

## Avaliação da estabilidade da enzima glicose oxidase livre e imobilizada na produção de ácido xilônico

Julia Aparecida C. Fagundes<sup>1</sup>, Thálya F. Pacheco<sup>2</sup> e Dasciana S. Rodrigues<sup>2</sup>

### Introdução

Ácido xilônico, um dos produtos de maior valor agregado segundo o Departamento de Energia dos EUA, tem aplicação na produção de diversos químicos nas áreas alimentícia, farmacêutica e na agricultura (RAGAUSKAS et al., 2006). A viabilidade do etanol lignocelulósico depende também do aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa, constituída majoritariamente de xilose e correspondente a até 40% da massa seca do material. Uma das possíveis utilizações da xilose é a produção de ácido xilônico. Este pode ser produzido a partir da oxidação da xilose, catalisada pela enzima xilose desidrogenase. Este processo requer a utilização de cofatores como NAD<sup>+</sup>. O ácido xilônico também pode ser obtido pela ação da enzima glicose oxidase na conversão da xilose, sem dependência de cofatores (LIU et al., 2012; BUCHERT et al., 1986).

A imobilização de enzimas apresenta vantagens em relação ao uso destas solúveis, tais como: possibilidade de reutilização e de operação em modo contínuo, maior facilidade de separação do produto final, melhoria no desempenho catalítico e redução da inativação por distorção de sua estrutura nativa.

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de avaliar a ação da enzima glicose oxidase na produção de ácido xilônico, empregando xilose como substrato. Será avaliada a atuação da enzima livre e sob três técnicas de imobilização (entrecruzamento, ligação covalente em resina agarose-amino e ligação covalente em quitosana), visando sucessivas reutilizações sem perda de estabilidade.

### Métodos

A conversão de xilose em ácido xilônico foi realizada utilizando a enzima comercial glicose oxidase de *A. niger*. Primeiramente, foi feita a avaliação do comportamento da enzima livre em xilose pura e determinação da concentração de enzima a ser empregada na imobilização. Foram então avaliadas três técnicas de imobilização. Na imobilização por entrecruzamento, foi utilizando álcool iso-propílico como agente precipitante e glutaraldeído

<sup>1</sup> Universidade de Brasília – UnB, Instituto de Química ;

<sup>2</sup> Embrapa Agroenergia, PqEB, Av. W3 Norte (final), Brasília/DF, Brasil, 70770-901

\*julia.fagundes@colaborador.embrapa.br; dasciana.rodrigues@embrapa.br

como agente de entrecruzamento. Duas técnicas de imobilização por ligação covalente foram avaliadas. Na primeira delas foi utilizada resina agarose-amino como suporte. Para a segunda técnica, a imobilização da enzima em quitosana, primeiramente foi realizada a ativação da quitosana utilizando o método descrito por Budriene et al. (2005). Como agente ligante foi utilizado glutaraldeído. Para as três técnicas, o sólido resultante da imobilização foi lavado e centrifugado até que não houvesse perda de proteína no sobrenadante. Todas as soluções de enzima e sobrenadantes tiveram seu teor de proteína quantificado por Bradford para determinação da eficiência de imobilização. A conversão de xilose a ácido xilônico empregando as enzimas livre e imobilizadas foi avaliada em reator encamisado a 35°C, com agitação constante, empregando solução de 10 g/L de xilose. Foram coletadas amostras periodicamente para construção dos perfis de conversão de xilose a ácido xilônico. O ácido xilônico produzido foi quantificado por método colorimétrico descrito por Lien (1959). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo apresentadas as médias dos valores obtidos.

## Resultados e Conclusões

Na avaliação da enzima livre, quando utilizados 2,0 mg da enzima glicose oxidase (correspondente a 0,53 mg de proteína) para 10 mL de solução de xilose na concentração de 10 g/L, houve formação de 0,89 g/L de ácido xilônico em duas horas. Quando oferecidos 10 mg de enzima (2,65 mg de proteína), para as mesmas condições do meio reacional, houve produção de 2,02 g/L de ácido xilônico em 2 horas. Com 6 horas de reação, foram formados 9,02 g/L de ácido xilônico, o que corresponde a 81,55% do rendimento teórico de conversão. Foi convencionada a utilização de 2,65 mg de proteína (10 mg de enzima) para avaliação das imobilizações. Nas condições de maior eficiência, houve a imobilização de 65,6% da proteína na técnica de entrecruzamento, 28,4% na ligação covalente com resina agarose-amino e 16,1% na ligação covalente em quitosana. As massas restantes de proteína foram perdidas nos sobrenadantes, ou seja, não se imobilizaram. Em 6 horas de reação, as técnicas de imobilização por entrecruzamento, ligação covalente em agarose-amino e em quitosana resultaram, respectivamente, em 1,6 g/L, 1,56 g/L e 3,19 g/L de ácido xilônico, correspondendo a 14,5%, 14,1% e 28,8% da conversão teórica de xilose a ácido xilônico. Com 24 horas de reação, obteve-se, para as imobilizações por entrecruzamento, ligação covalente em agarose-amino e em quitosana, rendimentos de 21,9%, 22,7% e 74,9% na conversão a ácido xilônico, respectivamente. Os resultados observados até o momento permitem concluir que a imobilização em quitosana, que teve a menor adesão da enzima ao suporte, resultou no maior rendimento de conversão dentre as imobilizações avaliadas. Possivelmente, além da perda de enzima nas lavagens (parcela não imobilizada), ocorre perda da atividade da fração imobilizada, devido às condições de imobilização de cada uma das técnicas. Até o momento, a imobilização por ligação covalente em quitosana se qualifica

como o melhor método para imobilização da enzima glicose oxidase, pois converte maior quantidade de xilose utilizando uma menor quantidade de enzima. Novas condições de imobilização para cada uma das técnicas devem ser avaliadas, de maneira a elevar a taxa de imobilização e evitar a perda de atividade da enzima durante o processo.

## Apoio Financeiro

Este trabalho foi financiado com recurso proveniente do Sistema Embrapa de Gestão (Projeto C5 AGREGA).

## Referências

BUCHERT, J.; VIKARI, L.; LINKO, M.; MARKKANEN, P. Production of xylonic acid by *Pseudomonas-fragi*. **Biotechnology Letters**, London, v. 8, n. 8, p. 541-546, 1986.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, L. V.; MIEZELINE, A.; DIENYS, G.; ZUBRIENE, A.  $\beta$ -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, Warsaw, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2005.

LIEN, O. G. Determination of gluconolactone, galactonolactone and their free acids by hydroxamate method. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 31, n. 8, p. 1363-1366, 1959.

LIU, H.; VALDEHUESA, K. N. G.; NISOLA, G. M.; RAMOS, K. R. M.; CHUNG, W. Hight yied production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 115, p. 244-248, 2012.