

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA AMILASE

Alexandre Zandonadi Meneguelli¹
Lorhenn Bryanda Lemes Maia²
Suellen Rolon de Souza Silva³
Lucas Rodrigues de Lima⁴
Claudia Aguiar dos Santos⁵
Willer Cardoso Girardi⁶
Cirano José Ulhoa⁷

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização enzimática da α -amilase derivada do pâncreas de camundongos, por análises de dosagem enzimática visando caracterizar as melhores condições para a reação enzimática *in vitro*. Foi realizado ensaio para a construção de uma Curva Padrão de Glicose usando cinco diluições de solução de glicose à 1%. Para se dosar a atividade enzimática, mediu-se a formação de seu produto (glicose), através da incorporação de um agente redutor (DNS). Foram testados quatro tempos diferentes, 5, 10, 15 e 20 minutos, sete condições de pH diferentes (de 2,2 até 8,0), em temperaturas de 22, 30, 40, 50 e 60°C, com cinco diluições diferentes com 100 μ g, 200 μ g, 400 μ g, 600 μ g, 800 μ g e 1000 μ g. Para obter a Curva Padrão, plotou-se os dados obtidos na ferramenta Excel gerando um gráfico de dispersão com os valores de molaridade calculados (eixo X) em função das absorvâncias obtidas (eixo Y). Na análise do efeito do tempo de incubação da reação, houve maior liberação de AR (concentração: 0,884 μ g/mL) no tempo 30min. Analisando o efeito do pH na atividade enzimática, com tempo de incubação de 15 minutos, a maior liberação de AR se deu em pH 6,0, com valor de 0,494 μ g/mL. A maior liberação de AR ocorreu na temperatura de 40°C (concentração: 0,563 μ g/mL). O Vmax obtido no ensaio corresponde à 1,088 μ moles de glicose/min (com [] de 1000 μ g/ μ L). Conclui-se para tanto que, a enzima α -amilase possui características de temperatura e pH semelhantes a análogas extraídas de locais e espécies distintas.

Palavras chave: α -amilase. Curva padrão. Atividade enzimática.

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF AMYLASE

ABSTRACT. The objective of this work was to characterize the enzymatic characterization of α -amylase derived from the pancreas of mice by enzymatic assays to characterize the best

¹ Doutorando em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB e bolsista da CAPES. Professor e Coordenador na Faculdade Panamericana de Ji-Paraná – UNIJIPA. E-mail: alexandrezandonadi@hotmail.com

² Doutoranda em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. E-mail: lorhenn.maia@gmail.com

³ Mestre em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. E-mail: suellen_rolon@hotmail.com

⁴ Mestrando em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. E-mail: lukas6923@gmail.com

⁵ Mestranda em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. E-mail: profclaudia.fcg@gmail.com.

⁶ Mestrando em Biotecnologia, pela Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. E-mail: willergirardi@caimasul.com

⁷ Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. E-mail ulhoa@ufg.br

conditions for the *in vitro* enzymatic reaction. An assay was performed for the construction of a Glucose Standard Curve using five dilutions of 1% glucose solution. In order to measure the enzymatic activity, the formation of its product (glucose) was measured through the incorporation of a reducing agent (DNS). Seven different pH conditions (5, 10, 15 and 20 minutes) were tested at seven different pH conditions (from 2.2 to 8.0) at temperatures of 22, 30, 40, 50 and 60°C, with five different dilutions with 100µg, 200µg, 400µg, 600µg, 800µg and 1000µg. To obtain the standard curve, we plotted the data obtained in the Excel tool, generating a scatter plot with the calculated molarity values (X axis) as a function of the obtained absorbances (Y axis). In the analysis of the effect of the incubation time of the reaction, there was a greater release of RA (concentration: 0.884 µg / mL) in the 30min time. Analyzing the effect of pH on the enzymatic activity, with a 15 minute incubation time, the highest release of RA occurred at pH 6.0, with a value of 0.494 µg / mL. The highest release of AR occurred at a temperature of 40 ° C (concentration: 0.563 µg / mL). The Vmax obtained in the test corresponds to 1,088 µmoles of glucose / min (with [] of 1000 µg / µL). It is concluded that the α-amylase enzyme has temperature and pH characteristics similar to those extracted from different sites and species.

