

## ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS: UMA ABORDAGEM

SANDRA APARECIDA DE ASSIS<sup>1\*</sup>, RODRIGO QUEIROZ OLIVEIRA<sup>1</sup>, WAGNER RODRIGUES DE ASSIS SOARES<sup>2</sup>  
& OLGA MARIA MASCARENHAS DE FARIA OLIVEIRA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Saúde, Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, 44036-900, Feira de Santana, Bahia.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Feira de Santana, Depto. de Ciências Biológicas, Lab. de Pesquisa em Microbiologia.

<sup>3</sup>Universidade do Estado de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Rua Prof. Francisco Degni, s/n, Caixa Postal 355, 14801-970, Araraquara, São Paulo.

\*Autor para correspondência: (sandraassis@uefs.br)

**(Estabilização de enzimas: uma abordagem)** – A estabilização de enzimas é um ponto crítico em enzimologia básica e aplicada. O crescente interesse na aplicação de enzimas em processos industriais tem levado à pesquisa por catalisadores com novas propriedades ou estabilidade extrema. A estabilização enzimática pode ser obtida por diferentes métodos: engenharia de proteínas, modificação química, uso de aditivos, uso de solventes orgânicos, isolamento a partir de organismos que vivem em ambientes extremos (extremozimas) e imobilização. Esta breve revisão tem por objetivo a abordagem destes métodos de estabilização enzimática.

**Palavras-chave:** Estabilização de enzimas, engenharia de proteínas, extremozimas, biocatálise, modificação química.

**(Enzyme stabilization: An approach)** – Enzyme stabilization is one critic point in basic and applied enzymology. The increasing interest in applying enzymes in industrial processes has fostered the search for biocatalysts with new properties or extreme stability. Enzyme stabilization can be achieved by different methods: isolating enzyme variants from organisms living in appropriate extreme environments (extremozymes), by protein engineering, chemical modification, use of additives, immobilization. This brief review aims to give a better understanding of those methods employed for enzyme stabilization.

**Key words:** Enzyme stabilization, protein engineering, extremozymes, biocatalysis, chemistry modification.

### INTRODUÇÃO

O papel das enzimas em muitos processos é conhecido há muito tempo. Sua existência é associada com a história da Grécia antiga quando enzimas microbianas eram usadas na produção de álcool, cerveja, queijo e na panificação (HAKI & RAKSHIT, 2003).

O crescente aumento da aplicação de enzimas em processos industriais tem levado à busca por biocatalisadores com propriedades novas ou melhoradas (EJISINK *et al.*, 2005). Devido à capacidade única das enzimas de serem altamente específicas e catalisar reações em alta velocidade, o desenvolvimento de processos biocatalíticos é um ramo muito promissor (EJISINK *et al.*, 2005).

Infelizmente, enzimas naturalmente disponíveis geralmente não são adequadas para aplicações industriais, devido às condições dos processos, que muitas vezes requerem uso de condições extremas. Deste modo, a estabilidade de um biocatalisador geralmente é um fator econômico importante (EJISINK *et al.*, 2005).

A estabilidade de um biocatalisador, isto é, a capacidade de reter a atividade durante o tempo, é sem dúvida um dos fatores mais importantes em biotecnologia (ILLANES, 1999). A estabilidade de uma enzima é afetada por vários fatores, tais como temperatura, pH, estresse oxidativo, solventes, ligação com íons metálicos ou cofatores, presença de surfactantes. O efeito de surfactantes é extremamente

importante do ponto de vista industrial, pois a área de detergentes é uma das maiores aplicações de enzimas industriais. O efeito de solventes orgânicos é importante, pois a presença de tais solventes é essencial na aplicação de enzimas para a produção de química fina (EJISINK *et al.*, 2005).

A estabilidade operacional de um biocatalisador determinará a viabilidade de um grande número de processos, quer seja novo ou para competir com aqueles já existentes (ILLANES, 1999).

