

Comparação de Metodologias para Determinação de Atividade de beta-glicosidase de Cotilédones de Soja

Ana Camila Vaitkevicius Ferreira¹, Ellen Cristine Duarte Garcia¹, Amanda Aleixo Moreira¹, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro¹, Mara Lúcia Luiz Ribeiro¹

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia- Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

RESUMO

As β -glicosidases podem ser aplicadas em diversos processos biotecnológicos. Entretanto, na literatura há relatos de diferentes metodologias para determinação de sua atividade. Assim, o objetivo deste trabalho foi comparar três metodologias de determinação de atividade de β -glicosidase em amostras de soja. A β -glicosidase de cotilédones de soja foi extraída com tampão fosfato citrato 0,1 M, pH 6,6. Foi realizado um planejamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições, e as metodologias testadas foram A: reação com 1mM de p -NPG, tampão fosfato citrato em 30 min a 30 °C e Na_2CO_3 ; B: reação com 5mM de p -NPG, tampão fosfato de sódio em 15 min a 37 °C e tampão fosfato de sódio e C: reação com 5mM de p -NPG, tampão fosfato citrato em 15 min a 37 °C e tampão fosfato de sódio. As metodologias mais eficientes foram B e C com resultados de atividade 5 vezes superior aos da metodologia A.

Palavras-chave: β -glicosidase, soja, metodologia.

INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (BGLs) apresentam importância em inúmeras aplicações biotecnológicas. Formam um grupo altamente heterogêneo em enzimas hidrolíticas¹. Tais enzimas são encontradas em diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas e animais² com reação catalisada pela hidrólise de ligações β -glicosídicas de di e/ou oligosacarídeos liberando glicose. As BGLs possuem inúmeras funções endógenas nos vegetais, podendo ser utilizadas na hidrólise de isoflavonas glicosídicas (genistina, daidzina e glicitina) em agliconas (genisteína, daidzeína e gliciteína) que apresentam ação benéfica na saúde humana, atuando no controle e prevenção de doenças crônicas².

Assim podem ser aplicadas em diversos setores industriais, principalmente na indústria de alimentos. A demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem aumentado, a clonagem molecular de genes codificantes para BGLs representa uma poderosa ferramenta para a produção de proteínas em grande escala e também oferece a possibilidade da aplicação de métodos de engenharia de proteínas e no melhoramento de suas funções³. Além disso, a utilização de BGLs imobilizadas em vários suportes tem destaque, em virtude da possibilidade de reutilização das enzimas, operação contínua e controle da formação do



produto⁴. A seleção de metodologias envolvendo análise de enzima é comum. Santos et al.⁵ comparou duas técnicas para quantificação de lipase de *Aspergillus sp.*, utilizando extração pré-titulação e titulação direta. A titulação direta apresentou resultado mais eficiente, pois apresentou maior reprodutibilidade, apesar de possuir menor sensibilidade.

Dessa forma, para o sucesso das aplicações biotecnológicas de BGLs a atividade da enzima precisa ser verificada. Para isso é necessário escolher um método adequado, considerando a amostra a ser utilizada. Assim, o objetivo do trabalho foi comparar três metodologias para determinação de atividade de β -glicosidase em amostras de soja utilizando um planejamento experimental inteiramente casualizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises de atividade de β -glicosidase dos cotilédones de soja foi realizado um planejamento experimental inteiramente casualizado, tendo como variáveis três técnicas de determinação (A, B e C) com cinco repetições cada uma, totalizando 15 experimentos realizados aleatoriamente. Para obtenção das amostras, a soja foi separada em cotilédones, gérmen e casca. Os cotilédones foram moídos em granulometria fina e a β -glicosidase foi extraída com tampão fosfato citrato 0,1 M, pH 6,6, segundo Matsuura e Obata⁶. Este extrato foi utilizado para testar as técnicas de determinação de atividade denominadas de A: p -NPG 1mM, tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5 em 30 min a 30 °C e Na_2CO_3 0,5 M como solução finalizadora de reação (Matsuura e Obata)⁶; B: p -NPG 5 mM, tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5 em 15 min a 37 °C e tampão fosfato de sódio 1M, pH 10 como solução finalizadora de reação (Isgrove)⁷ e C: p -NPG 5mM, tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5 em 15 mim a 37 °C e tampão fosfato de sódio 1M pH 10 como solução finalizadora de reação (Isgrove modificado)⁷. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p -nitrofenol por min nas condições de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de atividade de β -glicosidase de extrato de cotilédone de soja, avaliada por diferentes metodologias podem ser observados na Tabela 1.