Keywords: α-amylase. Standard curve. Enzymatic activity.

1 INTRODUÇÃO

As amilases são classificadas como uma das famílias com maior importância para a produção biotecnológica. Podem ser derivadas de várias fontes, como: animais, microorganismos e vegetais. Com ampla riqueza biotecnológica, as enzimas α-amilases podem ser úteis na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia e até mesmo para o tratamento de resíduos e efluentes (PANDEY et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006).

As α-amilases são enzimas que catalisam reações de hidrólises das ligações glicosídicas internas do amido e de produtos de baixo peso molecular, tais como: glicose, maltose e algumas unidades de maltotriose (GUPTA et al., 2003).

Se destacando como uma das mais importantes enzimas, as α-amilases constituem uma classe de enzimas industriais que chega a corresponder a aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas (RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização enzimática da α-amilase derivada do pâncreas de camundongos, através de análises de dosagem enzimática visando caracterizar as melhores condições para a reação enzimática *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para se realizar a caracterização enzimática da α -amilase derivada do pâncreas de camundongos, inicialmente, foi realizado um ensaio para a construção de uma Curva Padrão de Glicose. Uma vez que, o método adotado para a dosagem enzimática foi a medição de seu produto, construiu-se uma curva padrão de glicose, que é o produto formado na reação enzimática entre a amilase e seu substrato, amido.

2.1 Construção de Curva Padrão de Glicose

Para a construção desta curva, preparou-se cinco diluições de solução de glicose à 1%, com valores de massa e molaridades (Tabela 1). Os valores de molaridade e de absorbância foram plotados em planilha de excel, para a construção de um gráfico de dispersão com os valores de molaridade calculados (eixo X) em função das absorbâncias obtidas (eixo Y). Com estes valores, obteve-se uma equação de reta necessária para calcular a atividade enzimática da amilase.

2.2 Ensaio de Dosagem Enzimática

Após a construção da Curva Padrão de Glicose, iniciou-se os ensaios de dosagem enzimática da amilase. Para se dosar a atividade enzimática, mediu-se a formação de seu produto (glicose), através da incorporação de um agente redutor (DNS) no ensaio, que é oxidado pela glicose gerando um açúcar reduzido, que pode então, ser quantificado.

A caracterização enzimática se deu a partir de ensaios de dosagem enzimática com finalidade para determinar as melhores condições para a cinética da reação. Alguns parâmetros de condição foram avaliados, entre eles: tempo de incubação, pH, temperatura e concentração de substrato. Um ensaio enzimático contém o tampão de reação com pH e molaridade adequados, enzima e substrato em temperatura e tempo de incubação adequados. Além, do reagente utilizado, para o método de identificação do produto formado.

Todos os ensaios continham 100µL do substrato - amido 1% e 350µL de tampão 0,1M com pH 4.5 (exceto no ensaio de pH, que continha tubos variando o pH em uma faixa de valores). Para a reação enzimática ocorrer, estes tubos foram colocados em banho-maria a 50°C e, adicionou-se 50µL da enzima amilase. Deixou-se reagir por 20 minutos de incubação. Paralisou-se a reação retirando os tubos do banho-maria e adicionando 500µL de DNS. Para obtenção do açúcar redutor, colocou-se os tubos com DNS em banho de ebulição por 10 minutos, paralisando a reação com banho em gelo. Na sequência, adicionou-se 2mL de água destilada para diluir e fez-se a leitura em espectrofotômetro à 540nm. Posteriormente, foi calculado a atividade enzimática usando a curva padrão de glicose previamente construída.

Todos os ensaios contiveram uma reação sem enzima, para controle negativo de reação – a qual foi intitulada de BRANCO.

