

Imobilização Covalente na Superfície de Sílica Gel da Enzima β -1,3-Glucanase Produzida por *Trichoderma Harzianum*

Fernando A. Silva, Edésio F. C. Alcântara & Valdirene N. Monteiro

Neste trabalho, o suporte utilizado para imobilizar a enzima β -1,3-glucanase foi a sílica gel (Ξ Si-OH) com área superficial (S_{BET}) de $466,0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, volume (V) e diâmetro médio de poros (\check{D}) de $0,803 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ e $6,89 \text{ nm}$, respectivamente. A sílica foi modificada via reação de silanização com os grupos 3-aminopropiltrimetoxissilano (Ξ Si-NH₂), seguida de funcionalização com glutaraldeído (G) (2,5% v/v) (Ξ Si-NH-G). A enzima β -1,3-glucanase (extrato bruto) produzida por *Trichoderma harzianum*, na concentração de $0,069 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ de proteína total, foi imobilizada covalentemente ao suporte funcionalizado com glutaraldeído (Ξ Si-NH-G-Enzima), obtendo-se $0,512 \text{ mg}$ de proteína imobilizada por grama de Ξ Si-NH-G. Os ensaios enzimáticos de atividades específicas forneceram $2,30 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a enzima imobilizada e de $1,88 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a enzima livre.

Palavras-chave: β -1,3-glucanase, imobilização, sílica gel.

In this work, silica gel (Ξ Si-OH) with surface area (S_{BET}), pore volume (V) and average pore diameter (\check{D}) of $466.0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, $0.803 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ and 6.89 nm , respectively, was used as support to immobilize β -1,3-glucanase enzyme. Silica gel was modified through silanization reaction with 3-aminopropyltrimetoxysilano (Ξ Si-NH₂). After that, functionalization was performed with glutaraldehyde (G) (2.5%) (Ξ Si-NH-G). A β -1,3-glucanase enzyme native extract was produced by *Trichoderma harzianum* with overall protein concentration of $0.069 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$. The enzyme was immobilized through covalent links on the support functionalized with glutaraldehyde (Ξ Si-NH-G-enzyme), producing 0.512 mg of immobilized enzyme per gram of Ξ Si-NH-G. Enzymatic assays showed specific activity of $2.30 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ and $1.88 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ for immobilized and free enzymes, respectively.

Keywords: β -1,3-glucanase, enzyme immobilization, silica gel.

Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos, formadas por aminoácidos, que participam de um grande número de reações metabólicas que ocorrem nos seres vivos¹. Atuam de forma a acelerar a velocidade de uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação sem, no entanto, alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. Como a enzima não é consumida na reação, sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos. O que se distingue de um catalisador químico comum, é a sua capacidade de catalisar uma reação sob condições suaves, como em soluções aquosas à temperatura e pressão normais, com consequente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis¹.

Com a compreensão da natureza das enzimas e do seu potencial catalítico, houve uma ampliação do campo de utilização industrial, tal como para a produção de alimentos, cerveja, têxteis e produtos farmacêuticos. A química continua a ser o sustentáculo para a solução dos mecanismos envolvidos na catálise enzimática². Convencionalmente, as reações enzimáticas são conduzidas em processos de batelada onde se incuba a mistura do substrato com a enzima solúvel e no fim do processo, esta é separada do produto por meio de desnaturação térmica ou variação drástica de pH, devido a inviabilidade econômica de se recuperar a enzima ativa livre (em solução) para posterior reutilização. Assim apesar das vantagens catalíticas das enzimas livres em relação aos catalisadores químicos, as mesmas não têm sido amplamente utilizadas nos processos industriais devido, principalmente: i) à baixa estabilidade; ii) ao elevado custo de obtenção; iii) à dificuldade de separação da mistura reacional (substrato/produto) para uso contínuo, pois são moléculas hidrosolúveis¹.

Tem-se observado nas últimas décadas, que as enzimas industrialmente utilizáveis representam um mercado global da ordem de 340 milhões de dólares para uma produção de 70.000 toneladas/ano, sendo que os dois principais setores de aplicação são: a indústria de transformação do amido e a indústria de detergentes. Observa-se também, que estes dois segmentos industriais são responsáveis por 70% do mercado mundial de enzimas, sendo que os 30% restantes, são representados

por aplicações na indústria alimentícia onde se utilizam: proteases, pectinases, amilases e outras enzimas³.

Tabela 1. Enzimas utilizadas em diferentes segmentos industriais⁴.

