

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE IMOBILIZADA EM SUPORTES PRODUZIDOS A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

TAISSA Y. M. SAITO¹, DEBORA A. HIGUCHI², VANESSA A. SOARES³

¹ Graduando em Tecnologia de Processos Químicos, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Suzano, taissaysaito@gmail.com

² Professora EBTT, Doutora em Biotecnologia, IFSP, Câmpus Suzano, da.higuchi@ifsp.edu.br

³ Professora EBTT, Doutora em Biotecnologia, IFSP, Câmpus Suzano, soavan@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.00.00-2 Bioquímica

Apresentado no
8º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
06 a 09 de novembro de 2017 - Cubatão-SP, Brasil

RESUMO: Muitos processos industriais podem ser catalisados por enzimas. Essas moléculas são capazes de acelerar processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, além de necessitar em seu meio reacional condições suaves de temperatura e pH, desta forma, gerando economia de recursos hídricos, energéticos e redução de efluentes nos processos industriais. O desenvolvimento de tecnologia para imobilização enzimática possibilita a estabilidade dessas moléculas e a reutilização das mesmas. A celulose é um abundante recurso orgânico renovável com reconhecidas propriedades para diversas aplicações, e pode ser convenientemente funcionalizada como suporte estável para imobilização. Pretende-se, neste projeto, caracterizar os sistemas de imobilização enzimática produzidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar, através da atividade da enzima amilase. As atividades enzimáticas foram analisadas por espectrofotometria, o substrato utilizado para atividade amiolítica foi amido 0,5% m/v e a quantificação dos açúcares livres reduzidos foi realizada utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) com leitura de absorbância em 540nm. As atividades enzimáticas das enzimas imobilizadas foram comparadas às atividades enzimáticas das enzimas livres, verificando a eficiência catalítica da enzima nos suportes produzidos já em laboratório. Espera-se que este estudo contribua com os estudos de caracterização de suportes de imobilização enzimática de baixo custo para usos industriais.

PALAVRAS-CHAVE: imobilização enzimática; cana-de-açúcar; enzimas; amilase.

ENZYMATIC ACTIVITY OF AMILASE IMMOBILIZED IN SUPPORTS PRODUCED FROM THE SUGARCANE BAGASSE

ABSTRACT: Many industrial processes can be catalyzed by enzymes. These molecules are capable of accelerating chemical processes with great advantages over chemical catalysts, in addition to require a mild temperature and pH conditions in their reaction medium, thus saving water resources and energy and reducing effluent in industrial processes. The development of technology for enzymatic immobilization allows the stability of these molecules and their reuse. Cellulose is an abundant renewable organic resource with recognized properties for various applications, and can be conveniently functionalized as a stable support for immobilization. In this project, we intend to characterize the enzymatic immobilization systems produced from the sugarcane bagasse, through the activity of the amylase enzyme. The enzymatic activities were analyzed by spectrophotometry, the substrate used for amiolytic activity was starch 0.5% w/v and the quantification of free reducing sugars was performed using dinitrosalicylic acid (DNS) with absorbance reading at 540nm. The enzymatic activities of the immobilized enzymes were compared to the enzymatic activities of the free enzymes, verifying the catalytic efficiency of the enzyme in the substrates already produced in the laboratory. It is hoped that this study will contribute to the characterization studies of substrates of enzymatic immobilization of low cost for industrial uses.

KEYWORDS: enzymatic immobilization; sugarcane; enzymes; amylase.

INTRODUÇÃO

A biocatálise é um processo catalítico muito interessante do ponto de vista industrial, sendo um método alternativo à catálise química. As enzimas geralmente possuem poder catalítico muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH (NELSON; COX, 2011).

Porém, a principal desvantagem do uso de enzimas como biocatalisadores é o alto custo das enzimas e a baixa taxa de recuperação dessas enzimas do meio reacional. A imobilização de enzimas tem se mostrado uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade, apresentando diversas vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, como: aumento do tempo de estabilidade da enzima em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH; reutilização; fácil separação da enzima dos produtos da reação (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

Muitos métodos para a imobilização de enzimas têm sido descritos em patentes e publicações, relativamente poucos processos que empregam enzimas imobilizadas têm sido comercializadas com sucesso. Os custos adicionais associados com a imobilização de enzimas muitas vezes não se justificam (MATOS, 2014). Neste trabalho estuda-se a possibilidade de imobilização de uma amilase produzida por *Aspergillus oryzae*, através do desenvolvimento de um suporte de imobilização enzimática de baixo custo produzido a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do bagaço de cana:

