

Artigo

IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE SOJA EM BUCHA VEGETAL (*LUFFA CYLINDRICA*) UTILIZANDO TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO COMO ATIVADOR

Ferreira ACV¹

Universidade Estadual de Londrina
<http://orcid.org/0000-0001-8379-195X>

Moreira AA²

Universidade Estadual de Londrina
<https://orcid.org/0000-0002-3233-0405>

Silva JB³

Universidade Estadual de Londrina
<https://orcid.org/0000-0002-8429-8558>

Ribeiro MLL⁴

Universidade Estadual de Londrina
<https://orcid.org/0000-0002-0800-3391>

Resumo: Bucha vegetal ativada com trimetafosfato de sódio foi utilizada como suporte para a imobilização da β -glicosidase, com o objetivo de propor um novo sistema catalítico econômico e não tóxico para a aplicação industrial. A β -glicosidase foi obtida a partir de grãos de soja e parcialmente purificada por precipitação fracionada com sulfato de amônio e imobilizada em bucha vegetal tratada. A bucha foi tratada por lavagem com água quente e fria e depois ativada com trimetafosfato de sódio. O procedimento de imobilização foi otimizado, e a enzima imobilizada foi caracterizada por testes de estabilidade térmica, parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e reutilização. Concluiu-se que a bucha vegetal, em sua estrutura natural, apresenta bons resultados

¹ Especialista em Perícias Judiciais pelo Centro Universitário Filadélfia; mestranda em Biotecnologia pelo programa de Pós graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina; anacamilavf@gmail.com

² Mestre e doutoranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Londrina; aleixomoreira1712@gmail.com

³ Doutora e Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina; josibonifacio0576@gmail.com

⁴ Doutora e Mestre em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina; maralucia.ribeiro@gmail.com

de imobilização. O trimetafosfato de sódio foi um ativador eficiente. A estabilidade térmica da enzima imobilizada aumentou quando comparada à enzima livre. Foi possível reutilizá-lo cinco vezes antes que houvesse uma queda repentina na atividade. Portanto, o sistema é uma boa alternativa para a indústria, oferecendo uma opção segura e de baixo custo.

Palavras-chave: Bucha vegetal. β -glicosidase. Trimetafosfato de sódio.

Immobilization of soybean β -glycosidase in loofa sponges (*Luffa cylindrica*) using sodium trimetaphosphate as activator

Abstract: *Loofah sponge activated with sodium trimetaphosphate was used as support for the immobilization of β -glycosidase, with the objective to propose a new economic and non-toxic catalytic system for the industrial application. of β -glycosidase was obtained from soybeans grains and partially purified by fractional precipitation with ammonium sulfate and immobilized in treated loofa sponge. The loofa was treated by washing with hot and cold water and then activated with sodium trimetaphosphate. The immobilization procedure was optimized and the immobilized enzyme was characterized by thermal stability tests, kinetic parameters (K_m and V_{max}) and reuse. It was concluded that the alkaline treatment was not efficient for the immobilization, and the loofa sponge in its natural structure presents good immobilization results. Sodium trimetaphosphate was an efficient activator. The thermal stability of the immobilized enzyme increased when compared to the free enzyme. It was possible to reuse it 5 times before there was a sudden drop in activity. Therefore the system is a good alternative for the industry, providing a low cost and safe option.*

Keywords: *Loofah sponge. β -glycosidase. Sodium trimetaphosphate.*

1 INTRODUÇÃO

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo hidrolases, E.C. 3.2.1.21) são um grupo de enzimas que atuam em ligações glicosídicas, presentes em dissacarídeos, oligossacarídeos e outros glicosídeos conjugados, hidrolisando-se e liberando glicose.¹ Nos vários organismos em que são encontradas, as β -glicosidases apresentam diversas funções, e é essa diversidade que possibilita sua utilização em diferentes ramos e processos industriais. Na indústria alimentícia, essas enzimas desempenham um papel importante na sacarificação, fermentação e produção de aromas, chás, vinhos, sucos de frutas

e celulose.² Também são utilizadas pela indústria de combustíveis em matérias-primas renováveis para conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis.³ Porém, seu uso ainda é limitado em razão da instabilidade de sua estrutura, dificuldade de separação da enzima do produto final e a impossibilidade de sua recuperação para aplicações repetidas.^{4,5} Uma alternativa para esse problema seria a sua imobilização.

A imobilização de enzimas é um processo que consiste basicamente na ligação de uma enzima a um suporte, com o objetivo de manter a sua atividade catalítica.⁶ Esse processo pode trazer vantagens para a indústria, como, por exemplo, a maior resistência das enzimas às condições adversas dos meios reacionais, a possibilidade de reutilização, a redução dos custos e a ausência dela no produto final, evitando possíveis alterações de sabor, odor e textura.⁷

O processo de imobilização pode ser feito por meio de quatro diferentes métodos: imobilização por confinamento, por encapsulação, por adsorção ou por ligação covalente,⁸ sendo que a escolha deve ser feita analisando as características dos agentes envolvidos – enzima e suporte – além do custo total do procedimento, a possível toxicidade dos agentes envolvidos, a estabilidade operacional, as características finais desejadas e a aplicação desejada.^{9,10}

O método de imobilização por ligação covalente exige o tratamento do suporte com reagente ativador, que vai ligar a enzima ao suporte de maneira estável.¹⁰ O trimetafosfato de sódio (TMP) (Figura 1) é um reagente que pode ser utilizado como ativador para a imobilização de enzimas. Ele possui características não tóxicas, e por isso seu uso é mais amplo, tendo sido utilizado na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica na liberação cólon-específica de fármacos.¹¹ Além disso, seu custo, comparado ao glutaraldeído, um dos ativadores mais utilizados em processos de imobilização, pode chegar a ser três vezes menor considerando as principais marcas no mercado. Um fator também muito importante no processo de imobilização de enzimas é a escolha adequada do suporte. O suporte deve ter elevada área superficial, ser permeável, ser estável química e mecanicamente às condições operacionais, ser regenerável, ter baixo custo, ser de natureza hidrofílica ou hidrofóbica e ter uma morfologia e composição favoráveis ao processo.¹² Um material que se adequa a esses requisitos é a bucha vegetal.

