensional conhecida, sendo composta por oito folhas-beta circundadas por onze alfa-hélices **(Fig. 3b)**, estando o sítio ativo localizado ao fundo de um sulco localizado a 16 Å da superfície (KASHIWAGI et al., 2002). Esta enzima é expressa como uma pró-enzima cujos 45 primeiros aminoácidos da extremidade amino-terminal formam uma alfa-hélice que bloqueia o sítio catalítico impedindo o acesso do substrato, mantendo a enzima inativa durante a expressão **(Fig. 3c)** (YANG et al., 2011a), atuando também como uma chaperona que auxilia no enovelamento correto da proteína (YURIMOTO et al., 2004). Após a secreção, o pró-peptídeo é clivado, deixando a enzima ativa (STROP., 2014). Durante a cultura de *S. mobaraense*, a pró-enzima é clivada, por pelo menos, duas proteases, uma metaloprotease activadora da família da termolisina (M4) e uma tripeptidilaminopeptidase específica de Ala-Pro que conduz à enzima madura (ZOTZEL J., et al 2003; ZHANG D., et al 2008). A ativação pode também ser realizada por uma série de outras proteases tais como dispase, proteinase K, tripsina bovina ou quimotripsina (SOMMER C., et al, 2012; DU K., et al, 2014; FIEBIG D., et al, 2016).

Figura 3 - Estrutura e mecanismo da transglutaminase microbiana.



Fonte: (STROP, 2014). a) cadeia lateral de glutamina reagindo com amina primária na presença de m TG, b) m TG com tríade catalítica prevista (Cys64, Asp255, His274), c) posição catalítica Cys64 na parte inferior do sítio ativo. O pró-peptídeo α -helicoidal participa/facilita o enovelamento da proteína.

2.2 Utilização de transglutaminase na Indústria

A descoberta de transglutaminases chamou a atenção das mais variadas indústrias pela sua atividade de catalisar modificações pós-traducionais em proteínas. Até meados da década de 80, a transglutaminase extraída do fígado de porquinho-da-índia remanesceu como a única fonte comercial de transglutaminase, sendo seu custo de aproximadamente US\$80/U devido à dificuldade em obter fígados deste animal para extrair a enzima e ao difícil processo de purificação do material (ZHU; TRAMPER, 2008). A dependência de cálcio desta enzima também levava a outros problemas, como a precipitação de proteínas, o que podia acarretar na perda das características desejáveis do produto (MOTOKI; SEGURO, 1998).

Com o isolamento e caracterização da transglutaminase microbiana de *S. mobaraense*, esta enzima se tornou uma alternativa para a indústria frente à transglutaminase animal, devido à sua menor massa molecular, baixo custo de produção e atividade em um amplo espectro de temperaturas e pHs (YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004). Testes de toxicidade mostraram que esta enzima é segura e

não possui potencial carcinogênico ou toxicológico, sendo, portanto, capaz de ser utilizada na indústria de alimentos (K. BERNARD, S. TSUBUKU, S. SHIOYA, 1998).

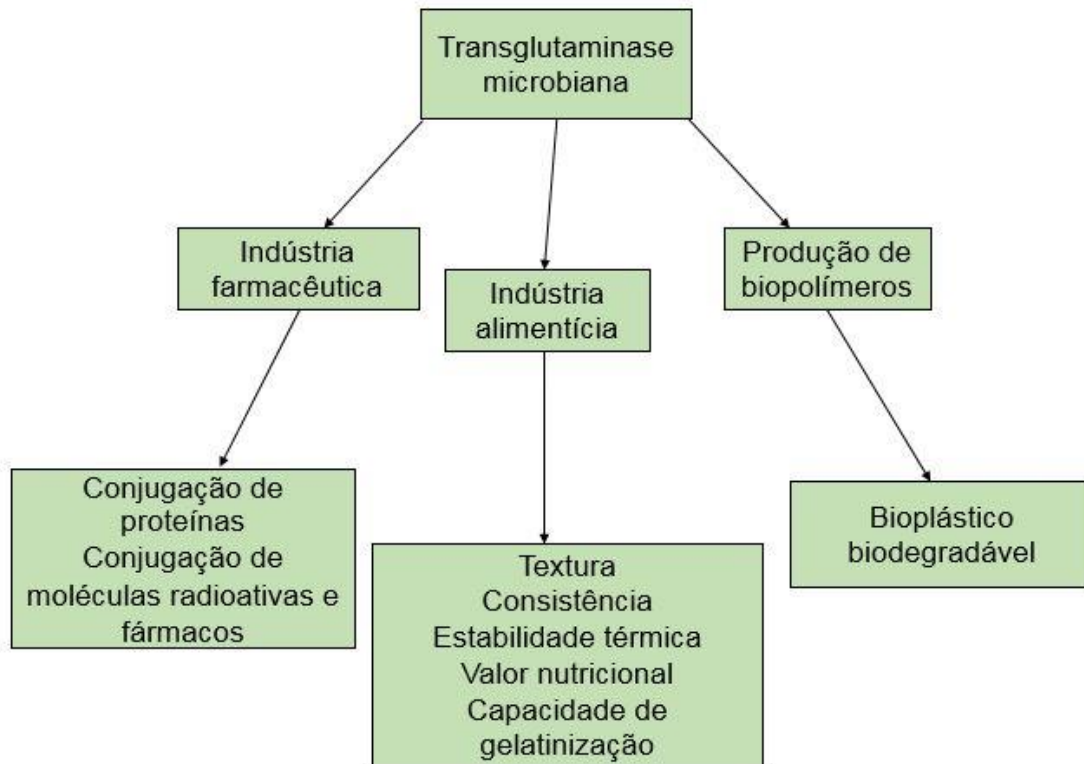
A transglutaminase de origem microbiana (mTG) é principalmente explorada na indústria alimentícia, atuando na alteração da textura da carne, na melhora de consistência de produtos derivados de leite e da resiliência de massas a base de farinha (**Fig.4**) (KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014). Apesar de poder melhorar o valor nutricional dos alimentos, adicionando aminoácidos necessários para a dieta (IKURA et al., 1985), o principal papel exercido pela mTG nesta indústria está na polimerização de proteínas, causando grandes modificações em sua estrutura e aumentando, conseqüentemente, seu valor comercial (NIELSEN, 1995; YOKOYAMA; NIO; KIKUCHI, 2004).

O potencial das transglutaminases fez com que ela venha sendo estudada para os mais variados propósitos nos últimos anos. Na indústria farmacêutica, a mTG está sendo utilizada para ligar anticorpos a drogas a fim de auxiliar no tratamento de câncer (**Fig.4**) (ANDO et al., 2014; STROP, 2014). A ligação de anticorpos a outras moléculas, como a biotina, vem sendo pesquisada para uso em laboratório (JOSTEN et al., 2000), e a fusão de marcadores moleculares como o peptídeo c-myc, que facilita a incorporação de moléculas via transglutaminase devido à presença de uma glutamina reativa em sua estrutura (DENNLER et al., 2015). Recentemente, pesquisas têm demonstrado também o potencial uso de mTG na indústria de biopolímeros através da produção de bioplásticos, tanto biodegradáveis quanto comestíveis, utilizando esta enzima (**Fig.4**) (PORTA et al., 2011).