Segmento Industrial	Enzima	Aplicação
Detergentes	Proteases, Amilases, Celulase	Remoção de manchas, lavagem e clarificação de cores
Álcool combustível	Amilase, Amidoglicosidase, Glucose isomerase	liquefação do amido; sacarificação e conversão da glicose a frutose.
Alimentos	Proteases, Amilases, Lactases, Transglutaminase, Lipoxigenase	Coagulação do leite (fórmulas infantis), queijo, remoção da lactose, branqueamento e amolecimento do pão, etc.
Bebidas	Amilase, β -glucanase, Acetolactato descarboxilase, Lactases	Tratamento de sucos, maturação de cervejas,
Têxtil	Celulase, Amilase, Catalase	Amolecimento do algodão, remoção de tintas em excesso
Higiene pessoal e beleza	Amiloglicosidase, Glicose oxidase, Peroxidase	Atividade antimicrobiana

Apesar de suas admiráveis características, a ampliação do uso de enzimas tem se deparado com a barreira econômica. O custo de purificação, mesmo que parcial, ou ainda da produção desses catalisadores tem barrado seu uso disseminado e, algumas vezes, tornado seu uso proibitivo em processos industriais⁵. Dentre as abordagens utilizadas na Tecnologia Enzimática na tentativa de solucionar esses problemas, a Imobilização de Enzimas desponta como uma das ferramentas mais versáteis. Segundo Cardoso *et al.*⁶, a imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico.

Um dos principais fatores que afetam a imobilização de uma enzima em um suporte é justamente a escolha ideal do mesmo, visto que, a sua escolha é fundamental para o bom desempenho da enzima imobilizada, pois um suporte bem selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, por outro lado, uma escolha equivocada do suporte pode afetar não somente a sua estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema⁷.

A escolha do suporte é tão importante quanto à escolha do método de imobilização a ser utilizado em um determinado sistema^{5,8}. Alguns cuidados devem ser tomados nessa escolha, uma vez que, após a imobilização, o suporte será o principal constituinte do microambiente em que a enzima estará imobilizada. Neste sentido, é aconselhável que sejam avaliadas algumas características do sistema, que servirão de guia no processo de escolha do material mais adequado. Segundo Mendes⁷, as principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo, dentre outras. Eles podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, e conforme sua morfologia em materiais porosos, não porosos e de estrutura de gel.

Os suportes inorgânicos têm a sílica e vidros de poro controlado como seus principais representantes. A possibilidade de obtenção de materiais com propriedades morfológicas variadas, tais como diâmetros do poro, área superficial e forma das partículas, somada às propriedades mecânicas, particularmente, a baixa compressibilidade, tornaram tais suportes os elementos de escolha para montagem de reatores para aplicações industriais⁵.

Neste trabalho, a enzima: β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum*, isolado da região do Cerrado, foi imobilizada covalentemente na superfície de sílica gel previamente modificada via reação com 3-aminopropiltrimetoxissilano, seguida da funcionalização com glutaraldeído. No processo de imobilização enzimática, foi estudado o efeito da atividade da β -1,3-glucanase frente ao substrato β -glucana (laminarina). Uma vez caracterizada a β -1,3-glucanase imobilizada, exploram-se as potencialidades desta quando comparada

com a mesma livre (em solução), através dos seguintes parâmetros: i) tempo ideal de imobilização ao suporte; ii) efeitos de temperatura; iii) efeitos de pH; iv) de termoestabilidade; v) cinéticos K_M e $V_{MÁX}$; e, vi) estabilidade à estocagem.

Material e Métodos

ATIVACÃO DA SUPERFÍCIE DE SÍLICA GEL

A modificação da superfície envolve a reação entre os grupos silanóis (OH) da superfície com um agente modificador apropriado⁹. A ativação da superfície com a remoção de moléculas de água adsorvidas fisicamente¹⁰ ou ligadas por ligações de hidrogênio¹¹, facilita a reação destes grupos silanóis com o agente modificador apropriado.

Cerca de 40,0 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), com área superficial BET na faixa de 460 a 540 m².g⁻¹, foram ativadas através do aquecimento a 150°C em banho de óleo, sob vácuo durante 8 h^{10,12}. Após o tratamento, passou-se nitrogênio seco e em seguida, a sílica foi guardada em frasco vedado e mantida num dessecador contendo agente secante como cloreto de cálcio anidro e/ou sílica gel com indicador.

REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA SÍLICA GEL

Nesta síntese, os grupos silanóis reagem com o agente silanzante, 3-aminopropiltrimetoxissilano. Esta modificação da superfície foi efetuada de acordo com o método descrito por Vrancken *et al.*¹³, com algumas alterações. Para esta síntese, fez-se a suspensão de 35,0 g de sílica gel em 60,0 cm³ de xileno, em um balão de fundo redondo de três bocas de 500 cm³, contendo condensador de refluxo, funil de adição e agitador mecânico. Esta suspensão foi aquecida em banho de óleo a 80°C, sob agitação, seguindo-se à adição de 20,54 g (0,11 mol) de 3-aminopropiltrimetoxissilano, dissolvidos em 10,0 cm³ de xileno. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo a 120°C por 48 h. A mistura reacional depois de resfriada, foi separada por filtração em funil de placa porosa, sendo primeiramente lavada com xileno e seguida de sucessivas lavagens com água deionizada, etanol, acetona e éter etílico. O produto obtido 3-aminopropilsílica gel (E-Si-NH_2), foi seco a vácuo a 120°C, durante 5 h.

REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE MODIFICADA ($\Xi\text{Si-NH}_2$) COM GLUTARALDEÍDO (G)

A reação de funcionalização da superfície ($\Xi\text{Si-NH}_2$) com glutaraldeído foi efetuada em dois erlenmeyer de 125 cm³. Em cada um dos erlenmeyer adicionamos 10,0 g do suporte ($\Xi\text{Si-NH}_2$) em seguida adicionamos 40,0 cm³ de solução glutaraldeído 2,5 e 5 %, respectivamente, que foi preparada em solução tampão hidrogenofosfato de potássio (0,10 mol.dm⁻³) em pH = 7,0¹⁴. Ambas, misturas foram colocadas sob agitação mecânica de batelada, em banho termostatizado na temperatura de 25°C, por 1h. Em seguida, a mistura reacional foi separada por filtração em funil de placa porosa, e lavada com água deionizada. O material $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5 e 5 %) foi seco sob vácuo na temperatura ambiente, durante 2h.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA β -1,3-GLUCANASE NO SUPORTE FUNCIONALIZADO ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$)

A imobilização da enzima β -1,3-glucanase no suporte funcionalizado $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5 e 5 %) foi efetuada adicionando-se 0,5 g do suporte em erlenmeyer de 125 cm³, seguida da adição de 10,0 cm³ da solução da enzima β -1,3-glucanase (extrato bruto) contendo 0,069 mg.cm⁻³ de proteína total e 5,0 cm³ de solução tampão acetato de sódio (0,050 mol.dm⁻³) em pH = 4,5. A mistura foi colocada sob agitação mecânica (sistema de batelada) em banho termostatizado na temperatura de 4°C, por 22 h. Após a reação de imobilização o suporte contendo a enzima β -1,3-glucanase foi separado da solução sobrenadante por filtração em funil de placa porosa, seguida de lavagem com solução tamponada em pH = 4,5. Coletou-se as alíquotas do filtrado e do lavado em frascos vedados e guardadas a 4°C, para dosar proteína e atividade enzimática. Em seguida, o material imobilizado ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G-Enzima}$), foi seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h e estocado a seco (na ausência de solução tampão), em frascos vedados e guardados na temperatura de aproximadamente 4°C.

Caracterização das Superfícies

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGÊNIO DE $\Xi\text{Si-NH}_2$

O teor de nitrogênio nas amostras de sílica modificada ($\Xi\text{Si-NH}_2$), foi determinado quantitativamente pelo

método de Kjeldhal¹⁵, utilizando um sistema de microdestilação. Nessas análises foram empregadas cerca de 0,10 g de sílica, seguido do tratamento com 2,0 cm³ de ácido sulfúrico concentrado, 0,40 g de sulfato de potássio, 0,50 g de sulfato de cobre e 3,0 cm³ de água deionizada. Em seguida, deixou-se essa mistura em digestão a 250°C, por 8 h. Após este tempo, a mistura foi resfriada e transferida quantitativamente para o microdestilador contendo água deionizada e aquecida. O sulfato de amônio formado na digestão foi hidrolisado com 20,0 cm³ de uma mistura de solução concentrada de tiosulfato de sódio 5,0% e hidróxido de sódio 40,0%, liberando o nitrogênio na forma de amônia, que foi destilada a vapor e recolhida em frascos com 10,0 cm³ de uma solução de ácido bórico a 0,5%, contendo indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol. A amônia presente foi titulada com uma solução padrão de ácido clorídrico (0,010 mol.dm⁻³). As determinações foram efetuadas em triplicata.

DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL, DO VOLUME E DO DIÂMETRO MÉDIO DOS POROS

A determinação da área superficial específica (S_{BET}), do volume (V) e diâmetro (\bar{D}) dos poros da sílica gel ($\Xi\text{Si-OH}$), da sílica modificada ($\Xi\text{Si-NH}_2$) e da sílica funcionalizada ($\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$), foi realizada através da técnica de adsorção de nitrogênio gasoso.

Caracterização da Enzima β -1,3-Glucanase

Determinação do tempo ideal de imobilização

No experimento de imobilização de uma enzima em um suporte, o tempo necessário para que o sistema atinja o equilíbrio é um fator importante. Assim procura-se determinar a quantidade de enzimas ligadas na superfície do suporte em função do tempo de agitação.

Neste sentido fez-se o estudo cinético da imobilização da enzima β -1,3-glucanase no suporte $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ em função do tempo. Para isso, pesou-se cinco amostras de 0,25 g de suporte funcionalizado $\Xi\text{Si-NH}_2\text{-G}$ (2,5%), os quais foram transferidos para erlenmeyers de 125 cm³ em presença de uma mistura de 5,0 cm³ da solução do extrato bruto contendo 0,069 mg.dm⁻³ de proteína total e 3,0 cm³ de solução tampão acetato de sódio (0,050 mol.

dm⁻³) em pH = 4,5. Em seguida os erlenmeyers contendo as misturas reacionais foram colocados sob agitação mecânica em banha termostatizado à temperatura de 4°C, variando-se o tempo de agitação de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 h. Após a reação de imobilização o suporte contendo a enzima β -1,3-glucanase imobilizada, foi separado da solução sobrenadante por filtração em funil de placa porosa, lavado com solução tamponada em pH = 4,5 e seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h. Coletou-se as alíquotas do filtrado e do lavado em frascos vedados e guardadas a 4°C, para dosar a proteína. Em seguida o material imobilizado (Ξ Si-NH₂-G-Enzima), foi seco a vácuo, à temperatura ambiente, durante 1 h e estocado a seco (na ausência de solução tampão), em frascos vedados e guardados na temperatura de aproximadamente 4°C.