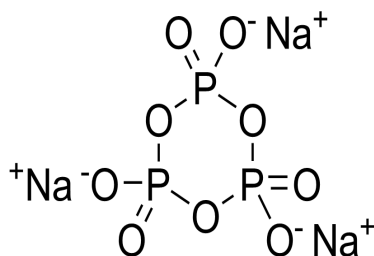


Figura 1 – Estrutura molecular do trimetafosfato de sódio (TMP)

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*), uma planta facilmente encontrada no Brasil, é formada por uma rede de fibras finas, resistentes, elásticas e macias, constituídas de celulose, hemicelulose e lignina. É um material altamente poroso, de elevado volume específico, biodegradável, de baixo custo, proveniente de fonte renovável e atóxico, características que a tornam uma boa opção como suporte para imobilização de enzimas.¹³ Sua utilização em sistemas catalíticos já foi abordada por Zhu et al. (2013)¹⁴ e Gong et al. (2013)¹⁵ pela imobilização de lipase em bucha vegetal ativada com carbodiimida e oxidação por periodato, respectivamente, e em ambos trabalhos foram observadas melhorias de estabilidade térmica e reutilizações. Outros autores¹⁶ imobilizaram a ciclodextrina glicosiltransferase em bucha vegetal com sucesso e a utilizaram para produção de ciclodextrinas.

Considerando os benefícios que um sistema catalítico com a β -glicosidase imobilizada em bucha vegetal como suporte podem proporcionar para favorecer a aplicação industrial, com possibilidade de reuso da enzima com redução de custos, o objetivo neste trabalho foi otimizar as condições de imobilização de β -glicosidase de soja em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) foi adquirida em supermercado local. A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] foi obtida da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

(Embrapa-Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil), cultivar BRS 213, considerando-se que os grãos danificados, manchados e de materiais estranhos foram removidos. O substrato p-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (p-NPG), padrão p-nitrofenol (p-NP), albumina sérica bovina (BSA) e trimetafosfato de sódio com 95% de pureza foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 OBTENÇÃO DA β -GLICOSIDASE

A extração de β -glicosidase dos grãos de soja foi realizada conforme Matsuura e Obata (1993)¹⁷. Os grãos foram moídos até se tornarem uma farinha fina. À farinha de soja foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,6, na proporção de 1:10 (peso/volume). A solução foi deixada sob agitação constante durante 1 hora a 4 °C e posteriormente foi centrifugada a 4 °C, 10000 x g por 20 min. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante foi acidificado com HCl 100 mM até atingir pH 5,0 e ser novamente centrifugado sob as mesmas condições. O sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

Para purificação parcial da enzima foi feita precipitação fracionada com sulfato de amônio até 85% em duas etapas, 0-40%, e depois 40-85%. O precipitado da última etapa (P40-85%) foi ressuspenso em tampão fosfato-citrato 50 mM, pH 5,0 e submetido à diálise por 24 horas a 4 °C.¹⁸ Essa fração parcialmente purificada foi utilizada como fonte de enzima para a aplicação na bucha vegetal.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE E ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA SOLÚVEL E IMOBILIZADA

Para análise de atividade de β -glicosidase solúvel, 1 mL do substrato sintético p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p-NPG) 1 mM em tampão fosfato citrato 100 mM, pH 5,0 foi acondicionado em banho-Maria a 30 °C por 10 min. Após esse período, 0,25 mL de amostra foi adicionado e mantido novamente em banho-maria a 30 °C por 30 min. Decorrido esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1,25 mL

de carbonato de sódio 500 mM.¹⁷ Para análise de atividade da enzima imobilizada em bucha vegetal adicionaram-se 100 mg do suporte contendo a enzima em 4 mL de tampão fosfato-citrato (100 mM, pH 5) com p-NPG (1 mM) a 30 °C durante 30 min e separou-se por filtração. Ao filtrado (1 mL) adicionou-se 1,25 mL de carbonato de sódio (500 mM). A atividade da enzima solúvel e imobilizada foi determinada pela liberação do p-nitrofenol (p-NP) quantificado por espectrofotometria a 420 nm, utilizando uma curva padrão (p-NP: 0,016 a 0,160 µmol). Uma unidade de atividade da enzima (UA) foi definida como a quantidade de β-glicosidase, que libera 1 µmol de p-NP min⁻¹, nas condições de ensaio.

Para determinação da atividade específica da enzima o teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry, Rosenbroughn, Farr e Randar,¹⁸ sendo que a atividade específica da enzima foi definida como unidade de atividade da enzima por mg de proteínas (UA/mg). Foi utilizada uma curva de calibração com albumina de soro bovino (ASB) com concentrações de 40 a 400 µg/mL.