A transglutaminase microbiana é considerada um aditivo eficiente, porém caro, para a indústria. Mesmo após mais de 20 anos de sua descoberta, a transglutaminase de *S. mobaraense* ainda é a principal fonte desta enzima para a indústria (ARRIZUBIETA, 2007), sendo produzida unicamente pela empresa japonesa Ajinomoto sob vários nomes comerciais. Nos últimos anos, muitos pesquisadores tentaram produzir esta enzima através de manipulação genética usando diferentes microorganismos hospedeiros, tais como *Streptomyces lividans* (LIN et al., 2006), *Escherichia coli* (RICKERT et al., 2015) e *Pichia pastoris* (BURCU GÜNDÜZ, 2012). Apesar da expressão desta enzima ter se mostrado difícil devido a toxicidade da enzima ativa no interior da célula hospedeira, produzindo proteínas insolúveis em corpos de inclusão e baixa atividade, alguns pesquisadores obtiveram sucesso ao

expressar a proteína juntamente com uma protease desenhada para interagir com o pró-peptídeo de forma dependente de temperatura (RICKERT et al., 2015).

Figura 4 - Aplicações da transglutaminase microbiana.



Fonte: (STROP ,2014) modificada.

2.3 *Bacillus megaterium* sp. DSM 32

O *Bacillus megaterium* é um microrganismo Gram-positivo, aeróbio, com a capacidade de formação de esporos, sendo encontrado em uma vasta gama de habitats (WU et al., 2001).

O *B. megaterium* é também capaz de utilizar mais de 62 espécies diferentes de fontes de carbono que incluem porém não se limitam a: glicose, lactose, frutose, maltose, trealose, glicerol, amido, além de formatos e acetatos. É frequentemente utilizado em laboratório por ser um hospedeiro de clonagem que pode abrigar vários vetores plasmídicos permanecendo estável. Além disso, é um bom vetor de expressão, pois não possui proteases alcalinas, permitindo assim a síntese de proteínas recombinantes. O gênero possui ainda resistência a condições com elevada

temperatura e pressão osmótica, o que facilita sua utilização nos mais variados processos (WU et al., 2001; VARY et al., 2007; PANDIAN et al., 2010).

Esta bactéria ainda apresenta grande importância tecnológica, sendo um dos principais microrganismos utilizados na produção de penicilina sintética e produzindo também diversas enzimas que podem ser utilizadas na produção de alimentos (VARY et al., 2007).

2.4 Fermentação em estado submerso e estado sólido

No fermentador, o meio de cultura recebe o inóculo, suspensão do microrganismo capaz de garantir a fermentação do meio. O processo de fermentação é, então, controlado (temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes, entre outros) de modo a manter condições favoráveis ao trabalho do microrganismo. Completado o processo, o meio fermentado é encaminhado aos tratamentos finais, com o intuito de separar o produto dos subprodutos (BORZANI et al., 1975).

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto à condução do processo (descontínuos, semicontínuos ou contínuos), quanto ao modo de cultivo, (processos em estado sólido ou submerso) e quanto ao suprimento de oxigênio (processos aerados ou não aerados) (REGULY, 2000).

O processo fermentativo em estado sólido pode ser definido como aquele que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre, empregando um substrato natural como fonte de carbono/energia (PANDEY et al., 2000; ALONSO et al., 2001). Entende-se por água livre a não separação ou escorrimento da água da matriz sólida, que deve conter umidade suficiente, na forma absorvida ou complexada, permitindo o crescimento do microrganismo (COSTA, 1996).

A fermentação em estado submerso consiste na utilização de um meio fermentativo líquido no qual os nutrientes encontram-se dissolvidos ou suspensos. Esta técnica tornou-se o método fermentativo preferido para as aplicações comerciais, sendo utilizada pela maioria das indústrias de bioprodutos. Esse tipo de fermentação é intrinsecamente menos problemático, pois a transferência de massa, calor e oxigênio são facilitadas e a homogeneidade geralmente é superior. Portanto, este

processo é mais confiável e reprodutível, facilmente monitorado e o controle dos parâmetros chaves são mais flexíveis (FAZENDA et al., 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Transglutaminases são enzimas muito utilizadas na indústria de alimentos, atuando na reestruturação de alimentos protéicos. Ultimamente, esta enzima vem sendo utilizada nas mais variadas indústrias para a obtenção de produtos biotecnológicos, com destaque para a indústria farmacêutica, em que transglutaminases estão sendo utilizadas para ligar anticorpos a drogas a fim de tornar o tratamento de certas doenças mais efetivo. Um dos empecilhos para o seu uso está no fato da produção desta enzima ser considerada cara e ineficiente, sendo produzida através do cultivo de *Streptoverticillium mobaraense*, que exige substratos caros, o tempo de produção da enzima é demorado e rende 2 U/mL de atividade enzimática. Desta forma, a busca por novos microrganismos produtores de transglutaminases pode ser uma alternativa para encontrar enzimas mais eficientes em determinados processos e que possam ser produzidas em menor tempo e a custos mais baixos, aumentando a eficiência do processo e diminuindo, conseqüentemente, os custos dos produtos derivados deste processo.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

- Estudar a produção de transglutaminase em *Bacillus megaterium* na sua forma selvagem.

4.2 Objetivos Específicos

- Testar meios de cultura que possam influenciar e aumentar a produção de transglutaminase.
- Produzir transglutaminase em maior escala utilizando Bioreator de 2L.
- Relacionar a atividade de transglutaminase com a concentração de açúcar redutor ; concentração de amido ; atividade de protease e biomassa.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Microrganismos

A linhagem de microrganismo utilizada neste trabalho *Bacillus megaterium* DSM32 foi selecionada de um trabalho anterior (Luvizetto D. J., 2007) e cedida, primeiramente, pelo Laboratório de Bioprocessos da COPPE/UFRJ. Esta foi identificada como *Bacillus megaterium* utilizando-se sequenciamento de análise de árvore filogenética de fragmentos de DNA r 16S realizado pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CQPBA) da UNICAMP.

A bactéria foi armazenada congelada, em freezer -80°C, no meio de cultura com 20% de glicerol, crioprotetor, que tem a função de proteger as células para não romper durante o congelamento.

5.2 Instrumentação e equipamentos

Todos os equipamentos, meios de cultura e vidrarias foram esterilizados em autoclave vertical modelo AV-75 da marca Phoenix Equipamentos.

O cultivo do microrganismos, nos testes primários, foi feito em frascos Erlenmeyer e submetidos a incubação do tipo “shaker” com agitação orbital e temperatura controlada da marca Nova Técnica.

As leituras espectrofotométricas foram feitas em aparelho modelo Ultrospec 3100 da marca Amersham Biosciences.

As determinações de pH foram realizadas em pHmetro marca KASVI .

As centrifugações foram realizadas em microcentrífuga da marca Sigma modelo 2K15 e para volumes maiores foi usada a centrífuga da marca Termo scientific modelo ST 16R.

5.3 Meios de cultivo para testes primários

Os testes primários foram realizados com o objetivo de selecionar o melhor meio de cultura para a produção de transglutaminase. O meio de cultura em que o

microrganismo apresentar maior atividade será escolhido para prosseguir os experimentos.

Foram escolhidos quatro meios de cultura. Dois relacionados com a produção de transglutaminase em trabalhos anteriores e outro relacionado com a indução de esporulação do *Bacillus megaterium*.