Ensaio de atividade enzimática da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

As atividades de β -1,3-glucanase livre e imobilizada foram determinadas utilizando-se solução de laminarina como substrato na concentração de 0,5%, em solução tampão acetato de sódio (50,0 mmol.dm⁻³) pH = 5,0. Assim, amostras de 50,0 μ L da enzima livre e 10,0 mg da enzima imobilizada foram incubados com 100,0 μ L de solução de laminarina a 40°C por 60 min, sendo que a incubação da enzima imobilizada sofreu agitação (em sistema de batelada). A concentração de açúcar redutor liberado da laminarina, foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS), utilizando solução de glicose como padrão, por espectrofotometria de UV-visível em $\lambda = 550$ nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de açúcar redutor (A.R.) em um minuto de reação.

Determinação do teor de proteína total

As concentrações de proteína total nas amostras de enzima livre e imobilizada foram determinadas pelo método colorimétrico de Lowry *et al.*¹⁶, utilizando albumina sérica bovina (BSA-Sigma) como padrão.

Determinação do pH ótimo da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade de β -1,3-glucanase livre

e imobilizada foi determinado incubando a enzima livre e imobilizada em tampões com diferentes valores de pH que variaram de 2,6 a 3,8 em tampão citrato de sódio; de 4,2 a 5,4 em tampão acetato de sódio e de 5,8 a 7,0 em tampão fosfato de sódio, todos na concentração de 100,0 mmol.dm⁻³. Os ensaios de atividade da enzima livre e imobilizada.

Determinação da temperatura ótima da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito da temperatura foi determinado incubando a enzima livre e imobilizada em diferentes temperaturas e no pH ótimo. As temperaturas testadas foram: 25, 30, 40, 45, 55 e 60°C. Os ensaios da atividade da enzima livre e imobilizada.

Efeito da temperatura na estabilidade da enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O estudo da estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi feito incubando-se amostras da enzima livre na ausência do substrato por 90 min nas temperaturas de 45 e 50°C e da enzima imobilizada na ausência do substrato por 150 min nas temperaturas de 40 e 45°C. Alíquotas 50,0 μ L e 10,0 mg dessas amostras foram retiradas em intervalos de 15 min e os ensaios para se determinar as atividades residuais das enzimas, em ambos os casos foram realizados nas condições ótimas de temperatura e pH.

Determinação dos parâmetros K_M e $V_{MÁX}$

Os parâmetros cinéticos K_M aparente e $V_{MÁX}$ da β -1,3-glucanase livre e imobilizada, foram determinadas nas condições ótimas de temperaturas de 50°C para enzima livre e 40°C para enzima imobilizada e de pH 4,6 para enzima livre e 3,8 para a enzima imobilizada, respectivamente. Esses parâmetros foram calculados, através das medidas da velocidade da reação do substrato com a enzima β -1,3-glucanase livre e imobilizada, variando-se as concentrações iniciais da solução do substrato (laminarina) de 0,1 a 1,2 mg.dm⁻³.

Determinação do tempo de estocagem da enzima imobilizada

A estabilidade da enzima em relação ao tempo de estocagem é um dos parâmetros de fundamental

importância quando se pretende utilizar industrialmente uma enzima imobilizada. Considerando-se que uma das grandes vantagens de uma enzima imobilizada, está na possibilidade de manter a sua atividade durante um determinado tempo. Foram feitos estudos para se verificar a manutenção da atividade da β -1,3-glucanase imobilizada por um período de 60 dias quando estocadas em frascos vedados e secos (na ausência de tampão), na temperatura de 4°C.

Resultados e Discussão

Teor de nitrogênio na amostra de Ξ Si-NH₂

A análise de nitrogênio do grupo -NH₂ da superfície 3-aminopropilsílica gel (Ξ Si-NH₂), forneceu uma porcentagem de 1,76 de nitrogênio. Sabendo-se que esta superfície modificada apresenta apenas um átomo de nitrogênio (massa atômica = 14,0067 g.mol⁻¹), podemos dizer que $1,76 \times 10^{-2} / 14,0067 = 1,25$ mmol de N por grama de Ξ Si-NH₂, como também será a quantidade de grupos 3-aminopropil presentes por grama da sílica.

Determinação da área superficial, do diâmetro dos poros e do volume dos poros

A análise dos resultados da Tabela 2 mostra que ao efetuar a cobertura da superfície da sílica gel (Ξ Si-OH) com os grupos organofuncionais, ocorreu uma diminuição da área superficial como mostram os valores de ΔS_{BET} . Essa redução de área superficial, após a modificação, é explicada pelo recobrimento dos poros da superfície pelos grupos organofuncionais, impedindo assim, o acesso de moléculas de nitrogênio gasoso durante a medida de área. Verificou-se também que quanto menor for a área superficial específica (S_{BET}), volume (V) e diâmetro médio (\check{D}) dos poros de uma sílica modificada e/ou funcionalizada em relação ao material de partida, maior será a quantidade de grupos ligantes presentes na superfície¹⁷.

