

Aplicação de Bucha Vegetal (*Luffa Cylindrica*) como Suporte para Produção de Xarope de Açúcar Invertido

Application of Loofa Sponge (*Luffa cylindrica*) as Carrier for Invertase Immobilization for Invert Sugar Syrup Production

Evandro Cesar Poças¹.; João Batista Buzato²; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi³; Doumit Camilios Neto⁴

Resumo

No presente trabalho, procedeu-se à imobilização de invertase em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) para produção de xarope de açúcar invertido. A imobilização consistiu de tratamento da bucha com NaIO₄ seguido do uso de composto diamino, glutaraldeído e posterior imobilização da enzima. Os melhores resultados foram: atividade de invertase imobilizada: 4,510 (mmols/g de suporte x min x mL); rendimento de imobilização: 0,428 %, atividade recuperada: 1,5% e extensão de hidrólise da sacarose de 2,6x10⁻³%·h⁻¹.

Palavras-chave: Imobilização. Invertase. *Luffa Cylindrica*.

Abstract

Invertase immobilization in loofa sponge (*Luffa cylindrica*) for invert sugar syrup production has been carried out. Loofa sponge was treated with NaIO₄ followed by the use of diamine compound, glutaraldehyde and enzyme immobilization. The best results obtained were: invertase immobilized activity: 4.510 (mmols/g matrix x min x mL); enzyme coupling efficiency: 0.428%, recovered activity: 1.5% and the extent of hydrolysis was of 2.6x10⁻³%·h⁻¹.

Key words: Immobilization. Invertase. *Luffa Cylindrica*.

¹ Graduando em química - Universidade Estadual de Londrina

² Docente do Dep. Bioquímica e Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina. - Email: buzato@uel.br

³ Docente do Dep. Bioquímica e Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina

⁴ Mestrando em Biotecnologia - Universidade Estadual de Londrina

Introdução

Nos últimos anos, o estudo da imobilização de enzimas tem focado diversos aspectos, tanto nos suportes usados como o fundamento do método da imobilização. Entretanto muito dos materiais utilizados em imobilização são sintéticos e não-biodegradáveis, o que causa problemas no meio ambiente após sua utilização. Outros, por sua vez, são tóxicos ou mesmo conferindo ao produto propriedades indesejáveis tais como cor, sabor e aroma, o que os tornam inapropriados para imobilização principalmente na indústria de alimentos (GEMEINER; STEFUCA; BALES, 1993; OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996). Existe, assim, a necessidade da busca de materiais alternativos para serem usados como suporte. As qualidades esperadas dos materiais alternativos é que sejam renováveis, biodegradáveis, de baixo custo, bem como de fácil disponibilidade particularmente em países em desenvolvimento (OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996). Tem sido relatado o uso de diversos compostos de natureza celulósica que apresentam essas características. Entre eles citam-se o bagaço de cana, pedaços de madeira, pó-de-serra e casca de arroz (CHEUNG et al., 1986; CHOU; JASOVISKY, 1993).

A bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) é de crescimento fácil em nosso país. É leve, cilíndrica e apresenta naturalmente uma arquitetura entrelaçada e altamente porosa. Essas características conferem a esse material um potencial de uso como suporte em imobilização (OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996).

O Paraná é o segundo maior produtor de açúcar e álcool e na região de Londrina estão localizadas diversas usinas de açúcar e álcool.

Sendo assim, essa grande produção de cana-de-açúcar representa um desafio para utilização do açúcar, caldo e melão de cana-de-açúcar como matéria prima na produção de compostos de valor agregado mais elevado que o açúcar e o etanol.

O termo xarope de açúcar invertido descreve uma mistura de açúcares em solução, principalmente glicose, frutose e sacarose obtida através da reação de hidrólise da sacarose, também denominada inversão (CHOU; JASOVISKY, 1993). Para a produção do açúcar invertido, dois métodos podem ser usados: a hidrólise enzimática, catalisada pela enzima invertase e a hidrólise ácida, catalisada por um ácido. Entretanto, na hidrólise ácida ocorre a formação de produtos secundários, os quais devem ser removidos. Embora a invertase seja uma enzima de custo relativamente baixo, sua utilização na forma livre em sistema de batelada reduz a eficiência do processo. Sendo assim, o desenvolvimento de uma tecnologia de invertase imobilizada oferece uma alternativa de reutilização da enzima e para baratear o processo (GEMEINER; STEFUCA; BALES, 1993). Dessa maneira, o desenvolvimento de uma tecnologia de invertase imobilizada oferece uma alternativa para um sistema contínuo de hidrólise da sacarose no qual possibilita a reutilização da enzima.

