

IMOBILIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE EM NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

Thamara C. Coutinho^{1,2}, Mayerlenis J. Rojas², Elaine C. Paris², Cristiane S. Farinas^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP; ²Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP
thamaraccoutinho@gmail.com

Classificação: Processos de imobilização de biomoléculas e funcionalização em nanopartículas

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de imobilização da enzima β -glicosidase em nanopartículas de hidroxiapatita. O pH ótimo e a força iônica ótima de imobilização foram considerados aqueles que resultaram no maior rendimento de imobilização (RI), obtidos através da medida da atividade enzimática do sobrenadante durante a imobilização. As melhores condições de imobilização foram obtidas em pH 7 e força iônica de 5 mM, com um RI de 64% e atividade recuperada de aproximadamente 120%. Portanto, essa enzima de grande aplicação agroindustrial pode ser eficientemente imobilizada em nanopartículas de hidroxiapatita com retenção total de sua atividade catalítica.

Palavras-chave: Hidroxiapatita, β -glicosidase, imobilização enzimática.

β -GLYCOSIDASE IMMOBILIZATION IN HYDROXYPATITE NANOPARTICLES

Abstract

The aim of this work was to evaluate the conditions of immobilization of the β -glucosidase enzyme in nanoparticles of hydroxyapatite. The optimum pH and ionic strength were considered to be those that resulted in the highest yield of immobilization (YI), obtained by measuring the enzymatic activity in the supernatant during immobilization. The best immobilization conditions were achieved at pH 7 and ionic strength 5 mM, resulting in a 64% YI and recovered activity of around 120%. This enzyme of great agroindustrial application could be efficiently immobilized in nanoparticles of hydroxyapatite, with total retention of its catalytic activity.

Keywords: Hydroxyapatite, β -glycosidase, enzymatic immobilization.

1. INTRODUÇÃO

A β -glicosidase é uma enzima de vasta aplicação agroindustrial, com atuação na liberação de constituintes aromáticos melhorando o aroma de bebidas (Celik *et al.*, 2016) e hidrólise de isoflavonas, cujos produtos são aplicados na indústria farmacêutica (Michlmayr e Kneifel, 2014). Além disso, a β -glicosidase tem importante aplicação na degradação de materiais lignocelulósicos, participando da conversão da celulose em açúcares simples (Shewale, 1982). O desenvolvimento de técnicas que permitam sua reutilização tem sido muito pesquisado devido ao alto custo desse biocatalisador.

A imobilização de enzimas em suportes insolúveis garante o reaproveitamento dessas moléculas no processo, gerando vantagens quanto ao custo operacional e estabilidade dessas biomoléculas (Puri *et al.*, 2013). A utilização de nanoestruturas como suportes tem como vantagem a capacidade de reter maior carga enzimática por unidade de massa de partícula. Além disso, as nanopartículas geram baixa resistência à transferência de massa, garantindo uma boa acessibilidade do substrato ao biocatalisador (Cipolatti *et al.*, 2014).

Um material com potencial aplicação para imobilização de enzimas é a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), material inorgânico e não tóxico, que pode ser sintetizado como nanopartículas (Xie e Zang, 2017). A hidroxiapatita apresenta grupos fosfatos e de cálcio disponíveis para realizarem adsorção iônica com grupos laterais carregados de proteínas (Farinas *et al.*, 2007). Sendo assim, nesse

trabalho avaliou-se a imobilização da β -glicosidase em nanopartículas de hidroxiapatita. O foco deste estudo foi encontrar as melhores condições de imobilização, como o tempo de imobilização, o pH e a força iônica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Nano-imobilização enzimática em hidroxiapatita

A solução de imobilização foi preparada com $0,1 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$ de nanopartícula de hidroxiapatita (Sigma-Aldrich, USA) e com carga enzimática de $10 \text{ mg enzima} \times \text{g}^{-1}$ suporte da enzima β -glicosidase (Novozymes - NS22118). A adsorção iônica foi submetida à agitação lenta a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade enzimática do sobrenadante (obtido por centrifugação a 8000 rpm durante 2 min) e do controle (enzima solúvel) foi medida em triplicata em intervalos de 30 min. A medida de atividade da β -glicosidase foi realizada segundo Ghose (1987), com a solução de celobiose (15 mM) preparada em pH 7, em que uma unidade de atividade enzimática (UI) representa a quantidade de enzima necessária para liberar $1 \text{ } \mu\text{mol}$ do produto por minuto na mistura reacional.

O Rendimento de Imobilização (RI) foi calculado conforme a Equação 1, onde $A_{S,f}$ e $A_{B,f}$ representam a atividade final do sobrenadante e a atividade final do controle, respectivamente. Ao final da imobilização, o derivado foi lavado três vezes com tampão de força iônica cinco vezes maior. A atividade enzimática do derivado (A_{derivado}) foi medida e a Atividade Recuperada (AR) foi calculada através da Equação 2. A Atividade Teoricamente Imobilizada (A_T) foi obtida através do produto da atividade oferecida com o RI.

$$\text{RI} = 1 - \frac{A_{S,f}}{A_{B,f}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{AR} = \frac{A_{\text{derivado}}}{A_T} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.2 Condições ótimas de imobilização

O ensaio descrito no item 2.1 foi realizado com diferentes forças iônicas (5, 10, 20, 35 e 50 mM) e diferentes pH (4, 5, 6, 7 e 8). O pH ótimo e a força iônica ótima de imobilização foram considerados aqueles que demonstraram o maior rendimento de imobilização (RI).