Para se calcular os valores de açúcar redutor (AR) liberado/mL, utilizou-se a equação de reta obtida na curva padrão de glicose: $Y = aX + b$, onde “X” - é o valor de concentração que queremos, “Y” -corresponde a absorbância obtida, “a” - é a inclinação da reta e “b” - a intercepção.

Para se obter a velocidade da reação (V) em µmoles de glicose por minuto, multiplicou-se o valor de AR liberado/mL por 20 (para converter µL em mL) e dividiu-se por 10 (tempo de incubação adotado).

- a. Ensaio de variação do tempo de incubação (cinética): realizou-se ensaio de dosagem enzimática para reações com variação no tempo de incubação. Testamos quatro tempos diferentes: 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos e 20 minutos. Para cada tempo de incubação foram feitas duplicatas.
- b. Ensaio de variação de pH: o ensaio de dosagem para reações com variação de pH contou com uma faixa de variação que foi do pH ácido 2,2 até o pH básico 8,0, testou-se para tal sete condições de pH diferentes. Para cada pH testado, foram feitas duplicatas.
- c. Ensaio de variação na temperatura de incubação: testou-se as temperaturas de 22°C, 30°C, 40°C, 50°C e 60°C no ensaio de dosagem enzimática para variação na temperatura de incubação. Para cada temperatura de incubação foram feitas duplicatas.

- d. Ensaio de variação da concentração do substrato: variou-se a concentração da solução estoque de amido à 1%, criando-se cinco diluições diferentes com 100µg, 200µg, 400µg, 600µg, 800µg e 1000µg. Para tal ensaio, utilizou-se os valores de tempo de incubação, pH e temperatura ótimas obtidas nas análises anteriores.

2.3 Equação de Michaelis-Wenten

Toda enzima tem uma velocidade máxima de reação. E a cinética da reação enzimática revela dois parâmetros importantes: V_{max} e K_m . V_{max} , corresponde a velocidade máxima de reação obtida no ensaio. K_m , é uma constante que mede a afinidade da enzima pelo substrato. Seu valor é obtido em µg/µL, no eixo X do gráfico de velocidade de reação em função da concentração de substrato (µg/µL). Quanto menor o valor de K_m , maior a afinidade da enzima pelo substrato. A partir dos valores obtidos no ensaio de variação da concentração do substrato, e do gráfico construído com estes valores, pode-se interpolar a partir da equação de Michaelis-Wenten, os valores dos parâmetros V_{max} e K_m da reação enzimática da amilase.

A construção de um gráfico de dispersão com os valores obtidos no ensaio de variação da concentração do substrato foi necessária para visualizar o K_m . O gráfico construído (Gráfico 5), relaciona as concentrações do substrato [S] – glicose, com a velocidade da reação (V) em µmoles de glicose/min, calculada para cada diluição do substrato.

De acordo com a fórmula da equação de Michaelis-Wenten: $V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$, em uma velocidade de reação $\frac{V_{max}}{2}$, a concentração de substrato ([S]) correspondente no gráfico, corresponderá ao valor de K_m . Assim, temos que $K_m =$ valor de [S], em µg/µL (eixo X), obtido no ponto $\frac{V_{max}}{2}$ do eixo Y do gráfico (V). Sendo possível relacionar seu valor no eixo X, através da fórmula: $\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$.

Já o K_{cat} , corresponde ao tempo que a enzima se liga ao substrato para formar o produto. Esta constante mede a capacidade da enzima em formar o

produto. K_{cat} corresponde a $\frac{V_{max}}{[ET]}$, sendo $[ET]$ a concentração de enzima total da reação $[ET] = [E] + [ES]$, onde $[E]$ é concentração de enzima livre e $[ES]$ complexo enzima-substrato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o ensaio de construção da curva padrão foram obtidos valores de absorbância em cada diluição (Tabela 1).