A estrutura nativa de uma proteína é geralmente função da conformação exibida pelas proteínas dentro do ambiente celular ou pelas proteínas isoladas na sua máxima atividade biológica. A estabilidade enzimática é uma função de sua configuração tridimensional, que por sua vez é determinada por fatores genéticos (estrutura primária) e ambientais (interação com o meio) (ILLANES, 1999).

A desnaturação das proteínas é um processo que envolve uma maior ou menor transformação da estrutura nativa, sem alteração da estrutura de aminoácido (GIANFREDA & SCARFFI, 1991). A transformação da estrutura protéica compromete o correto arranjo do sítio ativo, e conseqüentemente, isto resulta na inativação enzimática. Logo, a estabilização de moléculas protéicas significa prevenção da transformação e preservação da estrutura nativa de proteínas não alteradas (GIANFREDA & SCARFFI, 1991).

Tanto os mecanismos da inativação reversível quanto aqueles da inativação irreversível são bastante obscuros. Pela comparação das estruturas protéicas de organismos termófilos, halófilos e mesófilos, tem-se tentado encontrar a relação estrutura/estabilidade para formular modelos para os problemas da estabilização de enzimas em bases teóricas (GIANFREDA & SCARFI, 1991).

Em diversos campos da ciência, diferentes abordagens vêm sendo empregadas para estabilizar enzimas, muitas das quais com o objetivo de aperfeiçoar recursos tecnológicos e garantir a qualidade na produção de insumos, sejam eles utilizados na indústria de alimentos ou na indústria farmacêutica. Dentre as técnicas mais utilizadas para estabilização de enzimas, destacam-se: imobilização de enzimas, modificação enzimática, engenharia de proteínas e engenharia do solvente (MZHAEV *et al.*, 1990).

A estabilidade de enzimas e proteínas *in vitro* permanece como um importante capítulo em biotecnologia. Procedimentos como a estocagem e a estabilidade operacional afetam a utilidade de produtos baseados em enzimas (O'FAGAIN, 2003). Esta estabilidade na estocagem ou a vida útil refere-se à manutenção das capacidades catalíticas entre o período de armazenagem e o seu eventual uso. Esquemas aplicados de maneira generalizada têm sido utilizados para descrever o desempenho das enzimas e a inativação dentro das condições de processo. Grandes avanços têm ocorrido no campo da engenharia de proteínas através da evolução direta das técnicas de modificação química, estabilização por aditivos orgânicos e por outras estratégias utilizando os novos conhecimentos e metodologias da biologia celular e molecular (O'FAGAIN, 2003).

#### AVANÇOS NA TÉCNICA DE ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Importantes avanços nos últimos 15 anos têm acrescido o conhecimento acerca da estabilidade de proteínas (CAMPOS *et al.*, 2004). A combinação dos ganhos em crescentes áreas, como em estudos mutacionais e termodinâmicos, demonstra a diversidade que este tema pode alcançar. Utilizando pequenos modelos de proteínas para estudar seu comportamento no estado de equilíbrio, MATTHEWS *et al.* (1987) já atestavam a grande variabilidade de domínios ou multi-estados das proteínas. VIGUERRA (1993) acrescenta que a estabilidade pode ser afetada por parâmetros cinéticos e termodinâmicos para atingir o estado de equilíbrio.

Novas descobertas ampliam o saber acerca do assunto que se deseja explorar. Muitas delas trazem novas tendências, outras traduzem a necessidade do mercado por técnicas com uma melhor relação custo/benefício, de forma a gerar alternativas para aproveitar melhor os recursos e atingir os objetivos desejados em tempo hábil. A estabilidade de enzimas e proteínas está relacionada também com o meio na qual a enzima está inserida e/ou acondicionada. Torná-la mais estável e garantir que terá a ação prevista é função da

engenharia de proteína, campo que vem se desenvolvendo de maneira crescente e em paralelo às técnicas de engenharia genética e modelagem molecular (O'FAGAIN, 2003).

