



IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM QUITOSANA, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E SUA APLICAÇÃO EM EXTRATO AQUOSO DE SOJA

Luciana Carvalho Grade¹, Caio Ferreira de Oliveira², Virgínia Prezzi Santos², Amanda Medeiros Orcioli³, Mara Lúcia Luiz Ribeiro⁴

RESUMO: β -glicosidase de soja foi imobilizada em quitosana ativada com glutaraldeído. A β -glicosidase imobilizada apresentou valores de pH e temperatura ótimos de 5.5 e 50 °C. A enzima imobilizada foi aplicada em extrato aquoso de soja para obtenção de um produto com maior teor de isoflavonas agliconas. Após 120 min de incubação, o conteúdo de glicose aumentou em 48%, o que é diretamente proporcional à liberação de agliconas.

PALAVRAS-CHAVE: agliconas, β -glicosidase, imobilização, quitosana.

INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21) formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam a ligação β -glicosídica de oligossacarídeos e outros conjugados glicosídicos, liberando glicose. Estas enzimas hidrolisam as isoflavonas β -glicosídicas presentes na soja (genistina, daidzina e glicitina) e liberam as isoflavonas agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) as quais são descritas devido a possíveis ações benéficas na saúde humana (HSIEH, GRAHAM, 2001).

Considerando que o teor de isoflavonas agliconas na soja é de 2% (RIBEIRO et al., 2007), a aplicação de β -glicosidase em produtos de soja pode ser viável para aumentar o teor destas isoflavonas. A utilização de enzimas imobilizadas é uma estratégia para a condução de bioprocessos contínuos, pois pode melhorar a eficiência de processos biotecnológicos, reduzindo os custos de produção (CANILHA et al., 2006).

Os materiais utilizados como suportes na imobilização devem ser encontrados com facilidade e abundância, ter baixo custo, facilidade de operação em grande escala, capacidade de retenção e resistência mecânica para uma longa vida operacional (CANILHA et al., 2006). Por isso optou-se por utilizar a quitosana neste estudo, além de

¹ Mestrado em Biotecnologia – UEL, Londrina – PR. lugrade@yahoo.com.br

² Acadêmicos do curso de Biomedicina – UEL, Londrina - PR. Bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/UEL. caioferreira.biomed@gmail.com; virps18@hotmail.com

³ Acadêmica do curso de Química – UEL, Londrina – PR. Bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)/UEL. amanda_orcioli@hotmail.com

⁴ Orientadora, Professora doutora na Universidade Estadual de Londrina – UEL. mararibeiro@uel.br

ter sido utilizada para imobilização de diversas enzimas, apresentando ótimos resultados, principalmente quando ativada pelo reagente bifuncional glutaraldeído (SU et al., 2010).

Assim, considerando a importância da aplicação de β -glicosidase no aumento do teor de isoflavonas agliconas, o objetivo deste trabalho foi imobilizar a β -glicosidase de soja em quitosana, caracterizar o pH e temperatura ótimos da enzima imobilizada e aplicá-la em extrato aquoso de soja (EAS).

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Foram utilizados cotilédones da cultivar de soja BRS 213; quitosana de alta massa molecular em pó e reagentes de pureza analítica.

Métodos

Determinação de Atividade de β -glicosidase, Proteínas Solúveis e Atividade Específica de β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG), conforme descrito por Matsuura e Obata (1993). Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μ M *p*-NP min^{-1} , nas condições experimentais. O teor de proteínas solúveis foi quantificado pelo método de Lowry et al (1951). A atividade específica de β -glicosidase foi definida pela relação entre unidades de atividade da enzima (UA) e mg de proteínas, ou seja, UA mg^{-1} de proteínas.

Extração e Fracionamento de β -glicosidase

A extração da enzima foi realizada conforme metodologia descrita por Matsuura e Obata (1993). O extrato bruto (EB) foi fracionado com sulfato de amônio de 0 a 40% e de 40 a 85% de saturação. Após diálise das frações, foram determinadas as atividades específicas (AEs). A fração denominada de P₄₀₋₈₅ com elevada AE de β -glicosidase foi utilizada para imobilização.

Preparo de Grânulos de Quitosana e Ativação com Glutaraldeído

Os grânulos de quitosana foram preparados segundo Kumar, Dwevedi e Kayastha (2009). Os grânulos de quitosana foram ativados por incubação com glutaraldeído 2,5%, a 37°C, sob agitação durante 8 horas, sendo lavados e armazenados em tampão TRIS-acetato 0,1M, pH 7,5 até serem utilizados.