2.3 Ponto isoelétrico da β -glicosidase

O ponto isoelétrico (pI) da β -glicosidase foi obtido através da medida do Potencial Zeta, na faixa de pH de 1,5 a 8, no Equipamento Zeta Sizer (Malvern Instruments). A solução enzimática foi preparada em água na concentração $1 \text{ mg} \times 100 \text{ mL}$ e o pH das soluções foi ajustado com as soluções de hidróxido de sódio 0,1M e ácido clorídrico 0,1M.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanopartículas de hidroxiapatita utilizadas para imobilizar a β -glicosidase por adsorção iônica foram caracterizadas por Giroto *et al.* (2015) e apresentaram-se como aglomerados sólidos menores que 100 nm. A adsorção enzimática sobre as nanopartículas foi rápida, após 1 hora de reação a interação da β -glicosidase com o suporte permaneceu constante, como mostrado na Figura 1-a. A força iônica não afetou o RI, contudo a AR foi maior com a menor força iônica, 5 mM (Figura 1-b), demonstrando que a presença de poucos íons em solução a reação enzimática é favorecida.

Curiosamente, a atividade recuperada (AR) do derivado superou os 100%. Isso sugere que o sítio ativo da enzima tornou-se mais disponível para reação após ligar-se ao suporte, atribuindo uma grande vantagem à técnica de imobilização da β -glicosidase em hidroxiapatita.

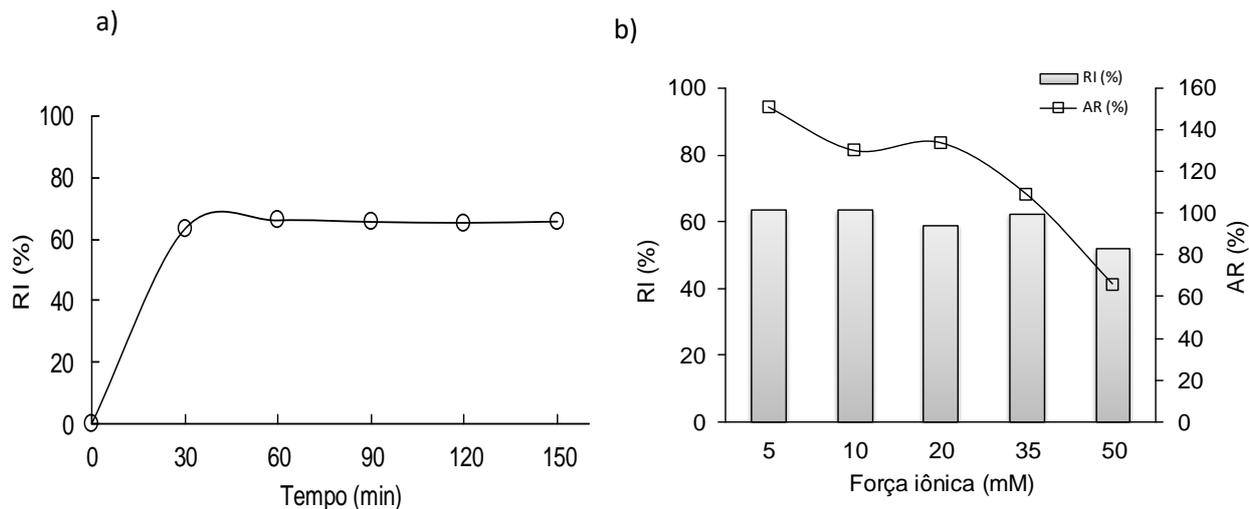


Figura 1 – (a) Tempo de imobilização da β -glicosidase em hidroxiapatita, em pH 7 e 5mM. (b) Efeito da força iônica no RI e na AR da β -glicosidase imobilizada em hidroxiapatita em pH 7.

O pH ótimo de imobilização foi 7 (Figura 2-a) e o pI da β -glicosidase obtido através da medida do potencial zeta foi 3,6 (Figura 2-b). Isso indica que os grupos Ca^{2+} do suporte permitiram a orientação da enzima pela região que contém alta concentração de cargas negativas, representados pelos resíduos aspártico e glutâmico. Embora a enzima apresente cargas negativas em pH 5 e 6, supõe-se que nessas condições ela ainda não se tornou negativa o suficiente para interagir eletrostaticamente com o suporte. O RI de 17% obtido em pH 4 sugere que outros tipos de interações, além da eletrostática, podem ter ocorrido. Por exemplo, interações de afinidade entre resíduos de aminoácidos com os íons Ca^{2+} . Nesse caso, aminoácidos como a histidina e o imidazol, que contém moléculas doadoras de elétrons (como o nitrogênio) fazem uma reação de coordenação com os íons metálicos (Bresolin *et al.*, 2009). Além desse tipo de reação, pode-se pressupor que nesse pH, muito próximo à neutralidade da enzima, ambos os sítios de adsorção da hidroxiapatita foram capazes de interagir com a enzima.