O preparo do bagaço de cana (BC) foi realizado conforme indicado por SANTOS (2010). O BC bruto foi lavado com água corrente por 6 h para a remoção de impurezas. Em seguida, acrescentou-se uma solução de NaOH 2 M para que houvesse a degradação da lignina presente nas fibras celulósicas do bagaço, deixando-as nessa solução por 24 h sob agitação. Após esse período, lavou-se exaustivamente as fibras do bagaço, com água corrente, até que apresentassem um pH próximo do neutro. Posteriormente, acondicionou-se o BC lavado em béqueres de 600 mL e realizou-se a secagem das fibras em estufa a 140 °C. Após secagem, o bagaço foi triturado em um moinho, cedido pela empresa Clariant, obtendo-se assim um material particulado, aumentando consideravelmente sua superfície de contato. Por fim, submergiu-se essas partículas, novamente, em solução NaOH (2 M), para uma segunda extração de lignina, por mais 24 h. Após realizar a lavagem até o pH neutro, secou-se as fibras à vácuo e acondicionou as mesmas em tubos falcon, para uso nos procedimentos de imobilização.

Produção dos Suportes

Foram construídos 3 tipos de suporte: de imobilização por aprisionamento, por ligação covalente e pela combinação desses dois sistemas. Para o aprisionamento foi utilizado a acrilamida. Em um tubo eppendorf, pesou-se 0,0045g de amilase e adicionou-se 500 uL de gel acrilamida (12,5%) e aplicou-se 8,5 µl de TEMED. Rapidamente transferiu-se o material para um suporte plástico com papel Parafilm para facilitar sua posterior remoção. Para o controle foi feito o mesmo procedimento sem a adição da amilase. Para o suporte de imobilização por ligação covalente utilizou-se o BC e sua produção foi realizada conforme indicado por GUIÁN (2010) a pH 10,0. Finalmente, para a imobilização por aprisionamento e ligação covalente utilizando acrilamida e BC, procedeu-se da mesma forma que na imobilização por aprisionamento, mas no lugar da amilase, foram usados 50 mg do suporte por ligação covalente.

Atividade Amilolítica

Foi adicionada solução de amido (0,5% em m/v) ao tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5) contendo a amostra enzimática, na proporção 1:1 (v/v). A mistura foi incubada a 50 °C por aproximadamente 30 min. Após este tempo, 750 µL ou metade do volume total da solução que foi incubada (o que for menor) da mistura de reação foram coletadas e analisadas pelo método de DNS.

Para cada atividade foram analisadas, em duplicata, a enzima livre, a enzima imobilizada no suporte e o suporte controle (sem a enzima). Para a quantificação de açúcares redutores (AR) liberados após a reação, utilizou-se o método colorimétrico de DNS descrito por MILLER (1959).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A unidade amiolítica foi definida como sendo o número de μmols de AR formados por minuto, sob as condições do teste. A enzima livre apresentou atividade de 0,20 U e atividade específica de 0,059 U/mg de amilase. Já os três sistemas de imobilização tratados neste trabalho não apresentaram nenhuma atividade enzimática, sendo que suas absorvâncias lidas no espectrofotômetro foram equivalentes às absorvâncias de seus respectivos controles, demonstrando nenhuma formação de AR e, portanto, nenhuma degradação de amido pela amilase suportada nos três processos de imobilização.

TAVANO (2006) destaca um fator decisivo neste resultado, em seu trabalho a α -amilase de *Aspergillus oryzae* mostrou-se pouco estável, em especial nos meios alcalinos, onde se observou uma perda de mais de 90% de sua atividade quando esta foi incubada a pH 10,0, por 3 h. Esta baixa estabilidade da α -amilase refletiu negativamente em suas possibilidades de imobilização, uma vez que não se apresentava capaz de suportar processos longos de incubação em soluções de altos valores de pH, como é necessário para a imobilização em glicil-agarose descrita no trabalho de GUIÁN (2010) que ocorre em pH 10,0.

CONCLUSÕES

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de suportes enzimáticos no uso industrial das enzimas, como possibilidade de reutilização e maior estabilidade, procurou-se produzir suportes de baixo custo eficazes na imobilização da α -amilase. Os resultados parciais demonstraram a total perda da atividade amilolítica nos três métodos de imobilização utilizados, seja por aprisionamento com acrilamida, seja por ligação covalente com o bagaço de cana, corroborando os resultados já descritos na literatura. No entanto, necessita-se de um estudo mais aprofundado, para investigar as causas da inibição da atividade da amilase, nos suportes aqui trabalhados.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao IFSP, pela estrutura cedida e pelo investimento no projeto através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v.32, n.1, p.175-187, 2009.
- GUIÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 10, p. 375-382, 1988.
- NELSON, D. L.; COX M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- MATOS, L. J. B. L. de. Imobilização da lipase tipo B de *Candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.
- SANTOS, A. F. dos. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- TAVANO, O. L. Imobilização de amilase de *Neurospora crassa* (mutante *exo-1*) e produção de derivados ativos estabilizados. 2006. 89 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.