Determinação do tempo de imobilização

A partir dos resultados apresentados nos testes de imobilização da enzima β -1,3-glucanase quando se variou o tempo de 0,5 a 3 h. Podemos observar que a medida que aumentamos o tempo de 0,5 a 1,5 h, houve um aumento significativo na taxa de imobilização,

ficando evidente que o sistema suporte funcionalizado com glutaraldeído (2,5%) ainda não atingiu o equilíbrio com a enzima β -1,3-glucanase, como atestam os valores da atividade (U). Após o tempo de 1,5 h de imobilização da enzima, os valores de atividade (U) se mantiveram praticamente estáveis (Figura 1). Assim, podemos dizer que para imobilizar a enzima β -1,3-glucanase no suporte funcionalizado é necessário um tempo acima de 1,5 h. Evidenciando uma cinética de imobilização enzimática, relativamente rápida para este processo.

Tabela 2. Área superficial específica (S_{BET}); Volume dos poros (V) e Diâmetro médio dos poros (\check{D}) das superfícies

Superfícies	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	ΔS_{BET} (m ² .g ⁻¹)	V (cm ³ .g ⁻¹)	\check{D} (nm)
Ξ Si-OH	466,0	—	0,803	6,89
Ξ Si-NH ₂	332,0	134,0	0,542	6,53
Ξ Si-NH-G (2,5%)	323,0	9,0	0,470	5,13
Ξ Si-NH-G (5,0%)	318,0	5,0	0,390	4,90

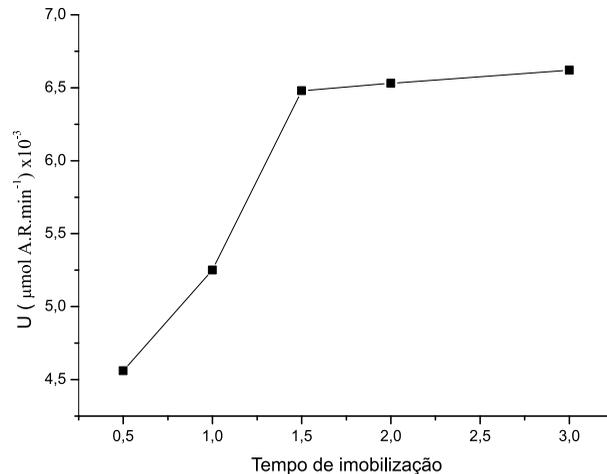


Figura 1. Tempo necessário para a reação de imobilização

Determinação de proteína total, concentração de enzima ligada ao suporte e atividade específica da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

A concentração de proteína no extrato bruto apresentou um valor de 0,069 mg.cm⁻³ de proteínas totais e uma atividade específica de 1,88 U.mg⁻¹, para a enzima livre. A enzima imobilizada apresentou 0,0296 mg.cm⁻³

de proteínas totais e uma atividade específica de 2,30 U.mg⁻¹, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Teor de proteína total, concentração de enzima ligada ao suporte e atividade específica da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

Enzima	Proteína total (mg. cm ⁻³)	Concentração (mg.g ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)
Livre	0,0690	—	1,88
Imobilizada	0,0296	0,592	2,30
Filtrado + lavado	0,0394	—	—

Efeito do pH na atividade da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade da enzima β -1,3-glucanase livre quando comparada com enzima imobilizada na mesma faixa de pH (2,6 a 7,0), na temperatura ótima de 50 e 40°C, respectivamente. Na Figura 2, notamos que os comportamentos das curvas são bastante similares em ambos os casos. Um deslocamento de 0,8 unidades do pH da enzima livre (pH ótimo 4,6) para o pH da enzima imobilizada (pH ótimo 3,8), caracterizando um deslocamento para a região mais ácida, indicando que os sítios ativos da enzima imobilizada encontram-se mais reativos no pH = 3,8. Isto também pode ser explicado devido às interações secundárias (como a força iônica da solução, interações polares e ligações de hidrogênio) entre a enzima β -1,3-glucanase e o suporte sílica gel. Observações similares para outras enzimas imobilizadas são descritas por vários autores^{18,19,20}.