Materiais e Métodos

Aminoácido: Solução composta de 0,1g/mL de lisina, asparagina, histidina, arginina, glutamina e ornitina dissolvidos em tampão citrato-fosfato (0,1 M).

Solução bloqueadora: A solução bloqueadora foi preparada numa concentração de 2,5mg de aminoácidos (triptofano, leucina, glicina, arginina e ác. aspártico) / mL dissolvidos em tampão citrato-fosfato (0,1 M).

Invertase: A enzima invertase (²-frutofuranosidase; E.C. 3.2.1.26) de *S. cerevisiae*, gentilmente cedida pela Novo Nordisk Bioindustrial Ltda, foi utilizada na concentração de 220mg% de proteínas, em tampão citrato-fosfato (0,1 M).

Polietilenoimina (PEI): Solução de Polietilenoimina 1%(v/v) tamponada em citrato-fosfato pH 7,0.

Atividade enzimática: Foi determinada na solução de enzima livre inicial, na solução de pós-imobilização, na água de lavagem com tampão

citrato-fosfato e na enzima imobilizada. Transferiu-se 1 mL de solução de invertase ou três pedaços de bucha com a invertase imobilizada para 25mL de sacarose 1% (P/V) em tampão citrato-fosfato, temperatura de 37°C. Decorrido o tempo de hidrólise (1 a 5 minutos), o açúcar redutor formado foi determinado pelo método de Somogy e Nelson (NELSON, 1944). As unidades para atividade de invertase livre e imobilizada são respectivamente $\mu\text{mols/mL} \times \text{min.}$ e $\text{mmols/g de suporte} \times \text{min} \times \text{mL}$. Para calcular a atividade enzimática de invertase livre, pós-imobilização e da água de lavagem com tampão citrato-fosfato, utilizou-se a seguinte fórmula: Absorvância x (1/ inclinação da curva de calibração) x (1/ volume Enzima) x (1/ volume hidrolisado) x (1/ tempo de reação) x diluição. A unidade desta fórmula é dada como: $\mu\text{mols/mL} \times \text{min.}$ Para calcular a atividade enzimática de invertase imobilizada utilizou-se a seguinte fórmula: Absorvância x (1/inclinação da curva de calibração) x (1/g de suporte) x (1/volume hidrolisado) x (1/ tempo de reação) x diluição. A unidade desta fórmula é dada como: $\mu\text{mols/g de suporte} \times \text{min.}$

Rendimento de imobilização: para calcular o rendimento da imobilização (%), utilizou-se a seguinte fórmula: [Atividade enzimática da invertase imobilizada / Atividade enzimática livre x volume enzimático utilizado] x 100.

Atividade recuperada: para calcular a atividade recuperada (%) utilizou-se a seguinte fórmula: [Atividade enzimática imobilizada / absorvância enzimática livre x (1/g de suporte) x fator de diluição x (1/inclinação) x (1/tempo de reação)] x 100.

Extensão de hidrólise: para calcular a extensão de hidrólise (conversão de substrato em produto) utilizou-se a seguinte formula: [(quantidade de glicose no hidrolisado) / (quantidade teórica de glicose no substrato x tempo)] x 100%.

Procedimento padrão de Imobilização: Utilizaram-se três pedaços de bucha vegetal de 2cm² (0,08g cada pedaço) tratados com 150mL de NaIO₄ (20mM) tamponado, por 30 minutos na temperatura

de 4°C com agitação. Decantou-se o sobrenadante e lavaram-se as buchas com água destilada três vezes. A seguir, os pedaços de bucha foram embebidos em 150mL da solução de aminoácidos por 24 horas na temperatura ambiente com agitação. Decantou-se o sobrenadante e lavaram-se as buchas com água destilada três vezes. A seguir, os pedaços de bucha foram embebidos em 150mL de glutaraldeído (2,5% V/V) tamponado por 30 minutos na temperatura ambiente com agitação.