#### ENGENHARIA DE PROTEÍNAS

Com o advento da tecnologia de DNA recombinante foi possível a produção e comercialização de proteínas para aplicação farmacêutica, no início de 1980. O desenvolvimento farmacêutico destas tecnologias emergentes tem capacitado e provido o mercado com produtos altamente puros em sua essência. Para a manutenção de tais padrões de qualidade e produção, deve-se fazer com que as drogas protéicas sejam totalmente ativas e que elas não contenham produtos tóxicos. Portanto, as formulações podem ser capazes de liberar um princípio ativo intacto e tem a habilidade de garantir estabilidade de proteínas dentre os produtos farmacêuticos e durante a fabricação, sendo isto um dos pré-requisitos para o estágio de aprovação da nova droga (DAVIS, 1993; JONES & CLELAND, 1996; BILATI *et al.*, 2005).

As proteínas são um grande e complexo grupo de moléculas compostas de aminoácidos. A seqüência de aminoácidos e a função da proteína são determinadas por uma seqüência de pares de bases no gene que as codificam. Exemplos claros são os hormônios, enzimas e anticorpos. Os métodos para construir proteínas ganharam impulso com a descoberta da estrutura do DNA e os estudos pós-traducionais, que alavancaram esta área juntamente com o desenvolvimento da bioquímica de proteínas (KIM *et al.*, 2006).

Desenvolvimentos na área de engenharia de proteínas têm permitido a produção *in vitro* de enzimas com propriedade que favorecem os processos de interesse e também com especificidade pelo substrato ou enantioseletividade alteradas (HIBBERT & DALBY, 2005).

O processo de engenharia de proteínas vem avançando nas últimas décadas em paralelo com os processos biotecnológicos de extração, purificação e estabilização de proteínas e enzimas, contudo, um obstáculo a ser vencido é a cristalografia de proteínas, que ainda dificulta os processos de caracterização de suas estruturas moleculares. Apesar destas técnicas, podem-se inferir outros métodos que são utilizados para modificar e construir novas proteínas, dentre eles: biologia computacional, biologia molecular, citogenética, engenharia de proteínas e enzimologia (BILATI *et al.*, 2005).

Trabalhos recentes (p.ex., WUDERLICH *et al.*, 2005) têm demonstrado que novas técnicas estão sendo utilizadas para modelar proteínas. Duas delas podem ser consideradas atualmente como as principais estratégias usadas para estabilização de enzimas: evolução *in vitro* e o design computacional. Outras técnicas de aperfeiçoamento que funcionam como suportes para a estabilização encontram-se relacionadas à estrutura enzimática e sua capacidade de ligação a substratos específicos.

### ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA

A função de uma enzima e sua estabilidade é influenciada por sua seqüência de aminoácidos, a qual define as interações químicas que conduzem sua conformação específica. Modificações químicas na estrutura enzimática, por meio de técnicas específicas, tornam-se úteis para o aumento da eficiência de uma enzima, uma vez que podem resultar em mudanças significativas na sua estabilidade.

A utilização de proteínas modificadas quimicamente teve início no final da década de 1950, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas (MATSUSHIMA *et al.*, 1996). Esse processo, apesar de ter sido obscurecido nos anos recentes por estratégias genéticas, pode ser complementar a estas, como demonstrado por BRUGGER *et al.* (2001), que utilizaram dois processos para formar oligômeros de fitase.

O método de modificação por ligação covalente no suporte ou por ligação cruzada envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Tal processo pode estabilizar a proteína por prevenir o desdobramento sob condições de estresse.

Uma forma particular desse método envolve uma ligação cruzada de pequenos cristais de enzimas (1-200 micrômetros) com o reagente bifuncional glutaraldeído (CLEC - *crosslinked enzyme crystals*) (O'FAGAIN, 2003). A interação ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos aminas livres do composto (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Esse tipo de ligação, notavelmente, aumenta a estabilidade operacional da enzima, sob temperaturas elevadas, em solventes e sob baixa agitação, se comparado com sua forma nativa. As enzimas particularizadas por esse método podem ser misturadas com outras reações e facilmente reutilizadas. Canais são formados dentro de CLEC, permitindo a fácil difusão de substratos e produtos (O'FAGAIN, 2003). Enzimas estabilizadas neste modo incluem lipase, penicilina acilase, subtilisina e termolisina. GOVARDHAN (1999) escreveu uma clara e sucinta revisão da tecnologia CLEC.

