



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus Araraquara**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
Área Ciência de Alimentos**

Dissertação de Mestrado

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE EM
SUPORTES ALGINATO-QUITOSANA E GLIOXIL-AGAROSE.**

Mariana Vendrasco Tacin

Araraquara 2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus Araraquara**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
Área Ciência de Alimentos**

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE EM
SUPORTES ALGINATO-QUITOSANA E GLIOXIL-AGAROSE.**

Defesa de Dissertação apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara – UNESP,
para obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos.

**Mariana Vendrasco Tacin
Orientadora Prof^a Dr^a Edwil Aparecida de Lucca Gattás**

Araraquara 2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

T118i

Tacin, Mariana Vendrasco

Imobilização da enzima álcool desidrogenase em suportes alginato-quitosana e glioxil-agarose / Mariana Vendrasco Tacin. – Araraquara, 2015
52 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Edwil Aparecida de Lucca Gattas

1. Álcool desidrogenase. 2. Enzimologia. 3. Imobilização. 4. *Saccharomyces cerevisiae* I.
Gattas, Edwil Aparecida de Lucca, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Mariana Vendrasco Tacin

**IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE EM SUPORTES
ALGINATO-QUITOSANA E GLIOXIL-AGAROSE.**

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Edwil Aparecida de Lucca Gattás

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido

Prof^a. Dr^a. Maristela de Freitas Sanches Peres

AGRADECIMENTOS

À minha família que me incentivou e me apoiou a conquistar mais essa etapa da minha vida.

Obrigada à Prof^a. Edwil Gattas, que me deu a oportunidade de cursar esse Mestrado, me orientando e ajudando no desenvolvimento desse projeto.

Ao Romulo Oliveira, técnico do laboratório, que tanto ajudou e aconselhou, do começo ao fim do meu trabalho. Não tenho palavras para expressar tamanha gratidão!

Ao Prof^o. Rubens Monti por me ajudar sempre que precisei, seja tirando dúvidas, dando explicações, mas, principalmente, por ceder espaço no seu laboratório. Obrigada ao Julian, Prof^o. Antonio, à Juliana e a todos do laboratório de Enzimologia pela atenção e auxílio.

Aos amigos da Equipe de Saúde da Família de Água Vermelha. Não canso de falar que sou o que sou hoje, graças a vocês. Muito obrigada por tudo!

Às amigas que fiz nesses anos de pós-graduação, pois posso dizer que conheci pessoas que permanecerão pra sempre no meu coração.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Secretaria de Pós-graduação por todo o suporte.

À todos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

As enzimas são importantes catalisadores de reações biológicas, sendo que as de origem microbiológicas tem recebido atenção especial devido à facilidade de obtenção ou até mesmo na síntese de enzimas geneticamente modificadas. O uso desses catalisadores biológicos na indústria vem aumentando com o avanço de estudos e pesquisas de suas propriedades e melhoramento dos processos em que são empregados. A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima de uso industrial e biotecnológico importante para quantificação de etanol em biocombustíveis e em bebidas, onde, em comparação com outros métodos, têm mostrado ser o mais eficaz. A melhora da estabilidade da enzima é feita pelo processo de imobilização. Alguns métodos de imobilização são mais comumente aplicados devido à facilidade de preparo e/ou imobilização da enzima no suporte, como por exemplo, o suporte alginato-quitosana. Os suportes alginato-quitosana e glixil-agarose foram utilizados neste trabalho para se tentar melhorar a estabilidade da ADH. O objetivo principal deste estudo foi o de encontrar um método mais eficaz para imobilizar a ADH e avaliar sua estabilidade frente a pH, temperatura, variação de concentração de substrato, adição de sais metálicos ao ensaio, entre outros. Os resultados mostraram que houve interferência do pH na estabilidade das esferas de alginato-quitosana impossibilitando seu uso neste ensaio e quando imobilizada em suporte glioxil-agarose apresentou estabilidade maior em maiores temperaturas e pH, mas não demonstrou boa estabilidade quando estocada.

Palavras-chave: álcool desidrogenase; enzimologia; imobilização; *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Enzymes are important catalysts of biological reactions, and the microbiological origin has received special attention due to the ease of obtaining or even in the synthesis of genetically modified enzymes. The use of these biological catalysts in the industry is increasing with the advancement of studies and research of its properties and improving processes in which they are employed. The alcohol dehydrogenase (ADH) is an enzyme of industrial use and biotechnological important for quantitation of ethanol in biofuels and beverages, which in comparison with other methods, have shown to be most effective. The improvement of the enzyme stability is made by the immobilization process. Some methods of immobilization are most commonly applied because of the ease of preparation and/or immobilization of the enzyme on the support, for example, alginate-chitosan support. The supports alginate-chitosan and glyoxyl-agarose were used in this study to try to improve the stability of ADH. The aim of this study was to find a more effective method to immobilize the ADH and evaluate its stability against pH, temperature, variation of substrate concentration, addition of metal salts in the assay, among others. The results showed that there was interference of pH on the stability of alginate-chitosan beads precluding their use in this assay and when immobilized on glyoxyl agarose support was more stable at higher temperatures and pH, but showed good stability when stored.

Keywords: alcohol dehydrogenase; enzymology; immobilization; *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Alguns métodos mais comuns de imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, encapsulação e aprisionamento17
- Figura 2** – Ligação entre o alginato e a quitosana para formação do complexo alginato-quitosana19
- Figura 3** – Imobilização da enzima por ligação covalente multipontual: enzima ligada ao suporte por vários braços espaçadores20
- Figura 4** – Esquema da ativação do gel de agarose, formação dos grupos gliceril e oxidação dos gliceril para formação de glioxil21
- Figura 5** – Formação de acetaldeído a partir do metabolismo do álcool na presença da enzima álcool desidrogenase e do cofator NAD^+ dentro da célula....22

CAPÍTULO 2

- Figura 1** – Tempos de formação de (■) etanol e (●) biomassa, e (▲) açúcares consumidos pelo fermento de pão durante 8h de fermentação. Cada ponto representa a média de duas determinações36
- Figura 2** – Curva padrão do etanol37
- Figura 3** – Imagem das fotografias das esferas de alginato-quitosana, com ADH imobilizada, A) em água destilada, B) incubadas em etanol e C) incubadas em solução tampão pirofosfato de sódio pH 8,5 para teste de estabilidade nas soluções. A numeração representa a ordem das fotos, tiradas a cada 10 minutos após incubação41
- Figura 4** – Leituras de absorbância do processo de imobilização, de 5 em 5 minutos, do (■) Controle, (●) Suspensão e (▲) Sobrenadante42
- Figura 5** – Atividade relativa da enzima em função: (A) do pH e (B) da temperatura, da (●) ADH livre (■) ADH imobilizada43
- Figura 6** – Atividade relativa da ADH imobilizada após estocagem em temperaturas de 10 à 60°C por 20 minutos44

