

USO DE PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTOS NA DETERMINAÇÃO DO PH E TEMPERATURA ÓTIMOS DE α -AMILASE DE *BACILLUS LICHENIFORMIS*

A. TRENTIN¹, A. L. ASTOLFI¹, J. ZENI¹, A. C. SCHUMANN¹, C. M. BOCALON¹, J. COLLA¹, N. L. D. NYARI¹

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: jamilezeni@uricer.edu.br

RESUMO – Neste trabalho objetivou-se caracterizar parcialmente a α -amilase de *Bacillus licheniformis* em termo de pH e temperatura ótimos usando planejamento estatístico de experimentos. Para a determinação dos valores ótimos de temperatura e pH foi realizado um planejamento fatorial completo 2², onde o pH ira variar de 5 a 11 e temperatura de 30 a 80°C. A determinação da atividade enzimática da α -amilase foi realizada adicionando-se 0,1mL de enzima a 0,9 mL de solução de glicina 50mM contendo 1% de amido e incubando a reação por 10 minutos, segundo metodologia descrita por San *et al.* (2011). De acordo com os resultados obtidos usando o planejamento estatístico experimental, a enzima α -amilase apresentou a maior atividade enzimática (8,7U/mL), com temperatura acima de 60°C e pH na faixa de 9 a 11.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são substâncias orgânicas poliméricas formadas por unidades de aminoácidos que atuam no metabolismo dos seres vivos como catalisadores naturais. Estes biocatalisadores, na maioria das vezes de estrutura proteica do tipo globular terciária ou quaternária, aceleram bastante a velocidade de uma reação termodinamicamente favorável, diminuindo a energia de ativação e estabilizando o estado de transição das reações (Nelson; Cox, 2011). As enzimas estão presentes em todos os organismos vivos sejam plantas ou animais, dos mais simples, como as formas de vida unicelulares, aos mais complexos (Spier, 2005).

A denominação das enzimas geralmente é dada de acordo com o substrato em que atuam. Assim, o termo amilase indica a ação enzimática sobre o amido (amilo), que é constituído por dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%) (Vieira-Júnior, 2006).

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1-4 glicosídicas de polissacarídeos, como glicogênio, amido ou seus produtos de degradação. Sobre o amido, atuam liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (Vieira-Júnior, 2006). Produzida na saliva e no pâncreas, a amilase também é produzida por diversos fungos, bactérias e vegetais (Sankalia *et al.*, 2007).

As enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais observados com as proteínas pela variação de pH e de temperatura, estes fatores são capazes de alterar a atividade das enzimas e, conseqüentemente, a velocidade das reações por elas catalisadas. Sendo assim, cada enzima possui um pH ótimo de atividade (onde sua atividade é máxima); para a maioria das enzimas ele está entre 4,5 e 8,0. Levando em conta que mudanças extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas. No entanto, as mudanças de pH que não afetam totalmente a estrutura de uma enzima, podendo apenas diminuir sua atividade por estar afetando somente resíduos do sítio catalítico (Silva *et al.*, 2008).

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente a α -amilase de *Bacillus licheniformis* em termo de pH e temperatura ótimos usando planejamento estatístico de experimentos.

2. METODOLOGIA

2.1 Enzima

A enzima utilizada neste estudo foi a α -amilase comercial de *Bacillus licheniformis* (Sigma).

2.2 Caracterização parcial da α -amilase

A caracterização das enzimas é de suma importância para o estabelecimento das condições de aplicação, como temperatura e pH ótimos, uma vez que tais condições podem ter uma grande variação de acordo com a origem e os meios de produção utilizados.

Para a determinação dos valores ótimos de temperatura e pH foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , onde o pH ira variar de 5 a 11 e temperatura de 30 a 80°C (Tabela 1).

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo 2^2 de temperatura e pH ótimos para a α -amilase.

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
pH	X ₇	5,0	5,54	7,0	9,8	11
Temperatura (°C)	X ₈	30	37	55	73	80

2.3 Determinação da atividade enzimática

A quantificação de atividade enzimática da α -amilase foi realizada segundo metodologia descrita por San *et al.*, (2011), onde 0,1mL de enzima era adicionado a 0,9 mL de solução de substrato, que contem 1% solúvel amido em 50mM glycine-NaOH (pH 9,0), e a mistura então era incubada a 50 °C por 10 minutos. A quantidade de açúcares redutores produzidos foi determinada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959) com glucose como um padrão. Uma unidade de atividade da amilase foi definida como a liberação de 1mol de açúcar redutor por 10 minutos a 50°C e pH 9.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização parcial da α -amilase em termos de pH e temperatura ótimos

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento do fatorial completo 2^2 com os valores codificados (reais) das variáveis independentes estudadas e as respostas em atividade de amilase.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, podemos observar que a maior atividade de amilase foi de 8,7U/mL no ensaio 4, com temperatura de 60°C e pH de 11.

