

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Imobilização da Naringinase em Grafeno Oxidado: Estabilidade e Reuso do Derivado Enzimático

Rubens Monti<sup>a\*</sup>; Julián Paul Martínez Galán<sup>a</sup>; Juliana Cristina Bassan<sup>a</sup>; Guilherme Peixoto<sup>b</sup>; Fernando Masarin<sup>b</sup>; José Miguel Carceller<sup>c</sup>; Sara Iborra<sup>c</sup>; Avelino Corma<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição, UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14800-903, Araraquara, SP, Brasil

<sup>b</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UNESP – Univ. Estadual Paulista, 14800-903, Araraquara, SP, Brasil

<sup>c</sup>Instituto de Tecnologia Química, Universidade Politécnica de Valência-Espanha.

#### RESUMO

Pesquisas recentes em nanotecnologia permitiram inovações sobre imobilização de enzimas no suporte grafeno oxidado (GO), devido possuir grande área de superfície com muitos grupos funcionais. Neste trabalho, a enzima naringinase comercial foi imobilizada em grafeno por adsorção física. O derivado obtido após 3 h, apresentou melhor atividade em pH 4,5 em temperatura de 70°C. Resultados com dez vezes de reutilização mostraram que a atividade enzimática permaneceu 100%. O derivado grafeno-naringinase apresentou melhor eficiência catalítica ( $K_m \text{ apar.} = 0,8 \text{ mM}$ ;  $V_{\text{máx apar.}} = 476,2 \text{ U.mg}^{-1}$ ) comparado com a enzima livre ( $K_m \text{ apar.} = 1,8 \text{ mM}$ ;  $V_{\text{máx apar.}} = 2,0 \text{ U.mg}^{-1}$ ). O derivado quando ensaiado a 80°C, mantém atividade enzimática acima de 80% enquanto que a enzima livre atinge apenas 40% de sua atividade (1h de incubação). Os resultados obtidos mostram que o grafeno foi excelente suporte para a enzima naringinase, podendo ser aplicado para outras enzimas.

#### INTRODUÇÃO

A naringinase é uma enzima utilizada na indústria do processamento de sucos de laranja para diminuir os níveis elevados de naringina responsável pelo sabor amargo o que reduz a qualidade sensorial e o valor comercial do produto (Puri, 2000). Esta enzima hidrolisa a naringina em duas etapas, sendo cada uma delas catalisada por uma atividade diferente (Fig.1) (Yadav, *et al.*, 2013).

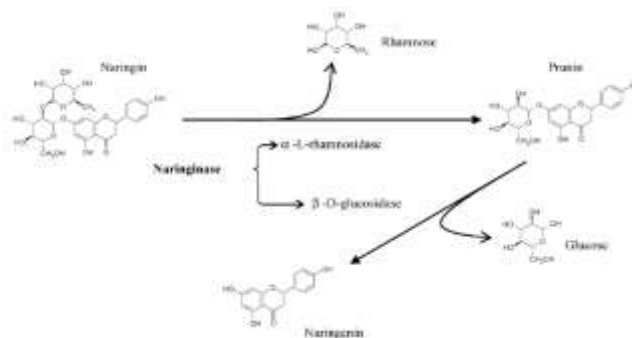
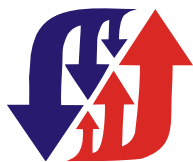
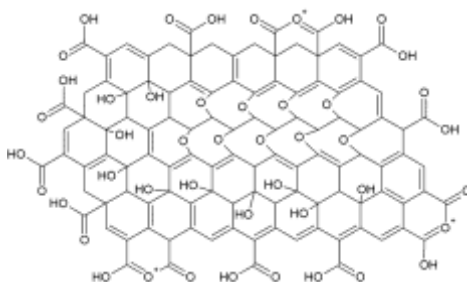