Figura 7 – Atividade relativa das amostras de soluções enzimáticas, estocadas em (■) ADH livre em 25°C, (●) ADH livre no refrigerador à 4°C, (▲) ADH livre no freezer à -18°C e (◆) ADH imobilizada no refrigerador à 4°C ..	45
Figura 8 – Efeito da concentração de NAD ⁺ sobre a atividade da ADH (A) livre e (B) imobilizada ..	45
Figura 9 – Efeito da concentração de etanol sobre a atividade da ADH (A) livre e (B) imobilizada ..	46
Figura 10 – Atividade relativa do controle (sem adição de sais metálicos) em comparação aos ensaios com adição de sais metálicos: ■ enzima livre e □ enzima imobilizada ..	47
Figura 11 – Atividade relativa após reuso do derivado ..	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade da enzima ADH imobilizada em suporte alginato-quitosana em diferentes soluções tampão	39
Tabela 2 – Cálculos da cinética de Michaelis e Menten dos substratos, NAD^+ e etanol	46

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
REFERÊNCIAS	24

CAPÍTULO 2

RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1. <i>Material</i>	30
2.2. <i>Condições de fermentação</i>	30
2.3. <i>Determinação de açúcares redutores totais, viabilidade celular e de biomassa</i>	31
2.4. <i>Determinação do etanol da fermentação de caldo-de-cana</i>	31
2.5. <i>Preparo e imobilização em diferentes suportes</i>	31
2.6. <i>Acompanhamento da imobilização da ADH no suporte glioxil-agarose</i>	32
2.7. <i>A atividade enzimática dos ensaios com a álcool desidrogenase</i>	32
2.8. <i>Ensaio do efeito do pH e da temperatura</i>	33
2.9 <i>Ensaio de estabilidade em diferentes temperaturas de estocagem</i>	33
2.10. <i>Ensaio com diferentes concentrações de substratos</i>	34
2.11. <i>Ensaio com adição de sais metálicos</i>	34
2.12. <i>Ensaio de reutilização do derivado</i>	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. <i>A produção de bioetanol e quantificação utilizando ADH comercial livre</i>	35
3.2. <i>Ensaio enzimático de imobilização da ADH em suporte de alginato-quitosana</i>	38
3.3. <i>Imobilização da ADH em suporte glioxil-agarose</i>	41
3.4. <i>Efeito do pH e temperatura</i>	42
3.5. <i>Estabilidade em temperatura de estocagem</i>	44
3.6. <i>Concentração de substratos e parâmetros cinéticos</i>	45

3.7. <i>Adição de sais de metais</i>	46
3.8. <i>Reutilização de enzima imobilizada</i>	47
4. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar (acelerar) reações químicas e são responsáveis pela regulação da maioria dos processos metabólicos do corpo humano. Além de ser um catalisador natural de reações, as enzimas podem ser obtidas através de várias fontes: animal, vegetal e microbiana.

Com o aumento do conhecimento e das pesquisas acerca dos mecanismos de ação das enzimas, sua utilização na indústria e na biotecnologia vem aumentando cada vez mais a fim de aperfeiçoar os processos industriais para geração de produtos de melhores qualidades, redução dos custos de produção, melhoria do processo e geração de menores quantidades de subprodutos.

Dentre as enzimas utilizadas na indústria de alimentos, são encontradas as desidrogenases, que são enzimas oxirredutases, que, em sua maioria, utilizam cofatores (NAD ou NADP) como aceptores de elétrons.

A álcool desidrogenase (ADH) é a enzima responsável pelo metabolismo do etanol, podendo ser encontrada naturalmente no citosol dos hepatócitos e sua principal fonte de origem microbiana é a *Saccharomyces cerevisiae*, levedura de fermento de pão. Sua reação de metabolização do etanol ocorre na presença do NAD^+ , tendo como produto de reação o acetaldeído e a formação de NADH e H^+ .

Devido ao aumento do uso das enzimas industriais e necessidade de melhorar cada vez mais as condições do processo industrial, faz com que se busque métodos para aumentar o rendimento e estabilidade das enzimas, e melhorar a qualidade do produto final. Para essa finalidade, são usados suportes onde as enzimas são imobilizadas e com isso fatores que poderiam ocasionar inibição ou desnaturação, como pH e temperatura, não causem interferência na estabilidade da

enzima. Além disso, o uso de enzimas imobilizadas faz com que haja o reaproveitamento do derivado (enzima+suporte), baixando o custo de produção e diminuição de subprodutos indesejáveis.

Vários são os protocolos que podem ser utilizados para imobilização de uma enzima. Deve-se levar em consideração as características da enzima e do substrato para a escolha do suporte ideal, podendo este ser sólido, poroso, membranoso, fibroso, entre outros.

Diante do exposto, a importância da utilização de enzimas para fins biotecnológicos vem aumentando e com isso, a necessidade do melhoramento das condições enzimáticas e de estabilidade frente a um suporte é tema atual de estudo, contribuindo para o desenvolvimento de novos métodos e protocolos de utilização de enzimas industriais, seja para alimentos, fármacos, produção de energia ou outros fins.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os organismos vivos sofrem reações químicas para manutenção das células, síntese de DNA e RNA, digestão, metabolismo e muitos outros processos que, em condições normais de temperatura corporal (por volta de 37°C), seriam lentas devido à alta complexidade desses processos. Para tornar essas reações mais eficientes, há catalisadores biológicos que as tornam muito rápidas sem requerer aumento de energia de ativação. As responsáveis por acelerar as reações biológicas são as enzimas.

Atividades enzimáticas são descritas desde 1700 quando era desconhecido o processo de digestão da carne ocorrido pelo suco gástrico. A partir do interesse em saber como processos como este ocorriam, foram feitas diversas pesquisas, como a de Louis Pasteur que classificou como fermentos as substâncias presentes nas reações que convertiam amido em açúcares simples e mais tarde foi também estudado por Eduard Buchner, que utilizou extrato de levedura para a fermentação de açúcar até álcool (NELSON e COX, 2006). Com esse experimento, ele provou, em 1897, que moléculas, mesmo fora das células, continuavam a funcionar e a denominação dessas moléculas foi feita por Frederick Kühne, passando a chamá-las de enzimas (NELSON e COX, 2006).

As enzimas são proteínas altamente seletivas e especializadas em acelerar reações biológicas, funcionando como catalizadoras de reações, sem precisar participar como reagentes ou produtos, formadas no interior das células, mas capazes de agir no meio extracelular. Atuam como reguladoras da maior parte dos processos do metabolismo celular dos organismos vivos.

As enzimas e seu potencial catalítico são sempre explorados e cada vez mais estudados devido à vasta aplicação em processos industriais de produção de alimentos, em cervejarias, indústria têxtil, indústria farmacêutica e diversas outras (SAID e PIETRO, 2004). Com o aumento das pesquisas sobre as enzimas, sua funcionalidade e a procura por desenvolvimento no processo industrial e da biotecnologia, busca-se aumentar a eficiência das reações catalíticas, de forma que haja melhor custo benefício, reaproveitamento de enzimas, sem perda de qualidade do produto final. Ainda de acordo com Said e Pietro (2004), a alta especificidade das enzimas ao substrato, faz com que a obtenção dos subprodutos indesejáveis da

reação seja baixa, fazendo com que os custos com a separação destes e possíveis problemas com tratamentos de efluentes na indústria diminuam.