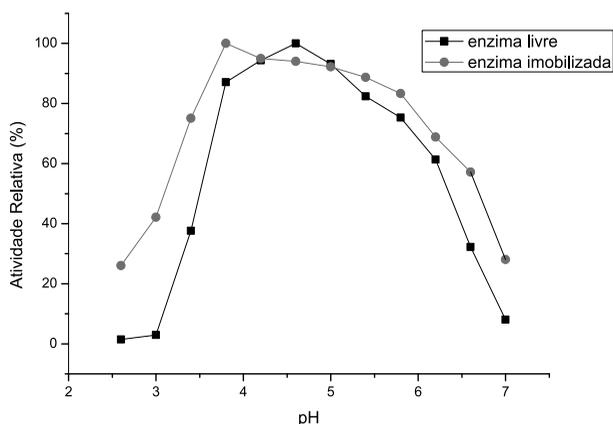


Figura 2. Efeito do pH na atividade da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

Efeito da temperatura na atividade da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

O efeito da temperatura na atividade da enzima β -1,3-glucanase livre quando comparada com enzima imobilizada na faixa de temperatura de 25 a 60°C é mostrado na Figura 3. O comportamento da curva da enzima livre exibe uma temperatura ótima de 50°C, com atividade relativa acima de 85% entre 40 e 55°C, e para a enzima imobilizada com atividade relativa acima de 75% entre 25 e 50°C, com temperatura ótima de 40°C. A enzima imobilizada apresenta, portanto uma faixa de temperatura maior, com atividade relativa acima de 75%. Em relação a enzima livre houve uma diminuição da temperatura ótima de 50 para 40°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Cabral *et al.*²¹ para outras enzimas.

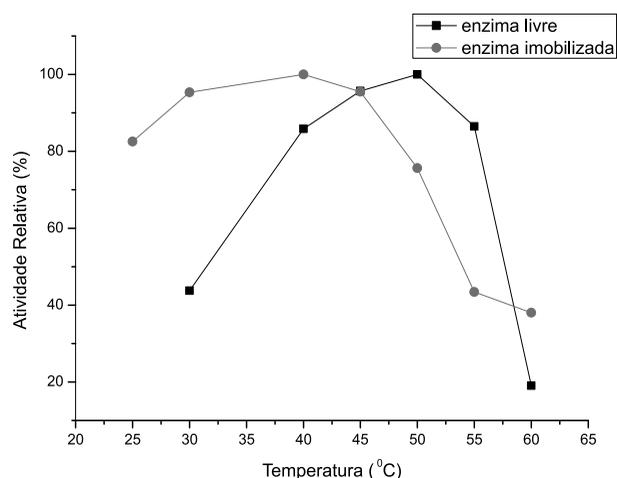


Figura 3. Efeito da temperatura na atividade da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glucanase livre e imobilizada

As Figuras 4 e 5, mostram a termoestabilidade da enzima livre nas temperaturas de 45 e 50°C por 90 minutos e da imobilizada nas temperaturas de 40 e 45°C por 150 minutos. A termoestabilidade da enzima livre e imobilizada foi calculada pela medida da atividade residual. Podemos observar que a enzima livre é estável a 45°C, pois mesmo após incubação por 90 minutos manteve 55% da atividade inicial. Entretanto a 50°C a atividade enzimática decresce rapidamente, perdendo totalmente a sua atividade após 60 minutos de incubação.

Entretanto, podemos observar na Figura 5, que a enzima imobilizada é estável tanto a 40 quanto a 45°C, pois mesmo após incubação por 150 minutos, manteve uma atividade residual em torno de 50%. Os resultados acima, sugerem que a termoestabilidade da enzima β -1,3-glicanase imobilizada sobre sílica gel, aumenta significativamente quando comparada com a enzima livre. Resultados semelhantes tem sido descritos para várias enzimas imobilizadas^{18,19}. Em geral o processo de imobilização de enzimas protege a enzima contra a inativação térmica²².

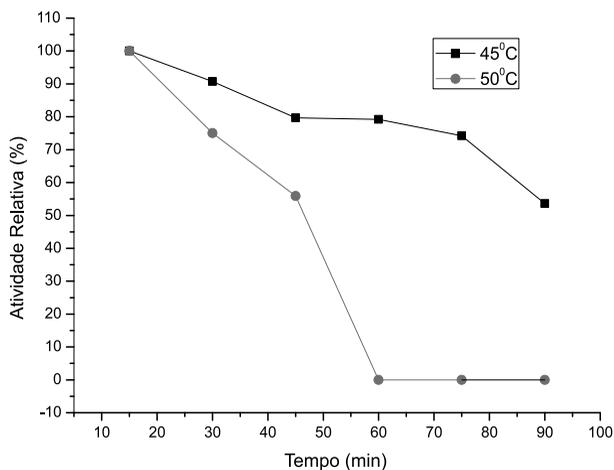


Figura 4. Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glicanase livre

Determinação dos parâmetros cinéticos K_M e $V_{MÁX}$ para β -1,3-glicanase livre e imobilizada

O valor do K_M encontrado foi de 0,148 mg.cm⁻³ e $V_{MÁX}$ de 0,159 U.cm⁻³. O valor de K_M foi maior do que o valor descrito por Ramon *et al.*²² para β -1,3-glicanase de *Trichoderma harzianum* (0,1 mg.cm⁻³). Os valores encontrados de K_M e $V_{MÁX}$ para a enzima imobilizada foram ligeiramente maiores (K_M foi de 0,154 mg.cm⁻³ e $V_{MÁX}$ de 0,162 U.cm⁻³) do que para a enzima livre. Este pequeno aumento dos valores nestes parâmetros pode ser devido à influência do suporte, por ter uma alta afinidade pela enzima-substrato. Esta troca na afinidade da enzima pelo seu substrato é provavelmente, causada pela mudança estrutural da enzima introduzida pelo processo de imobilização e pela baixa acessibilidade do substrato para o sítio ativo da enzima imobilizada¹⁸. O aumento dos valores das constantes cinéticas K_M e $V_{MÁX}$

da enzima imobilizada, tem sido descrito na literatura para diferentes enzimas por muitos autores^{23,24,25}.