Figura 1. Hidrólise da naringina pela naringinase.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Estas enzimas são consideradas catalisadores "verdes", mas aplicações em larga escala têm sido dificultada devido ao alto custo, baixa capacidade de reutilização e fácil desativação. A imobilização é um dos processos capaz de aumentar a eficiência catalítica de diversas enzimas. Recentemente, vários estudos tem buscado a imobilização de enzimas em nanomateriais (Liu, *et al.*, 2014; Hermanová, *et al.*, 2015). O grafeno oxidado (GO) é um material obtido através da oxidação do grafite. Suas propriedades são diferentes daquelas apresentadas para o grafeno cristalino, o que o torna um novo material com características especiais para imobilização como grande área superficial com presença de grupos epóxidos e grupos hidroxilas posicionados nos vértices dos anéis aromáticos formando ácidos carboxílicos, os quais tornam este material um bom suporte para interagir quimicamente com as proteínas (Fig.2.) (Zhang, *et al.*, 2013)

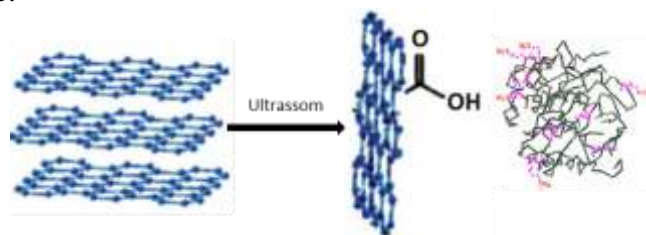


**Figura 2.** Grafeno Oxidado (GO) (Zhang, *et al.*, 2013).

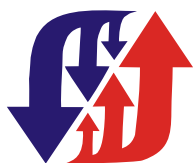
O objetivo principal deste trabalho foi imobilizar a enzima naringinase comercial em suporte inorgânico para obtenção de derivado estabilizado com possibilidades de reuso.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Material:** naringinase (*P. decumbens*), naringina, *p*-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnosídeo (*p*-NFR) e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo (*p*-NFG) foram obtidas da Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA). O óxido de grafeno foi oferecido pelo Instituto de Tecnologia Química-UPV. **Métodos:** Atividade enzimática foi determinada usando *p*-nitrofenil-  $\alpha$ -L-ramnosídeo (*p*-NFR) e *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo (*p*-NFG) (Romero, *et al.*, 1985) com algumas modificações. Açúcares redutores dosados por DNS (Miller, 1959). Imobilização da enzima: O material (GO) foi ressuspenso em tampão fosfato (100mM, pH 7.0) e submetido a ultrassom por 15 minutos para finalmente ser usado no processo de imobilização (Fig. 3.). A seguir foi incorporado a enzima e a mistura mantida em agitação suave por diferentes tempos, a temperatura ambiente.



**Figura 3.** Ativação do GO (Zhang, *et al.*, 2013).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Caracterização bioquímica: Experimentos em diferentes temperaturas e pHs foram realizados para determinar atividade e estabilidade da enzima livre e do derivado enzimático.  $K_M$  aparente e  $V_{m\acute{a}x}$  aparente foram também determinados. Dosagem de proteínas foi feita por Bradford (1976). Foram realizados ensaios enzimáticos com os derivados usando naringina como substrato, sendo que após cada ensaio o derivado foi recolhido, lavado e novamente utilizado em novos ensaios. A atividade enzimática foi acompanhada através de medidas do produto liberado.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO.

O material apresentou excelente afinidade pela enzima naringinase sendo imobilizada em 3h com um rendimento de 100% (Fig. 4) demonstrando que a ligação aos grupos carboxílicos e interações não específicas do GO contribuíram para a estabilização da enzima.

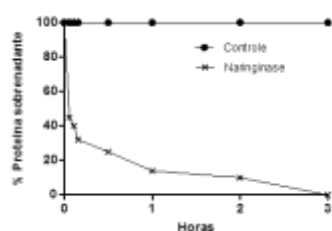


Figura 4. Processo de imobilização.

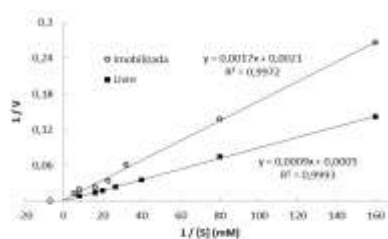


Figura 5. Gráfico Lineweaver-Burk Naringinase livre e imobilizada.