Imobilização de β -glicosidase nos Grânulos de Quitosana Ativados com Glutaraldeído

Para a imobilização da β -glicosidase, os grânulos de quitosana ativados foram incubados com solução enzimática (181,62 UA / mL) durante 20 horas a 4°C. Posteriormente, estes foram lavados com tampão TRIS-acetato 0,1M pH 6,5 para remover a enzima não-imobilizada (KUMAR, DWEVEDI, KAYASTHA, 2009).

Determinação de Temperatura e pH Ótimos

Para a determinação de temperatura e pH ótimos, foi utilizado o DCCR 2² com duas variáveis independentes, totalizando 11 experimentos. Os níveis das variáveis independentes X₁ (pH) e X₂ (temperatura) foram selecionados com base em experimentos preliminares e são apresentados na Tabela 1. Foram incubados 800 μ L de *p*-NPG em tampão fosfato-citrato 0,1 M por 30 min com a β -glicosidase imobilizada. A atividade de β -glicosidase foi estimada conforme Matsuura e Obata (1993) e os resultados expressos em

porcentagem de atividade em relação ao controle (resposta de maior atividade enzimática).

Tabela 1 - Matriz dos ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis independentes para os efeitos de pH e temperatura na taxa de imobilização (%).

Experimentos	Codificado (real)	
	pH x_1 (X1)	T (°C) x_2 (X2)
1	-1 (4,0)	-1 (35)
2	-1 (4,0)	+1 (65)
3	+1 (7,0)	-1 (35)
4	+1 (7,0)	+1 (65)
5	-1,41 (3,0)	0 (50)
6	+1,41 (8,0)	0 (50)
7	0 (5,5)	-1,41 (25)
8	0 (5,5)	+1,41 (75)
9	0 (5,5)	0 (50)
10	0 (5,5)	0 (50)
11	0 (5,5)	0 (50)

Análises estatísticas

Para análise das superfícies de resposta foi utilizado o software Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc.).

Aplicação de β -glicosidase Imobilizada em Extrato Aquoso de Soja

Grânulos de quitosana com enzima imobilizada foram incubados com EAS comercial diluído 1:2 em banho-maria a 50°C. O contato da enzima imobilizada com o EAS foi interrompido nos tempos de 2 a 120 min e posteriormente foi determinado o teor de glicose.

Determinação Quantitativa de Glicose

A glicose liberada após aplicação da enzima imobilizada em EAS foi determinada pelo método da glicose oxidase. Neste procedimento, a glicose liberada pela hidrólise de isoflavonas glicosídicas foi quantificada por espectrofotometria a 500 nm e o resultado expresso como aumento da taxa de glicose (%)/mL de EAS em relação ao tempo zero.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preparo dos Grânulos de Quitosana

Grânulos de quitosana 1% foram utilizados nos experimentos, os quais apresentavam aspecto branco opalescente e aproximadamente 5 mm de diâmetro.

Determinação de Temperatura e pH Ótimos da β -glicosidase Imobilizada

A influência da temperatura e do pH na atividade da β -glicosidase imobilizada foi analisada utilizando o planejamento experimental DCCR 2² e a superfície de resposta (Figura 1). Observou-se que a faixa de temperatura ótima foi de 30 a 50 °C e a faixa de pH ótimo de 3,5 a 6,5.

Como a β -glicosidase possui dois ácidos carboxílicos envolvidos na sua atividade catalítica (NAM et al., 2010), esta deve estar desprotonada para exercer sua função e isto ocorre com maior facilidade quando o meio encontra-se menos ácido, ou seja, a melhor

escolha neste caso é o pH 5,5. Pela superfície de resposta, percebe-se que em pH 5,5, a temperatura ótima é de 50°C.