As reações de formação das ligações cruzadas são realizadas sob condições relativamente severas, afetando em alguns casos a conformação do centro ativo da enzima, levando a significativas perdas de atividade.

Ligações covalentes de múltiplos sítios de um polímero solúvel com enzimas de interesse constituem uma estratégia alternativa de ligação cruzada. Tais ligações são predominantemente intramolecular, minimizando a formação de agregados multiméricos. Utilizando-se desse método, BIENIARZ *et al.* (1998) desenvolveram um novo protocolo de

ligação cruzada mediada por enzima, com bons resultados para a estabilização de proteína, envolvendo a combinação de um polímero polifosforilado contendo cadeias de fosfato de enxofre adjacentes e uma proteína de interesse, através de indução por fosfatase alcalina (ALP).

### ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR ADITIVOS

As enzimas podem facilmente ser desnaturadas pela ligeira mudança nas condições ambientais, tais como temperatura, pressão, pH e força iônica. Dentre as diversas maneiras de se conseguir a estabilidade destas enzimas durante o armazenamento, tem-se o uso de aditivos, os quais são dependentes da natureza das enzimas.

COSTA *et al.* (1998) estudaram os efeitos de vários aditivos na estabilização da catalase nativa de *Bacillus* sp. a fim de usá-la na degradação do peróxido de hidrogênio na indústria têxtil, após o alvejamento de tecidos. A aplicação dos aditivos deslocou o ótimo da atividade desta enzima para um pH mais alcalino e uma temperatura mais elevada, sendo o glicerol o aditivo de melhor desempenho.

Os surfactantes podem ter efeito na estabilidade e na atividade das enzimas. No trabalho de MARCOZZI *et al.* (2002), o cloreto de benzalcônio, um surfactante catiônico, manteve a atividade da lactoperoxidase de bovino por muito mais tempo, quando comparada a uma amostra controle (sem o surfactante).

Os polímeros também podem estabilizar proteínas. Poli(éter-imida) (PEI) é um polímero catiônico que aumenta a vida de prateleira das hidrolases (ANDERSSON & HATTI-KAUL, 1999).

Muitos trabalhos descrevem um melhoramento significativo na atividade e estabilidade de enzimas imobilizadas, quando o procedimento de imobilização é realizado em presença de aditivos (SOARES *et al.* 2003). Entretanto, a eficiência da estabilização do aditivo ocorre em função do tipo de enzima, do método de imobilização e da sua forma de adição.

SOARES *et al.* (2003) testaram albumina e polietilenoglicol como agentes estabilizantes de lipase imobilizada em matriz de sílica de porosidade controlada, e seus efeitos foram comparados ao controle (enzima imobilizada sem aditivo). O tempo de meia-vida da lipase imobilizada foi aumentado, quando comparado com o tempo de meia-vida da lipase imobilizada sem aditivo.

### ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS POR SOLVENTES ORGÂNICOS

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na estabilidade enzimática, pois quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária quanto nas mais proeminentes estruturas secundárias (a  $\alpha$ -hélice e a conformação  $\beta$ ) acarretando, desta maneira, sua desestabilização (LIMA & ANGNES, 1998).

Os solventes hidrofílicos podem retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação ou desnaturação, enquanto que os solventes hidrofóbicos podem apenas afetar parcialmente a atividade catalítica (O'FAGAIN, 2003). Sendo assim, as enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos.