Spier (2005) estudando pH e temperatura ótimos de atividade para amilase fúngica obtiveram pH ótimo em 6,0 e temperatura ótima entre 45-55°C, resultado este que diferem dos encontrados no presente estudo.

Figueira *et al.* (2000) produziram amilases dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus* obtendo valores de pH ótimos de 6,7 e 5,5 respectivamente, demonstrando a tendência de produção de amilases levemente ácidas por fungos.

Rasih; Rehm (2009) obtiveram uma amilase em *E. coli* recombinante que possuía pH ótimo 8,0.

Tabela 2- Matriz do planejamento do fatorial completo 2^2 em termos de temperatura e pH ótimos da enzima amilase (U/mL).

Ensaio	X_1	X_2	Atividade (U/mL)
1	-1(5,54)	-1(37)	0,0
2	1(9,8)	-1(37)	0,0
3	-1(5,54)	1(73)	3,9
4	1(9,8)	1(73)	8,7
5	-1,41(5)	0(50)	0,6
6	1,41(11)	0(50)	1,9
7	0(7)	-1,41(30)	0,0
8	0(7)	1,41(80)	0,2
9	0(7)	0(50)	2,1
10	0(7)	0(50)	2,6
11	0(7)	0(50)	2,3

*Variáveis independentes: X_1 = pH e X_2 = Temperatura (°C).

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de amilase, na qual podemos observar que as variáveis Temperatura (°C) (Q) e a interação entre o pH e temperatura (1L by 2L) não apresentaram efeito significativo a nível de 95% na atividade de amilase (U/mL).

Tabela 3- Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2^2 para atividade de amilase.

	Coeficiente de	Erro	t(2)	p
--	----------------	------	------	---

	<i>Regressão</i>	<i>Padrão</i>		
<i>Média</i>	14,289	0,3492	40,908	0,0005
(1)pH (L)	0,772	0,2142	3,605	0,0690
pH (Q)	-1,961	0,2556	-7,671	0,0165
(2) Temperatura (°C) (L)	3,845	0,2142	17,949	0,0030
Temperatura (°C) (Q)	-0,142	0,2556	-0,558	0,6327
1L by 2L	0,515	0,3025	1,702	0,2307

*Fatores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

A Tabela 4 apresenta a análise de variância realizada a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial completo 2^2 para a atividade da α -amilase (U/mL), onde podemos observar que o F calculado foi 1,33 vezes maior que o valor do F tabelado com um coeficiente de correlação de 0,91, permitindo desta forma a validação do modelo (Eq. 1) e a construção de superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 1 demonstrando que a máxima atividade de amilase se dará na faixa de pH de 7 a 9,8 e temperatura acima de 60°C.

Tabela 4- Análise de variância para a atividade da α -amilase (U/mL) do planejamento fatorial completo 2^2 .

<i>Fontes de Variação</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrados Médios</i>	<i>F Calculado</i>
Regressão	146,42	5	29,28	5,44
Resíduo	26,92	5	5,38	
Falta de Ajuste	26,1870	3		
Erro Puro	0,7321	2		
Total	173,3377	10		

Resíduos = Falta de ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab}, 95\%} = 4,10$.