- Meio para esporulação SSM- Sucrose salt medium (KOLODZIEJ B.J., SLEPECKY R. 1964)(VERMA N. et al.,2013): 0,1% sacarose; 0,1% NaCl; 0,24% KH_2PO_4 ; 1,1% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0007% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,0005% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7.1. Os fosfatos foram autoclavados separadamente e o pH foi ajustado com NaOH 1M.
- Meio otimizado para produção de transglutaminase (VOLKEN C.F. et al, 2008): glicerol (9 g/L); sacarose (2 g/L); peptona (7 g/L); triptona (1 g/L); Na_2HPO_4 (1 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 g/L) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L).
- Meio contendo amido (ANDO H. et al.,1989): amido solúvel (20 g/L); peptona (20 g/L); extrato de levedura (2 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g/L); K_2HPO_4 (2 g/L); KH_2PO_4 (2 g/L).
- Meio contendo amido acrescido de 2% de proteína de soja (EVANDRO, A. 2010).

5.4 Condições de cultivo

Pré-inóculo: *Bacillus megaterium* foi inoculado em frascos Erlenmeyer, de 250 mL, contendo 100mL de meio LB até atingir DO = 1 em espectrofotômetro a 600nm, sob as condições de incubação de 30 °C e 180rpm.

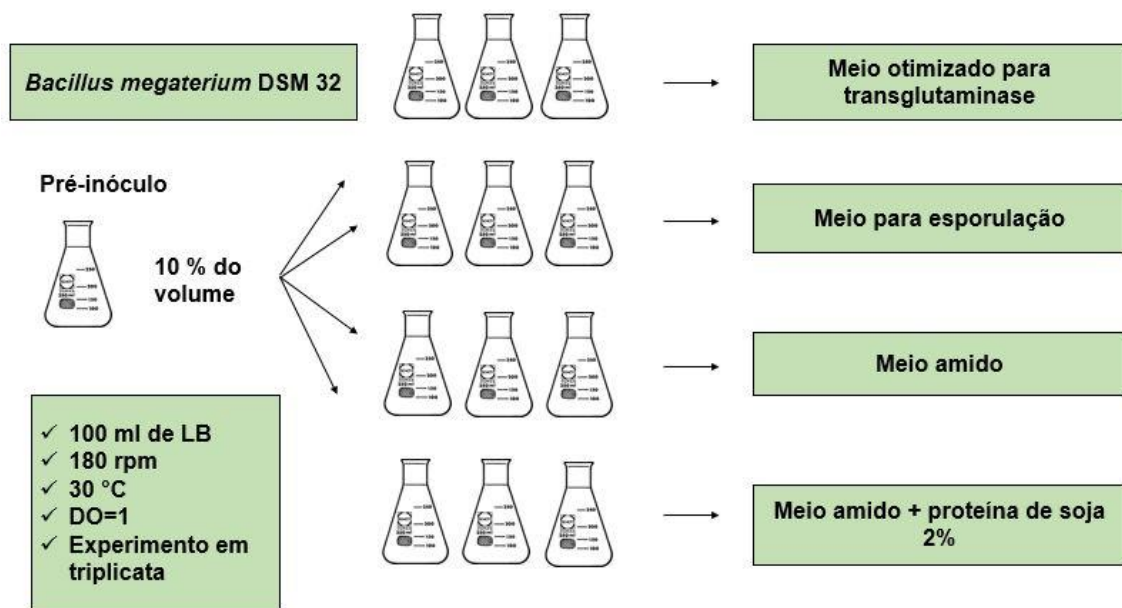
Testes iniciais: 10% do volume do pré-inóculo foi centrifugado a 3000x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado, uma vez, com água destilada estéril e ressuspendido nos respectivos meios: meio para esporulação, meio amido, meio amido acrescido de 2% de proteína de soja e meio otimizado para transglutaminase (**Fig.5**). Os testes foram feitos em triplicata e as amostras foram submetidas a incubação em “ shaker “ durante 10 dias a 30 °C e 180rpm.

Biorreator: 2L de meio amido enriquecido com 2% de proteína de soja, acrescido de 0,005% de anti-espumante, foram utilizados para a fermentação. Para o inóculo, 10% do volume de pré-inóculo foi centrifugado a 3000x g por 15 minutos e o

sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com água destilada estéril e ressuspensionado em 200 ml de meio contendo amido acrescido de proteína de soja 2% (**Fig.6**). O experimento prosseguiu por 12 dias sendo que no quinto dia foi suspenso o fornecimento de oxigênio para induzir a esporulação. As determinações analíticas foram feitas de 24 em 24h.

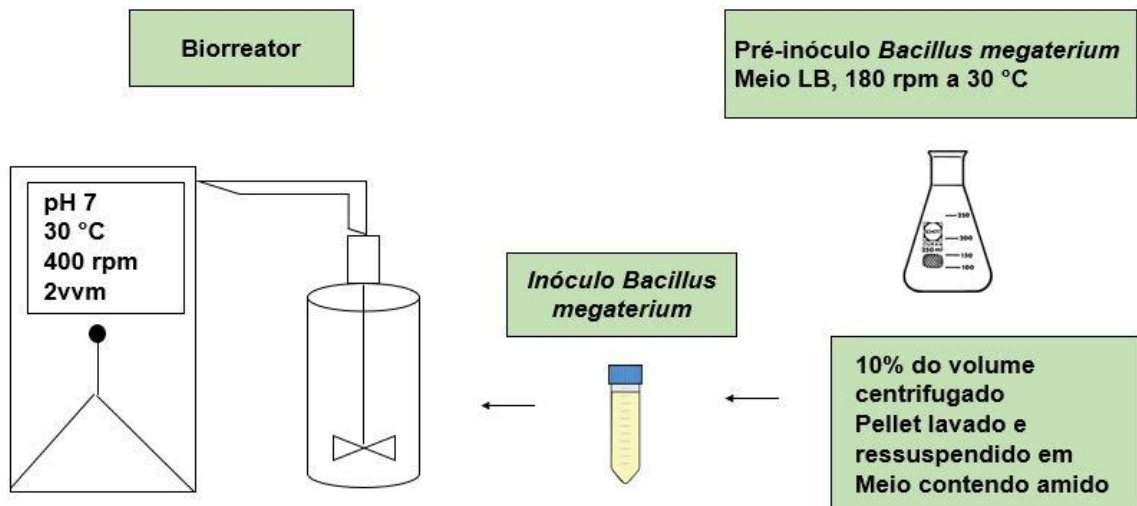
As condições de cultivo em Biorreator foram de 2vvm, 400rpm, 30 °C e pH 7. O pH foi controlado automaticamente com a adição de NaOH 1M e ácido fosfórico 1M.

Figura 5 - Esquema do experimento inicial.



Fonte: (do autor).

Figura 6 - Esquema de experimento em biorreator.



Fonte: (do autor).

4.5 Biorreator

Para realização dos cultivos em escala maior, utilizou-se um biorreator modelo BOSAT B plus marca Sartorius Stedim. Este consiste em um vaso de vidro com capacidade de 2L, acoplado a um sistema de controle digital integrado, sendo possível o controle de algumas variáveis do processo tais como temperatura, pH, agitação e pO_2 .

Figura 7 - Biorreator de 2L modelo BIOSAT B plus marca Sartorius Stedim.



Fonte : (do autor).

