

## **Interferência de Lipídios na Determinação de Atividade de beta-glicosidase de Soja Obtida por Ultrafiltração**

**Amanda Aleixo Moreira<sup>1</sup>, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro<sup>1</sup>, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira<sup>1</sup>, Ellen Cristine Duarte Garcia<sup>1</sup>, Geni da Silva Varéa<sup>1</sup>, Mara Lúcia Luiz Ribeiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia- Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr - E-mail: amanda\_a\_moreira@yahoo.com.br/maraluciaribeiro@uel.br

### **RESUMO**

*A beta-glicosidase apresenta aplicações importantes nos processos biotecnológicos, sendo relevante sua purificação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência de lipídeos na determinação da atividade de beta-glicosidase de soja por ultrafiltração e padronizar o tempo de extração de lipídios com o hexano. Os extratos das farinhas integral (FICS) e desengordurada (FDCS) com hexano foram ultrafiltrados em membranas de celulose (100 KDa e 10 KDa). A atividade de beta-glicosidase foi determinada utilizando p-NPG. O tempo de extração de lipídios a frio com hexano foi avaliado por DIC com 6 tempos de extração e 3 repetições e os resultados analisados no programa Estatística 7.0. A atividade de beta-glicosidase nas frações desengorduradas foi superior às integrais, refletindo no grau de purificação da enzima que foi 3,4 vezes superior nas amostras desengorduradas. A extração de lipídios por 4 h foi eficiente para redução de interferência na determinação de atividade de enzima.*

**Palavras-chave:** beta-glicosidase, soja, ultrafiltração, lipídios

### **INTRODUÇÃO**

As beta-glicosidases possuem diversas aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizada na indústria de alimentos<sup>1</sup>, vinhos<sup>2</sup> e de celulose<sup>3</sup>. São sintetizadas em vegetais, animais e micro-organismos. Devido sua importância, é relevante o desenvolvimento de técnicas para purificação. A ultrafiltração utiliza membranas para separar moléculas de diferentes tamanhos em sistemas aquosos<sup>4</sup>. Portanto, apresenta-se como uma alternativa para purificação de enzimas, entre estas, a beta-glicosidase de cotilédones de soja. Entretanto, a soja apresenta 20 % de lipídios em sua composição<sup>5</sup>, que podem atuar como interferentes na separação da enzima, devido suas características apolares e massa molar elevada. Além disso, podem permanecer solubilizados nos extratos, mesmo após a purificação da amostra<sup>6</sup>.

O uso de solventes orgânicos, como o hexano, no pré-tratamento de amostras é recomendado para maior precisão no resultado final. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a interferência de lipídeos na determinação de atividade de beta-glicosidase de amostra de soja durante a sua purificação parcial por ultrafiltração e padronizar o tempo de extração de lipídios com o hexano.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Farinha integral de cotilédones de soja (FICS) foi desengordurada a frio com hexano (1:10/p:v) por 1 h a 180 rpm para obtenção da farinha desengordurada de cotilédones de soja (FDGS). A FICS e FDGS foram utilizadas para extração de beta-glicosidase conforme Matsuura e Obata<sup>7</sup>. Os extratos brutos (EB) obtidos foram submetidos à ultrafiltração (Sistema Amicon) em membranas de celulose (Millipore) com pressão de 75 psi.

Os extratos de FICS e FDGS foram ultrafiltrados em membrana de 100 kDa, com obtenção de duas frações denominadas de R1 (substâncias retidas com massa molar superior a 100 kDa) e F1 (substâncias filtradas com massa molar inferior a 100 kDa). Posteriormente, a fração F1 foi ultrafiltrada em membrana 10 kDa, com obtenção de duas frações denominadas R2 (substâncias retidas com massa molar superior a 10 kDa) e F2 (substâncias filtradas com massa molar inferior a 100 kDa). Nas frações obtidas pela ultrafiltração dos extratos de FICS e FDGS foram determinadas a atividade de beta-glicosidase com substrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) conforme descrito por Matsuura e Obata<sup>7</sup> e teor de proteínas solúveis utilizando solução padrão de albumina de soro bovino, conforme descrito por Lowry et al.<sup>8</sup>. O tempo de extração de lipídios foi padronizado utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 tempos de extração, de 1–12 h, e 3 repetições, totalizando 18 experimentos realizados aleatoriamente. A análise de variância (ANOVA) e teste de tukey ( $p \leq 0,05$ ) dos resultados foram avaliados no programa Estatística 7.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As atividades de beta-glicosidase e teor de proteínas das frações obtidas na ultrafiltração de extratos de FICS e FDGS podem ser observados na Tabela 1. A partir da ultrafiltração dos EB de FICS e FDGS em membranas de 100 kDa foram obtidas as respectivas frações R1, F1, R2 e F2. Considerando que a massa molar estimada da beta-glicosidase de cotilédones de soja é de 53 kDa<sup>9</sup>, as respectivas frações R1 (massa molecular superior a 100 kDa) e F2 (massa molecular inferior a 10 kDa) foram descartadas. A fração R2 dos EB de FICS e FDGS contem proteínas de massa molar entre 10 kDa e 100 kDa e foram avaliadas em relação a atividade de beta-glicosidase.