Tabela 1. Curva Padrão de Glicose

TUBOS	ÁGUA DESTILADA (µL)	SOLUÇÃO DE GLICOSE 0,1% (µL)	MASSA DA GLICOSE (µg)	MOLARIDADE (µmol)	ABSORBÂNCIA (nm)
0	500	0	0	0	0
1	450	50	50	0,277	0,111
2	400	100	100	0,555	0,278
3	350	150	150	0,833	0,589
4	300	200	200	1,111	0,896
5	250	250	250	1,388	1,288

*PM da glicose: 180

Para obter a Curva Padrão, plotou-se os dados obtidos na ferramenta excel onde foi gerado um gráfico de dispersão com os valores de molaridade calculados (eixo X) em função das absorbâncias obtidas (eixo Y). Com estes valores, obteve-se a equação de reta: $Y = 0,9366X - 0,1234$ com $R^2 = 0,9616$ (Gráfico 1).

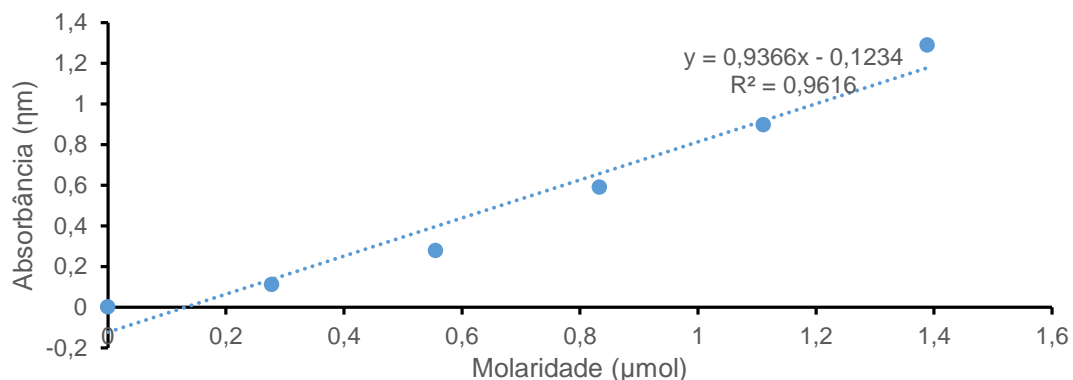


Gráfico 1. Curva Padrão de Glicose. Equação da reta obtida para os valores de molaridade em função da absorbância em cada diluição do ensaio. Estes valores compreendem a curva padrão da glicose, utilizada para calcular a atividade enzimática.

Os resultados obtidos em cada ensaio de dosagem enzimática da amilase, estão descritos nos Gráficos 2, 3, 4 e 5.

Na análise do efeito do tempo de incubação da reação, houve maior liberação de AR (concentração: 0,884 $\mu\text{g/mL}$) no tempo máximo testado - 30min (Gráfico 2).