As metodologias B e C não apresentaram diferenças significativas entre si ($p \geq 0,05$) e os resultados de atividade de β -glicosidase foram superiores em cinco vezes em relação a metodologia A ($p \leq 0,05$). Esta diferença pode ser atribuída à concentração do substrato p -NPG, temperatura e tempo de incubação e solução finalizadora.

Os dados obtidos para as metodologias B e C indicam que a utilização do tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,0 ou fosfato citrato 0,1 M, pH 5,0 não interferiu nos resultados.



Tabela 1- Atividade de β -glicosidase de extrato de cotilédone de soja, avaliada por diferentes metodologias

	METODOLOGIA					UA**	
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	ρ -NPG* (mM)	Tampão 0,1 M; pH 5,0	Finalizador	410 nm ($\times 10^{-3}$)	420 nm ($\times 10^{-3}$)
A	30	30	1	Fosfato Citrato	Carbonato Sódio 0,5 M	0,98 bA	0,95 bA
B	15	37	5	Fosfato Sódio	Fosfato Sódio 1 M	5,48 aA	5,27 aA
C	15	37	5	Fosfato Citrato	Fosfato Sódio 1 M	5,19 aA	5,13 aA

* ρ -NPG: ρ -nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo.

**UA: quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ρ -nitrofenol por min.

^{410 nm e 420 nm} Comprimentos de onda utilizados para análise em espectrofotômetro.

Média de cinco repetições; teste de tukey 5% com CV: 2,11%.

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente ($p \geq 0,05$).

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna não diferem significativamente ($p \geq 0,05$).

As reações de determinação de atividade foram lidas em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda de 410 nm e 420 nm. Os resultados não apresentaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$). O coeficiente de variação (CV) dos resultados foi de 2,11%. Portanto, as metodologias avaliadas apresentaram boa reprodutibilidade e são consideradas precisas.

Segundo Pimentel-Gomes⁸, quanto menor CV mais precisos são os experimentos, sendo que abaixo de 10% é considerado bom.

CONCLUSÕES

Duas metodologias (B e C) foram mais eficientes na determinação de atividade de β -glicosidase de soja e os fatores que intereriram nos resultados foram concentração do substrato ρ -NPG e condições de incubação da reação.

REFERÊNCIAS

- (1) BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.
- (2) ESEN, A. **beta-glucosidase**. In: Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Inc., 2003.
- (3) JANG, H. D.; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 19, p. 263-268, 2003.
- (4) GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, c. 30, p. 261-275, 1997.
- (5) SANTOS, N. P.; ALMEIDA, F. G. O.; RESENDE, R. R.; FERNANDES, O. C. C.; FERREIRA, J. S.; CARNEIRO, A. L. B.; SILVA, J. C.; SILVA, S. L.; LONGATTI, T. R.; ALEIXO, A. A.; CARNEIRO, P. G.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

- Comparação de metodologia para determinação da atividade lipolítica de *Aspergillus sp.* In: 51º Congresso Brasileiro de Química – Meio Ambiente e Energia. **Trabalho Completo**, São Luís, 2011.
- (6) MATSUURA, M.; OBATA, A. β -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- (7) ISGROVE, F.H.; WILLIAMS, R.J.K.; NIVEN, A.T.; ANDREWS, A.T. Enzyme immobilization on nylon- optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 28, p. 225-232, 2001.
- (8) PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Editora F. Pimentel-Gomes, USP- Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo, 14. Ed, p. 477, 2000.