

## **Testes Preliminares com Bagaço de Cana-de-açúcar para Imobilização de beta-glicosidase de Cotelédones de Soja**

**Amanda Aleixo Moreira<sup>1</sup>, Maria Fernanda Ferreira Lima de Mauro<sup>1</sup>, Ana Camila Vaitkevicius Ferreira<sup>1</sup>, Ellen Cristine Duarte Garcia<sup>1</sup>, Mara Lúcia Luiz Ribeiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia- Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr - E-mail: amanda\_a\_moreira@yahoo.com.br/maraluciaribeiro@uel.br

### **RESUMO**

*A imobilização de enzimas é uma alternativa para sua reutilização e redução de custos em processos industriais. O bagaço de cana-de-açúcar pode ser um suporte viável, pois é atóxico e tem baixo custo. A beta-glicosidase hidrolisa ligações beta-glicosídicas e pode ser aplicada em vários setores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamentos químicos e térmico para imobilização de beta-glicosidase de soja. O bagaço foi tratado com NaOH, etanol 70%, calor úmido a 121 °C por 15 min e ativação com glutaraldeído 2,5%. A beta-glicosidase de soja foi obtida por ultrafiltração em membranas de 100 e 10 kDa. Os maiores rendimentos de imobilização da beta-glicosidase (68,3%) foram obtidos utilizando bagaço ativado com glutaraldeído e quando esta ativação foi precedida pelos tratamentos com NaOH e autoclavagem (76,1%). As médias de proteína e enzima imobilizada obtidas pelos tratamentos do bagaço não diferiram significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).*

**Palavras-chave:** Imobilização,  $\beta$ -glicosidase, soja, bagaço de cana-de-açúcar.

### **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, a utilização de enzimas na indústria cresceu devido às vantagens frente aos catalisadores químicos, tais como elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de temperatura e pressão<sup>1</sup>. A beta-glicosidase (beta-D-glicosídeo-glicohidrolase, EC 3.2.1.21) pertence a um grupo de hidrolases capazes de clivar as ligações beta-glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, ou outros conjugados glicosídicos. Esta enzima, amplamente distribuída na natureza, tem papel fundamental em muitos processos biológicos como a degradação de biomassa celulósica, hidrólise de glicolípídeos, cianogênese e modificação de metabólitos secundários, como as isoflavonas<sup>2</sup>.

Entretanto, a dificuldade de recuperação da forma solúvel da enzima do meio reacional para posterior aplicação e o alto custo são desvantagens do emprego de enzimas<sup>3</sup>. A fim de se contornar essas desvantagens, a imobilização de enzimas em suportes sólidos insolúveis com retenção de sua atividade catalítica é uma estratégia pesquisada para tornar essas biomoléculas