A eficiência dos processos enzimáticos é explorada industrialmente de modo que, economicamente e eficientemente, buscam-se maneiras que promovam resultados cada vez mais lucrativos e de melhor custo benefício. Para que isso ocorra, processos de imobilização de enzimas são realizados a fim de “aproveitar o poder catalítico das enzimas e reunir as vantagens dessas proteínas sobre catalisadores químicos” (SAID e PIETRO, 2004). No geral, as enzimas não são muito estáveis em solução tampão, mas quando imobilizadas a estabilidade é melhorada (DEHDAST et al., 2010; PETKOVA et al., 2012).

A imobilização enzimática tem como finalidade a obtenção de um biocatalisador onde a atividade e a estabilidade não sejam alteradas durante o processo, pois há menor interferência de inibidores e/ou ativadores. A imobilização é feita isolando a enzima do substrato natural e juntando quimicamente a um suporte ideal. O suporte deve ser criteriosamente selecionado levando em consideração suas características morfológicas (porosidade, diâmetro dos poros), características químicas (grupos químicos que permitam a ligação da enzima sem sofrer desnaturação), natureza hidrofílica (difusidade do substrato), insolubilidade (garantir o suporte não se dissolva no substrato, havendo contaminação do produto) e estabilidade química, mecânica e térmica (BON et al., 2008). Além disso, Bon et al. (2008) diz que o uso constante da enzima imobilizada faz com que o suporte sofra constantes processos de filtração, centrifugação e agitação, sendo necessário, portanto, que o suporte seja resistente mecanicamente.

A primeira imobilização foi feita por Nelson & Griffin, quando em 1916 imobilizaram a enzima invertase em carvão ativado, mas somente a partir da década

de 60 a técnica foi mais desenvolvida, devido ao aumento de estudos e de interesse na produção industrial em larga escala.

Existem vários métodos de imobilização de enzimas como por ligação covalente, inclusão, aprisionamento, encapsulação (ou microencapsulação), adsorção, ligação iônica, ligação metálica e formação de ponte dissulfeto (DEHDAST et al., 2010; GUISÁN, 2006; HANEFELD et al., 2009; MENDES et al., 2011).

Alguns métodos são mais comumente utilizados na imobilização de enzima, mostrados na figura 1.

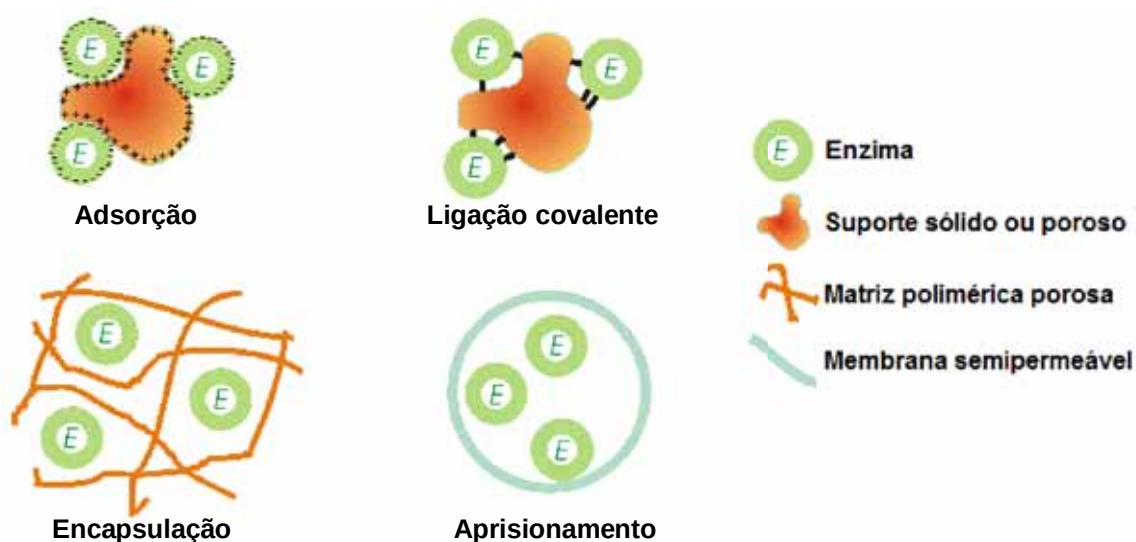


Figura 1 – Alguns métodos mais comuns de imobilização de enzimas: adsorção, ligação covalente, encapsulação e aprisionamento (CHAPLIN, 2014).

O melhor meio de se evitar qualquer influência negativa sobre a estrutura de uma enzima é a encapsulação (HANEFELD et al., 2009). De acordo com Guisán (2006), a encapsulação é baseada no confinamento da enzima por uma membrana, que retém a enzima, e apresenta porosidade que pode ser controlada, a fim de permitir que o substrato e os produtos de reação se difundam livremente pelo

derivado. As desvantagens estão associadas ao crescimento de microrganismos sobre a superfície da membrana, fazendo com que haja inibição da enzima e com que o derivado se comporte erroneamente.

Algumas membranas podem ser usadas para a encapsulação como o nylon, o nitrato de celulose, acetato de celulose, resinas epóxi, colágeno, polisulfona, poliacrilatos e policarbonatos (GUISÁN, 2006). O sistema de microencapsulamento em alginato-quitosana, que são biopolímeros de polissacarídeos, vem despertando interesse devido às propriedades de biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade e tem sido amplamente relatado em estudos de imobilização de enzimas e células (YU et al., 2011; ZHOU et al., 2010).

O alginato é um polissacarídeo natural biocompatível e biodegradável extraído de algas marrons. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de proteínas e células devido às suas vantagens significativas, como a boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simplicidade de preparação (LU et al., 2005, ZHOU et al., 2010). Uma das desvantagens do alginato é baixa resistência mecânica (LU et al., 2005).

Quitosana é um produto da quitina, extraído e isolado das conchas de crustáceos como lagostas, camarões e caranguejos. É também considerado um polissacarídeo biocompatível, biodegradável e não tóxico. Estudos mostraram que a formação de microcápsulas de alginato-quitosana exibiram uma melhor biocompatibilidade e resistência mecânica (WANG et al., 2006).

A quitosana é um polissacarídeo catiônico que interage com o alginato, que é um polissacarídeo linear aniônico, formando uma matriz tridimensional através da interação iônica entre grupos amino protonados da quitosana e porções de

carboxilato de alginato (YU et al., 2011; ZHOU et al., 2010). A figura 2 mostra a ligação entre a carboxila do alginato e a amina da quitosana.

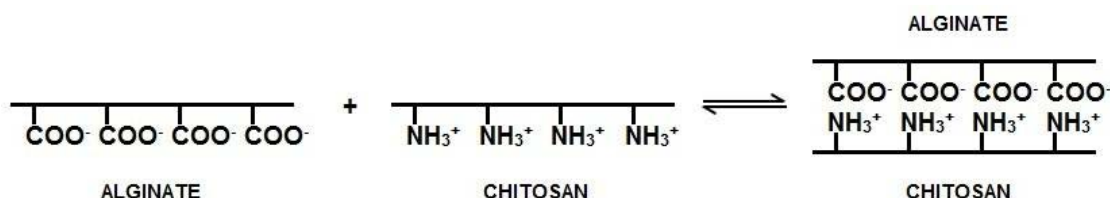


Figura 2 – Ligação entre o alginato e a quitosana para formação do complexo alginato-quitosana (WANG, 2006).