No trabalho de CASTRO *et al.* (1997), foi estudada a influência de alguns parâmetros, dentre eles solvente orgânico (acetonitrila, tetracloreto de carbono, clorofórmio, tolueno, ciclohexano, hexano e heptano) no rendimento da esterificação do butanol com ácido butírico, utilizando uma preparação enzimática comercial de lipase. O solvente heptano foi o que apresentou compatibilidade. A polaridade (apolar) e a natureza desse solvente (hidrofóbico) foram considerados os fatores que mais influenciaram o desenvolvimento dessa síntese enzimática.

#### ENZIMAS DE EXTREMÓFILOS

A maioria das enzimas usadas na biocatálise e biotransformação é obtida de microrganismos mesófilos. Entretanto, a aplicação industrial destas enzimas se restringe por causa de sua limitada estabilidade aos processos industriais. Por outro lado, os microrganismos extremófilos, encontrados nos ambientes caracterizados por extremos de temperatura (-2 a 15°C e 60 a 110°C), salinidade (NaCl de 2-5M) ou valores de pH (<4 e >9), emergiram como fontes de extremozimas (HOUGH & DANSON, 1999). Estas apresentam atividade sob as circunstâncias operacionais extremas, as quais tornaram os processos industriais mais rentáveis, pois ofereceram melhores rendimentos (VAZOLLER *et al.*, 1999).

As proteínas de microrganismos termófilos apresentam seqüências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas. A maior termoestabilidade intrínseca observada nessas moléculas tem sido foco de inúmeras teorias e pesquisas, porém, ainda não é completamente entendida. Algumas diferenças na composição de aminoácidos, nos mecanismos de manutenção do enovelamento e da estabilização da estrutura, foram constatadas entre enzimas de mesófilos e termófilos, porém, os fatores de pressão seletiva (pressão, pH, temperatura) e as variações filogenéticas devem ser considerados (GOMES *et al.*, 2007).

Os mecanismos responsáveis pela alta estabilidade molecular de proteínas termofílicas incluem interações hidrofóbicas, empacotamento molecular, maior presença de pontes salinas e de hidrogênio, menor superfície de *loops*, maior formação de alfa hélice, restrita mobilidade N-terminal (VIEILLE & ZEIKUS, 1996; COWAN, 1997; VOGT & ARGOS, 1997; WANG, 1999). Fatores extrínsecos (não relacionados à estrutura primária) também têm contribuído para a

estabilização protéica. Entre estes fatores está a presença de grande conteúdo de açúcar, ou solutos orgânicos/osmólitos (RAMAKRISHNAN *et al.*, 1997; WANG, 1999).

A extremofilia não constitui uma característica filogenética. Entretanto, os microrganismos resistentes a extremos de agressão das condições ambientais tendem a pertencer ao Domínio Archaea. Os estudos de tais microrganismos são extremamente atraentes, pois as extremozimas são reconhecidas internacionalmente como prioritárias para biotecnologia. Como exemplo, pode-se citar os casos de microrganismos que proliferam em lagos fortemente alcalinos, que têm atualmente um fortíssimo impacto na indústria dos detergentes (VAZOLLER *et al.*, 1999). Mas, sem dúvida, a descoberta com maior impacto científico foi a da Taq polimerase, ativa a temperaturas superiores a 95°C, de *Thermus aquaticus*, que é empregada amplamente nos procedimentos de PCR.

A aplicação das extremozimas nas indústrias de biotecnologia é hoje uma realidade que nos permite imaginar uma miríade de aplicações ainda por explorar (HORIKOSHI, 1999).

#### IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O processo de imobilização de enzimas teve início em 1916, quando Nelson e Griffin constataram que a enzima invertase, adsorvida em carvão ativado, tinha a mesma atividade que a enzima solúvel. SUMNER (1948) descobriu que uma forma insolúvel da urease, precipitada em etanol 30%, com cloreto de sódio, continuava ativa. Apesar dessas descobertas, a primeira tentativa de imobilizar uma enzima com o objetivo de melhorar suas propriedades foi feita, em 1953, por GRUBHOFFER & SCHLEITH, quando carboxipeptidase, diastase, pepsina e ribonuclease foram imobilizadas numa resina de poliaminopoliéster diatonizada. Embora um grande volume de trabalhos tenha surgido durante a década de 1970, apenas o processo de resolução óptica de aminoácidos foi estabelecido em escala industrial por CHIBATA *et al.*, em 1972.