2.4 TRATAMENTOS DA BUCHA VEGETAL

A bucha vegetal foi cortada em pedaços de 2 cm³, mantidos em água fervente por 30 min, lavados abundantemente em água corrente e então deixados por 24 horas em água destilada (trocada três vezes durante esse período). Posteriormente, o material foi seco em estufa a 70 °C e armazenado até o uso.¹⁹

A ativação da bucha vegetal – nas etapas seguintes – foi realizada da mesma forma, variando as concentrações de trimetafosfato de sódio conforme os delineamentos (Tabelas 1 e 2). O suporte tratado foi colocado em contato com a solução de trimetafosfato de sódio (50 mL de solução para cada quatro pedaços de bucha) e deixado sob agitação lenta e constante, a 25 °C, por 30 min. Na sequência foi realizada a imobilização.

Para a imobilização da enzima foram utilizados quatro pedaços de 2 cm³ de bucha vegetal tratada com o ensaio escolhido. Aos pedaços de bucha vegetal foram adicionados 50 mL de solução de enzima. O esquema de ligação dos grupamentos

envolvidos suporte-ativador-enzima pode ser observado na Figura 2, considerado básico, uma vez que podem ocorrer ligações cruzadas.

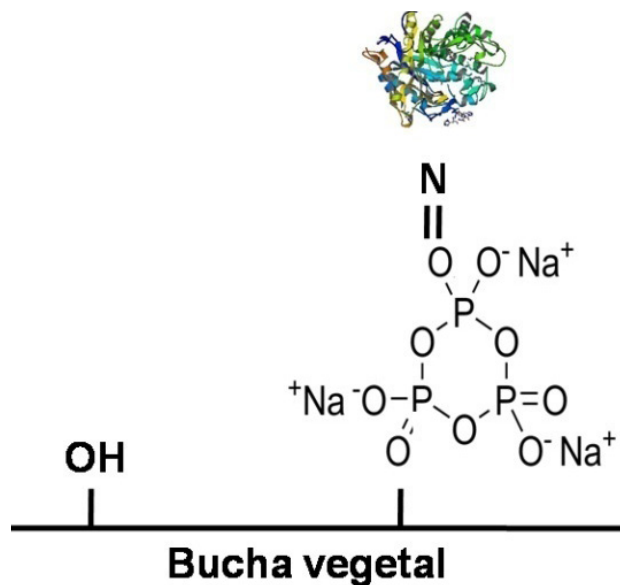


Figura 2 – Esquema dos possíveis grupamentos químicos envolvidos no processo de ativação da bucha vegetal com trimetafosfato de sódio e imobilização da β-glicosidase de soja

2.5 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS E AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO

A bucha vegetal tratada ativada com trimetafosfato de sódio foi utilizada para análises exploratórias por delineamento Box Hunter & Hunter completo. As variáveis independentes investigadas foram: pH, tempo de incubação enzima-suporte, concentração inicial de proteínas e concentração do agente ativador (Tabela 1). O rendimento de imobilização (RI) foi determinado como variável dependente (y). Após a análise dos resultados obtidos nesse delineamento, as variáveis pH e tempo de incubação foram fixadas em pH 7,0 e 24 horas de incubação. Para otimizar a imobilização da β-glicosidase foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (2^2) DCCR para avaliar a influência das variáveis independentes, concentração do ativador (X_1) e

concentração inicial de proteínas (X_2) (Tabela 2). As funções-resposta foram avaliadas pelo modelo matemático:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i^2 + \sum \beta_{ii} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

Em que:

Y = função resposta;

$x_i x_j$ = variáveis codificadas;

β = coeficientes estimados para cada termo do modelo matemático de superfície de resposta);

ε = erro experimental.

Esse modelo matemático foi obtido por análise de variância (ANOVA, $p = 0,05$) e análise de regressão pelo programa estatística 10,0 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Superfícies de respostas foram geradas para função de resposta avaliada.

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis Box Hunter & Hunter

Variáveis independentes	Níveis do planejamento		
	-1	0	1
X_1 pH	4,0	5,5	7,0
X_2 tempo de incubação da enzima (h)	16	24	32
X_3 concentração de proteínas da solução de enzima (mg/mL)	0,5	1,0	1,5
X_4 concentração do trimetafosfato de sódio (%)	10	20	30

Tabela 2 – Variáveis independentes e níveis de variação do DCCR

Variáveis independentes	Níveis do planejamento				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X_1 concentração do trimetafosfato de sódio (%)	1	4	12	20	23
X_2 concentração de proteínas inicial (mg/mL)	0,04	0,2	0,6	1	1,16

O rendimento de imobilização foi calculado por meio da Equação:

$$RI = \frac{\text{Atividade específica da enzima inicial} - \text{Atividade específica no S0}}{\text{Atividade específica inicial da enzima}} \times 100 \quad (2)$$

$$RI = \frac{\text{Atividade específica da enzima inicial} - \text{Atividade específica no S0}}{\text{Atividade específica inicial da enzima}} \times 100$$

Em que:

RI = rendimento de imobilização;

S0 = solução de enzima após o processo de imobilização e retirada dos pedaços de bucha.

O cálculo do RI pela atividade específica foi empregado por diversos autores.²⁰⁻²²

2.7 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

2.7.1 Determinação de pH e temperatura ótimos

Para a determinação de pH e temperatura ótimos para a atividade da β-glicosidase livre e imobilizada em bucha vegetal foi realizado um DCCR 2², com quatro pontos axiais e cinco repetições do ponto central, totalizando 13 experimentos (Tabela 3). O pH variou de 4,2 a 9,8 (tampão fosfato citrato e fosfato de sódio 100 mM), e a temperatura variou de 25 a 75 °C, com incubação em banho-maria.