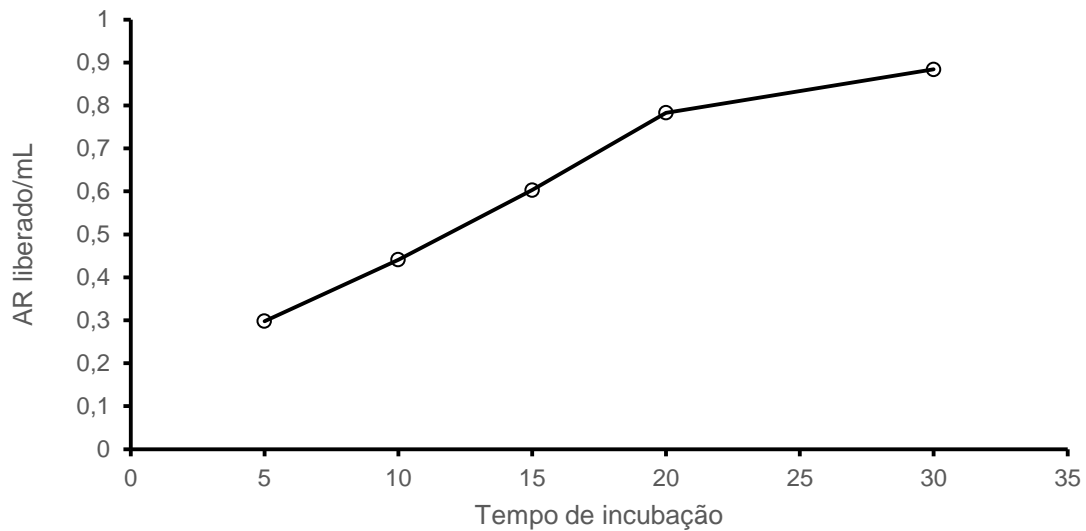


Gráfico 2. Ensaio de variação do tempo de incubação (cinética). O gráfico relaciona os valores de AR liberados por mL em cada tempo de incubação testado.

Quando se analisou o efeito do pH na atividade enzimática, com tempo de incubação de 15 minutos, a maior liberação de AR se deu em pH 6,0, com valor de 0,494 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 3).

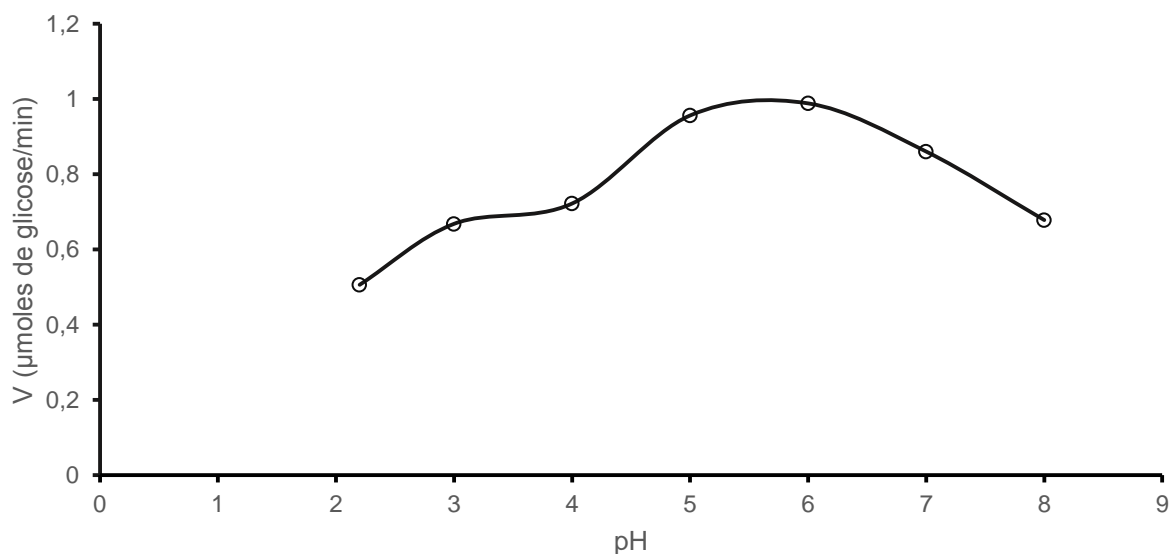


Gráfico 3. Ensaio de variação do pH. O gráfico relaciona os valores de $\mu\text{moles de glicose por min}$ em cada pH testado.

O Gráfico 4 descreve os dados obtidos na análise do efeito da temperatura de incubação na atividade enzimática. Observou-se uma maior liberação de AR na temperatura de 40°C (concentração: 0,563 µg/mL).