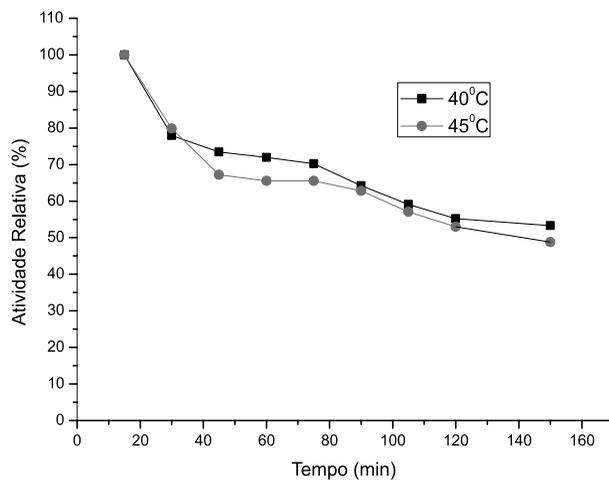


Figura 5. Efeito da temperatura na estabilidade da β -1,3-glicanase imobilizada

Determinação do tempo de estocagem da enzima imobilizada

Os resultados obtidos mostram que a enzima imobilizada quando estocada em frascos vedados a seco (na ausência de tampão) na temperatura de 4°C, após 35 dias, manteve 52% de sua atividade residual (próximo do tempo de meia vida que é de 50%) e, após 60 dias de estocagem, manteve 18% de sua atividade residual, com visto na Figura 6.

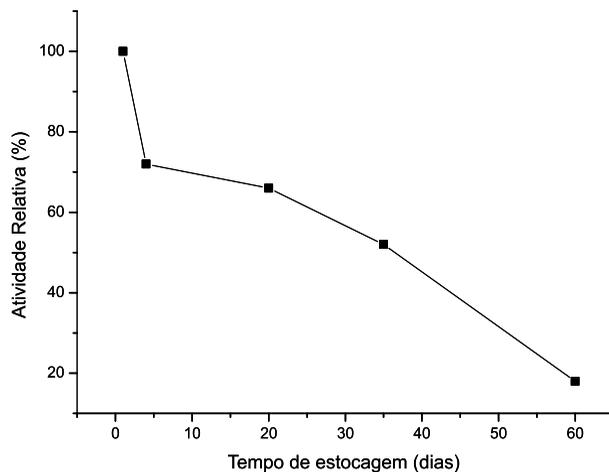


Figura 6. Tempo de estocagem da enzima imobilizada na temperatura de 4°C

Conclusões

O suporte sílica gel após sofrer modificação e funcionalização deve seus valores de área superficial, volume dos poro e diâmetro dos poros menores em relação à sílica gel usada inicialmente. A análise elementar de nitrogênio forneceu 1,75% de N por grama do suporte $\Xi\text{Si-NH}_2$, que permitiu estimar o grau de modificação do suporte, obtendo-se 1,25 mmol de N (grupos aminopropil) por grama do $\Xi\text{Si-NH}_2$.

A enzima β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma harzianum* (extrato bruto) na concentração de 0,069 mg.cm⁻³ de proteína total, foi imobilizada covalentemente ao suporte funcionalizado com glutaraldeído ($\Xi\text{Si-NH-G-Enzima}$), obtendo-se 0,0296 mg.cm⁻³ de proteína total. Isto quer dizer 0,512 mg de proteína imobilizada por grama do suporte $\Xi\text{Si-NH-G}$. Os ensaios enzimáticos forneceram os valores das atividades específicas (U) da β -1,3-glucanase de 2,30 U.mg⁻¹ para a imobilizada e de 1,88 U.mg⁻¹ para a enzima livre.

Evidenciou-se para este processo uma cinética de imobilização relativamente rápida, atingindo o equilíbrio com o suporte em cerca de 1,5 h. O pH de imobilização tem grande influência na retenção da atividade enzimática. Verificou-se que para a mesma faixa de pH 2,6 a 7,0 a enzima livre apresentou um pH ótimo de 4,6, enquanto que para a imobilizada um pH ótimo de 3,8. Indicando assim, um deslocamento de 0,8 unidade de pH para a região mais ácida em relação ao pH da enzima livre. O efeito da temperatura na atividade da enzima β -1,3-glucanase mostrou que a enzima imobilizada apresenta uma faixa de trabalho mais ampla (25 a 50°C) com atividade relativa acima de 75%.

O processo de imobilização da β -1,3-glucanase confere maior efeito de termoestabilidade em relação a enzima livre. Os parâmetros cinéticos obtidos mostraram que os valores de K_M e $V_{M\text{AX}}$ para a enzima imobilizada são ligeiramente maiores do que aquele da enzima livre.