Tabela 3 – DCCR para determinação da atividade de β-glicosidase

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas	
	x ₁ (X ₁)	x ₂ (X ₂)
1	-1 (5)	-1 (35)
2	-1 (5)	1 (75)
3	1 (9)	-1 (35)

Experimentos	Variáveis codificadas e decodificadas	
	$x_1 (X_1)$	$x_2 (X_2)$
4	1 (9)	1 (75)
5	-1,41 (4,2)	0 (50)
6	1,41 (9,8)	0 (50)
7	0 (7)	-1,41 (25)
8	0 (7)	1,41 (75)
9	0 (7)	0 (50)
10	0 (7)	0 (50)
11	0 (7)	0 (50)
12	0 (7)	0 (50)
13	0 (7)	0 (50)

Nota: X_1 (pH) e X_2 (temperatura).

2.7.2 Determinação da estabilidade térmica

A β -glicosidase livre e imobilizada em bucha vegetal lavada e ativada com TMP foram pré-incubadas a 30, 50 e 70 °C, ausente o substrato, em tampão fosfato-citrato 100 mM, pH 5,0 por 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 220 e 240 min.⁹ Amostras de enzima livre e imobilizada foram retiradas do meio de incubação nos tempos determinados e foram analisadas quanto à atividade residual de β -glicosidase (%) nas condições ótimas de pH (7,0) e temperatura (50 °C).

2.7.3 Determinação de K_m e V_{max}

Os valores de K_m e V_{max} foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk, conforme descrição de Nelson e Cox.²³ Para isso, foram preparados tubos contendo p-NPG em concentração de 0,1 – 20 mM, sendo aplicada concentração constante da enzima livre ($9,3 \cdot 10^{-3}$) e imobilizada (um pedaço de enzima imobilizada em bucha vegetal). Posteriormente, a atividade de β -glicosidase foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura.

2.7.4 Determinação da estabilidade operacional

A estabilidade operacional da β-glicosidase livre e imobilizada foi determinada mediante a avaliação da atividade residual da enzima quando reutilizada. Para isso, um pedaço de bucha vegetal foi incubado com 5 mL de p-NPG consecutivamente, e a atividade residual foi analisada nas condições ótimas de pH e temperatura.

3 RESULTADOS

3.1 RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE EM BUCHA VEGETAL TRATADA: ANÁLISE EXPLORATÓRIA

A partir da análise dos resultados pode-se observar que todas as variáveis foram significativas ($p \leq 0,05$), porém a interação entre as variáveis X_1X_2 , X_2X_3 e X_2X_4 não foi significativa ($p \geq 0,05$). A variável pH se mostrou significativa e positiva, e experimentos com um pH mais neutro (7,0) apresentaram maior rendimento de imobilização. O contrário pode ser observado para a concentração de trimetafosfato, visto que experimentos em que foi feita a ativação do suporte com uma menor concentração do agente reticulante apresentaram maior rendimento para o tempo e para a concentração de proteínas. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,83, ou seja, 83% dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (Equação 3), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y_1 = 77,64 + 55,33x_1 - 9,24x_2 - 30,28x_3 - 23,98x_4 - 26,55x_1x_3 - 22,84x_1x_4 + 12,66x_3x_4 \quad (3)$$

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 9 e 287%, sendo que os resultados maiores que 100% indicaram que houve uma grande imobilização de proteínas, porém, provavelmente, foram formadas muitas ligações cruzadas entre elas ou hiperativação em razão da imobilização da enzima. Os dois melhores resultados foram encontrados nas

mesmas condições: pH 7,0, concentração inicial de proteínas de 0,5 mg e ativação feita com trimetafosfato 10%; a única diferença entre eles foi o tempo de incubação.

A região com maior RI da β -glicosidase de soja na bucha vegetal foi encontrada com 1,5 mg de proteínas, pH 4,0 (Figura 3a) e 10% de trimetafosfato de sódio (Figura 3b).