4.6 Determinações analíticas

4.6.1 Determinação da atividade de transglutaminase

A atividade enzimática foi determinada pela técnica de formação de hidroxamato (GROSSOWICZ et al., 1950).

Alíquotas foram retiradas a cada dia e centrifugadas em microcentrífuga a 14000 g, 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de transglutaminase.

Em 400 µL de amostra adicionou-se a mesma quantidade de reagente A. Após homogeneização incubou-se por 10 minutos a 37 °C e interrompeu-se a reação adicionando 400µL do reagente B. Este foi centrifugado e em seguida, procedeu-se a leitura da absorbância a 525 nm. O branco foi feito nas mesmas condições, mas incubou-se o sobrenadante a 100 °C para inativação da enzima. A curva padrão foi feita com ácido L-glutâmico-γ-monohidroxâmico. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1,0 µmol de hidroxamato por minuto nas condições do ensaio.

Reagente A: Tampão Tris-HCl 200 mM contendo 100 mM de hidroxilamina, 50 mM de CaCl₂, 10 mM de glutatona reduzida e 30 mM de CBZ-Gln-Gly.

Reagente B: solução 1:1:1 (v/v/v) de HCl 3 N; ácido tricloroacético 12%, FeCl₃.6H₂O 5% dissolvido em HCl 0,1 N.

4.6.2 Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação de proteínas solúveis no meio foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, M.M., 1976).

4.6.3 Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada pelo método adaptado (SARATH et al., 1989) com azocaseína como substrato.

Em tubos de microcentrífuga contendo 250 µL de uma solução-substrato com 2% de azocaseína em tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 7,0 adicionou-se 150 µL de extrato enzimático. A mistura foi incubada a 40 °C por 40 minutos e no final deste período adicionou-se ácido tricloroacético (TCA) a 10% em cada tudo. Para cada amostra enzimática preparou-se um branco, misturando, nesta ordem, enzima, TCA e substrato azocaseína. Após 15 minutos de repouso centrifugou-se os tubos a 14000 g por 5 minutos. Transferiu-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio contendo 1 mL de hidróxido de sódio 1,0 M. A absorbância desta solução foi determinada a 440 nm em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir, em cubeta de 1 cm, a variação de uma unidade na absorvância, sob as condições do método.

4.6.4 Determinação de amido

A quantidade de amido presente no meio foi determinada pelo método de Fuwa (FUWA, H., 1954).

O reagente de Fuwa foi preparado pela mistura de uma solução alcoólica de iodo a 1%, uma solução aquosa de iodo de potássio a 10% e água na proporção de 1:1:3, respectivamente.

Foram pipetados 10 μ L de cada amostra referente aos diferentes tempos de cultivo para tubos de ensaio. Em cada tudo foi acrescentado um volume de 40 μ L de solução tampão acetato de sódio 500 mM pH 6; 450 μ L de água destilada, 200 μ L de ácido acético 1M, 3,1mL de água destilada e 200 μ L de reagente de Fuwa. Os tubos foram homogeneizados em vórtex, e a absorvância de cada amostra foi determinada a 660 nm.

4.6.5 Dosagem de açúcares redutores

Os açúcares redutores totais foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico conforme (MILLER , 1959).

4.7 Biomassa

A quantificação de biomassa foi feita por peso seco em gramas de célula por litro de meio. O experimento foi feito em duplicata.

Alíquotas de 10 mL foram colocadas em tubos falcons com capacidade para 15 mL. Centrifugou-se as amostras durante 15 minutos a 5000 g e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de determinação analítica. O pellet foi lavado, duas vezes, e incubado em estufa a 100 °C até atingir peso constante.

4.8 Análise gráfica

Os gráficos de atividade foram feitos no software Origin 8.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes preliminares

Os testes preliminares foram feitos com o objetivo de se obter o meio de cultura que apresentasse maior atividade de transglutaminase e são apresentados na **(Tabela 2)**, onde é possível observar o início de atividade, na maioria dos meios de cultura, a partir de 144h de incubação, tempo aproximado em que o microrganismo começa a esporular, contribuindo assim, com a hipótese de que a produção de transglutaminase pode estar envolvida com a formação do endosporo bacteriano.

No meio contendo amido acrescido de 2% de proteína de soja ocorreu um registro de atividade em 96h de incubação, 48h antes do primeiro registro de atividade no meio contendo apenas amido, confirmando resultados de trabalhos anteriores, onde o extrato de soja, a farinha de soja ou a proteína de soja acrescidos no meio, anteciparam e/ou aumentaram a atividade de transglutaminase (EVANDRO, A. 2010).

Tempo (h)	Amido	Amido + soja	Meio otimizado	Meio esporulação
24	-	-	-	-
48	-	-	-	-
72	-	-	-	-
96	-	0,0498	-	-
120	-	0,0507	-	-
144	0,0511	0,0258	0,0076	-
168	0,0250	0,0242	0,0151	-
192	0,0184	0,0043	0,0076	-
216	0,0259	-	0,0035	-
240	0,0072	-	0,0018	-

Tabela 2 - Atividade de transglutaminase (U/mL) em função do tempo prodizado por *Bacillus megaterium*.

O meio otimizado para a produção de transglutaminase apresentou atividades muito baixas em relação aos meios contendo amido. Já no meio para induzir a esporulação do *Bacillus megaterium*, composto por sacarose e sais, não apresentou atividade em nenhuma das horas de experimento, sugerindo que o microrganismo não

produz transglutaminase sempre que induzido a esporulação, mas precisa do amido ou de outras fontes de carbono para que a enzima seja produzida de forma extracelular.

Contudo, o meio considerado com maior atividade e utilizado nos experimentos seguintes foi o meio amido acrescido de 2% de proteína de soja, pois este apresentou atividade de transglutaminase antes dos outros meios e permaneceu por mais tempo nas mesmas condições. Característica importante quando se trata de produção de enzimas em escala industrial.

Os outros meios apresentaram um valor de atividade máxima e nas horas seguintes este decaiu drasticamente.

Os dados foram plotados em gráficos para melhor visualização do tempo em que os meios apresentaram a atividade máxima de transglutaminase e a sua estabilidade **(Fig.8)**.

5.2 Cultivo em biorreator

O cultivo em biorreator durou 12 dias e valores como, biomassa, açúcar redutor, atividade de protease, atividade de transglutaminase, quantidade de proteína total e concentração de amido, foram acompanhados no decorrer do experimento.

Foram relacionados os valores de atividade de transglutaminase, açúcar redutor e concentração de amido presente no meio **(Fig.9)**. Esta relação teve como objetivo observar o tempo onde a bactéria começaria a degradar o amido para utilizar a glicose resultante como fonte de carbono. Também foi observado o tempo em que a concentração de glicose diminuiria, levando à esporulação da bactéria pela falta de nutrientes. Contudo, foi possível acompanhar o metabolismo da bactéria e relacionar o decréscimo de nutrientes presentes no meio com o início da esporulação e o início da atividade de transglutaminase.