Outro método de imobilização é a ligação covalente, que tem a vantagem de a enzima fixar-se firmemente ao suporte, minimizando problemas de possíveis ocorrências de contaminação do produto pela enzima. Assim, dá-se preferência à imobilização covalente quando se trabalha com solução aquosa e quando existem fatores que podem provocar a desnaturação do derivado (HANEFELD et al., 2009). Também de acordo com Hanefeld et al. (2009), uma desvantagem da ligação covalente é que a enzima é quimicamente modificada, pois os grupos amino da enzima são utilizados para a imobilização covalente. (HANEFELD et al., 2009).

A imobilização de enzimas, por ligação covalente multipontual (Figura 3), em suporte glicil-agarose apresenta um método de imobilização que é bastante diferente dos métodos mais populares, pois envolvem três etapas principais: ativação do suporte, bloqueio dos grupos reativos restantes e imobilização da enzima (GUISÁN, 1997). Além disso, este pode ser um dos métodos mais eficientes pela capacidade de se autodirigir pelas áreas da enzima que são mais ricas em grupos reativos (BOLÍVAR et al., 2006).



Figura 3 – Imobilização da enzima por ligação covalente multipontual: enzima ligada ao suporte por vários braços espaçadores (GUISÁN, 2006).

Segundo Mateo et al. (2006), o suporte glioxil-agarose é formado por fibras de agarose bastante espessas, contendo um grande número de grupos aldeído muito estáveis ligados ao suporte por meio de braços de espaçamento muito curtos, que aumentam a rigidez da enzima. Os grupos glioxil com os grupos amino não-ionizados possuem reatividade muito elevada. Devido à alta estabilidade dos grupos glioxil, a interação entre enzima-suporte e o tempo de armazenamento podem ser muito longos.

A ligação entre a enzima e o suporte é por bases de Schiff muito fracas (grupos imina). Uma característica distinta deste suporte é a redução com boro-hidreto de sódio, que transforma as bases de Schiff fracas em ligações amino secundários muito estáveis e todos os aldeídos restantes no suporte em grupos hidroxil.

De acordo com Guisán (1997), a estabilidade do glioxil-agarose faz com que a gama de aplicações práticas possíveis do suporte seja bastante aumentada e as concentrações de grupos glioxil do suporte, depois de ativado (Figura 4), permaneça constante em armazenamento à 4°C durante 1 ano (GUISÁN, 1997). Também segundo Guisán (1997), estas propriedades permitem a imobilização de uma grande quantidade de enzima por unidade de volume de suporte.

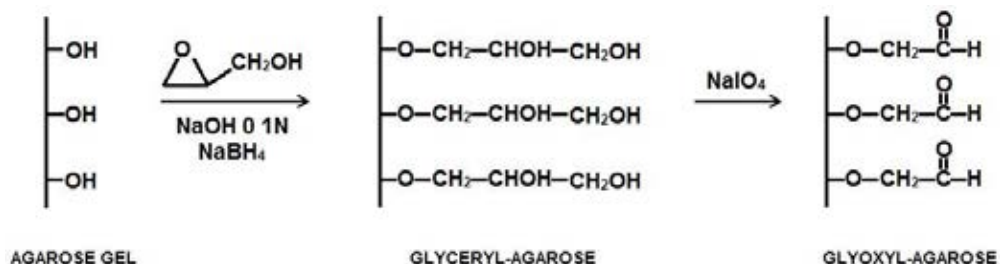


Figura 4 – Esquema da ativação do gel de agarose, formação dos grupos gliceril e oxidação dos gliceril para formação de glioxil (GUISÁN, 1997).

De acordo com Mateo et al. (2006), o objetivo principal da imobilização de enzimas é a reutilização de biocatalisadores por longos períodos de tempo, sob condições industriais. As vantagens da imobilização enzimática são o aumento da estabilidade da enzima, o seu reaproveitamento no processo catalítico, tornando esse processo contínuo, devido à estabilidade. Sua desvantagem principal é a falta de um método geral para imobilização e o alto grau de pureza da enzima antes de ser imobilizada.

Algumas enzimas são mais utilizadas nos processos biotecnológicos industriais, como por exemplo, as enzimas desidrogenases.

A álcool desidrogenase (ADH) pertence ao grupo das oxidoreduktases, é uma holoenzima (dependente do cofator NADH) e possui nomenclatura científica EC 1.1.1.1. Uma das fontes mais comuns da ADH é o fermento de pão, onde a enzima é produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A ADH participa da oxidação do etanol, convertendo-o em acetaldeído e o NADH é formado como produto da oxidação da coenzima NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), que funciona como aceptor de elétrons. A ADH também é produzida por animais, localizado no citosol dos hepatócitos e atua no metabolismo do álcool quando este é ingerido. A figura 5 demonstra como ocorre esse metabolismo dentro de uma célula (*in vivo*),

que é o mesmo processo da formação de acetaldeído a partir de etanol no meio extracelular a partir da utilização de ADH e NAD^+ .

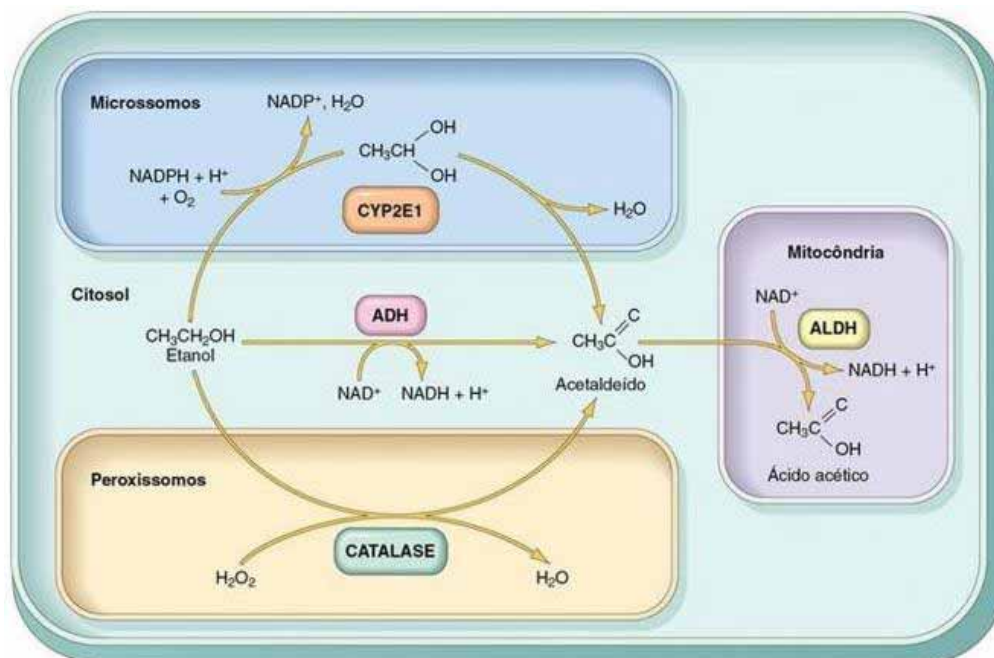


Figura 5 – Formação de acetaldeído a partir do metabolismo do álcool na presença da enzima álcool desidrogenase e do cofator NAD^+ dentro da célula (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A principal limitação do uso industrial das desidrogenases é a sua baixa estabilidade. (BOLÍVAR et al., 2012). Algumas ferramentas são utilizadas para tentar aumentar a estabilidade da enzima, e a imobilização possui as vantagens já descritas, como a reutilização e aumento da produtividade da enzima. As enzimas pertencentes ao grupo das desidrogenases têm sido largamente aplicadas na tecnologia de biossensores por apresentarem uma elevada especificidade, e quando imobilizadas, são bastante utilizadas (BOLÍVAR et al., 2006). Por esta razão vários protocolos de imobilização da álcool desidrogenase são descritos (BOLÍVAR et al., 2006; BOLÍVAR et al., 2012; CAI et al., 1997; CASELI et al., 2009; DEHDAST et al., 2010; LEE e TSAI, 2009; PETKOVA et al., 2012; ZHOU et al., 2010). Assim, é de

considerável interesse a utilização de novos protocolos para tentar a estabilização da álcool desidrogenase para fins industriais.

