

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UREASE DE SOJA

Vagna Aparecida Pereira Freire¹, Joana Maria Leite de Souza¹, Daniel Rutz¹, Walter Augusto Ruiz², Ricardo Peraça Toralles³, Wladimir Padilha da Silva⁴

¹Programa de Pós graduação em de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, s/n, CEP 96010-900, caixa postal 354, Pelotas, RS, vagnafreire@gmail.com; ²Prof. Dr. Universidade Federal de Rio Grande – FURG; ³Prof. Dr. Instituto Federal Sul Rio Grandense – IFSul; ⁴Prof. Dr. Universidade Federal de Pelotas - UFPel

Resumo: A determinação da atividade ureásica da soja é importante porque se constitui um teste simples e rápido na avaliação da eficiência do processamento desta leguminosa, devido a que a urease apresenta resistência térmica semelhante aos fatores antinutricionais presentes nos grãos de soja. No seguinte trabalho foram analisadas as seguintes características das proteínas de soja: análise quantitativa e qualitativa da proteína, teste qualitativo da atividade enzimática, determinação qualitativa da inativação enzimática por metais pesados.

Palavras-chave: Urease, soja, extração

Introdução: As ureases (uréia amidoidrolase, EC 3.5.1.5) são metalo-enzimas dependentes de níquel (DIXON et al., 1975) que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia. Em meio aquoso a hidrólise da uréia é favorecida em pH da neutralidade, nesse meio a formação de carbonato de amônio indica o grau de avanço da reação. Para a identificação de sub-processamento ou nenhum processamento térmico é empregado o teste da atividade da enzima urease, que está presente no farelo de soja e que, segundo alguns autores, é desnaturada com uma intensidade similar a da proteína anti-tripsínica de Kunitz, que é aquela que realmente causa inibição de crescimentos em alguns animais por sua ação negativa sobre a enzima pancreática tripsina, indispensável para a digestão das proteínas que chegam ao lúmen intestinal dos animais. O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor meio para a extração da Urease da soja, demonstrar a sua natureza protéica, determinar quantitativamente sua concentração, fazer a caracterização bioquímica qualitativa e quantitativa da enzima e determinar a atividade enzimática, usando método oficial.

Materiais e Métodos: Foram utilizados Grãos de soja obtidos em comércio local de Pelotas, RS, os quais foram deixados de molho em água para serem hidratados overnight e a partir daí foi realizada a extração da proteína. Para determinação quantitativa da proteína, preparou-se uma curva-padrão com a Albumina de Soro Bovina (BSA) na faixa de concentração de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 mg. A cada alíquota de 1,0 mL de cada solução padrão adicionou-se 1,0 mL de água e 3,0 ml do reagente de Biureto. Em seguida, efetuaram-se as leituras de %T (Transmitância) a 540 nm e a partir dos valores encontrados, construiu-se a curva-padrão onde estabeleceu a relação entre A (Absorbância) vs. C (Concentração). Para determinação qualitativa da proteína da soja, pipetou-se 0,5 mL de extrato de soja em um tubo de ensaio, em seguida, adicionou-se 1,5 mL de água destilada e 1,0mL de HNO₃ p.a, deixando-se em repousar por 10 minutos até a turvação do meio. Tal teste foi comparado com um branco de glicerol 50%. Para o teste qualitativo da atividade enzimática, em um tubo de ensaio adicionou-se 0,2 mL de extrato de soja, 0,8 mL de água, 3,0 mL de tampão fosfato 0,001 M (pH 7,0 com uréia) e 0,2 ml do indicador de vermelho de fenol, levando-se em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Observou-se a mudança de coloração e comparou-se com branco de tampão fosfato sem uréia 0,001 M pH 7,0, 0,2 mL de extrato, 0,8 ml de água, 0,2 mL de indicador, 37°C por 5 min. Para determinação qualitativa da inativação pelo calor, ferveu-se 5 mL do extrato de soja por 5 minutos, onde uma alíquota de 0,2 mL desta foi adicionada 0,8 mL de água mais 3,0 mL tampão com uréia, seguido de agitação vagarosa. Logo após, adicionou-se 0,2 ml do indicador vermelho de fenol, e levou-se em banho-maria 37°C por 5 min. O resultado da coloração foi comparado com o branco de tampão fosfato sem uréia. Para determinação qualitativa da inativação enzimática por metais pesados, retirou-se 0,5 mL do extrato de proteína, adicionando-se 1,5 mL de água, 3 gotas de Cl₂Hg, 3,0 mL do tampão fosfato pH 7,0 0,001 M com uréia e 0,2 mL do indicador vermelho de fenol, procedendo-se a agitando-se vagarosa e logo levou-se em banho-maria a 37° C por 5 min. Comparou-se a cor com branco de extrato e tampão sem uréia.

Resultados e Discussão: A partir da equação da regressão obtida a partir da curva analítica padrão com BSA foi determinada a concentração de proteínas em tampão fosfato 0,001 M pH 7,0 como tendo 17,70 mg.mL⁻¹; em água, 12,02 mg.mL⁻¹; em

glicerol 50%, 4,88 mg.mL⁻¹ e em glicerol 60%, 4,27 mg.mL⁻¹. O teste qualitativo da atividade enzimática revelou que quando em presença do seu substrato (uréia), a urease degradava-o produzindo amônia e conseqüentemente elevando o pH, tornado-o básico. Isso pôde ser observado quando colocava-se o indicador vermelho de fenol, tornando a solução rósea intenso. Já na amostra padrão sem uréia, a falta deste substrato impossibilitou a ação da urease, conseqüentemente o pH foi mantido na neutralidade, ficando com a coloração alaranjada na presença do indicador vermelho de fenol. No teste qualitativo de inativação pelo calor, verificou-se a desnaturação das proteínas do extrato de soja, já que são termolábeis e quando submetidas à ação do calor desnaturam-se irreversivelmente. Tal fato pôde ser observado através da turvação do meio. Com relação ao teste qualitativo da inativação enzimática por metais pesados, observou-se a precipitação das proteínas ao entrarem em contato com o reagente contendo metal pesado.

Conclusão: De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que o melhor meio para a extração da Urease da soja foi o de reagente Biureto com água, uma vez que a concentração de proteínas foi de 17,70 mg.mL⁻¹. E que a enzima urease sofreu desnaturação devido a utilização do HNO₃, turvando o meio onde se encontrava. Também mostrou ser uma enzima termolábel, uma vez que desnaturou-se quando submetida ao calor, do mesmo modo, sofreu precipitação quando em presença de metais pesado, como mercúrio

Referências

DIXON, N. E., GAZZOLA, C., WATTERS, J. J., BLAKELEY, R. L., and ZERNER, B. (1975). Inhibition of jack bean urease (EC 3.5.1.5) by acetohydroxamic acid and by phosphoramidate. An equivalent weight for urease. J.Amer.Chem.Soc. 97, 4130-4131.