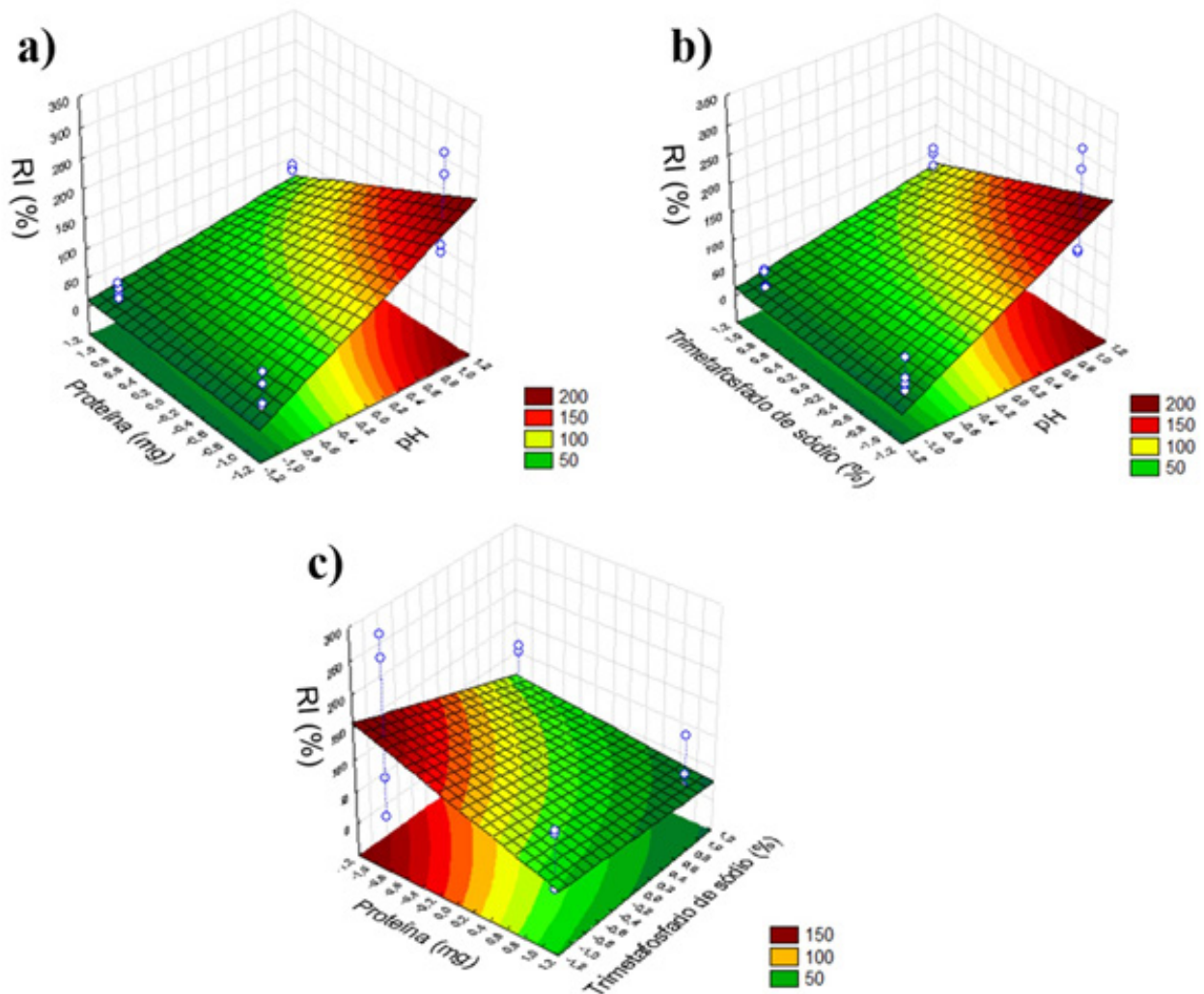


Figura 3 – Superfície de resposta em função da pH/proteína (a), pH/trimetafosfato de sódio (b) e proteína/trimetafosfato de sódio (c) para o RI (%) da ativação com trimetafosfato de sódio

Com os resultados obtidos nos testes preliminares de imobilização da enzima foi possível fixar o tempo de incubação em 24 h e o pH 7,0, possibilitando, então, a melhor avaliação das outras duas variáveis, a concentração do trimetafosfato de sódio e a concentração inicial de proteínas.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE B-GLICOSIDASE EM BUCHA VEGETAL

A partir da análise dos resultados pode-se observar que somente a variável concentração de TMP apresentou diferença sobre o RI ($p \leq 0,05$), assim como a interação entre ambas as variáveis. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,89, ou seja, 89% dos dados experimentais se ajustam adequadamente ao modelo proposto (Equação 4), dessa forma, o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

$$Y_2 = 91,6 - 72,5887x_1 - 62,1550x_1x_2 \quad (4)$$

O rendimento de imobilização no experimento variou entre 0 e 93%. Os melhores resultados foram encontrados na repetição do ponto central, condição que valida o experimento. A região ótima para imobilização da β -glicosidase nesse experimento foi com 0,6 mg/mL de proteína e ativação com TMP 12% (Figura 4).

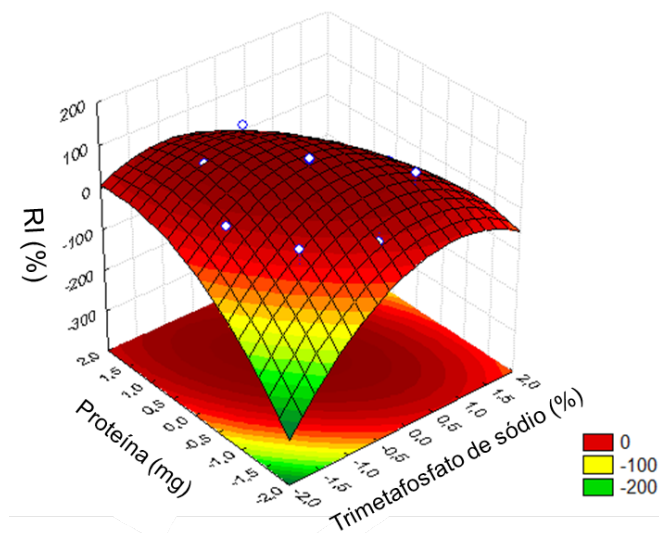


Figura 4 – Superfície de resposta em função da concentração de proteína/trimetafosfato de sódio para o RI (%) da ativação com trimetafosfato de sódio

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA IMOBILIZADA

3.3.1 pH e temperatura ótimos

A influência do pH e da temperatura na atividade da enzima imobilizada foi analisada utilizando um DCCR². Os resultados de atividade da enzima encontrados variaram de 0,30 a 3,69 UA 10⁻³ para enzima solúvel e de 0,43 a 5,02 UA 10⁻³ para enzima imobilizada.