As condições de imobilização encontradas corroboram com o estudo de (Vieira *et al.*, 2011), o qual imobilizou β -glicosidase por adsorção iônica em Polietilenimina-agarose funcionalizada com grupos aminas, utilizando pH 7 e força iônica de 5 mM. Eles obtiveram total imobilização em um tempo de 2 horas. Embora eles tenham obtido um RI de quase 100%, foi oferecido cerca de 1000 vezes menos enzima por grama de suporte do que no presente estudo, o que demonstra a alta capacidade de adsorção das nanopartículas utilizadas.

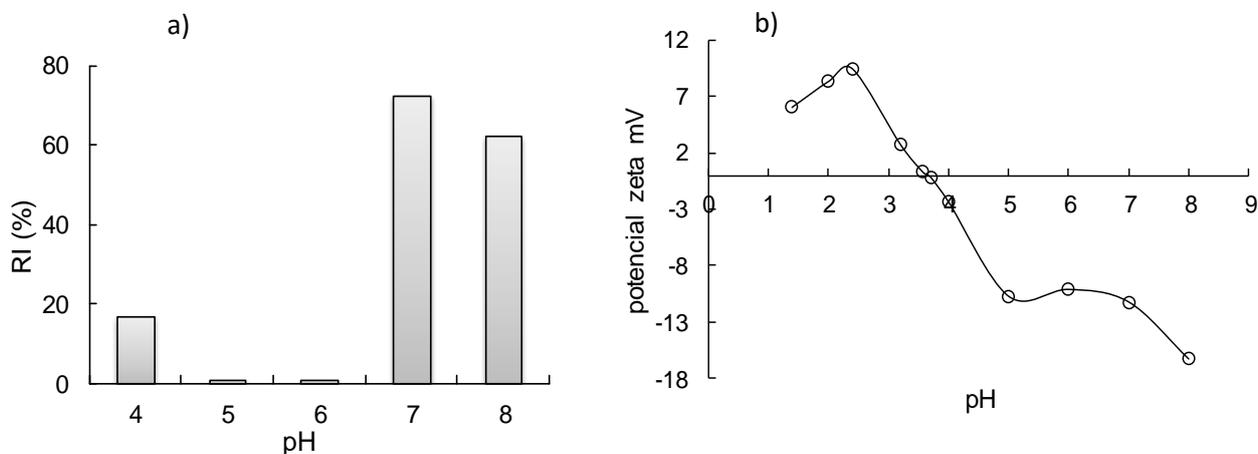


Figura 2 – (a) Efeito do pH no RI da β -glicosidase imobilizada em hidroxiapatita com força iônica 5mM. (b) Medida do potencial zeta da β -glicosidase na faixa de pH 1,4 a 8,4.

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi demonstrado que nanopartículas de hidroxiapatita são capazes de imobilizar eficientemente a β -glicosidase em pH 7 e 5mM, com retenção de atividade catalítica superior ao da enzima livre. Sendo assim, o derivado β -glicosidase-hidroxiapatita apresenta potencial aplicação em processos que almejam a recuperação da enzima do meio reacional.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa, a Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BRESOLIN, I.; MIRANDA, E.; BUENO, S. Immobilized metal-ion affinity chromatography (imac) of biomolecules: fundamental aspects and technological applications. *Quimica Nova*, v. 32, n. 5, p. 1288-1296, 2009.
- CELIK, A.; DINCER, A.; AYDEMIR, T. Characterization of beta-glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 406-414, 2016.
- CIPOLATTI, E. et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 99, p. 56-67, 2014.
- FARINAS, C. et al. Adsorption of myoglobin onto hydroxyapatite modified with metal ions. *Adsorption Science & Technology*, v. 25, n. 10, p. 717-727, 2007.
- GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, FEB 1987.
- GIROTO, A.; FIDELIS, S.; RIBEIRO, C. Controlled release from hydroxyapatite nanoparticles incorporated into biodegradable, soluble host matrixes. *Rsc Advances*, v. 5, n. 126, p. 104179-104186, 2015.
- MICHLMAYR, H.; KNEIFEL, W. beta-Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *Fems Microbiology Letters*, v. 352, n. 1, p. 1-10, MAR 2014.
- PURI, M.; BARROW, C.; VERMA, M. Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 4, p. 215-216, APR 2013 2013.
- SHEWALE, J. Beta-glucosidase - its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *International Journal of Biochemistry*, v. 14, n. 6, p. 435-443, 1982.
- VIEIRA, M. et al. beta-Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 69, n. 1-2, p. 47-53, 2011.
- XIE, W.; ZANG, X. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated-gamma-Fe₂O₃ nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. *Food Chemistry*, v. 227, p. 397-403, 2017.