atrativas do ponto de vista industrial<sup>4</sup>. Além disso, estudos indicam que resíduos agroindustriais como o bagaço de cana-de-açúcar podem ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas e representam um importante recurso, devido preocupação com as questões ambientais e por apresentar redução de custos do processo<sup>4,5</sup>. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o bagaço de cana submetido a tratamentos químicos e térmico para imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para o tratamento do bagaço de cana foi realizado um planejamento experimental inteiramente casualizado com as variáveis bagaço de cana (X1), bagaço de cana ativado com glutaraldeído (X2), bagaço de cana tratado com NaOH e autoclavado (X3), bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído (X4), bagaço de cana tratado com etanol 70% e autoclavado (X5), bagaço de cana tratado com etano 70%, autoclavado e ativado com glutaraldeído (X6) em três repetições, totalizando 18 experimentos realizados aleatoriamente. Inicialmente, bagaço de cana foi lavado com água a 60 °C e enxaguado exaustivamente com água destilada a temperatura ambiente para retirada de açúcares. O tratamento alcalino do bagaço de cana foi realizado com NaOH 0,5 M (1 g : 40 mL) com agitação de 120 rpm por 24 h. Para o tratamento alcoólico do bagaço foi utilizado etanol 70% (1 g : 40 mL). A ativação dos bagaços foi realizada com glutaraldeído 2,5% a 25 °C por 30 min a 70 rpm. A beta-glicosidase de farinha de cotilédones de soja foi extraída com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,6, conforme Matsuura e Obata<sup>6</sup> e purificada parcialmente por ultrafiltração em membranas de 100 kDa e 10 kDa obtendo o extrato contendo enzima livre (EEL). Assim, para a imobilização da beta-glicosidase de soja, em 1 g de suporte tratado foram adicionados 2,8 mg mL<sup>-1</sup> de proteína e 4,35 UA x10<sup>-3</sup> mL<sup>-1</sup> do EEL em tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7. O sistema foi mantido a 4 °C e 70 rpm durante 6 h. A atividade de beta-glicosidase foi determinada utilizando o substrato sintético p-nitrofenil-beta-D-glicopiranosídeo (p-NPG) conforme descrito por Matsuura e Obata<sup>6</sup> e o teor de proteínas solúveis, segundo Lowry et al.<sup>7</sup>, com padrão de albumina de soro bovino. O rendimento de imobilização (%) foi expresso como (atividade da enzima imobilizada/atividade da enzima livre) × 100 (Y). A análise de variância (ANOVA) e teste de tukey (p≤0,05) dos resultados foram avaliados no programa Estatística 7.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os rendimentos de imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químicos e térmico variaram de 48,5% a 76,1% (Tabela 1). Os melhores resultados foram observados na imobilização da enzima no bagaço de cana ativado com glutaraldeído (X2) e bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído (X4) e não diferiram significativamente entre si (p≥0,05). Estes foram 1,41 e 1,57 vezes superior ao bagaço não tratado (X1). Até o momento, não há dados sobre a imobilização de beta-glicosidase de soja em bagaço de cana. Entretanto, Santos<sup>8</sup> imobilizou invertase comercial em bagaço tratado com etanol 70%, NaOH e ativação com glutaraldeído e obteve



75% de rendimento de imobilização. Para a invertase purificada extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, o rendimento foi de 100%, nas mesmas condições.

**Tabela 1-** Rendimento de imobilização de beta-glicosidase de cotilédones de soja em bagaços de cana submetidos a tratamentos químicos e térmico.

<b>Tratamentos*</b>	<b>Proteína Imobilizada (mg)</b>	<b>**UA Imobilizada (<math>\times 10^{-3}</math>)</b>	<b>***AE (<math>\times 10^{-3}</math>)</b>	<b>Rendimento Imobilização (%)</b>
X1	0,87 <sub>D</sub>	2,11 <sub>C</sub>	2,43	48,5
X2	1,44 <sub>A</sub>	2,97 <sub>AB</sub>	2,06	68,3
X3	0,93 <sub>D</sub>	2,60 <sub>BC</sub>	2,80	59,8
X4	1,24 <sub>B</sub>	3,31 <sub>A</sub>	2,66	76,1
X5	0,97 <sub>CD</sub>	2,14 <sub>C</sub>	2,20	49,2
X6	1,13 <sub>BC</sub>	2,53 <sub>BC</sub>	2,23	58,2

Extrato contendo Enzima Livre: 2,8 mg mL<sup>-1</sup> proteína; 4,35  $\times 10^{-3}$ UA mL<sup>-1</sup> e 1,55  $\times 10^{-3}$  AE.

CV= 6,14% e teste de Tukey 5% com média de proteína imobilizada e UA imobilizada, seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si na mesma coluna ( $p \geq 0,05$ ).

\*X1: bagaço de cana, (X2): bagaço de cana ativado com glutaraldeído, (X3): bagaço de cana tratado com NaOH e autoclavado, (X4): bagaço de cana tratado com NaOH, autoclavado e ativado com glutaraldeído, (X5), bagaço de cana tratado com etanol 70% e autoclavado (X6) bagaço de cana tratado com etano 70%, autoclavado e ativado com glutaraldeído em três repetições. Autoclavagem: 15 min a 121°C.