Conforme os coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA), tanto o pH quanto a temperatura apresentaram efeito linear negativo e significativo de acordo com a ANOVA. O modelo matemático pode ser descrito pela Equação 5. O R² foi de 0,99, indicando que 99% dos dados se enquadram no modelo proposto.

$$Y = 0,000477 - 0,000209x_1 - 0,000200x_2 \quad (5)$$

A partir dos modelos matemáticos foram construídas as superfícies de resposta (Figura 5). Para obtenção de maior atividade de β -glicosidase de soja, a região ótima de pH foi 4 a 6 para enzima solúvel (Figura 5a) e pH 5 a 7 para a enzima imobilizada em bucha vegetal (Figura 5b). A região ótima de temperatura para a enzima solúvel foi de 30 a 60 °C, permanecendo o mesmo intervalo para a enzima imobilizada.

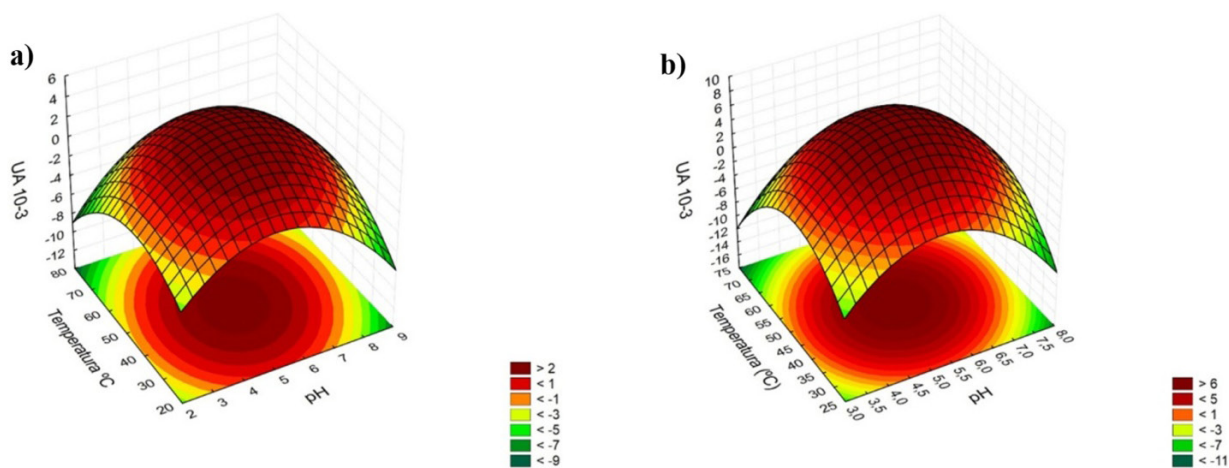


Figura 5 – Superfícies de resposta da interação pH/temperatura ótimos para atividade de β -glicosidase (UA 10⁻³) do DCCR 2^o da enzima solúvel (a) e imobilizada em bucha vegetal (b)

Os valores ótimos para a enzima solúvel observados foram pH 5,5 e temperatura de 50 °C, enquanto para a enzima imobilizada foram pH 7,0 e temperatura de 50 °C, observado nos pontos centrais; portanto, a validação do modelo matemático não foi necessária.

3.3.2 Estabilidade térmica da β -glicosidade de soja livre e imobilizada

A estabilidade térmica da enzima solúvel e da enzima imobilizada foi avaliada, e os resultados podem ser observados na Figura 6, com maior estabilidade para a enzima imobilizada.

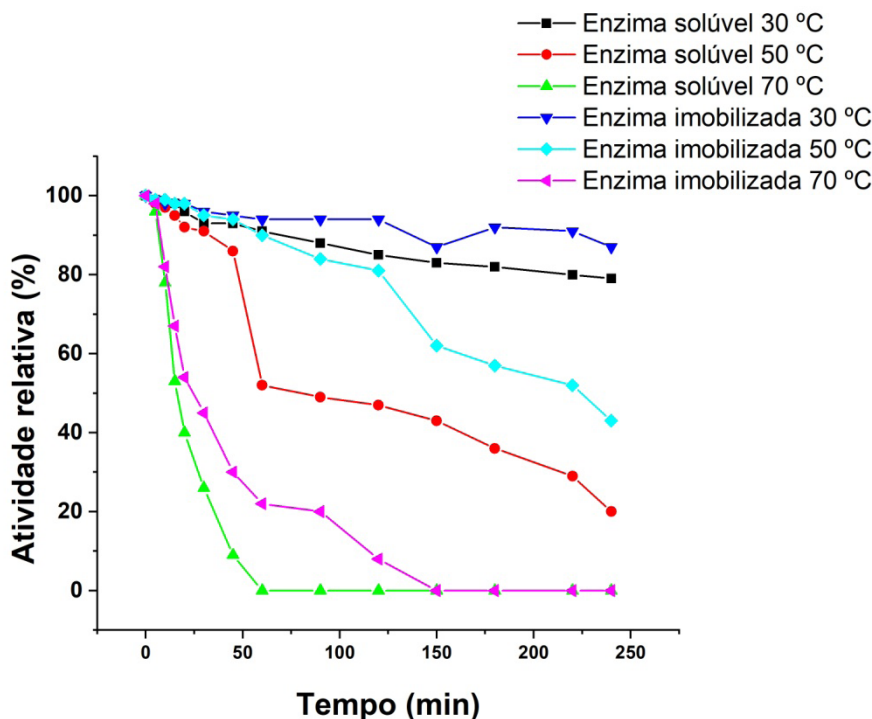


Figura 6 – Estabilidade térmica da enzima solúvel e imobilizada

3.3.3 K_m e $V_{máx}$ da enzima livre e imobilizada

Os valores do K_m da β -glicosidase solúvel e imobilizada foram de 0,29 mM e 0,34 mM, respectivamente, e os valores de velocidade máxima foram 7 $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$ para a enzima solúvel e 5,12 $\mu\text{mol de p-NP min}^{-1}$ para a enzima imobilizada, o que demonstra que houve uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato.