Decantou-se o sobrenadante e lavaram-se as buchas com água destilada três vezes. Em seguida, os pedaços de bucha foram embebidos em 150mL da solução de invertase tamponado por 24 horas na temperatura de 4°C com agitação. Decantou-se e reservou-se o sobrenadante. Em seguida, os pedaços de bucha foram embebidos em 150mL de tampão citrato-fosfato (0,1M) por alguns minutos. Decantou-se e reservou-se o sobrenadante. A seguir, lavaram-se os pedaços de bucha duas vezes com tampão citrato-fosfato. A seguir, os pedaços de bucha foram embebidos em solução bloqueadora por 2 horas na temperatura de 4°C com agitação. Decantou-se o sobrenadante e lavaram-se as buchas com tampão citrato-fosfato três vezes. Em seguida, os pedaços de bucha foram embebidos em 150mL de NaBH₄ (0,1M) por 30 minutos na temperatura ambiente com agitação. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se os pedaços de bucha três vezes com tampão citrato-fosfato. Em seguida, os pedaços de bucha foram lavados três vezes em 150mL de NaCl (1,0M) por alguns minutos na temperatura ambiente. A seguir, os pedaços foram embebidos em tampão até serem utilizados.

Seqüência dos procedimentos de imobilização:

- A) Bucha → NaIO₄ → Aminoácidos → Glutaraldeído → Invertase → Solução bloqueadora → NaBH₄ → NaCl
- B) Bucha → NaIO₄ → Aminoácidos → NaBH₄ → Glutaraldeído → NaBH₄ → Invertase → Solução Bloqueadora → NaBH₄ → NaCl
- C) Bucha → NaIO₄ → PEI ® NaBH₄ → Glutaraldeído → NaBH₄ → Invertase → Solução bloqueadora → NaBH₄ → NaCl

D) Bucha → NaIO₄ → Aminoácidos → NaBH₄ → Glutaraldeído → NaBH₄ → PEI → NaBH₄ → Glutaraldeído → NaBH₄ → Invertase → Solução bloqueadora → NaBH₄ → NaCl

Os procedimentos A e B foram conduzidos utilizando tampão citrato-fosfato pH 5 e 7, enquanto os procedimentos C e D foram conduzidos somente em pH 7.

Esses tampões também foram usados no procedimento B além de ter sido usado 3 vezes o NaBH₄ (após o uso de aminoácido, glutaraldeído e enzima). O procedimento C usou PEI no lugar de aminoácido e 3 vezes o NaBH₄. O procedimento D usou aminoácido, PEI e 5 vezes o NaBH₄ (após aminoácido, glutaraldeído, PEI, glutaraldeído e enzima).

Resultados e Discussão

Considerando-se a potencialidade da aplicação de enzimas imobilizadas particularmente na indústria de alimentos e a pouca exploração da utilização de materiais de baixo custo e isentos de toxidez, como suporte na imobilização, estamos propondo o uso da bucha vegetal. Em teoria, o tratamento da bucha

vegetal com periodato leva a oxidação dos carbonos adjacentes nas moléculas de glicose da celulose, que resulta na formação de grupos aldeídos. O uso de ativação de polissacarídios por meio do periodato não é novo e foi inicialmente usado na ativação de sephadex em preparações imunoabsorventes (WILSON; NAKANE, 1976). Em seguida, o aldeído reage com um composto diamino e cria-se assim, a Base de Schiff. Em seguida, é conduzido o tratamento com glutaraldeído onde ocorre a formação da segunda Base de Schiff, entre o grupamento amino livre do composto diamino e o glutaraldeído. Na última etapa, a bucha vegetal ativada é embebida na solução enzimática e uma terceira Base de Schiff é formada, entre o grupamento aldeído livre do glutaraldeído com algum grupamento amino livre da enzima. As Bases de Schiff criadas são estabilizadas pelo tratamento com NaBH₄. As Bases de Schiff são relativamente instáveis, especialmente em valores de pH baixos, mas podem ser estabilizadas pela redução com NaBH₄ (KENNEDY, 1990).

