

OTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE α -AMILASES EM ARROZ BRANCO POLIDO

Stephanie Pinto, Giniani Dors, Melissa Oliveira, Eliana Badiale-Furlong

Introdução

O conhecimento das condições ideais de atuação das enzimas torna-se necessário para avaliação de seu efeito catalítico. Os parâmetros que afetam a determinação de atividade enzimática variam entre diferentes matérias-primas, assim como para diferentes enzimas (WHITAKER, 1994).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer as condições ótimas para determinação da atividade de α e β -amilases extraídas de arroz branco polido, empregando planejamentos fatoriais.

Metodologia

O arroz polido, fornecido pelo Instituto Riograndense do Arroz, foi moído em moinho de pás e sua granulometria padronizada entre 0,35 e 0,60 mm, através de agitação manual em peneiras.

O extrato enzimático, utilizado na determinação de ambas as enzimas, foi obtido a partir da homogeneização de 5 g de arroz polido em 50 mL de solução salina 0,5 % mediante agitação orbital a 30°C durante 1 h 30 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada e filtrada em banho de gelo. O extrato enzimático bruto foi utilizado para a medida da atividade da α e β -amilase, segundo metodologia descrita por BARAJ et al. (2008).

Para o estabelecimento das melhores condições de reação, foram aplicados planejamentos fatoriais 2^3 e 2^2 com pontos centrais para α -amilase e β -amilase, respectivamente. Para α -amilase as variáveis estudadas foram temperatura, 40 °C (-1) e 50 °C (+1), tempo, 5 min (-1) e 15 min (+1) e pH, 5 (-1) e 7 (+1). Para β -amilase as variáveis analisadas foram temperatura e tempo nos mesmos níveis estudados para α -amilase.

Para determinação da atividade da β -amilase foi adicionado ao extrato tampão ácido cítrico-fosfato de sódio e solução de amido 0,4%. A mistura foi submetida a equilíbrio térmico, sendo a concentração de amido remanescente determinada por iodometria. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 620nm. Uma unidade de

atividade dextrinizante(UD) foi definida como a capacidade da enzima hidrolisar 1 µg de amido por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático.

A determinação da atividade da α -amilase consistiu em adicionar ao extrato enzimático amido 0,4%, submetendo a mistura a equilíbrio térmico. A medida do poder redutor da solução de amido através da hidrólise enzimática foi realizada utilizando ácido 3,5-dinitrossalicílico. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 546nm, e a quantidade de açúcar redutor quantificada a partir de curva de calibração de maltose. Uma unidade de atividade sacarificante (US) foi definida como a capacidade da enzima hidrolisar 1µg de maltose por minuto por miligrama de proteína solúvel contida no extrato.

Resultados e Discussão

O planejamento de α -amilase apresentou respostas que variam de 4,25 UD, quando as condições utilizadas foram 40°C, pH 5 e 5 minutos de reação, à 27,79 UD, quando foram 60°C, pH 5 e 5 minutos de reação.

Nas condições estudadas observou-se, a nível de 95% de confiança, que a variável temperatura, bem como as interações entre as variáveis temperatura e pH, temperatura e tempo e as três juntas foram significativas. Todas as interações e a variável temperatura tiveram efeito negativo, indicando que os menores valores das variáveis seriam as ideais para se obter maiores atividades enzimáticas, exceto a interação entre as três variáveis que teve influência positiva e significativa.

As melhores condições para determinação de α -amilase em arroz branco polido são temperatura de 40°C, pH 6 e tempo de 5 minutos de reação, e neste caso foram encontradas atividades de 24,68 e 33,36 UD, respectivamente, em arroz tratado e não tratado com pesticidas.

O planejamento de β -amilase apresentou respostas que variaram de 64,00 US, quando as condições utilizadas foram 60°C e 5 minutos de reação, à 15,73 US, quando as condições foram 50°C e 10 minutos de reação.

Observou-se que a variável temperatura foi significativa, a 95 % de confiança, tendo efeito positivo, indicando que os maiores valores das variáveis seriam as ideais para se obter maiores atividades enzimáticas.

As melhores condições para determinação de β -amilase em arroz são temperatura de 60°C e tempo de 10 minutos de reação. Estas condições estão sendo aplicadas na determinação de atividade α -amilase em arroz branco polido tratado e não tratado com pesticidas.

Referências Bibliográficas

WHITAKER, J.R. Principles of Enzymology for the Food Science, Marcel Dekker, 2ed, NY, 1994

BARAJ, E.; GARDA-BUFFON, J. BADIALE-FURLONG, E. Effect of Deoxynivalenol and T-
e Toxin in Malt Amylase Activity. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2008.