3.3.4 Estabilidade operacional da enzima imobilizada

A reutilização da enzima imobilizada em bucha vegetal foi analisada por 15 vezes, por meio da sua aplicação sucessiva em substrato sintético (p-NPG). Nos cinco primeiros usos a enzima manteve uma atividade alta, obtendo 88% de atividade no quinto uso. No sétimo uso apresentou 50% de atividade relativa, chegando a zerar a atividade no 14º uso (Figura 7).

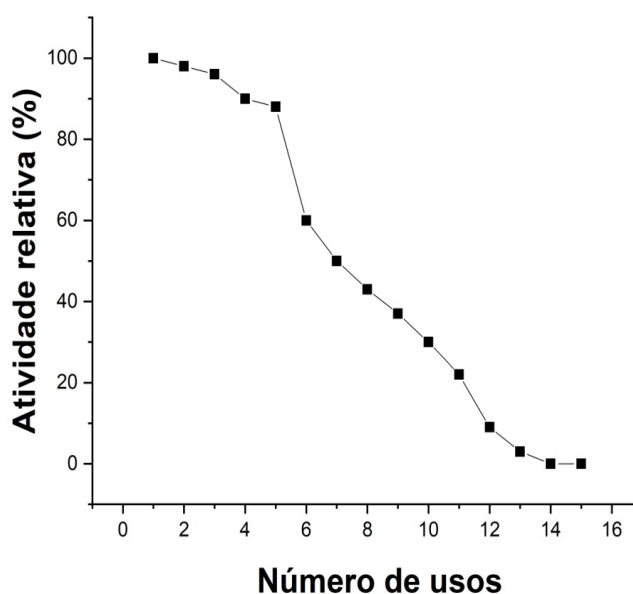


Figura 7 – Reutilização de β -glicosidade imobilizada em bucha vegetal e sua atividade relativa

4 DISCUSSÃO

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi usada como uma ferramenta estatística útil para modelar multivariada que influencia a função resposta. Esse método estatístico foi capaz de otimizar o processo de imobilização da β -glicosidase em bucha vegetal com elevado rendimento, economia de tempo e reagentes por reduções no número de experimentos de análise global, sendo vantajoso para a indústria. O MSR tem sido utilizado para otimização de processos de biocatálise e produção de enzima.¹⁵ Resultados com bom rendimento de imobilização em matrizes de celulose

foram observados por Moreira,²⁴ que alcançou rendimento de 99% de imobilização de β -glicosidase de soja em bagaço de cana.

O pH e a temperatura ótimos das β -glicosidases podem variar de acordo com a fonte e com a maneira de obtenção, mesmo em se tratando somente da soja como fonte. Condições de hidrólise da β -glicosidase de soja foram determinadas por Araújo, Carlos e Sedyama²⁵ com pH e temperatura ótimos de 5,2 a 6,0, 50 °C e pl de 4,2 a 4,4. Matsuura e Obata¹⁷ purificaram a β -glicosidase de cotilédones de soja, e a enzima parcialmente purificada apresentou temperatura e pH ótimos de 45 °C e 5,0. Já Hsieh e Graham²⁶ purificaram parcialmente a β -glicosidase da raiz de soja, e Ribeiro²⁷ purificou β -glicosidase de cotilédones de soja da cultivar BRS 213, obtendo as condições de pH e temperatura ótimos de 5,0 e 45 °C. Entretanto, Hsieh e Graham²³ observaram que a enzima teve pH ótimo de 6,0 a 30 °C. Os resultados aqui encontrados, pH 5,5 e temperatura de 50 °C, para a enzima livre não diferiram muito desses dados já encontrados na literatura. Já o comportamento da enzima imobilizada sofreu uma alteração significativa quando se trata do pH ótimo, passando de 5,5, considerado como ácido, para 7,0, um pH neutro.

A enzima imobilizada também apresentou maior estabilidade térmica quando comparada à enzima livre, isso indica que a ligação da enzima à bucha vegetal, com o TMP como ativador, faz com que a enzima fique mais resistente a temperaturas altas, mantendo uma maior porcentagem de atividade no decorrer do tempo e conseguindo atuar sobre o substrato por mais tempo. A estabilidade térmica elevada em sistemas imobilizados pode ser explicada pelo aumento da rigidez da enzima, com preservação de sua estrutura terciária e conformacional em diferentes ambientes.²⁸ Com relação à reutilização do sistema catalítico de β -glicosidase de soja imobilizada em bucha vegetal ativada com trimetafosfato do sódio, a perda de atividade conforme as utilizações pode estar associada a ligações enfraquecidas na matriz de imobilização em razão da liberação e de distorções tridimensionais que provavelmente ocorreram a partir da exposição recorrente do sítio catalítico aos substratos.²⁹

A enzima imobilizada apresentou um aumento do K_m e uma redução da V_{max} , isso pode ser explicado pelos microambientes que são gerados pela interação da enzima com o suporte, que podem gerar mudanças conformacionais que podem afetar a ação catalítica da enzima.¹²

5 CONCLUSÃO

A imobilização de β -glicosidade em bucha vegetal ativada com trimetafosfato de sódio é eficiente. A estabilidade térmica da enzima imobilizada é maior que o da enzima solúvel. A bucha vegetal é um eficiente suporte para imobilização de enzimas, com o trimetafosfato de sódio, como ativador. O aumento da estabilidade térmica da enzima e a possibilidade de reuso da enzima, além da não toxicidade dos agentes envolvidos, fazem com que o sistema seja uma boa alternativa para a indústria, fornecendo um sistema de baixo custo e seguro.

