

## APLICAÇÃO DE SABUGO DE MILHO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

D. M COSTA<sup>1</sup>, R. S. S. CASTRO<sup>1</sup>, R. Y. C. PADILHA<sup>1</sup>, D. S. RUZENE<sup>2</sup>, D. P. SILVA<sup>2</sup>, A. S. LIMA<sup>1</sup> e C. M. F SOARES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP, Aracaju-SE, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal de Sergipe, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, São Cristóvão-SE, Brasil.

E-mail para contato: diego.dmc@gmail.com

A busca por suportes alternativos para imobilização tem motivado diversos estudos na área de enzimologia, deste modo, o uso de sabugo de milho como suporte orgânico, pode ser uma alternativa. Portanto, neste trabalho se verificou a utilização de sabugo de milho como suporte para a imobilização de lipase. A granulometria média do sabugo de milho utilizada foi de 32-60 mesh, e apresentou 27% celulose, 24% hemicelulose e 36% de lignina. Testes de biodegradabilidade do suporte foram realizados, e o suporte não apresentou nenhuma formação de compostos de degradação. A lipase imobilizada apresentou um rendimento de imobilização de 62% e boa estabilidade operacional, mantendo entre 55 a 60% da sua atividade inicial até o sexto ciclo. O pH e temperatura ótimos para os biocatalisadores imobilizados foram 7,0 e 55°C. Os parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Mentem ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram 616,95 U/g e 361,38, respectivamente.

**Palavras-chave:** Resíduos agroindustriais, materiais lignocelulósicos, sabugo de milho, imobilização, lipase.

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas, especialmente as lipases, está crescendo rapidamente pelo fato destas enzimas apresentarem condições reacionais brandas e poderem ser usadas para diferentes reações (GOTOR-FERNANDEZ *et al.*, 2006). Entretanto, a aplicação de enzimas na sua forma livre é frequentemente dificultada pela desnaturação e inativação e, além disto, não é possível ser facilmente recuperada e reutilizada durante o processo industrial.

Desta maneira, a necessidade de suportes alternativos e mais baratos para imobilização tem motivado estudos de imobilização de enzimas em resíduos agroindustriais, visando aumentar dos produtos obtidos a partir de uma reação enzimática (BRIGIDA *et al.*, 2008).

Dentre as técnicas de imobilização, a adsorção física é usualmente utilizada, sendo que neste processo estão envolvidas forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas fortes. A desvantagem deste processo é a perda de enzima (dessorção) durante o processo de lavagem após a imobilização, como também no processo de reciclagem (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011).

Atualmente, materiais lignocelulósicos ganharam importância como suporte para imobilização de enzimas e células, tendo em conta a sua disponibilidade econômica como subprodutos agro-industriais. (CASTRO *et al.*, 2001; DEY *et al.*, 2002; D'SOUZA & GODBOLE, 2002). Na maioria das vezes, muitos materiais utilizados para imobilização são sintéticos e não biodegradáveis, gerando consequências para o meio ambiente após sua utilização (MOHMOUD, 2007).

Os resíduos agroindustriais utilizados para imobilização de enzimas descritos na literatura atualmente são: como milho, coco, bagaço de cana e palha de arroz. Estes suportes podem ser uma alternativa interessante uma vez que existe em abundância no Brasil como rejeito das indústrias de álcool, açúcares e até mesmo de pequenos produtores (BRIGIDA *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009; CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a utilização de sabugo de milho para a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* e avaliar a caracterização bioquímica do biocatalisador imobilizado por adsorção física.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Matéria-prima e Enzima**

Os sabugos de milho usados como matéria-prima neste trabalho foram obtidos do milho híbrido Dow 433, plantado no estado de Sergipe. Os sabugos foram moídos e selecionados de acordo com o tamanho. Em seguida foram submetidos a um processo de lavagem com água destilada, para que fosse retirada todas as impurezas existente no material (seja ela do campo ou do equipamento utilizado para a trituração do material). Como agente enzimático, foi utilizada a Lipase de *Burkholderia cepacia* - LPS (30.000 U/g), comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK).