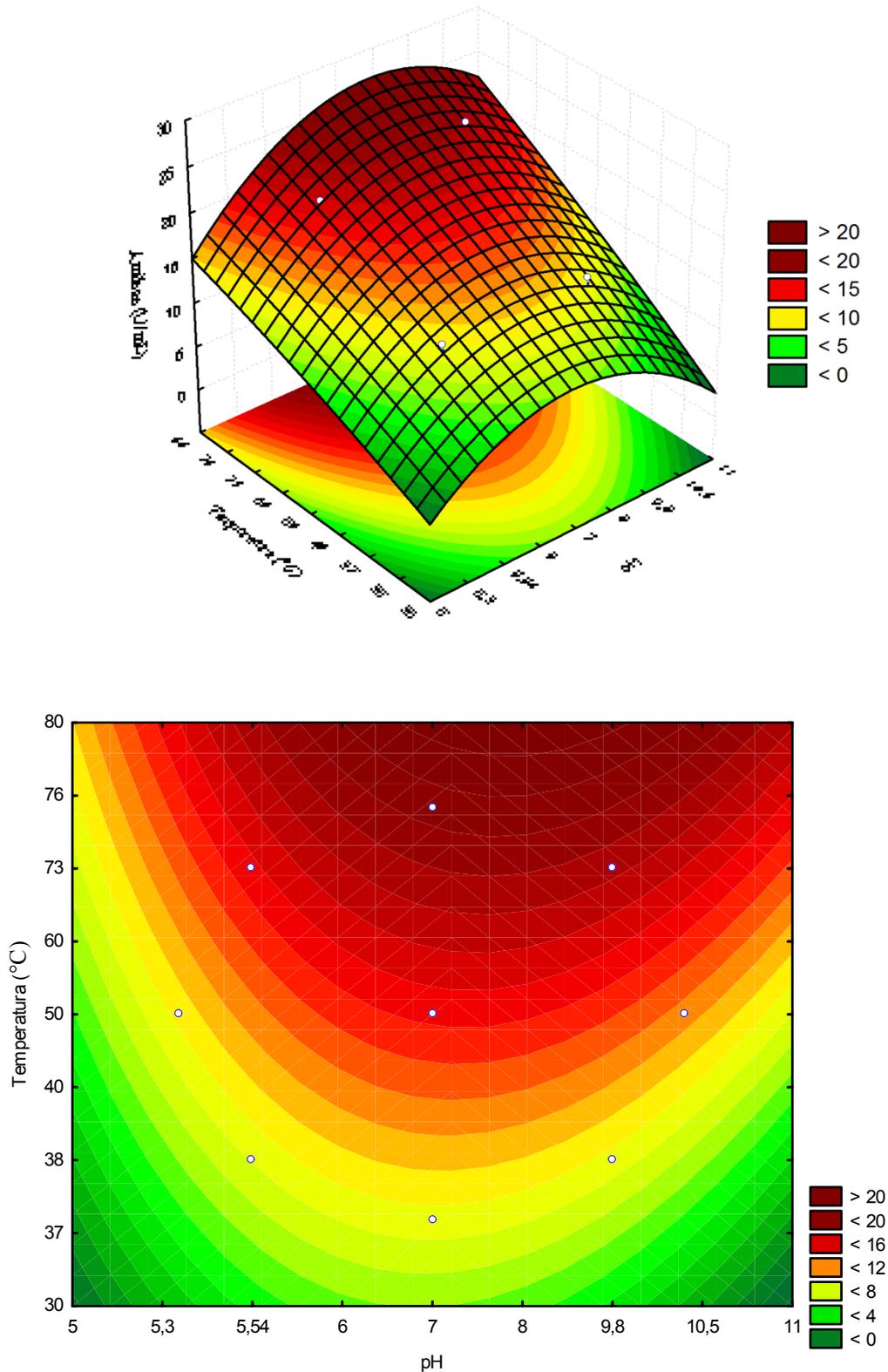
A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem que descreve a atividade da amilase em função do pH e temperatura, dentro das faixas estudadas.

$$\text{Amilase} = 14,29 - 1,96 \cdot X_1^2 + 3,84 \cdot X_2 \quad (\text{Eq.1})$$

Onde:

Amilase = Atividade de amilase (U/mL); X_1 = pH e X_2 = Temperatura (°C).

Figura 1- Superfície de resposta e curva de contorno do pH e da temperatura para a atividade da amilase (U/mL).



4. CONCLUSÃO

Na caracterização parcial em termos de pH e temperatura ótimos para a enzima α -amilase o maior valor de atividade foi de 8,7U/mL, com temperatura acima de 60°C e pH na faixa de 7 a 9,8.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Uri Erechim, FAPERGS, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

6. REFERENCIAS

- FIGUEIRA, E. L. Z.; SÁ, M. C.; IDA, E. I. e HIROOKA, E. Y. Produção e caracterização de amilases de *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, 18, 13-26, 2000.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426 - 428, 1959.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 5 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- RASIAH, I. A.; REHM, B. H. A. One-step production of immobilized α -amylase in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 75, 2012 – 2016, 2009.
- SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M., et al. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65, 215-232, 2007.
- SAN-LANG WANG, YEH-CHEN LIANG, TZU-WEN LIANG. Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. *Process Biochemistry*, 46, 745–750, 2011.
- SILVA, R. L. F. O. B.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 642-648, 2008.
- SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba - PR, 2005. 143p.
- VIEIRA-JÚNIOR, A. Alfa e beta-amilase no metabolismo do amido durante o amadurecimento da banana: clonagem e caracterização molecular. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2006. 91p.