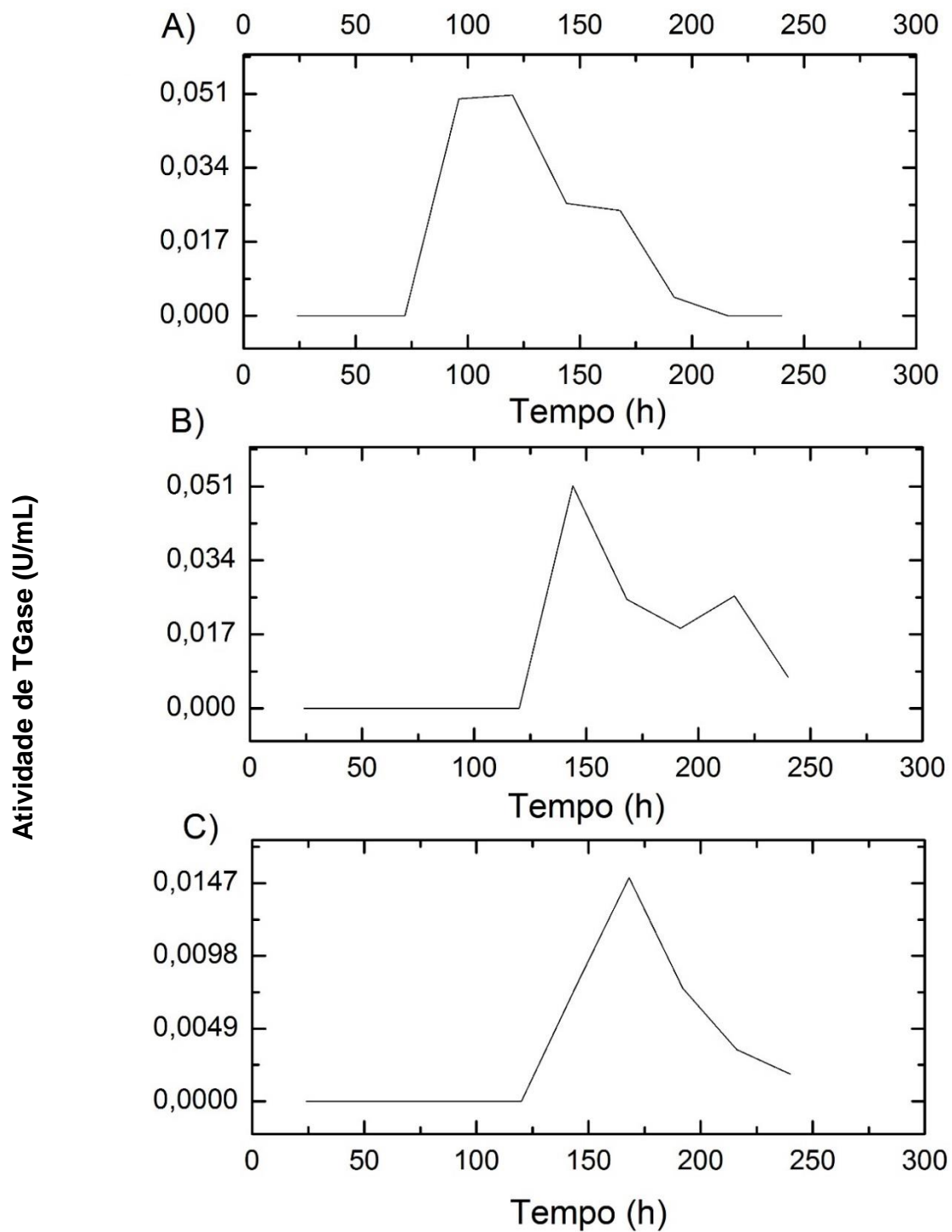


Figura 8 - Atividade de transglutaminase nos diferentes meios. Comportamento da atividade de transglutaminase A) Meio contendo amido acrescido de 2% de proteína de soja, B) meio contendo amido e C) meio otimizado para transglutaminase.

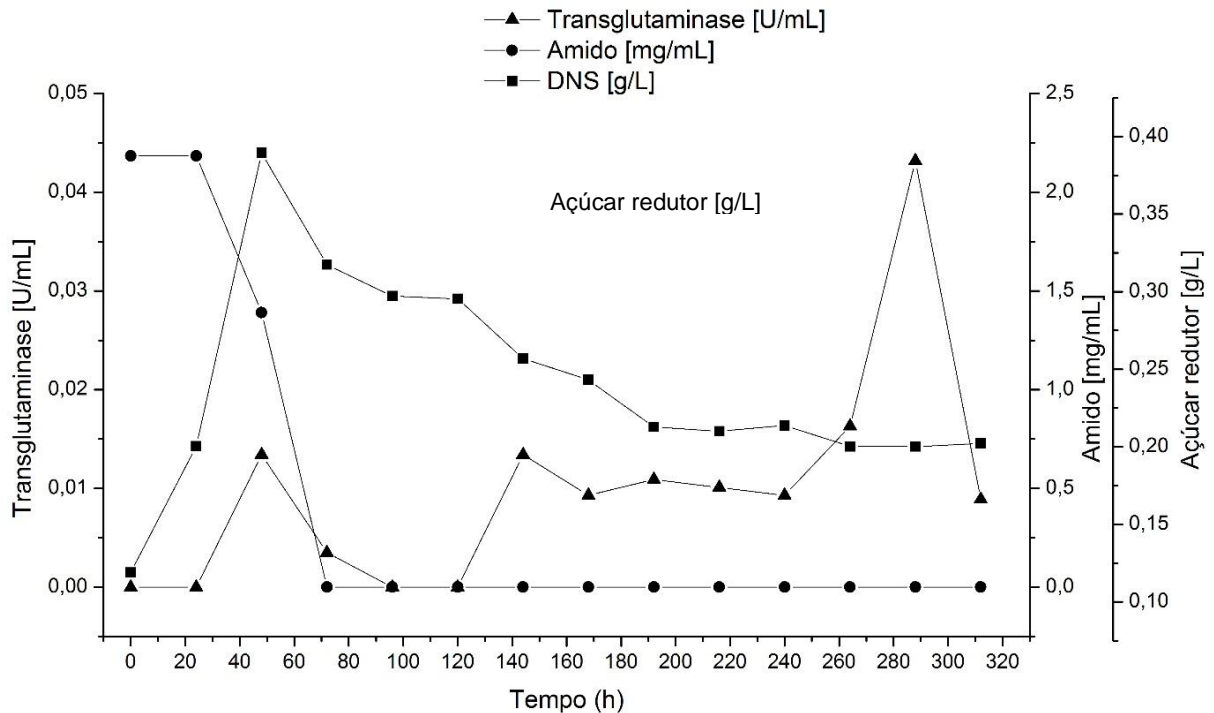


Figura 9 - Relação entre atividade de transglutaminase e degradação dos nutrientes do meio de cultura.

É possível observar que o amido foi totalmente hidrolizado no tempo de 72h e a concentração de açúcar redutor teve sua concentração máxima no mesmo tempo. Sugerindo que todo amido foi degradado pelas amilases e convertido em glicose.

No tempo de 120h, interrompeu-se a entrada de oxigênio com o objetivo de acelerar o processo de esporulação, já que a concentração de açúcar redutor começou a diminuir. Nota-se que ao cessar o oxigênio ocorreu um pico na atividade de transglutaminase, no tempo de 144h. Após esse período, ela decresceu levemente e se manteve estável até o tempo de 288h, onde apresentou o seu valor máximo de atividade.

Diferentemente dos testes iniciais, o cultivo em biorreator apresentou uma atividade de transglutaminase inicial no tempo de 48h, com um tempo de 48h a menos do primeiro valor apresentado nos testes em menor escala. Contudo, foi necessário mais tempo de incubação para que a atividade de transglutaminase apresentasse seu valor máximo de 0,0432 U/mL, menor que o valor máximo apresentado no experimento em menor escala.