### **2.2 Caracterização química do suporte**

#### Hidrólise ácida

Amostras de 2,0 g de sabugo de milho moído e classificado em 32-60 mesh foram tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (v/v) a 45°C por 7 min (ASTM, 1956). Para a completa hidrólise dos oligômeros restantes, os frascos foram autoclavados à 121°C por 30 min. Após a descompressão do autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada e completada com água destilada até um volume de 500 mL. A solução resultante foi utilizada para análises posteriores de lignina solúvel e carboidratos.

### Determinação de lignina

A lignina insolúvel (lignina *Klason*), a qual ficou retida no papel de filtro, foi lavada com aproximadamente 1,8 L de água destilada e seca em estufa a 110°C até a observação de massa constante. A lignina solúvel, presente no meio ácido, foi determinada conforme metodologia descrita por Rocha *et al.* (1997). A medida da absorbância a 280 nm foi determinada em espectrofotômetro UV/Visível. A linha base foi medida com uma solução contendo NaOH 6,5 mol/L sem a adição do hidrolisado.

### Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos

O hidrolisado ácido foi extraído em cartuchos de extração sólida *Sep-Pak C18* (Waters), para a remoção de compostos aromáticos e, então, injetado diretamente em uma coluna Aminex HPX-87H em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Como fase móvel foi empregado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol/L com fluxo de 0,6 mL/min, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração (ROCHA, 1997).

### Determinação de Hidroximetilfurfural e Furfural

Hidroximetilfurfural e furfural foram determinados por CLAE, em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL/min a 25°C. Os compostos foram detectados a 276 nm (UV/visível Shimadzu SPD-10A), e as respectivas concentrações de hidroximetilfurfural e furfural foram determinadas a partir de curvas de calibração com compostos puros (ROCHA *et al.*, 1997).

## **2.2 Imobilização enzimática por adsorção física da lipase**

### Teste de biodegradabilidade do suporte

Afim de verificar a estabilidade do suporte na presença da enzima, os testes foram realizados conforme descrito por CABRERA-PADILLA *et al.* (2013).

### Determinação do Carregamento de Enzima

A determinação da capacidade de adsorção de enzima ao suporte foi obtida analisando a atividade residual alcançada em diferentes relações (0,15; 0,3; 0,45 e 0,6), conforme descrito por CABRERA-PADILLA *et al.* (2013).

### Imobilização por Adsorção Física

Cerca de 1 g de suporte foram adicionados a 10 mL de hexano sob agitação vigorosa em temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, a solução enzimática contendo 0,45g de LBC em 10 mL de solução tampão foram adicionados ao suporte e mantido as condições de agitação por mais 2 horas. Após este período, a solução contendo o sistema imobilizado foi mantendo sem agitação por 24 horas a 4°C. Posteriormente, a lipase imobilizada foi recuperada por filtração à vácuo e lavado por três vezes, sendo as duas primeiras lavagens com 10 mL hexano e a terceira com 15mL. Os filtrados e o biocatalisador imobilizado foram analisados quanto à atividade enzimática

### Atividade Lipolítica

A Atividade foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por SOARES *et al.* (1999), com algumas modificações. As análises foram realizadas em triplicata e uma unidade (U) de lipase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

## 2.3 Caracterização bioquímica do biocatalisador livre e imobilizado

### Influência do pH e da temperatura

O efeito do pH na atividades da enzimas livre e imobilizada em sabugo de milho foram analisadas numa faixa de pH entre 4,0 e 9,0 e o efeito da temperatura foi avaliado medindo a atividade em tampão fosfato pH 7 nas temperaturas de 30 a 80°C.

### Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades iniciais das reações de hidrólise foram determinadas empregando substratos contendo proporções entre 1 a 60% (m/v) de azeite de oliva em solução aquosa de goma arábica (7,0% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pelas lipases imobilizadas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por SOARES *et al.* (1999). Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes foram calculados mediante ajuste não linear com o auxílio do programa Origin® 8,0.

### Estabilidade operacional

A estabilidade operacional das lipases imobilizadas foi determinada em reações de hidrólise em bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (0,1 g). Foram realizadas bateladas de 10min cada uma, à temperatura de 50°C e pH 7,0.