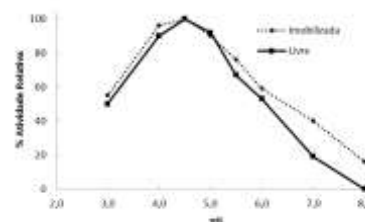


Figura 6. Perfil de atividade da naringinase em função do pH.

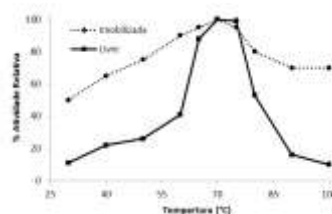


Figura 7. Perfil da atividade da naringinase em função da temperatura.

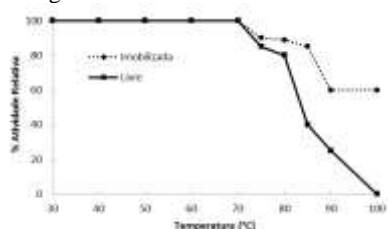


Figura 8. Perfil atividade da naringinase em função da estabilidade térmica.

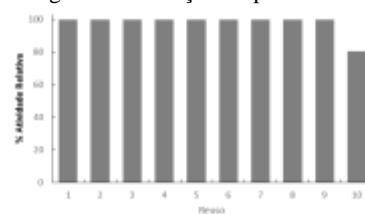
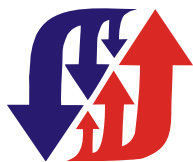


Figura 9. Reusos do derivado grafeno-naringinase.

Valores de  $K_M$  da naringinase livre e imobilizada foram estimados através do gráfico de Lineweaver-Burk, usando-se *pnp*-Rha como substrato, obtendo  $K_M$  de 1,8 e 0,8  $mM^{-1}$  respectivamente (Fig. 5). Estes valores indicam a boa afinidade da naringinase imobilizada pelo substrato. A enzima imobilizada e livre apresentaram máxima atividade em pH de 4,5 e em temperatura de 70-75°C, respectivamente (Fig. 6 e 7). A enzima livre apresentou ótima estabilidade até 70°C (1h). A naringinase imobilizada apresentou melhor estabilidade a 85°C, mantendo sua atividade acima de 85%, enquanto que a enzima livre nas mesmas condições perdeu 60 % de sua atividade (Fig. 8). O derivado estabilizado apresentou boa reusabilidade mantendo a taxa de hidrólise sem perda de atividade por até 10 ciclos consecutivos (Fig. 9). Estes resultados que demonstram que grafeno pode ser usado como suporte em processos de imobilização, pois apresentou uma excelente bio-compatibilidade com a enzima naringinase.

### CONCLUSÃO



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A naringinase ligada em GO reteve mais de 85% de sua atividade até 85°C apresentando alta afinidade pelo substrato quando comparado com a enzima livre. Do ponto de vista da complexidade do protocolo de imobilização e custos com reagentes, a adsorção física pode ser uma alternativa simples com alta retenção de atividade. O estudo confirma o sucesso da imobilização na obtenção de derivados estáveis e reutilizáveis, fatores importantes e atrativos para processos biotecnológicos industriais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* **72**: 248-254

Hermanová, S., M. Zarevúcká, *et al.* 2015. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. *Nanoscale*, v.7, p.5852.

Lei, S., Y. Xu, *et al.* 2011. Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit. *Applied Surface Science*, v.257, n.9, p.4096-4099.

Liu, Y., Q. Li, *et al.* 2014. Immobilisation of acid pectinase on graphene oxide nanosheets. *Chemical Papers*, v.68 (6), p.732-738.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.

Puri, M. e U. Banerjee. 2000. Production, purification, and characterization of the debittering enzyme naringinase. *Biotechnology Advances*, v.18, n.3, p.207-217.

Ribeiro, M. 2011. Naringinases: occurrence, characteristics, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* v.90, p.1883-1895.

Romero, C., A. Manjon, *et al.* 1985. A Method for Assaying the Rhamnosidase Activity of Naringinase. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, v.149, p.566-571.

Yadav, S., S. Yadava, *et al.* 2013. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Penicillium corylopholum* MTCC-2011. *Process Biochemistry*, v.48, n.9, p.1348-1354.

Zhang, Y., C. Wu, *et al.* 2013. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnol Rev*, v.2(1), p.27-45.