REFERÊNCIAS

1. Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, Crit. Rev. Biotechnol. 2002 (22):375-407.
2. Krisch J, Tako M, Papp T, Vágvolgyi C. Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. *Formatex*. 2010; (2):891-6.
3. Ferreira RG, Azzoni AR, Freitas S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *Biotechnol Biofuels*. 2018; 11(81):1-13.
4. Nisha S, Gobi N. A Review on methods, application and properties of immobilized enzymes. *Chem Sci Rev Lett*. 2012; 1(3):148-55.
5. Sheldon RA, Van Pelt S Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev*. 2013; 42(15):6223-35.
6. Canilha L, Carvalho W, Silva JBA. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotecnologia cienc. desenvolv.* 2006; 9(36):48-57.
7. Pradella JGC. Reatores com células imobilizadas. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial*, São Paulo: Edgard Blucher; 2001. cap. 16, p. 355-72.

8. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* 2012; (31-8):1808-25.
9. Dalla-Vecchia R, Nascimento MDG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quím Nova.* 2004; 27(4):623-30.
10. Mendes AA, Oliveira PCD, Castro HFD, Giordano RDLC, Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quím Nova*; 2011; (34):831-40.
11. Maire M, Logeart-Avramoglou D, Degat MC, Retention of transforming growth factor β 1 using functionalized dextran-based hydrogels. *Biomaterials.* 2005; 26(14):1771-80.
12. Simões AS, Mori RY, Faria R, Mendes AA, Castro, HF. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. *Quím Nova.* 2011; (34):33-8.
13. Oboh IO, Aluyor EO. *Luffa cylindrica* - an emerging cash crop. Nigéria, *African. J Agric Res.* 2009; 4(8):684-8.
14. Zhu J, Zhang J, Lai Q, Jiang B, Gong R; Covalent immobilization of lipase onto citric acid-esterified loofah sponge. *Bioresources.* 2013; (8):3289-98.
15. Gong R, Zhang J, Zhu J, Wang J, Lai Q, Jiang B. Loofah sponge activated by periodate oxidation as a carrier for covalent immobilization of lipase. *Korean J. Chem. Eng.* 2013; (8):1620-25.
16. Fenelon VC, Miyoshi JH, Aguiar MFA, Silva TT, Souza HM, Matiol G. Imobilização de CG-Tase em esponja vegetal para produção de ciclodextrinas em bateladas. 6º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul; 2016.
17. Matsuura M, Obata A. β -Glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *J Food Sci.* 1993; 58(1):144-7.

18. Lowry OH, Rosenbroughn NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; (193):265-75.
19. Iqbal M, Saeed A, Edyvan RGJ, O'Sullivan B, Styring P. Production of fungal biomass immobilized loofa sponge (FBILS)-discs for the removal of heavy metal ions and chlorinated compounds from aqueous solution. *Biotechnol. Lett.* 2005; (27):1319-23.
20. Celik A, Dincer A, Aydemir T. Characterization of β -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016 (89):406-14.
21. Gao J, Lu CL, Wang Y, Wang SS, Shen JJ, Zhang JX et al. Rapid Immobilization of Cellulase onto Graphene Oxide with a Hydrophobic Spacer. *Catalysts.* 2018; 8(180):1-12.
22. Gao Z, Chub J, Jiangb T, Xud T, Wua B, Heb B. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO₂: Specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. *Process Biochem.* 2018; (64):152-9.
23. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: Princípios de Bioquímica.* 5a ed. São Paulo: Savier; 2011.
24. Moreira AA. Imobilização de β -glicosidade de soja em bagaço de cana-de-açúcar e alginato de sódio [dissertação de mestrado] [Londrina, PR]: Universidade Estadual de Londrina; 2014.
25. Araújo JMA, Carlos JCS, Sedyama CS. Isoflavonas em grãos de soja: Importância da atividade de β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos,* 1997; 17(2):137-41.
26. Hsieh, MC, Graham, TL. Partial purification and characterization of a soybean β -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry.* 2001; (58):995-1005.

27. Ribeiro MLL. Teor de isoflavonas e atividade de β -glucosidase em grãos de soja germi-
nada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica
parcial da β -glucosidase. [tese de doutorado] [Londrina, PR]: Universidade Estadual de
Londrina, 2006.
28. Wang F, Su R, Qi W, Zhang M, He Z. Preparation and activity of bubbling-immobilized cello-
biase within chitosan-alginate composite. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2012; (40):57-64.
29. Dwevedi A, Kayastha AM. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsB-
GAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its
applications. *Bioresource Technol.* 2009 (100):2667-75.

Data da submissão: 16 de outubro de 2018

Avaliado em: 28 de outubro de 2018 (AVALIADOR A)

Avaliado em: 08 de novembro de 2018 (AVALIADOR B)

Aceito em: 13 de novembro de 2018