REFERÊNCIAS

BOLÍVAR, Juan Manuel; WILSON, Lorena; FERRAROTTI, Susana Alicia; GUISÁN, José Manuel; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MATEO, Cesar. Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalente immobilization on glyoxyl-agarose. **Journal of Biotechnology**, 125: 85-94, 2006.

BOLÍVAR, Juan Manuel; ROCHA-MARÍN, Javier; MATEO, Cesar; GUISÁN, José Manuel. Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques. **Process Biochemistry**. 47: 679–686, 2012.

BON, Elba P. S.; FERRARA, Maria Antonieta; CORVO, Maria Luiza. Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. **Editora Interciência**. Rio de Janeiro, 2008.

CAI, Chen-Xin.; XUE, Kuan-Hong; ZHOU, Yi-Ming; YANG, Hui. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode. **Talanta**. 44: 339-347, 1997.

CASELI, Luciano; PERINOTTO, Angelo C.; VIITALA, Tapani; ZUCOLOTTO, Valtencir; OLIVEIRA, Osvaldo N. Jr. Immobilization of alcohol dehydrogenase in phospholipid langmuir-blodgett films to detect ethanol. **Langmuir**. 25: 3057-3061, 2009.

CHAPLIN, Martin. Enzyme Technology: Methods of immobilisation. London South Bank University. Agosto/2014. Disponível em: <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immethode.html>, acesso 24/11/2015.

DEHDAST, Seyed Ahmad; GHOURCHIAN, Hedayatollah; RAFIEE-POUR, Hossain-Ali. Alcohol dehydrogenase immobilization on functionalized carbon nano-tubes modified electrode. **Journal of Paramedical Sciences (JPS)**. v. 1, nº 3, 2010.

GUISÁN, José Manuel. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization–stabilization of enzymes. **Enzyme Microb. Technol.** 10: 375-382, 1988.

GUISÁN, José Manuel. Immobilization of Enzymes and Cells. **New Jersey: Humana Press Inc.** 1: 278, 1997.

GUISÁN, José Manuel. Immobilization of Enzymes and Cells. **New Jersey: Humana Press Inc.** v. 2, 2006.

HANEFELD, Ulf; GARDOSI, Lucia; MAGNER, Edmond. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Review**. 38: 453-468, 2009.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C.: **Robbins Patologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEE, Chen-An; TSAI, Yu-Chen. Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of etanol. **Sensors and Actuators B**. 138: 518-523, 2009.

LU, Yang; XU, Songwei; JIANG, Zhongyi; YUAN, Weikang; WANG, Ting. Diffusion of Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Calcium Alginate Hydrogel Beads Doped with Carbon and Silica Nanotubes. **J. Chem. Eng. Data**. 50: 1319-1323, 2005.

MATEO, Cesar; PALOMBO, José Manuel; FUENTES, Manuel; BETANCOR, Lorena; GRAZU, Valeria; LOPEZ-GALEGO, Fernando; PESSELA, Benevides C. C.; HIDALGO, Aurélio; FERNANDEZ-LORENTE, Glória; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GUISÁN, José Manuel. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. 39: 274-280, 2006.

MENDES, Adriano. A.; DE OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F.; GIORDANO, Raquel L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. 34: 831-840, nº5, 2011.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Sarvier, 4ª edição, 2006.

PETKOVA, Galina A.; ZÁRUBA, Kamil; KRÁL, Vladimír. Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1824: 792–801, 2012.

SAID, Suraia; PIETRO, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004.

WANG, Wei; LIU, Xiudong; XIE, Yubing; ZHANG, Hua'an.; YU, Weiting; XIONG, Ying; XIE, Weiyang; MA, Xiaojun. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. **Journal of Materials Chemistry**. 16: 3252-3267, 2006.

YU, Weiting; SONG, Huiyi; ZHENG, Guoshuang; LIU, Xiundong; ZHANG, Ying; MA, Xiaojun. Study on membrane characteristics of alginate–chitosan microcapsule with cell growth. **Journal of Membrane Science**. 377: 214-220, 2011.

ZHOU, Zhi-de; LI, Gui-yin; LI, Yuan-jian. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**. 47: 21-26, 2010.

CAPÍTULO 2

Enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* na análise da produção de bioetanol e imobilização em diferentes suportes.

Mariana Vendrasco Tacin, Romulo César Oliveira, Edwil Aparecida de Lucca Gattas*

Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 14801-902 Araraquara, SP. Tel.: (16) 3301-6929; Fax: (16) 3301-6920; e-mail: gattas@fctfar.unesp.br.

RESUMO

A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima de uso industrial e biotecnológico importante para quantificação de etanol em biocombustíveis e em bebidas, onde, em comparação com outros métodos, têm mostrado ser o mais eficaz. A melhora da estabilidade da enzima é feita pelo processo de imobilização. Os suportes de imobilização utilizados neste trabalho para tentar melhorar a estabilidade da ADH foram alginato-quitosana e glioxil-agarose. Os objetivos deste estudo foram encontrar um método enzimático capaz de determinar etanol quantitativamente e analisar um grande número de amostras de bioetanol de fermentação do caldo-de-cana com ADH livre, e imobilizar a ADH nos suportes citados e estudar a estabilidade da enzima frente a vários testes. Os resultados mostraram que houve interferência do pH na estabilidade das esferas de alginato-quitosana impossibilitando a utilização com o protocolo estabelecido no estudo. A ADH imobilizada em suporte glioxil-agarose apresentou estabilidade maior em maiores temperaturas e pH, mas não demonstrou boa estabilidade quando estocada. A determinação de etanol apresentou boa repetibilidade, permitindo a utilização da ADH livre em um kit de baixo custo, rápido e preciso para ensaios de concentração de etanol em bebidas e biocombustíveis.

Palavras-chave: álcool desidrogenase, enzima, *Saccharomyces cerevisiae*, produção de bioetanol

1. INTRODUÇÃO

As enzimas álcool desidrogenases - ADH (EC 1.1.1.1) são oxidoredutases que catalisam a oxidação reversível de álcoois a aldeídos e cetonas, com a concomitante redução de NAD^+ ou NADP^+ , e eles são comumente encontrados em bactérias, leveduras, plantas e animais (BRANDEN, 1975; GONCHAR, 2001).