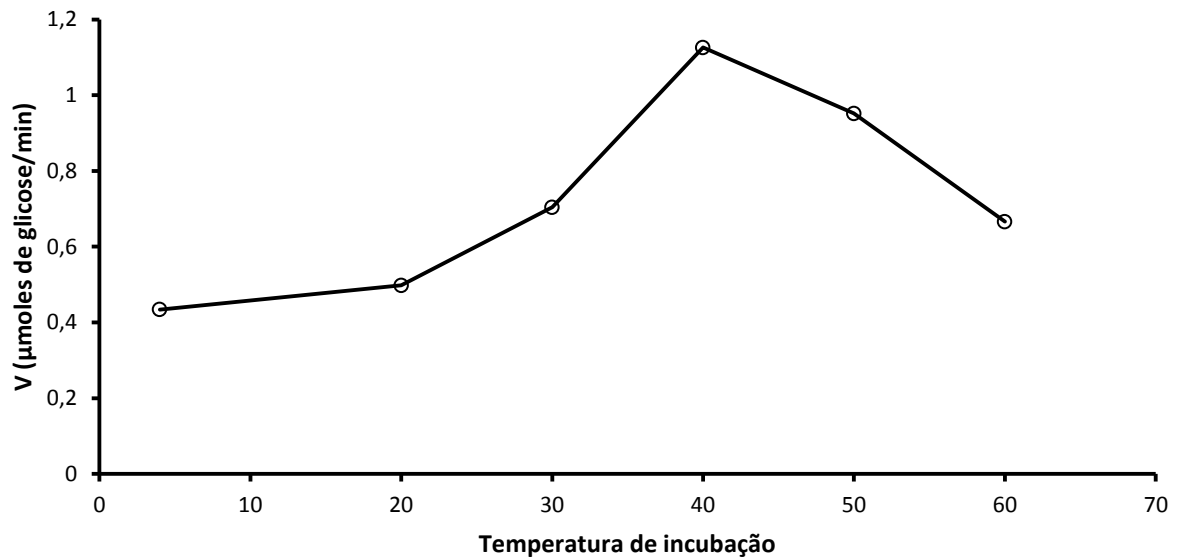


Gráfico 4. Ensaio de variação da temperatura de incubação. O gráfico relaciona os valores de µmoles de glicose por min em cada temperatura de incubação testada

Depois de avaliado os parâmetros de cinética, pH e temperatura, avaliou-se o efeito da concentração do substrato (amido) na atividade enzimática com as condições ótimas, previamente identificadas nos ensaios anteriores.

Para calcular o K_m , os valores da velocidade de reação obtidos (V) foram relacionados às concentrações de substrato correspondente ($[S]$), em um gráfico de dispersão (Gráfico 5).