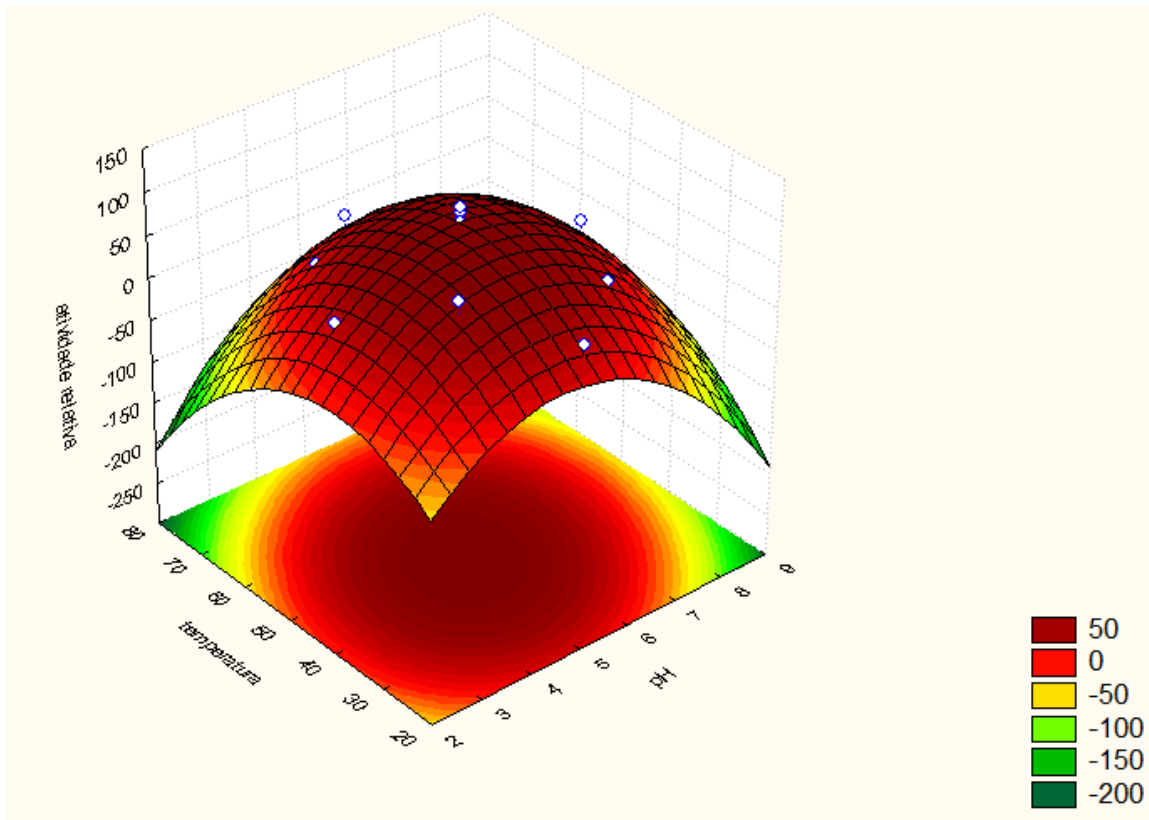


Figura 1 - Efeito da temperatura e pH na atividade de β -glicosidase imobilizada.

Aplicação da β -glicosidase Imobilizada em Extrato Aquoso de Soja

Os experimentos de aplicação de β -glicosidase imobilizada em EAS foram realizados a 50°C. Após 120 min de incubação, o teor de glicose aumentou aproximadamente 48%, sendo este aumento diretamente proporcional à liberação de isoflavonas agliconas. Santos (2010) observou um aumento de 50% na liberação de glicose após 4 a 6 h de incubação de β -glicosidase livre parcialmente purificada em farinha de soja integral. Assim, a taxa de liberação de isoflavonas agliconas com o emprego da enzima imobilizada em apenas 2 h foi similar à taxa obtida com enzima livre após 4 a 6 h, sendo assim, a enzima imobilizada apresentou-se mais eficiente.

CONCLUSÕES

A imobilização da β -glicosidase de cotilédones de soja em quitosana foi satisfatória, tendo a enzima imobilizada valores de pH e temperatura ótimos de 5,5 e 50°C. A sua aplicação em derivados β -glicosídicos como p -NPG resulta em liberação de glicose, o que indica indiretamente que ocorre a liberação de agliconas a partir da hidrólise de conjugados glicosídicos.

REFERENCIAS

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Biocatalizadores imobilizados. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.36, p.48-57, 2006.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v.100, p.2667-2675, 2009.

HSIEH, M. C.; GRAHAM, T. L. Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v.58, p.995–1005, 2001.

KUMAR, S.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: analytical applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v.58, p.138–145, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v.58, n.1, p.144-147, 1993.

MONIER, M.; AYAD, D. M.; WEI, Y.; SARHAN, A. A. Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, p.324-330, 2010.

NAM, K. H.; SUNG, M. W.; HWANG, K. Y. Structural insights into the substrate recognition properties of b-glucosidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.391, p.1131–1135, 2010.

SANTOS, R. F. **Purificação, caracterização e aplicação de β -glicosidase de cotilédones de soja**. 2010. Londrina, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEL, Londrina.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food and Bioproducts Processing**, v.88, n.(2-3), p.83-89, 2010.