O método espectrofotométrico é um dos mais simples, de baixo custo e mais versátil de todos os métodos para determinar etanol utilizando a enzima álcool desidrogenase. A eficiência dos processos enzimáticos é explorada industrialmente de modo que, economicamente e eficientemente, buscam-se maneiras que promovam resultados cada vez mais lucrativos e de melhor custo benefício. Para isto, os processos de imobilização são realizados a fim de aumentar o poder catalítico das enzimas e reunir as vantagens destes catalisadores químicos (SAID e PIETRO, 2004). Em geral, as enzimas não são muito estáveis em solução tampão, mas quando imobilizadas, a estabilidade é melhorada (DEHDAST et al., 2010; PETKOVA et al., 2012).

A imobilização de enzimas destina-se a obter um biocatalisador em que a atividade e a estabilidade não se alterem durante o processo enzimático, porque há menor interferência de inibidores/ativadores.

A imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual em glioxil-agarose é um método de imobilização diferente dos métodos mais populares, uma vez que envolvem três passos principais: a ativação do suporte, o bloqueio de grupos reativos e a imobilização da enzima (GUISÁN, 1997). Além disso, este pode ser um dos métodos mais eficazes pela capacidade de se autodirigir pelas áreas da enzima que são mais ricas em grupos reativos (BOLÍVAR et al., 2006).

O bioetanol convencional é definido como o etanol de primeira geração derivado de açúcares, amidos, óleo vegetal, ou de gorduras animais que utilizam a tecnologia convencional utilizada para transportar combustíveis como um substituto para os combustíveis fósseis (WALKER, 2010; BOROVIKONA et al., 2014). A cana de açúcar é praticamente a fonte exclusiva de matéria-prima para a produção de bioetanol no Brasil. Materiais à base de sacarose são predominantemente derivados da cana de açúcar (*Saccharum sp.*), constituem uma fonte de açúcar facilmente fermentável e a fermentação pode ser feita sem realização de hidrolises anteriores. Seus dissacarídeos podem ser metabolizados diretamente por enzimas presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (AMORIM, 2011).

A quantificação de etanol é importante para verificar o limite legal de porcentagem de etanol, ou sensorial de aceitação da sua utilização como combustível ou de bebidas, respectivamente (MATAIX e CASTRO, 2000). Além disso, uma outra razão importante para verificar a concentração de etanol é de ordem econômica, especialmente por causa das taxas cobradas para o etanol em diferentes países (YARITA et al., 2002).

Os métodos enzimáticos têm sido descritos como mais baratos, mais precisos e fácil de manusear (ZANON; PERES e GATTAS, 2006). Uma das principais metodologias enzimáticas usadas foi inicialmente descrito por Racker (1955), que se baseia na reação de oxidação de etanol catalisada pela enzima álcool desidrogenase, com a redução concomitante de NAD^+ . Neste processo, o NADH é medido a 340nm, que é proporcional à concentração de etanol metabolizado na reação.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi o de encontrar um método para determinar o etanol da fermentação do caldo-de-cana ou mesmo um controle

laboratorial, usando um protocolo rápido e confiável com a álcool desidrogenase (ADH) de *S. cerevisiae* e imobilizar a enzima ADH e estabelecer os parâmetros ótimos de reação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Material*

Etanol e ADH (A7011, de *Saccharomyces cerevisiae*) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, EUA), o gel de agarose (Sephacrose® CL 6B) foi adquirido da GE Healthcare Life Sciences. Todos os outros reagentes eram de grau analítico e foram utilizados tal como recebidos.

2.2. *Condições de fermentação*

Fermento de pão (correspondente à 25mg/mL de peso seco de levedura) produzido pela Fleischmann Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, foi usado como um iniciador na fermentação e cultivadas por 8h em condições estéreis a 30°C. As fermentações foram realizadas utilizando INFORS e HT-Minifors 5-L com 2,5L de meio de caldo-de-cana, e incubados a 120rpm. A oxigenação foi promovida pelo fluxo de ar (0.45vvm) a partir do compressor aplicado à base do reator e o pH inicial do meio foi de 4,5. O rendimento do produto foi calculado como a concentração de etanol produzido (g/L) em comparação com a massa de glicose metabolizada (fator 0,511). O experimento foi realizado em triplicata.

2.3. *Determinação de açúcares redutores totais, viabilidade celular e de biomassa*

O açúcar foi determinado utilizando o método descrito por Miller (1959). As amostras (0,5mL) foram hidrolisadas em HCl 2N durante 7min a 60°C e neutralizadas com NaOH à 2,4N. Variações (SD) no açúcar redutor total da cultura eram de $\pm 1,0\%$. A viabilidade das células foi determinada por coloração com azul de metileno (LEE et al., 1981). Variações (SD) na viabilidade das culturas foram $\pm 2,0\%$. A biomassa foi expressa em peso de células secas e foi determinado por espectrofotometria a 570nm (espectrofotômetro Ultrospec 2100, Amersham Bioscience). O fator de conversão foi 0,454mg células secas/mL, obtidos a partir de uma curva padrão de absorbância relativa ao peso seco da suspensão de células (7,21mg/mL).

2.4. *Determinação do etanol da fermentação de caldo-de-cana*

O etanol foi medido em amostras de cana fermentadas utilizando o método baseado na conversão enzimática de etanol a acetaldeído e NADH, através da reação de oxirredução, utilizando o coenzima NAD^+ como um aceptor de elétrons, descrito por Gattas et al. (2014). No ensaio de reação que se segue foi usado: 0,1mL de 0,015M NAD^+ ; 0,04mL de amostra convenientemente diluída; 2,76mL de tampão de pirofosfato de sódio 0,06M em pH 8,8 e 0,1mL de ADH comercial.

2.5. *Preparo e imobilização em diferentes suportes*

O suporte alginato-quitosana e a imobilização da ADH foram feitos como descrito por Zhou, Li e Li (2010). O suporte glioxil-agarose foi preparado como

previamente descrito por Guisán (1988) e a imobilização em suporte ativado foi preparado como previamente descrito por Bolívar et al. (2006).

2.6. Acompanhamento da imobilização da ADH no suporte glioxil-agarose

O acompanhamento do processo de imobilização no suporte glioxil-agarose foi feito em 70 minutos, retirando alíquotas, em tempos determinados, do controle (enzima em tampão de imobilização), da suspensão e do sobrenadante da solução contendo o suporte glioxil-agarose ativado e a solução enzimática para ser imobilizada.

2.7. A atividade enzimática dos ensaios com a álcool desidrogenase

A atividade de ADH foi analisada espectrofotometricamente de acordo com o aumento de absorbância a 340nm, promovida pela formação de NADH durante a oxidação do etanol (GATTAS et al., 2014). A mistura da reação continha 0,5mL de tampão de pirofosfato de sódio 0.060M em pH 8,5; 0,1mL de 0,015M NAD⁺; 0,1mL de solução de ADH; 0,1mL de etanol 3M e água destilada para final de 3,0mL. Reduções de NADH foram descartados do ensaio utilizando um branco de reação contendo todos os reagentes, exceto o substrato. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima formadora de um μ mol de NADH por minuto a 25°C, sob as condições especificadas. Nos ensaios de atividade da ADH imobilizada, foram utilizadas 5 esferas de enzima em alginato-quitosana e 5mg de ADH imobilizada em glioxil-agarose.