## 3. RESULTADOS

O sabugo de milho moído apresentou cerca de 10,5% do resíduo na granulometria de 32-60 mesh. Essa granulometria foi utilizada por ser a mais usualmente descrita na literatura como a de melhor rendimento de imobilização para uso de resíduos agroindustriais (BRIGIDA *et al.*, 2011; CRISTOVÃO *et al.*, 2011). Posteriormente, as amostras de sabugo de milho triturado foram analisadas quanto aos teores de lignina (solúvel e insolúvel), celulose e hemicelulose, bem como de compostos resultantes da degradação no decorrer das análises, como hidroximetilfurfural e furfural, conforme dados apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química (% , m/v) do sabugo de milho.

Celulose	Hidroximetilfurfural	Hemiceluloses	Furfural	Lignina	
				Solúvel	Insolúvel
27,4 $\pm$ 0,8	0,21 $\pm$ 0,05	24,3 $\pm$ 1,4	1,2 $\pm$ 0,3	11,2 $\pm$ 1,6	24,5 $\pm$ 2,1

Os valores da concentração de hemiceluloses, celulose e lignina apresentados na Tabela 1, provenientes da caracterização para o sabugo de milho, estão de acordo com a literatura (IBRAHIM *et al.*, 2010). A aplicação da hidrólise ácida no sabugo de milho é apontada na literatura como um método eficiente para se obter a degradação da fração lignocelulósica do material. Entretanto, durante o processo químico é comum ocorrer a formação de compostos provenientes da degradação de hexoses e pentoses. Deste modo, é possível observar que o índice de furfural encontrado no decorrer da caracterização do sabugo de milho foi de aproximadamente 1,2%, enquanto para os teores de hidroximetilfurfural foram encontrados 0,21%. Os teores máximos desejados destes componentes é de 1% (TAMANINI & HAULY, 2004).

Entre os principais requisitos para um bom suporte é sua capacidade de resistência a degradação por parte do biocatalisador imobilizado. Deste modo, os testes de biodegradabilidade que foram realizados com o sabugo de milho como suporte frente a lipase não apresentaram nenhum tipo de formação de compostos de degradação. Após a avaliação da biodegradabilidade, verificou-se o carregamento de lipase sobre o suporte e se verificou o máximo de rendimento de imobilização foi de 62%.

A determinação do carregamento foi analisada variando a relação enzima/suporte e verificando a atividade relativa apresentada no sistema, conforme mostra a Figura 1. É possível observar que o aumento da carga da enzima possibilitou o aumento na atividade relativa, seguindo este comportamento até um valor de 0,45 de enzima/suporte. Após este valor, ocorreu uma redução na atividade hidrolítica do biocatalisador obtido provavelmente devido a saturação do suporte. Deste modo, a relação de 0,45 entre a enzima e o suporte foi indicado como sendo o valor máximo de carga de enzima suportável na imobilização. As condições experimentais para determinação de carga máxima da enzima imobilizada também foi relatada na literatura por CABRERA-PADILLA *et al.* (2013), entretanto pode-se verificar que o tipo de lipase e de suporte influencia na quantidade de biocatalisadores imobilizados, pois para o PHBV foi de 0,3g de enzima lipase de *Candida rugosa* por grama de suporte.

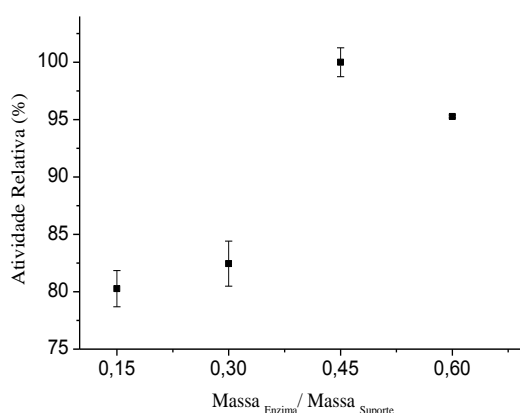


Figura 1 - Relação entre enzima/suporte (m/m) em função da atividade relativa após a imobilização em sabugo de milho *in natura*.