A atividade específica de beta-glicosidase dos EB de FICS e FDGS foi de  $0,61 \times 10^{-3}$  e  $0,57 \times 10^{-3}$ , e não diferiram significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). Entretanto, as frações R2 dos extratos FICS e FDGS foram de  $0,20 \times 10^{-3}$  e  $0,63 \times 10^{-3}$ , e diferiram significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ). O grau de purificação de beta-glicosidase de FDGS foi 3,4 vezes superior ao da FICS. Considerando que a farinha de soja integral apresenta teor elevado de lipídeos, em média 20%<sup>5</sup>, conclui-se que este interferiu na determinação de atividade da enzima e em sua filtração.

Esta interferência de lipídios em análise químicas foi relatada por Hajslová et al.<sup>6</sup> na determinação de pesticida residual por CG e por Berhow<sup>10</sup>, na análise de isoflavonas de soja por CLAE.

**Tabela 1-** Atividade de beta-glicosidase e teor de proteínas das frações obtidas na ultrafiltração de extratos de farinha integral de cotilédones de soja (FICS) e farinha desengordurada de cotilédones de soja (FDCS) em membranas de celulose de 100 kDa e 10 kDa

Amostra	Frações	Proteína		β-glicosidase	
		Mg	Atividade* (UA)	AE** ( $\times 10^{-3}$ )	Grau de Purificação***
FICS	EB	879,0 <sub>A</sub>	0,54 <sub>A</sub>	0,61 <sub>A</sub>	1,00
	R <sub>2</sub>	101,5 <sub>b</sub>	0,02 <sub>b</sub>	0,20 <sub>b</sub>	0,33
FDCS	EB	875,8 <sub>A</sub>	0,50 <sub>A</sub>	0,57 <sub>A</sub>	1,00
	R <sub>2</sub>	237,3 <sub>a</sub>	0,15 <sub>a</sub>	0,63 <sub>a</sub>	1,11

CV=5,04 e teste de Tukey 5%

Médias dos EB (extrato Bruto) com letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ( $p \geq 0,05$ ).

Médias dos R<sub>2</sub> (massa molar entre 10 kDa e 100 kDa) com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ( $p \geq 0,05$ ).

\*UA=  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol liberado por minuto de reação nas condições do ensaio

\*\*AE= Atividade Específica (UA/mg de proteínas)

\*\*\*Grau de purificação= (AE do R<sub>2</sub>/AE do EB)

Como a atividade específica de beta-glicosidase foi superior para o extrato de FDCS, foi pesquisado o melhor tempo de extração a frio de lipídios utilizando um delineamento experimental inteiramente casualizado (Tabela 2).

**Tabela 2-** Atividade de beta-glicosidase e teor de proteínas em farinha desengordurada de cotilédones de soja (FDCS) em diferentes tempos de extração a frio de lipídios

Extração de Lipídios (h)	Atividade <sup>1</sup> UA mL <sup>-1</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade Específica ( $\times 10^{-3}$ )
0	1,14 c	1,81 a	0,63
1	1,38 b	2,10 a	0,66
2	1,42 b	1,93 a	0,74
4	1,57 a	2,31 a	0,68
8	1,62 a	2,05 a	0,79
10	1,42 b	2,29 a	0,62
12	1,10 c	2,23 a	0,49

Teste de Tukey 5% com CV: 6,09.

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si na mesma coluna ( $p > 0,5$ ).

A atividade de beta-glicosidase das FDCS foi superior nos tempos de extração de lipídios de 4 h e 8 h, com  $1,57 \times 10^{-3}$  e  $1,62 \times 10^{-3}$  UA, não diferiram significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ), mas diferiram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) dos outros tempos de extração (Tabela 2). Após 10 h de extração de lipídios ocorreu uma redução na atividade da enzima, sugerindo desnaturação da mesma após este tempo de agitação em temperatura ambiente. O teor de proteínas das

amostras não diferiu significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ) indicando que sua determinação não foi afetada pela presença de lipídios.

### CONCLUSÕES

A presença de lipídios em amostras de soja interferiu na determinação de atividade de beta-glicosidase durante a sua purificação parcial por ultrafiltração. A extração de lipídios das amostras de soja com hexano a frio e agitação lenta por 4 h foi eficiente para eliminar esta interferência.

### REFERÊNCIAS

- (1) PARK, Y. K.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Biotransformação de isoflavonas de soja. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 20, p. 12–14, 2001.
- (2) PALMERI, R.; SPAGNA, G. b-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 382–389, 2007.
- (3) BALDRIAN, P.; VALASKOVA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- (4) SHKINEV, V. M.; DZHERAYAN, T. G.; KARANDASHEV, V. K.; ARAKCHAA, K. D.; SPIVAKOV, B. Y. Membrane Filtration for the Continuous Fractionation of Species and Macromolecules: Component Distribution in the Arzhaan Spring Water. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 135-141, 2000.
- (5) LIU, K. **Soybeans: chemistry, technology and utilization**, New York. Chapman & Hall, 537 p, 1997.
- (6) HAJŠLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUŠTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M.; J. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A** 1998, v. 800, p.283-295, 1998.
- (7) MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- (8) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- (9) SANTOS, R. F. **Purificação, caracterização e aplicação de  $\beta$ -glicosidase de cotilédones de soja**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.
- (10) BERHOW, M. A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B. S.; MANTHEY, J. A. (ed.). **Flavonoids in the living cell**, New York: Kluser Academic, p. 61 - 76, 2002.