2.8. *Ensaio do efeito do pH e da temperatura.*

Os ensaios de variação do pH do meio reativo foram feitos na faixa de 6 a 10,5 para a enzima livre, e de 6 a 11 para enzima imobilizada. Para os ensaios de variação da temperatura de reação, as soluções utilizadas no ensaio enzimático foram estocadas nas temperaturas de 10 a 60°C para os ensaios com a enzima livre, e de 25 a 70°C para os ensaios com a enzima imobilizada. Neste ensaio de efeito da temperatura, a solução enzimática não foi incubada nas temperaturas como as demais soluções, mantendo-a em banho de gelo.

Com base nos dados obtidos no ensaio de temperatura, foi calculada a equação de Arrhenius, necessária conhecer a energia de ativação da enzima em relação à temperatura, utilizando a equação 1:

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

(equação 1)

onde k é a constante de velocidade; A é conhecida como a constante de Arrhenius; E_a corresponde à energia de ativação; R é a constante dos gases (8,314 KJ.mol⁻¹); T é a temperatura absoluta.

Teste similar ao do efeito da temperatura foi feito com a ADH imobilizada, estocando o derivado e as soluções da reação separadamente, por 20 minutos nas temperaturas de 10 à 60°C.

2.9. *Ensaio de estabilidade em diferentes temperaturas de estocagem.*

A estabilidade térmica ao decorrer do período de armazenamento da enzima foi determinada pela atividade em condições padrão de ensaio após a incubação da

solução de enzima livre por 70 dias a diferentes temperaturas (-18, 4 e 25°C) e da enzima imobilizada em temperatura de 4°C por 35 dias.

2.10. Ensaios com diferentes concentrações de substratos.

Os gráficos de variação de concentração de substratos (NAD^+ e etanol) foram feitos nas concentrações de NAD^+ de 50-1000 μM para a enzima livre e de 0,05-1,0mM para a enzima imobilizada. Os ensaios com diferentes concentrações de etanol foram feitos nas concentrações de 100-1000 μM para a enzima livre e de 50-3000mM para a enzima imobilizada.

Os parâmetros cinéticos foram calculados através das constantes de Michaelis e Menten, determinando os valores de K_m , $V_{\text{máx}}$ e R^2 , e plotados em Origin 8.

2.11. Ensaios com adição de sais metálicos.

Aos ensaios de atividade, foram adicionados 1mL de solução 100mM do sal metálico a ser analisado. Os sais utilizados foram sulfato de ferro II, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de amônia, sulfato de sódio, sulfato de alumínio e potássio, sulfato de cobre, cloreto de potássio, cloreto de cálcio e óxido de zinco.

2.12. Ensaios de reutilização do derivado.

No teste de reutilização do derivado, 10mg de ADH imobilizada em glioxil-agarose foram utilizados. Após cada teste, o suporte foi lavado com tampão de reação (pirofosfato de sódio pH 9,5) e utilizado novamente por 10 vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *A produção de bioetanol e quantificação utilizando ADH comercial livre*

Etanol é o metabolito principal típico cuja produção está firmemente ligada com o crescimento da célula de levedura. O problema com levedura é condicionado à fase de retardamento, o período de tempo após a sua inoculação em levedura uma nova forma quando não há crescimento mensurável (GRAHOVAC et al., 2011). A adição de grandes quantidades de células no início do crescimento minimiza este problema e acelera a produção de etanol, com redução do tempo de fermentação utilizando cana. Os resultados mostrados na figura 1 indicam que o aumento da biomassa (taxa de 2,37g/L.h), enquanto que o conteúdo de açúcar fermentável decresceram significativamente durante as primeiras 3h de fermentação. O teor de açúcar residual é desprezável ao fim de 8h, sugerindo que seja o tempo de duração do processo. Os níveis de aumento de etanol durante 6h e os mais altos níveis de etanol na média foi $45,86 \pm 0,34$ g/L. Afigura-se que, durante o crescimento e fermentação, o crescimento diminui com o tempo (após 3h) e a formação de etanol é chegou ao máximo. Variações (SD) na viabilidade das culturas foram de $\pm 4,0\%$ (dados não mostrados).

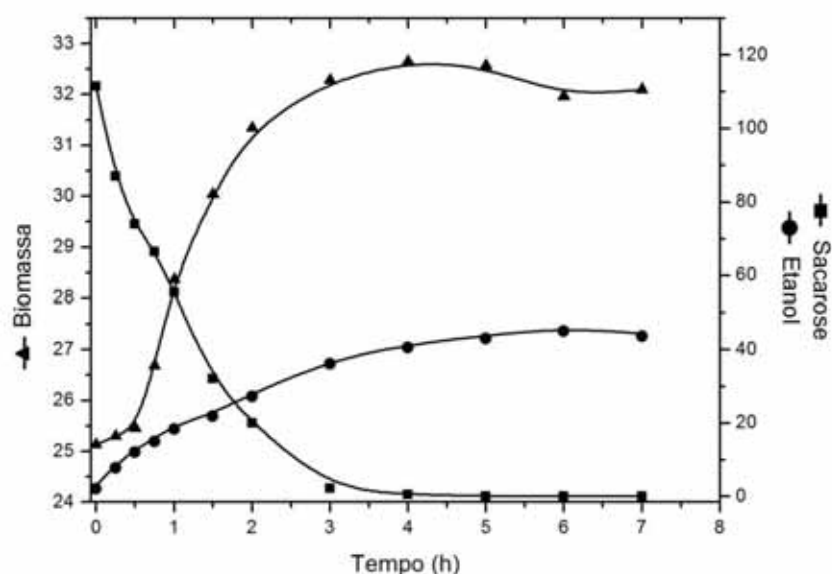


Figura 1 – Tempos de formação de (●) etanol e (▲) biomassa, e (■) açúcares consumidos pelo fermento de pão durante 8h de fermentação. Cada ponto representa a média de duas determinações.

Seguindo o protocolo estabelecido por Bonnichsen e Bergmeyer (1965), o método de quantificação de etanol utilizando a ADH comercial livre, mostrou sensibilidade na concentração mínima de etanol ensaiadas $100\mu\text{M}$ ($4,9 \times 10^{-3}$ g/L) e um limite superior de $500\mu\text{M}$ ($2,4 \times 10^{-2}$ g/L) (Figura 2), que indicava que a enzima comercial pode ser usado em um kit para determinação de etanol. A quantificação de etanol no tempo diferente de fermentação do caldo-de-cana também foi realizada utilizando o mesmo protocolo apresentado, com a utilização de $0,5\mu\text{L}$ de ADH comercial, mostrado na Figura 1.

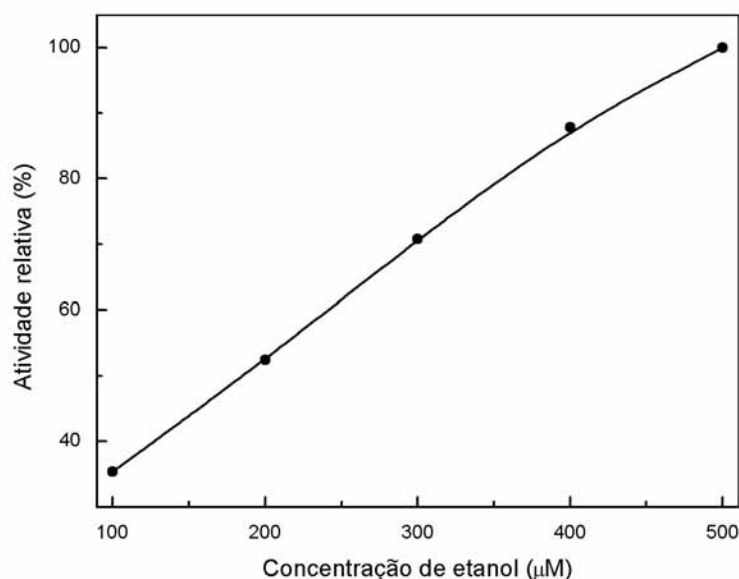


Figura 2 – Curva padrão do etanol.