O perfil da atividade relativa em função do pH (figura 2a) indicaram que a Lipase de *Burkholderia cepacia* livre ou imobilizada, apresentaram o pH ótimo 7. Resultados similares foram apresentados por BRIGIDA *et al* (2007), que analisou a influência do pH na imobilização da Lipase B de *candida antarctica* em fibra de coco verde.

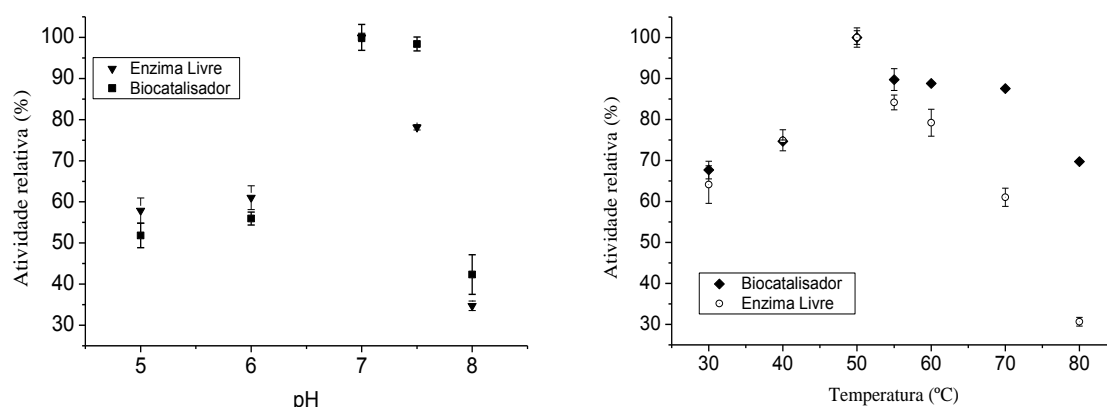


Figura 2 - (a) Efeito do pH na atividade relativa para enzima livre e os biocatalisador imobilizado e (b) Efeito da temperatura na atividade relativa da enzima livre e do biocatalisador imobilizado.

A influência da temperatura na atividade relativa foi verificada com o aumento da temperatura entre os valores de 30 a 50°C. A Figura 2b mostra que a temperatura ótima foi de 50°C para o biocatalisador livre e imobilizado, apresentando uma redução na sua atividade para temperaturas superiores.

A determinação dos parâmetros cinéticos do biocatalisador livre e imobilizado foi determinado a partir da conversão de ácidos graxos obtidos na metodologia da atividade hidrolítica. A variação dos valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  relaciona a interação do sítio catalítico da enzima com o suporte sistema imobilizado. Os Parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  foram respectivamente 3246,75 e 227,96 para a biocatalisador livre, e 616,95 e 361,38 para biocatalisador imobilizada em sabugo de milho. Durante o processo de imobilização a enzima pode ser imobilizada de forma a bloquear o acesso ao sítio ativo, reduzindo a afinidade da enzima pelo substrato (aumento do valor de  $K_m$ ) como também pode ocorrer o oposto, mantendo a enzima com a sua conformação aberta que promove um aumento da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) da enzima (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007).

A estabilidade operacional foi verificada a partir da capacidade de reutilização do biocatalisador testado, isto é, estabilidade operacional foi avaliada de acordo com o número de reuso, ou seja, frente a vários ciclos de reação e analisando o teor de ácidos graxos liberados durante esta reação. O biocatalisador imobilizado manteve-se acima de 50% da sua atividade inicial até o sexto ciclo (Figura 3).

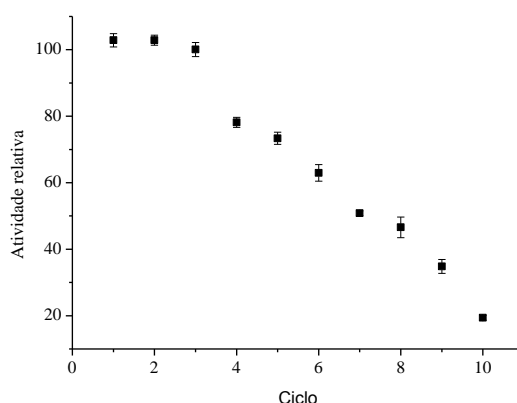


Figura 3 - Número de reuso (ciclo) do biocatalisador imobilizado em sabugo de milho in natura (Sup.00) em função da atividade relativa (%).