O campo de aplicações para enzimas imobilizadas parecia mais restrito a processos em pequena escala, com produto de alto valor agregado, no qual as rotas químicas convencionais seriam superadas pela alta especificidade enzimática. Contrariando essas expectativas, surgiu, em meados da década de 1970, um processo de produção em grande escala de um produto de baixo valor agregado, o xarope de glicose isomerizado (SKINNER, 1975), mudando as perspectivas em relação ao uso de enzimas imobilizadas.

A imobilização de enzimas é uma técnica extensivamente estudada desde o final da década de 1960 (SILMAR & KATCHALSKI, 1966) e que tem sido amplamente empregada em estudos fundamentais em bioquímica e em aplicações práticas em biotecnologia (GIANFREDA & SCARFI, 1991). Segundo WINGARD (1972), enzima imobilizada é aquela confinada ou localizada numa região definida, com retenção de atividade. A possibilidade de uso industrial da tecnologia de imobilização de enzimas promoveu o

desenvolvimento de vários métodos de imobilização (MONSAN *et al.*, 1984). Os métodos de imobilização, que resultam numa enzima insolúvel, podem ser agrupados atualmente em três categorias: ligações a suportes insolúveis, ligações cruzadas e oclusão. A ligação a suportes insolúveis é o método mais antigo de imobilização e subdivide-se em quatro categorias, de acordo com o tipo de interação enzima-suporte: adsorção física, ligação iônica, ligação metálica e ligação covalente. A ligação covalente consiste na ligação covalente entre a enzima e o suporte insolúvel e é o método mais difundido e divulgado de imobilização. A ligação enzima-suporte não permite perdas para a solução, mesmo na presença de substratos ou soluções de alta força iônica. A ligação da enzima deve envolver qualquer grupo que não seja essencial à atividade catalítica, o que significa que o sítio ativo não deve ser afetado pela imobilização (KENNEDY & CABRAL, 1987; VICENTE, 2000).

Além de mudanças nos parâmetros cinéticos da reação, o passo da imobilização pode melhorar a estabilidade (WANG *et al.*, 1997). As ligações multipontos entre enzima e materiais reduzem o envelhecimento protéico e podem melhorar a estabilidade (MOZHAEV *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2006). Recentes desenvolvimentos com cristais de enzimas unidos por ligações cruzadas ou agregados enzimáticos unidos por ligações cruzadas são baseados em ataque multipontual entre cristais de enzimas (ou moléculas) (O'FAGAIN, 2003; KIM *et al.*, 2006).

A imobilização da enzima sobre um suporte insolúvel produz uma redução de consumo da enzima, uma vez que pode ser usada mais vezes nas reações em batelada ou então continuamente em reatores contínuos do tipo tubular ou fluidizado. Dessa forma, ela permite utilizar preparações mais puras, certamente mais caras, mas de especificidade de ação restrita, que melhoram a qualidade dos produtos obtidos.

A nanotecnologia geralmente gera uma grande superfície de área para a imobilização de moléculas enzimáticas e tem grande aplicação para a estabilização de enzimas. É realizada principalmente através do uso de nanopartículas, nanofibras, sílica mesoporosa e nanopartículas preparadas via encapsulação sol-gel (Kim *et al.*, 2006).