Para um melhor entendimento da atividade de transglutaminase frente ao comportamento metabólico do microrganismo, foi relacionado o valor de atividade com a atividade de proteases presentes no meio (**Fig.10**).

Essa relação permite observar que o maior ponto de atividade de transglutaminase está presente quando a atividade de protease é menor, sugerindo a degradação da transglutaminase por alguma protease produzida pelo próprio microrganismo. Embora a transglutaminase de *Streptoverticillium mobarensis* necessite de proteases para a sua ativação, em *Bacillus subtilis* a enzima é expressa de forma madura (LIU, et al., 2014) sugerindo que o mesmo ocorra com *Bacillus megaterium*. Contudo a proteína pode ser expressa de forma ativa, mas é degradada por proteases presente no meio de cultivo.

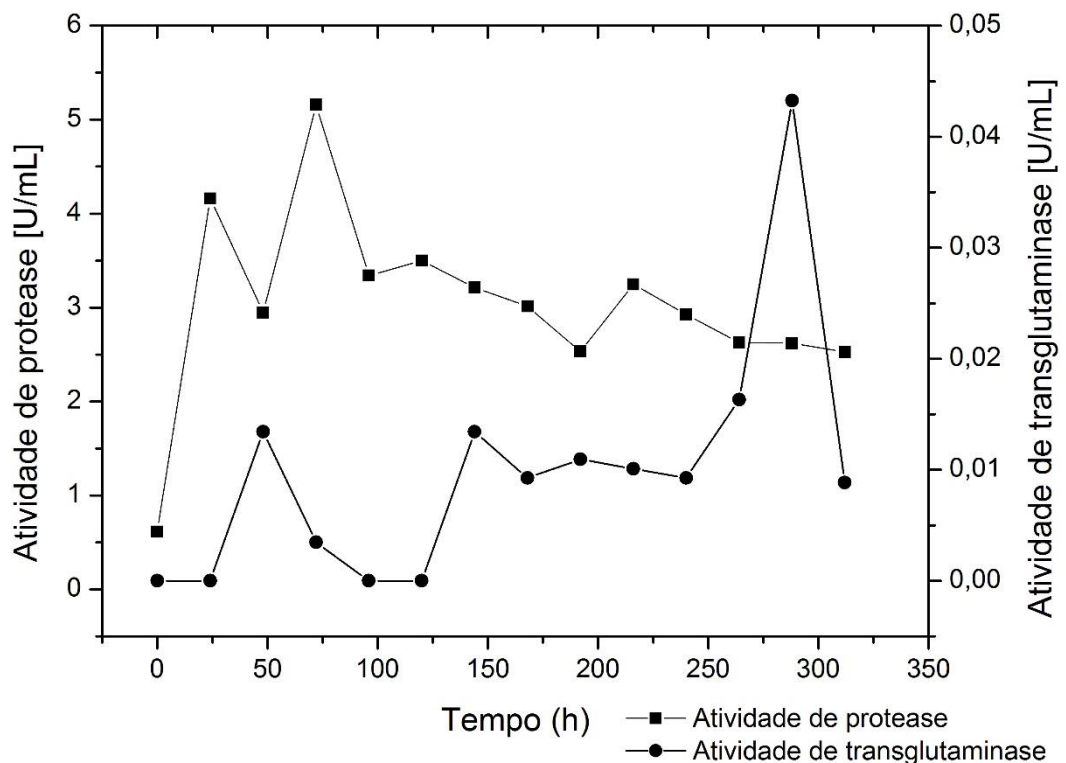


Figura 10 - Relação entre a atividade de transglutaminase e atividade de protease.

Uma relação entre a quantidade de proteína total e a atividade da transglutaminase também foi feita (**Fig. 11**).

Verificou-se que, nas primeiras 60h, a transglutaminase apresentou atividade enquanto a quantidade de proteína total ainda era baixa.

Após 100h de experimento, no momento em que a vazão de oxigênio foi interrompida no biorreator, no tempo de 120h, a quantidade de proteína total apresentou seu maior valor de 0,0012 g/mL enquanto que a atividade de transglutaminase não foi observada nesse mesmo tempo. Isso pode reforçar a hipótese da presença de proteases degradando ou interferindo na atividade da transglutaminase no meio, pois quando a quantidade de proteína total começa a diminuir, após 120h, a atividade de transglutaminase começa a ser observada novamente, apresentando seu maior valor de 0,0432 U/mL no tempo de 288h. Esses resultados podem indicar a esporulação da bactéria, resultando na diminuição do seu metabolismo e conseqüentemente na diminuição na produção de algumas proteases, permitindo assim, o aumento na atividade de transglutaminase.

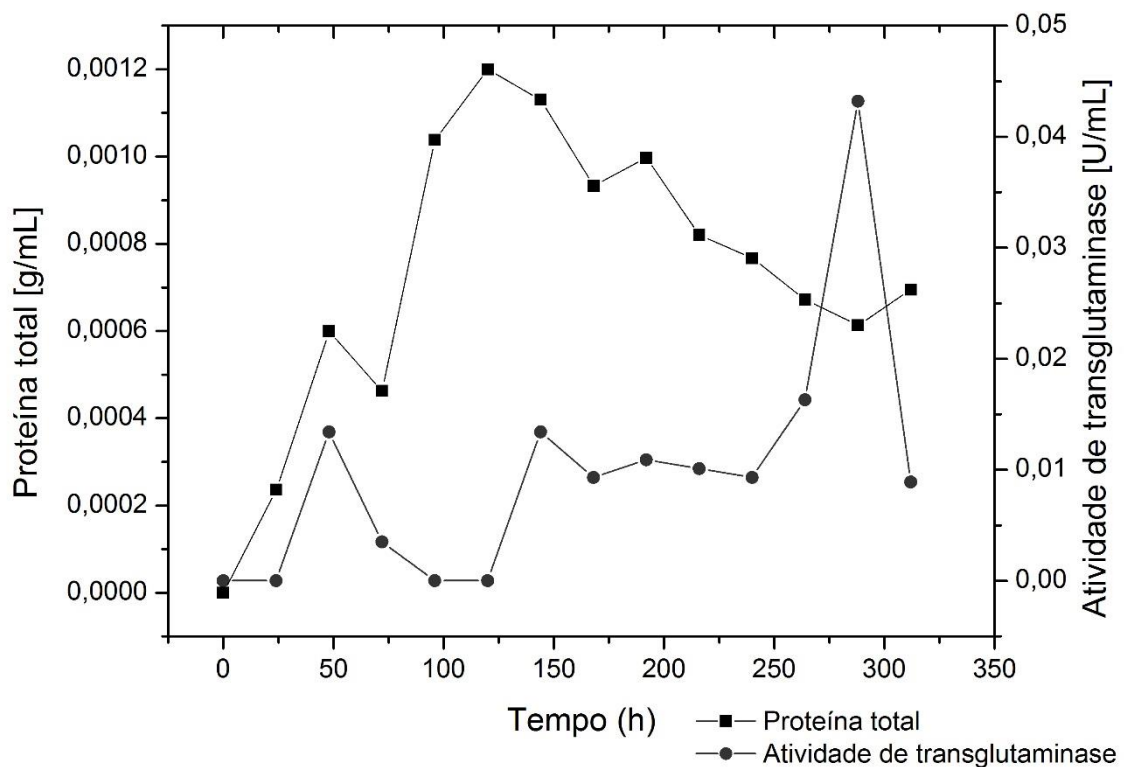


Figura 11 - Relação entre a quantidade de proteína total e a atividade de transglutaminase.