A invertase imobilizada na bucha vegetal foi usada para hidrolisar a sacarose e os resultados obtidos, nas diferentes seqüências (A, B, C e D) do procedimento de imobilização, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de atividade de invertase livre e imobilizada em *Luffa cylindrica*

	Tratamentos com NaBH ₄ tamponado		Atividade Livre	Atividade Imobilizada	Rendimento de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
	*	pH				
A	1	5,0	12,182	0,943	0,052	0,184
	1	7,0	6,743	2,168	0,219	0,772
B	3	5,0	10,97	0,818	0,050	0,179
	3	7,0	7,078	4,044	0,383	1,371
C	3	7,0	7,139	2,912	0,274	0,979
D	5	7,0	7,075	4,510	0,428	1,530

*Número de vezes

A celulose é disponível em diversas formas físicas e em processos industriais é possível o uso de celulose menos pura: corda, polpa, bagaço, tecido ou papel. Em imobilização da invertase, o material celulósico mais rústico usado como suporte, foi o pulverizado de sabugo de milho em processo de fluxo contínuo de inversão da sacarose (MONSAN; COMBES, 1984).

No presente trabalho, a metodologia foi testada com variações. Os resultados do Procedimento A, por meio do qual foram testados valores de pHs 5,0 e 7,0 mostraram que a hidrólise da sacarose foi maior em pH 7,0. Broggi et al. (2002) imobilizaram invertase utilizando a presente metodologia, contudo o tampão usado foi acetato e somente em pH 5. Esses autores obtiveram valores inferiores: 0,18 (mmols/g de suporte x min x mL) de atividade enzimática imobilizada embora o rendimento de imobilização foi maior: 3,64(%). Os resultados do presente trabalho demonstram que a utilização do tampão citrato-fosfato desfavoreceu o rendimento de imobilização, porém a quantidade de enzima imobilizada apresentou uma maior atividade enzimática. Poças, Buzato e Celligol (2004) utilizaram albumina bovina no lugar de aminoácidos e em pHs 5 e 7. O valor obtido foi de 3,63 (mmols/g de suporte x min x mL) de atividade imobilizada e não houve preferência em relação aos valores de pH testados e tratamentos com NaBH₄. No procedimento B, os valores foram melhorados com o aumento do número de uso de NaBH₄ para 3 vezes. No tratamento C, o PEI foi utilizado no lugar de aminoácido e o resultado foi inferior ao tratamento B. O procedimento D que usou a seqüência de tratamentos: aminoácido, glutaraldeído, PEI e glutaraldeído, obteve os maiores valores: 4,510 (mmols/g de suporte x min x mL) de atividade imobilizada; 0,428 (%) de rendimento de imobilização; 1,53 (%) de atividade recuperada e 2,6x10⁻³ %·h⁻¹ de extensão de hidrólise.

Conclusão

O uso de invertase imobilizada em bucha vegetal é promissor na obtenção de xarope de açúcar invertido e os melhores resultados foram obtidos

quando o suporte é tratado, previamente à imobilização, na seguinte seqüência: aminoácido, glutaraldeído, PEI e glutaraldeído.

Referências

- BROGGI, R. L.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. A. Nova metodologia de imobilização enzimática utilizando bucha vegetal (*luffa cylindrica*): aplicação na imobilização de invertase. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. *Anais...* Brasília: UNB, 2002. p.106.
- CHEUNG, I. H. S.; GISHEN, M.; GHOSH, P. E. PAMMANT, N. B. Continuous ethanol-production in an immobilized whole cell fermenter using untreated sugarcane bagasse as carrier. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.23, n.6, p.413-416, Mar. 1986.
- CHOU, C. C.; JASOVISKY, G. A. Advantages of Ecosorb precoats in liquid sugar production. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v.95, n.1138, p.425-430, 1993.
- GEMEINER, P.; STEFUCA, V.; BALES, V. Biochemical engineering of biocatalytic immobilized on cellulosic materials. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.15, p.551-556, 1993.
- KENNEDY, J. F. *Carbohydrate chemistry*. Oxford: Clarendon Press, 1990.
- MONSAN, P.; COMBES, D. Application of immobilized invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions. *Biotechnology & Bioengineering*, New York, v.26, p.347-351, 1984.
- NELSON, N. A. Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Analytical Biochemistry*, New York, v.153, p.375-380, 1944.
- OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Process Biochemistry*, London, v.31, n.8, p737-744, 1996.
- POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Otimização na imobilização de invertase em *luffa cylindrica* para produção de xarope invertido. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 6., 2004, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: ABEQ, 2004. p. 49.
- WILSON, M. B.; NAKANE, P. K. The covalent coupling of proteins to periodate-oxidized sephadex: a new approach to immunoadsorbent preparation. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v.12, n.1/2, p.171-181, 1976.