## CONCLUSÃO

Enzimas são moléculas com inúmeras aplicações em processos industriais. Contudo, quando expostas à condição extrema podem ter suas estruturas desestabilizadas, necessitando de recursos tecnológicos, muitas vezes para manter sua função. A estabilização de enzimas é um ponto crítico na enzimologia básica e aplicada. O crescente interesse pela aplicação industrial de enzimas tem causado a pesquisa por biocatalisadores com novas propriedades ou extrema estabilidade. Estabilização enzimática pode ser obtida por diferentes métodos: engenharia de proteínas, modificação química, uso de aditivos, uso de solventes orgânicos, produção a partir de microrganismos extremófilos e imobilização. Os campos de aplicação destas tecnologias se expandem e ultrapassam as esferas da biotecnologia vermelha (saúde), verde (agrícola) e adquirindo uma nova roupagem que é a biotecnologia branca ou industrial na qual estas enzimas poderão ser utilizadas para controlar processos que garantam não só a qualidade do produto final, bem como a estabilidade e a manutenção do prazo de validade. Aperfeiçoar estes processos industriais, tendo como suporte as ferramentas para estabilização de enzimas, trará retorno não só para a sociedade, como também para a empresa e para o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSSON MM & R HATTI-KAUL. 1999. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. **J. Biotech.** 72: 21-31.
- BIENIARZ C, MJ CORNWELL & DF YOUNG. 1998. Alkaline phosphatase activatable polymeric cross-linkers and their use in the stabilization of proteins. **Bioconjugate Chem.** 9:390-8.
- BILATI U, E ALLÉMAN & E DOELKER. 2005. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. **European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 59: 375-388.
- BRUGGER R, A KRONENBERGER, A BISCHOFF, D HUG, M LEHMANN, APMG VAN LOON & M MARKUS WYSS. 2001. Thermostability engineering of fungal phytases using low- $M_r$  additives and chemical crosslinking. **Biocatalysis and Biotransformation** 19(5-6): 505-516.
- CAMPOS LA, MM GARCIA-MIRA, R GODOY-RUIZ, JM SANCHEZ-RUIZAND & J SANCHO. 2004. Do proteins always benefit from a stability increase? Relevant and residual stabilization in a three-state. protein by charge optimization. **J. Mol. Biol.** 344: 223-237.
- CASTRO HF, PC OLIVEIRA & CMF SOARES. 1997. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 17: 237-241.
- CHIBATA I. 1972. Characteristics of immobilized aminoacylase from *Aspergillus oryzae* on macroporous copolymers, p. 383-389. **Fermentation technology today.** Japan: G. Terni Ltda.
- COSTA SA, T TZANOV, AF CARNEIRO, A PAAR, GM GÜBITZ & A CAVACO-PAULO. 2002. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology** 30: 387-391.
- COWAN DA. 1997. Thermophilic proteins: stability and function in aqueous and organic solvent. **Comp. Biochem. Physiol.** 118: 429-438.
- DALLA-VECCHIA R, MG NASCIMENTO & V VOLDI. 2004. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova** 27: 623-630.
- DAVIS GC. 1993. Protein stability: impact upon protein pharmaceuticals. **Biologicals** 21: 105.
- EJLSINK VGH, Bjørk A, GÅSEIDNES S, SIREVAG R, BORCHERT TV, VAN DEN BURG B. 2005. Directed evolution of enzyme stability. **Biomolecular Engineering** 22: 21-30.

