

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA BETA GLICOSIDASE OBTIDA DE *Bacillus polymyxa* EM NANOFOLHAS GRAFENO E SUA ATIVAÇÃO COM GLICOSE-6-FOSFATO.

Anderson Albino Gomes¹, Maria de Lourdes Borba Magalhães², Everton Skoronski³

¹Acadêmico do Curso de Engenharia Ambiental - CAV - bolsista PROBIC/CNPq.

²Professor Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV.

³Orientador, Departamento de Engenharia Ambiental - CAV – everton.skoronski@udesc.br.

Palavras-chave: Imobilização. Glicosidase. Glicose-6-fosfato.

Imobilização da enzima beta glicosidase em um suporte inerte ao meio reacional, possibilitando sua fácil separação após a reação e sua ativação com glicose-6-fosfato. Neste trabalho, *Bacillus ATCC842 polymyxa* foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os reagentes 4-nitrofenil β -D-glucopiranosídeo (pNBGP) e glicose-6-fosfato foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich. Oligonucleotídicos sintéticos foram usados para amplificar o gene *B. polymyxa* BGLA (1320bp) a partir de DNA genômico purificado, utilizando condições convencionais de PCR. O fragmento foi subclonado em pET28a (+) e o vector de expressão plasmídeo resultante pET28a (+): BGLA foi transformado em *Escherichia coli* Rosetta (DE3). As células transformadas foram inoculadas em meio líquido LB contendo 50 ug / ml de canamicina e 37,5 ug / ml de cloranfenicol e cultivados a 37 ° C até atingir a DO600nm de 0,6. As células foram induzidas com IPTG 0,05 mM e incubou-se a 17 ° C durante 24 horas. Para a purificação, todos os procedimentos foram realizados a 4 ° C. As células foram suspensas em 50 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 300 mM e 1,5 mM de imidazolo (tampão A), contendo PMSF, lisozima (20 mg / ml) e DNAase I (5 ug / mL). As células foram rompidas por sonicação e agita-se em gelo durante 30 minutos. Os restos celulares foram removidos por centrifugação e o sobrenadante foi aplicado a Ni-NTA-Sepharose pré-equilibrada com tampão A. proteínas fracamente ligadas foram removidas por lavagem da resina com tampão B (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 300 mM de NaCl; 40 mM imidazol) e as proteínas foram eluídas em tampão C (500 mM de imidazol, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0). As frações ativas foram dialisadas contra tampão A, misturado com 50% de glicerol e armazenadas a -20 ° C. A medição da atividade da enzima foi realizada utilizando o substrato natural celobiose ou a pNBGP substrato analógico. Todas as reacções foram monitoradas continuamente e atividades da enzima foi calculada a partir das taxas iniciais (<10%) de saturação. Resumidamente, as misturas de reação para 150 ul que foram adicionadas concentrações variáveis de celobiose e BGLA (110 nM), utilizando tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 6,0, e 50 mM de Glicose-6-fosfato. As reacções foram deixadas prosseguir a 20 ° C e terminadas depois de 15 minutos de incubação por aquecimento da amostra a 95oC durante 5 minutos. Para os ensaios de enzimas realizados com pNBGP, as reacções foram realizadas em volumes de reação de 150 uL na presença de BGLA (110 nM), concentrações variáveis de pNBGP, e tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 6,0 a 20 ° C. Após o período de incubação, a reação foi parada com 100 mL de Na₂CO₃ 1 M e a absorvância medida a 405 nm. A

concentração do produto foi estimado utilizando p-nitrofenol coeficiente de extinção de 18000 M⁻¹ cm⁻¹. Os dados cinéticos de velocidade inicial foram construídos usando Sigma Plot v.12.0. Os parâmetros cinéticos foram determinados a 11 concentrações diferentes de celobiose (0,2; 0,4; 0,5; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mM) ou PNPG (0,2; 0,4; 0,5; 1; 2; 3; 4 ; 5; 6; 7 e 8 mM). Dados cinéticos de saturação de substrato foram obtidos de acordo com a Eq. (1).

$$v = \frac{V \cdot S}{S + K_m}$$

As constantes k_m e V_{max} são de extrema importância no estudo das reações enzimáticas. O k_m permite entender a função de enzimas que catalisam uma reação específica. As Figuras 1 e 2 demonstram que a enzima obtida possui atividade e pode apresentar potencial na valorização de resíduos celulósicos visando a sua hidrólise. A enzima imobilizada em grafeno sem a presença de Glicose-6-fosfato apresentou um k_m de 3,08mM e uma V_{max} de 4,75, já a enzima imobilizada na presença de Glicose-6-fosfato apresentou k_m de 2,38mM e uma V_{max} de 4,08 conforme as Figura 1 abaixo. Isto demonstra que a glicose-6-fosfato atua também como um ativador na enzima imobilizada, podendo ser utilizado como tal finalidade par acelerar o processo de hidrólise enzimática.

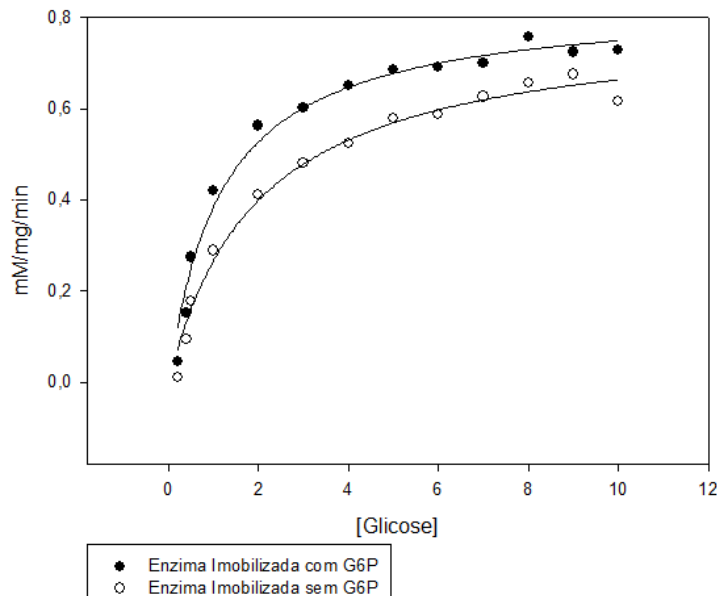


Fig. 1 Atividade enzimática da enzima imobilizada na presença e ausência de glicose-6-fosfato.