A estabilidade à estocagem da enzima imobilizada a 4°C, na ausência de tampão, durante o período de 60 dias, mostrou que a enzima reteve 52% e 18% de sua atividade residual após 35 e 60 dias, respectivamente. Portanto, como pode ser observado pelos estudos realizados neste trabalho, que os conhecimentos sobre as propriedades de uma enzima imobilizada tendo a sílica

como suporte, fornecem perspectivas de novas aplicações destes materiais, para as mais diversas finalidades desde analíticas às cromatográficas e as catalíticas que precisam ser exploradas.

Referências Bibliográficas

1. Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical eng. Fundamentals. 2nd. New York, McGraw-Hill, **1986**.
2. Fernandes, K.F., Lima, C.S., Lopes, F.M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. Revista Processos Químicos, **2010**.
3. Hartemeier, W. Immobilized Biocatalysts – na Introduction, Trans. J. Wieser, Berlin, Springer-Verlag, **1988**.
4. Kirk, O., Borchert, T.V. & Fuglsang, C.C. Industrial enzyme application. Current opinion in biotechnology, vol.13 n^o 4, 345-351, **2002**.
5. Fernandes, K. F. Imobilização de Horseradish Peroxidase em Diferentes Polianilinas: Aplicações Analíticas. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, **2000**.
6. Cardoso, C. L.; Moraes, M. C. DE; Cass, Q. B. Imobilização de Enzimas em Suportes Cromatográficos: uma Ferramenta na Busca por Substâncias Bioativas, Química Nova, v. 32, n. 1, p. 175-187, **2009**.
7. Mendes, A. A.; Oliveira, P. C. DE; Castro, H. F. DE; Giordano, R. L. C. Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial, Química Nova, No Prelo.
8. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. A Utilização de Materiais Obtidos pelo Processo de Sol-Gel na Construção de Biossensores, Química Nova, v. 25, n. 5, p. 835-841, **2002**.
9. Unger, K.K. Porous Silica, Elsevier. Amsterdam – New York, **1979**.
10. Iler, R.K. The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York, **1979**.
11. Scott, R.P.W. & Traiman, S.J. Chromatogr., 196: 193, **1980**.
12. Frye, J.S.; Hawkins, B.L. & Maciel, G.E. J. Catal., 98: 444, **1986**.
13. Vrancken, K.A.; Possemiers, K.; Voort, P. & Vansant, E.F. Surface modification of silica gels with aminoorganosilanes. J. Colloid Interface Sci. 235-241, **1994**.
14. Cestari, A.R. & Airoidi, C., Thiol-Anchored silica and its oxidized form- Some divalent cations chemisorbed in aqueous and non-aqueous solvents. J. Braz. Chem. Soc., vol.6, n^o 3, 291-296, **1995**.
15. Vogel, A.I. Química Orgânica, vol. 1, 3^a Ed. Livro Técnico S.A. e EDUSP, Rio de Janeiro, **1971**.
16. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.; Farr, A. & Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, **1951**.
17. Airoidi, C. & Alcântara, E.F.C. Silica gel immobilized acetylacetone – some thermodynamic data in non-aqueous

- solvents, *Thermochim Acta*, 259: 95-102, **1995**.
18. Arica, M.Y. & Hasirci, V. Immobilization of glucose oxidase: A comparison of e entrapment and covalente bonding. *J. Chem. Tech. Biochnol.* 58: 287-292, **1993**.
 19. Uhlich, T; Uhlich, M. & Tomaschewski, G. Immobilization of enzyme in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. *Enzyme Microb. Technol.* 19: 124-131, **1996**.
 20. Arica, M.Y.; Alaeddinoglu, N.G. & Hasirci, V. Immobilization of glucoamylase onto activated pHEMA/EGDMA microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 152-155, **1998**.
 21. Cabral, J.M.S.; Kennedy, J.F. & Novais, J.M. Investigation of the operation stabilities and kinetics of glucoamylase immobilized on alkylamine derivatives of titanium (IV) – activated porous inorganic supports. *Enz. Microb. Technol.* 4: 343-348, **1982**.
 22. Ramon, O.; Kupiec-Conhen, R. & Chet, I. Regulation of β -1,3-gluconases by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 104 (4): 415-420, **2000**.
 23. Kazan, D.; Ertan, H. & Erarslan, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 191-197, **1997**.
 24. Mohamed, A. & Abdel, N. Immobilization of *Paenibacillus macerans* NRRL B-3186 cyclodextran glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme, *Process Biochem.* 34: 399-405, **1999**.
 25. Oh, J.O. & Kim, J.H. Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PnanSS microspheres, *Enzyme Microb. Technol.* 27: 356-361, **2000**.

Fernando A. Silva^{1,2*}, Edésio F. C. Alcântara¹ & Valdirene N. Monteiro¹

¹Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, CP 131, Goiânia, GO.

²Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Anápolis, GO.

*e-mail: fernandoa.senai@sistefieg.org.br