- HAKI GD & SK RAKSHIT. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology** 89: 17-34.
- GIANFREDA L & MR SCARFI. 1991. Enzyme stabilization: state of the art. **Mol. Cell. Biochem.** 100: 97-128.
- GOVARDHAN CP. 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 331-335.
- GRUBHOFFER N & L SCHLEITH. 1953. Modified ion exchangers stationary phases in chromatography. **Naturwissenschaften** 40: 508.
- HIBBERT EG & PA DALBY. 2005 Directed evolution strategies for improved enzymatic performance. **Microbial Cell Factories** 4:29
- HORIKOSHI K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 63: 735-750.
- HOUGH DW & M DANSON. 1999. Extremozymes. **Current Opin. in Chem. Biol.** 3:39-46.
- ILLANES A. 1999. Stability of biocatalysts. **Electronic J. Biotech.** 2(1), issue of April 15.
- JONES AJS & JL CLELAND. 1996. Technical and regulatory hurdles in delivery aspects of macromolecular drugs. **Control Release** 41: 147-155.
- KENNEDY JF & JMS CABRAL. 1987. Enzyme immobilization, p. 347-406. In: HJ REHM & G REED (Eds.). **Enzyme technology**. Weinheim: VCH.
- KIM J, JW GRATE & P WANG. 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science** 61: 1017-1026.
- LEHNINGER AL, DL NELSON & MM COX. 1995. **Princípios de bioquímica**. 2ª ed. São Paulo: Sarvier.
- LIMA AWO & ANGNES L. 1999. Biocatalysis in aquo-restricted media: fundamentals and applications in analytical chemistry. **Química Nova** 22: 229-245.
- MARCOZZI G, C DI DOMENICO & N SPRETI. 1998. **Biotech. Prog.** 14: 653-656.
- MATSUSHIMA A, Y KODERA & M HIROTO. 1996. Bioconjugates of proteins and polyethylene glycol; potent tools in biotechnological processes **J. Mol. Catal. B**, 2: 1.
- MATTHEWS BW, H NICHOLSON & WJ BECKTEL. 1987. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84: 6663-6667.
- MONSAN P, D COMBES & I ALEMZAHED. 1984. Invertase covalent grafting onto corn stover. **Biotechnol. Bioeng.** 26: 658-664.
- MOZHAEV VV, NS MELIK-NUBAROV, MV SERGEEVA, V SIKSNIS & K MARTINEK. 1990. Strategy for stabilizing enzymes. Part one: increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. **Biocatalysis** 3: 179-187.
- O'FAGAIN C. 2003. Enzyme stabilization-recent experimental progress. **Enzyme and Microbial Tech.** 33: 137-149.
- RAMAKRISHNAN V, MFJM VERHAGEN & MWW ADAMS. 1997. Characterization of di-myo-inositol-1,1%-phosphate in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 347-350.
- SILMAR IH & E KATCHALSKI. 1966. Water-insoluble derivatives of enzymes antigens and antibodies. **Annu. Rev. Biochem.** 35: 873-908.
- SNIR R, PE KOEHLER, KA SIMS & L WICKER. 1995. pH and cations influence permeability of marsh grapefruit pectinesterase on polysulfone ultrafiltration membrane. **J. Agric. Food Chem.** 43: 1157-1161.
- SOARES CMF, MHA SANTANA, GM ZANIN & HF CASTRO. 2003. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova** 26: 832-838.
- SUMNER JB. 1948. Denaturation of urease without inactivation. **Science** 108: 410.
- VAN DEN BURG, B. 1999. Extremophiles as a source for novel enzymes. **Current Opinion in Microbiol.** 6: 213-218.
- VAZOLLER RF, GP MANFIO & VP CANHOS. 1999. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. In: CA JOLY & CEM BICUDO (Orgs.). **Microorganismos & Vírus**. São Paulo: FAPESP.
- VICENTE AA. 2000. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- VIEILLE C & JG ZEIKUS. 1996. Thermoenzymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **Trends Biotechnol.** 14: 183-191.
- VIGUERA AR, JC MARTINEZ, VV FILIMONOV, PL MATEO & L SERRANO. 1993. Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition **Biochemistry** 33: 2142-2150.
- VISURI K, O PASTINEN, X WU, K MÄKINEN & M LEISOLA. 1999. Stability of native and cross-linked crystalline glucose isomerase. **Biotechnol. Bioeng.** 64:377-80.
- WANG J, JIE LIU & G CEPRA. 1997. Thermal stabilization of enzymes immobilized within carbon paste electrodes. **Anal. Chem.** 69: 3124-3127.
- WANG W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Intern. J. Pharmaceutics** 185: 129-188.
- WINGARD JR. 1972. Enzyme engineering: a new area of specialization. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 3: 3-13.
- WUNDERLICH M, A MARTIN & CA STAAB. 2005. **J. Mol. Biol.** 351(5): 1160-1168.