O biocatalisador ainda apresentou cerca de 20% de sua atividade no 10º ciclo, sendo sua total inatividade foi alcançada no décimo quarto ciclo.

## 4. CONCLUSÕES

O uso do sabugo de milho de milho apresenta um potencial promissor quanto a sua resistência a biodegradação a lipase selecionada. O carregamento de lipase no método de imobilização por adsorção física foi de 0,45g/g. Quanto a caracterização bioquímica verificou-se os mesmos valores de pH ótimo (7,0), temperatura ótima (50°C) e os parâmetros cinéticos indicaram a afinidade do biocatalisador imobilizado ao substrato. A eficiência catalítica e a estabilidade operacional indicam a necessidade de mais estudos quanto a sua otimização.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao PNPd e a Capes pelo suporte financeiro.

## 6. REFERÊNCIAS

- ASTM. Methods Standard Test Methods for lignin in Wood. P. 271-48, 1956.
- BRÍGIDA A.I.S., CALADO V.M.A., GONÇALVES L.R.B., COELHO M.A.Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. Carbohydrate Polymers, vol. 79, p. 832-838, 2011.
- BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.146, p.173-187, 2008.
- BRÍGIDA, A.I.S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A.L.O.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalente attachment to green coconut fiber. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 136, p. 67-80, 2007.
- CABRAL, J.M.S.; BARROS, M.R.A.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.
- CABRERA-PADILLA, R.Y.; ALBUQUERQUE, M.; FIGUEIREDO, R.T.; FRICKS, A.T.; FRANCESCHI, E.; LIMA, A.S.; A DOS SANTOS, O.A.; SILVA, D.P.; SOARES, C.M.



- Immobilization and characterisation of a lipase from a new source, *Bacillus* sp. ITP-001. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v. 35, p. 1385-1394, 2013.
- CARDOSO, C.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, vol.32, p. 175-187, 2009.
- CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. *Biotechnology Progress*, v.17, p.1061-1064, 2001.
- CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P.M.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A.R.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 72, p. 6-12, 2011.
- CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. *Food biotechnology*, v.14, p.79-97, 2000.
- D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *J. of Bioch. and Biophysical Methods*, v.52, p.59-62, 2002.
- DEY, G.; NAQPAL, V.; BANERJEE, R. Immobilization of alpha-amylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber. *Appl Biochem Biotechnol.*, p.303-313, 2002.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDEZ-LORENTE, PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 242-250, 2007.
- GOTOR-FERNANDEZ, V., BRIEVA, R., GOTOR, V., Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal B-Enzym.*, v. 40, p.111-120. 2006.
- IBRAHIM, M.M., AGBLEVOR, F.A., EL-ZAWAWY, W. K. Isolation and characterization of cellulose and lignina from stem-exploded lignocellulosic biomass. *BioResources*, vol. 5, p. 397-418, 2010.
- MOHMOUD, D.A.R. Immobilization of invertase by a new economical method using wood sawdust waste. *Journal Australian Basic and Applied*, vol. 1, p 364-372, 2007.
- RIVAS, B.; MOLDES, A.B.; DOMINGUEZ, J.M.; PARAJO, J.C. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 627-634, 2004.
- ROCHA, G.J.M.; SILVA, F.T.; CURVELO, A.A.S.; ARAÚJO, G.T. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: *Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins and Other Wood Components*, 5, Curitiba, Brasil, v.6, p.3-8, 1997.
- SILVA, A. M.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTOVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. *Process Biochemistry*, v.47, p.1095-1101, 2012.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, p. 745-757, 1999.
- TAMANINI, C.; HAUALY, M. C. O. Resíduos Agro-industrial para produção biotecnológica de xylitol. *Semina*, v. 25, p. 315-330, 2004.