A atividade de transglutaminase e biomassa também foram observados (**Fig.12**). Pode-se observar uma queda brusca do peso seco após a retirada de oxigênio em biorreator, para indução da esporulação. Isso pode ocorrer devido ao tamanho da célula do *Bacillus megaterium*, que é um microrganismo relativamente grande quando comparado a outros do gênero *Bacillus*. Os seus esporos podem apresentar uma massa menor que as células vegetativas (**Fig.13**).

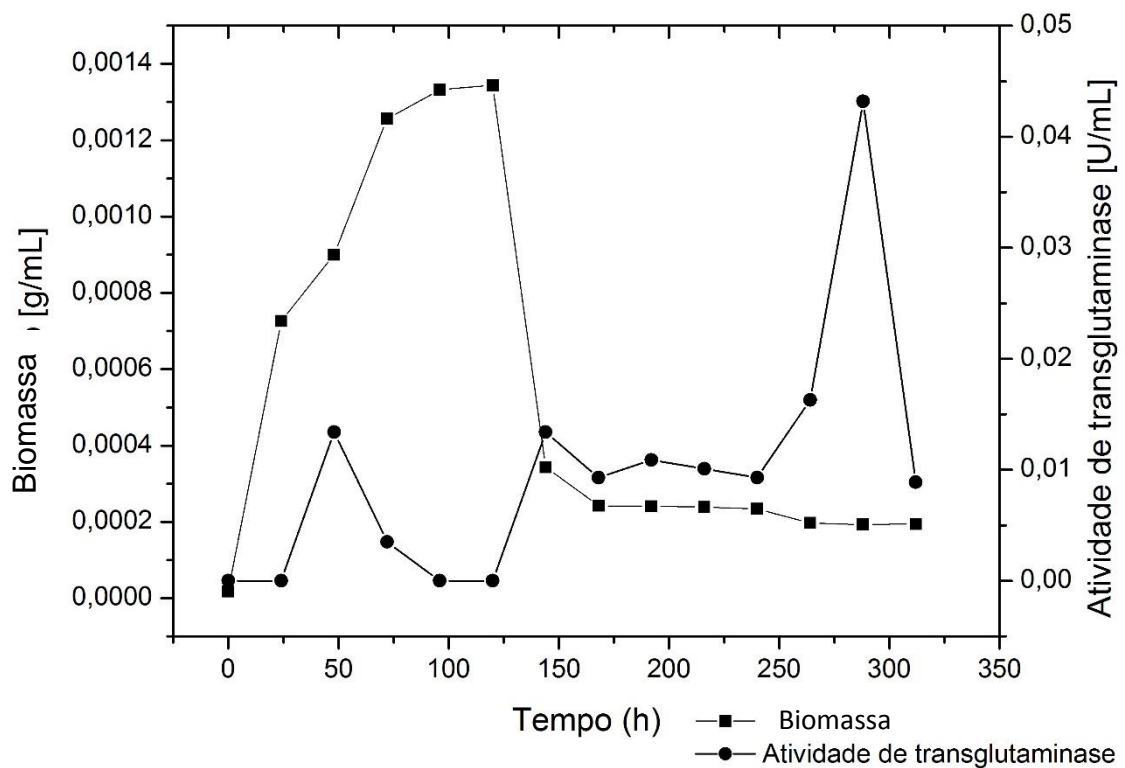
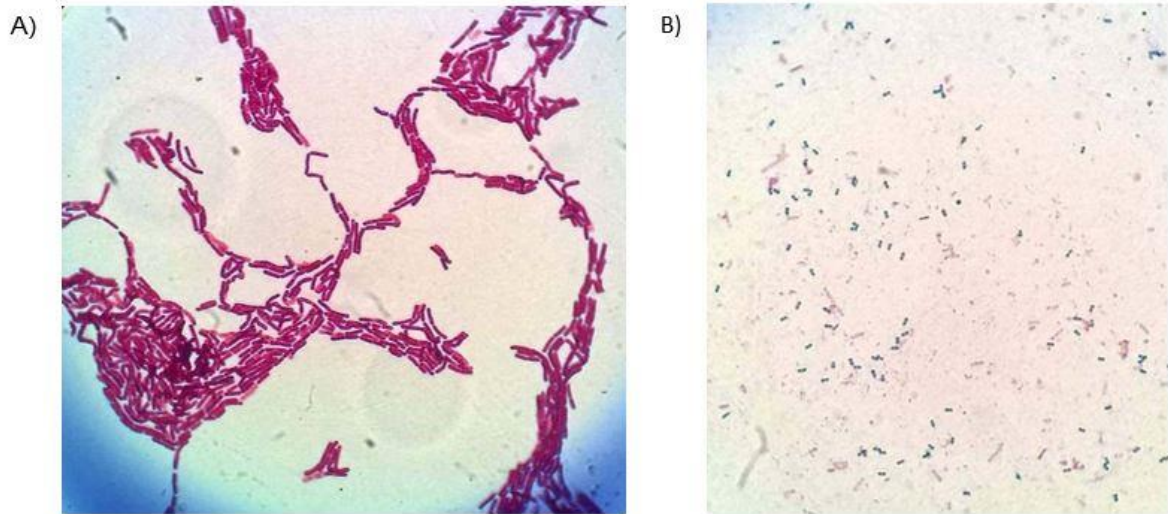


Figura 12 - Biomassa e atividade de transglutaminase.

A relação entre a biomassa e a atividade de transglutaminase mostrou uma quantidade aproximada de 223,83 U/g atividade de transglutaminase correspondente à de massa de célula.



Fonte: (do autor). **Figura 13 – *Bacillus megaterium***. A) Células vegetativas coradas com gram. B) Esporos corados com verde malaquita. Imagem feita pro microscópio com aumento de 100x.

6 CONCLUSÃO

Até o presente momento foi possível:

- Selecionar o melhor meio para a produção de transglutaminase, entre os três meios testados.
- Atingir uma atividade máxima de 0,0511 U/mL para o meio contendo amido; 0,0507 U/mL no meio contendo amido acrescido de proteína de soja 2% e 0,0076 U/mL no meio otimizado para produção de transglutaminase, nos testes iniciais.
- Atingir uma atividade máxima de 0,432 U/mL , no tempo de 288h, em biorreator.
- Relacionar a atividade de transglutaminase com a atividade de protease, concentração de amido, açúcares redutores e peso seco. Concluindo que a transglutaminase apresenta seu maior valor de atividade no período de esporulação da bactéria e quando a atividade de protease é menor.

7 PERSPECTIVAS

Como sequência a este trabalho, serão realizadas:

- Otimização do meio de cultura, avaliando quais as melhores fontes de carbono, nitrogênio e sais.
- Purificação da proteína e análise de espectrometria de massas para identificação do peptídeo e procura do gene correspondente.
- Clonagem do gene e superexpressão do mesmo.
- Caracterização da enzima, como pH ótimo, temperatura e inibição por metais.

8 REFERÊNCIAS

ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.