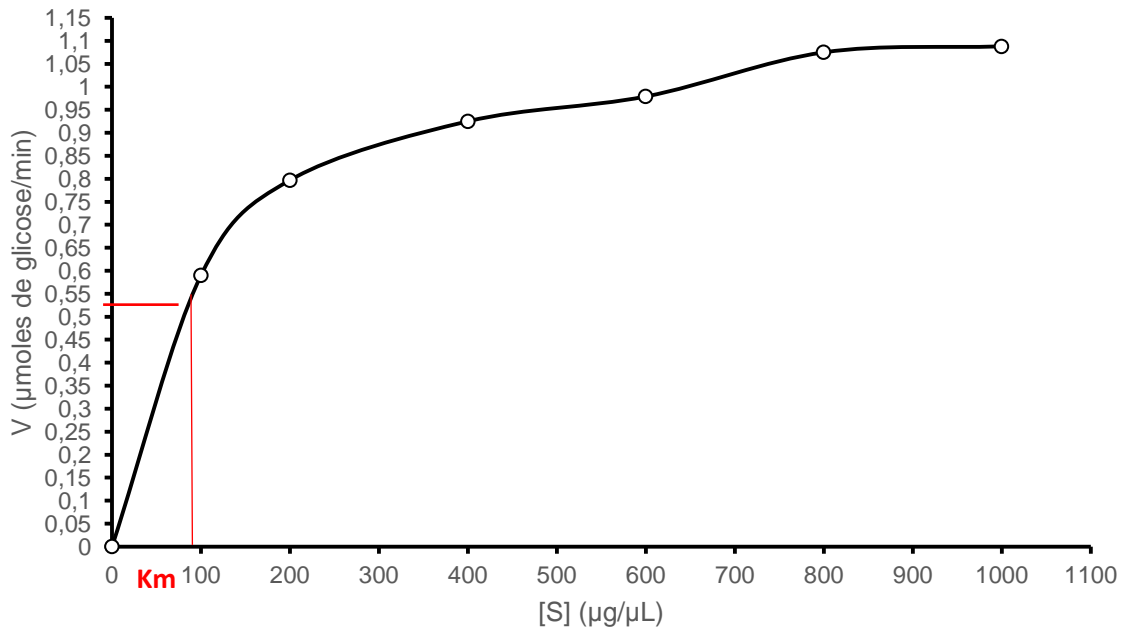


Gráfico 5. Gráfico de dispersão da velocidade de reação em função da concentração do substrato. Os valores conhecidos de V, no eixo Y do gráfico, foram utilizados para calcular Km, o qual corresponde a um valor de [S], através da equação de Michaelis-Wenten

O Vmax obtido no ensaio corresponde à 1,088 µmoles de glicose/min (com concentração de 1000 µg/µL de substrato). Como Km é o valor de [S] correspondente a velocidade de reação: $\frac{V_{max}}{2}$, será então o valor no eixo X, correspondente a velocidade de 0,544 µmoles de glicose/min. Assim, Km é cerca de 90 µg/µL.

O pesquisador Zóltowska (2001), obteve perfis de pH para isoenzimas intestinais em pH 4,7 e 4,5 e, para a enzima músculo-amilase em pH 5,0. Em nossos estudos foi obtido um valor de pH ótimo de 6,0.

Com relação a temperatura, a pesquisa de Zóltowska (2001), mostrou dois picos de temperatura ótima de atividade, sendo eles: 40°C e 50°C. Já na presente pesquisa houve apenas uma temperatura ótima, de 40°C. Comparando os resultados, percebe-se uma pequena diferença, que pode ser justificada pelo fato das enzimas terem sido extraídas de órgãos diferentes, com localização próxima.

Danielssone e colaboradores (1975) obtiveram pH ótimo para a enzima α-amilase pancreática de *Mus musculus*, em 7,0. Este resultado se mostrou semelhante ao encontrado no nosso trabalho, o que pode estar relacionado ao fato da enzima ter sido extraída de indivíduos de espécies próximas. No entanto, Asrat e

Girma (2018), obtiveram o pico de atividade da α -amilase, extraída de *Aspergillus niger*, no pH 6.0.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vale ressaltar que este pH é exatamente o mesmo, indicado como ótimo no nosso estudo, evidenciando que a enzima α -amilase possui um intervalo de atividade muito semelhante independentemente da espécie e local no qual a enzima foi extraída.

Conclui-se para tanto que, a enzima α -amilase possui características de temperatura e pH semelhantes a análogas extraídas de locais e espécies distintas. O que demonstra sua estabilidade para utilização biotecnológica. Em relação a concentração obtida, seu rendimento é similar à de diferentes fontes.

REFERÊNCIAS

ASRAT, B., GIRMA, A., Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211, **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, V. 9, p. 7-14, 2018.

DANIELSSON, A., MARKLUND, S., WIGBRAND, T., Purification and characterization of mouse pancreatic α -amylase, Int. 1. **Biochem.**, V. 6, p. 585-589. Pergamon Press. Printed in Great Britain, 1975.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. **Process Biochem.** 2003, 38, 1599–1616

Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C. R.; Soccol, V. T.; Singh, D.; Mohan, R. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 2000, 31, 135–156.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresour Technol** 99, 3044-3050

RODRIGUES, V. B.; Alameda, E. J.; Gallegos, J. F. M.; Requena, A. R.; López, A. I. G. **Biotechnol. Prog.** 2006, 22, 718–722

ZÓTOWSKA, K., Purification and characterization of α -amylases from the intestine and muscle of *Ascaris suum* (Nematoda), V. 48 N°. 3, 2001.