\*\*UA =  $\mu$ mol de p-nitrofenol liberado por minuto de reação nas condições do ensaio.

\*\*\*AE = Atividade Específica (UA/mg de proteínas).

O bagaço de cana submetido a tratamento alcalino seguido de térmico apresentou um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) no rendimento de imobilização da enzima. Pires et al.<sup>12</sup> e Zimmermann et al.<sup>13</sup> observaram redução de lignina e hemicelulose em bagaço de cana e fibra de bananeira tratados com NaOH. Assim, o tratamento alcalino (NaOH) do bagaço pode ser utilizado para purificação parcial da celulose, promovendo maior interação da enzima com o suporte e aumentando o rendimento de imobilização. Entretanto, o tratamento alcoólico do bagaço de cana (X5) não foi eficiente, sendo que não diferiu significativamente ( $p \geq 0,05$ ) do bagaço não tratado (X1). Possivelmente, este tratamento não alterou de forma suficiente a estrutura do bagaço para promover maior interação entre enzima, glutaraldeído e suporte.

A ativação dos suportes com glutaraldeído (X2, X4 e X6) aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o rendimento de imobilização da enzima em relação aos suportes não ativados (X1, X3 e X5). Na literatura há relatos do aumento do rendimento de imobilização de diferentes enzimas em suportes ativados com glutaraldeído<sup>9,10,11</sup>. Portanto, o glutaraldeído pode ser fator importante para aumentar o rendimento de imobilização da beta-glicosidase em bagaço de cana.

As atividades específicas da enzima imobilizada nos bagaços de cana submetidos a diferentes tratamentos foram superiores a da enzima livre ( $1,55 \times 10^{-3}$ ), indicando que a imobilização de beta-glicosidase foi superior a de outras proteínas encontradas no EEL.

## CONCLUSÕES

Os tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar que resultaram em maior rendimento de imobilização de beta-glicosidase de soja foram o alcalino associado ao térmico, seguido de ativação do suporte tratado com glutaraldeído. O tratamento alcoólico do bagaço de cana não foi efetivo para aumento de rendimento de imobilização da enzima.

## REFERÊNCIAS

- (1) HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251. 2006.
- (2) ESEN, A. **beta-glucosidase**. In: Handbook of Food Enzymology. Marcel Dekker Inc., 2003.
- (3) GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guisan JM editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa. p. 1-13. 2006.
- (4) LOPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J.M.; FERÁNDEZ-LAFUENTE R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2005.
- (5) GUISÁN, J.M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA.; FERNÁNDZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. In: BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, c. 30, p. 261-275, 1997.
- (6) MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- (7) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- (8) SANTOS, A. F. **Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho– UNESP. Araraquara, 2010.
- (9) ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, J.; LI, L.; YU, C.; HEI, T. Surface derivatization with spacer molecules on glutaraldehyde-activated amino-microplates for covalent immobilization of  $\beta$ -glucosidase. **Applied Surface Science**, n. 57, p. 2712-2716, 2011.
- (10) SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization and characterization of tannase and its haze-removing. **Food Science and Technology International**, v. 15, p. 545- 552, 2009.
- (11) RESHMI, R.; SUGUNAN, S. Improved biochemical characteristics of crosslinked  $\beta$ -glucosidase on nanoporous silica foams. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, n. 86, p. 111-118, 2013.
- (12) PIRES, A. J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. G. P.; SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 953-957, 2006.
- (13) ZIMMERMANN, M. V. G.; TURELLA, T. C. ZATTERA, A. J. SANTANA, R. M. C. Influência do Tratamento Químico da Fibra de Bananeira em Compósitos de Poli (etileno-co-acetato de vinila) com e sem Agente de Expansão. **Polímeros, Ciência e Tecnologia**, 2013.