ANDO, H. *et al.* Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 1–8, Maio 2014.

ANDO, H. *et al.* Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. February 2015, p. 2613–2617, 1989.

BERNARD, B. K.; TSUBUKU, S.; SHIOYA, S. Acute toxicity and genotoxicity studies of a microbial transglutaminase. **International journal of toxicology**, v. 17, n. 6, p. 703-721, 1998.

BONFIM, R. C. *et al.* Aplicação de transglutaminase microbiana em produto cárneos processados com teor reduzido de sódio. **Ciência Rural**, Santa Maria v.45, n.6, p. 1133-1138, Jun. 2015.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. Tecnologia das Fermentações. Vol. 1, São Paulo/SP, Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p.248-254, 1976.

CAMPOS, N. *et al.* Rice transglutaminase gene: Identification, protein expression, functionality, light dependence and specific cell location. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 205-206, p. 97–110, maio 2013.

CHEN, J. S.; MEHTA, K. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 31, n. 8, p. 817–36, ago. 1999.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*. 41, 483-488, 2006.

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *Journal of Food Engineering*. 2006.

DENNLER, P. *et al.* Microbial transglutaminase and c-myc-tag: a strong couple for the functionalization of antibody-like protein scaffolds from discovery platforms. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, v. 16, n. 5, p. 861–7, 23 mar. 2015.

EVANDRO, A. de L. Estabilização, concentração, purificação e aplicação da transglutaminase microbiana de *Streptomyces* sp. CBMAI 837. Dissertação de mestrado Unicamp, 2010.

FAZENDA, M. L.; SEVIOUR, R.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Chapter 2. Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, v. 63, 2008.

FIEBIG D. et al. Structure of the Dispase Autolysis-inducing Protein from *Streptomyces mobaraensis* and Glutamine Cross-linking Sites for Transglutaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.291, n.39, p.20417-20426. September, 2016.

FUWA H. A new method for microdetermination of amylase activity by use of amylose as the substrate. **Journal Biochem**, v.41, p.583-603, 1964.

GASPAR, A.L.C.; de GÓES, S.P. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. **Elsevier Food Chemistry**, v.171, p.315-322, 2015.

GRIFFIN, M.; CASADIO, R.; BERGAMINI, C. M. Transglutaminases: nature’s biological glues. **The Biochemical journal**, v. 368, n. Pt 2, p. 377–96, 1 dez. 2002.

GROSSOWICZ, N. et al. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. **Journal Biology Chemistry**, v.187, p. 111-125.

GÜNDÜZ B. Recombinant Transglutaminase production by metabolically engineered *Pichia pastoris*. **Master of Science in Biotechnology**, Middle East Technical University, September 2012.

IKURA, K. et al. Incorporation of lysyldipeptides into food protein by transglutaminase. **Agricultural and Biological Chemistry (Japan)**, 1985.

JOSTEN, A. et al. Use of microbial transglutaminase for the enzymatic biotinylation of antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 240, p. 47–54, 2000.

KASHIWAGI, T. et al. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44252–44260, 2002.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 241–50, May 2014.

KLÖCK, C.; DIRAIMONDO, T.R.; KHOSLA, C. Role of Transglutaminase 2 in Celiac Disease Pathogenesis. **Semin Immunopathol**, v.34, n.4, p. 513-522, July 2012.

KOŁODZIEJ, B. J. SLEPECKY, R. Trace metal requirements for sporulation of *Bacillus megaterium*. **Journal Bacteriol**, v.88, p.821-830, 1964.

LE, B. V et al. Characterization of *Anopheles gambiae* transglutaminase 3 (AgTG3) and its native substrate Plugin. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 7, p. 4844–53, 15 fev. 2013.

- LIN, Y. S., CHAO, M. L., LIU, C. H., TSENG, M. & CHU, W. S. Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. **Process Biochemistry**, v. 41, p.519-524, 2006.
- LIU S., WANG M., DU G., CHEN J. Improving the active expression of transglutaminase in *Streptomyces lividans* by promoter engineering and codon optimization. **BMC Biotechnology**, 2016.
- LIU Y.; et al. A novel approach for improving the yield of *Bacillus subtilis* transglutaminase in heterologous strains. **J. Ind. Microbial Biotechnol**, n.41, p.1227–1235, 2014.
- LORAND, L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 291–311, jan. 2001.
- LORAND, L.; GRAHAM, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 140–156, 2003.
- LUVIZETTO, D. J. Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli (3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. Dissertação de mestrado, UFRGS, 2007.
- MARTINS, I.M. et al. Transglutaminases: recent achievements and new sources. **Microbiol Biotechnol**, v.98, p.6957-6964, 2014.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.
- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 5, p. 204–210, maio 1998.
- MUSZBEK, L. et al. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. **Physiological reviews**, v. 91, n. 3, p. 931–72, jul. 2011.
- MYCEK, M. J. et al. Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 84, p. 528–40, out. 1959.
- MYNENI, V. D.; MELINO, G.; KAARTINEN, M. T. Transglutaminase 2--a novel inhibitor of adipogenesis. **Cell death & disease**, v. 6, p. e1868, jan. 2015.
- NAGY, V.; SZAKACS, G. Production of transglutaminase by *Streptomyces* isolates in solid-state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 122–127, 2008.
- NIELSEN, P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents. **Food biotechnology (New York, N.Y.) (USA)**, 1995.
- PANDIAN, S. R. et al. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Biores. Tech.*, v. 101, n. 2, p. 705-711, Jan 2010.

PORTA, R. *et al.* Promising Perspectives for Transglutaminase In “Bioplastics” Production. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 01, n. 03, p. 1–4, 2011.

RACHEL, N.M.; PELLETIER, J.N. Biotechnological Applications of Transglutaminases. **Biomolecules**, v.3, p.870-888, 2013.

REGULY, J. C. *Biocologia dos Processos Fermentativos*. Vol. 3, Pelotas/RS, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.

RICKERT, M. *et al.* Production of soluble and active microbial transglutaminase in *Escherichia coli* for site-specific antibody drug conjugation. **Protein science: a publication of the Protein Society**, 20 out. 2015.

SARATH, G., DE LA MOTTE, R. S., and WAGNER, F. W. Protease assay methods, in *Proteolytic Enzymes – A practical approach*. IRL Oxford p.83-104, 1989.

STROP, P. Versatility of microbial transglutaminase. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, p. 855–862, 2014.

VARY, PATRICIA S. *et al.* *Bacillus megaterium* - from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.76, p.957-967, 2007.

VERMA, N. *et al.* Screening of different media for sporulation of *Bacillus megaterium*. **International Journal of Microbiology Reserch and Reviews**, v.1, p.68-73, April 2013.

VOLKEN, C.F.S.; FLÔRES, S.H.; AYUB, M.A.Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Elsevier Process Biochemistry**, v.41, p.1186-1192, 2006.

WANG, L.; YANG, S-T. Solid state fermentation and its applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, p. 465-471, Chapter 18, 2007.

WU, Q. *et al.* Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp JMa5 cultivated in molasses media. **Int. J. of Gen. and Mol. Micro.**, v. 80, n. 2, p. 111-118, Oct 2001.

YEE, V. C. *et al.* Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 15, p. 7296–300, 19 jul. 1994.

YOKOYAMA, K.; NIO, N.; KIKUCHI, Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 447–54, 2004.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 559–65, out. 2008.