De modo a verificar a precisão do método proposto, as concentrações de etanol ($100\mu\text{M}$) foram adicionadas ao meio de fermentação e as recuperações obtidas estão entre 96-102%. O estudo da precisão do método foi determinado utilizando medidas no mesmo dia com soluções de etanol 3M.

O bioetanol é produzido no Brasil a partir de uma ampla gama de matérias-primas, que inclui suco de cana de açúcar, melaço e recursos celulósico, como o bagaço de cana. Determinação da concentração de etanol durante o processo de fermentação, utilizando uma metodologia simples, com condições rápidas e precisas, de baixo custo-benefício, são muito interessantes. Além disso, a determinação de etanol em bebidas alcoólicas, drogas e combustível é muito importante para aumentar o rendimento dos processos de produção e qualidade do produto. Vários métodos podem ser usados para a determinação de etanol, incluindo metodologias cromatográficas e métodos amperométricos (MONOSIK et al. 2012), e espectrofotometria (ZANON; PERES e GATTAS, 2007). Os métodos clássicos, tais como cromatografia gasosa, por HPLC ou espectrometria de massa, são muito mais

caros (SALGADO et al., 2000). Usando um método de determinação de etanol, recentemente desenvolvido no nosso laboratório (GATTAS et al., 2014), este estudo foi realizado contendo culturas agitadas, para as condições iniciais 112 g/L de cana de açúcar, de pH em 4,5, à temperatura a 30°C e 25,0 g/L de levedura de pão. A produção de etanol em condições experimentais aplicadas foi $45,41 \pm 1,36$ g/L, correspondente à 79,4% do rendimento teórico, em comparação com a massa de glicose metabolizada (fator 0,511), depois de 8h. O conteúdo máximo de etanol é atingida após 50 horas de fermentação usando melaço, correspondente à 88% do rendimento teórico, obtido por Grahovac et al. (2011).

Assim, são necessários métodos econômicos sensíveis, confiáveis e, analíticos para a quantificação de etanol para análise de rotina. O desenvolvimento de kits enzimáticos que ofereçam alta estabilidade e atividade operacional é um desafio para a indústria. Os parâmetros analíticos dos procedimentos de validação: precisão analítica, linearidade, limite de detecção e quantificação, foram estudados.

Para isso, a otimização dos parâmetros de cinética da enzima são muito importantes. Assim, a avaliação do modo como a quantidade de enzima, NAD^+ e da concentração de substrato na reação influencia a atividade enzimática foi realizada antes da determinação de bioetanol. As condições dos ensaios foram as preparações enzimáticas diluídas 30 vezes, em solução tampão pH 8,5 e temperatura de 35°C.

3.2. *Ensaio enzimático de imobilização da ADH em suporte de alginato-quitosana*

O primeiro método de imobilização utilizado foi em suporte alginato-quitosana. Após a imobilização da enzima neste suporte, o ensaio enzimático foi feito baseado

no protocolo de Zhou et al. (2010), com alteração do tampão, utilizando o mesmo da enzima livre (pirofosfato de sódio pH8,5). O ensaio foi levado à agitação, de modo que houvesse uma maior homogeneização do substrato e derivado. Notou-se que, sob agitação por até 1 hora, a solução tornou-se turva e as leituras de absorbância sem condições de leitura. Outro ensaio foi realizado alterando o tampão pirofosfato de sódio pH 8,5 por Tris-HCl 50mM pH 7,0, o mesmo utilizado por Zhou et al. (2010). A adição de Tris-HCl 50mM pH7,0, sem agitação do meio reativo não ativou a enzima e com agitação, a atividade da ADH foi de 0,75U/mL (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade da enzima ADH imobilizada em suporte alginato-quitosana em diferentes soluções tampão.

Suporte	Solução tampão	Atividade enzimática	
		Sem agitação	Com agitação
Alginato-quitosana	Pirofosfato de sódio pH 8,5	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00
	Tris-HCl pH 7,0	0,02 ± 0,00	0,75 ± 0,01

Somente no ensaio com tampão pirofosfato de sódio, e com agitação, houve turbidez na cubeta devido à dissolução do derivado (enzima + suporte), o que sugere que o pirofosfato de sódio reagiu com alginato/quitosana, fazendo com que a estrutura das esferas se dissolvesse com o aumento do tempo de contato.

Um teste foi feito com esferas de alginato-quitosana contendo ADH imobilizada, separadas em três béqueres: um primeiro contendo tampão pirofosfato de sódio pH8,5; um segundo com etanol 3M e o terceiro com a mistura de pirofosfato de sódio pH8,5 e etanol 3M. Após alguns minutos, foi possível notar que as esferas dos béqueres contendo tampão sofreram mudança de coloração, enquanto que no béquer somente com etanol, não houve alteração perceptível das esferas. Após cerca de 30 minutos, observou-se a deformação da estrutura das

esferas e após 1 hora o derivado tinha sido completamente solubilizado no tampão pirofosfato de sódio.

Para demonstrar o processo de degradação das esferas, fotografias foram tiradas em microscópio estereoscópico Leica MZ APO, com câmara de luz e câmera acoplada. As fotos foram tiradas das esferas em água destilada (controle), em tampão e em etanol, em intervalos de 10 minutos, e foram numeradas de acordo com a ordem em que as fotos foram tiradas (Figura 3).

Notou-se que o derivado em etanol não apresentou alteração na estrutura após 40 minutos de armazenamento, comparadas às esferas deixadas em água destilada. Após 10 minutos de contato com pirofosfato de sódio pH 8,5, as esferas já apresentavam formação de um halo central, após 30 minutos houve deformação das bordas e aos 100 minutos, as esferas estavam quase totalmente solubilizadas.

Para identificar em qual faixa de pH a mudança na estrutura das esferas ocorria, 5 esferas foram incubadas em soluções de pirofosfato de sódio, nas faixas de pH de 2 a 11. O resultado mostrou que nas faixas de pH de 6 e 7 não houve alteração das esferas e em todas as outras, as esferas se solubilizaram após cerca de 1 hora de incubação, fato este que também foi observado por Lima e Vieira (2013) que relataram que o alginato pode sofrer influência em pHs ácidos, sofrendo clivagem hidrolítica, fato este que não ocorre tão rapidamente em soluções de pHs básicos, mas que também podem afetar a estrutura do alginato.

Outro teste foi feito para saber se as esferas solubilizadas em tampão liberariam as enzimas com ou sem atividade. Leituras de absorbância foram feitas de 10 em 10 minutos após incubação das esferas no pirofosfato de sódio pH 8,5 até 1 hora e em nenhum tempo de leitura foi encontrado atividade da ADH.

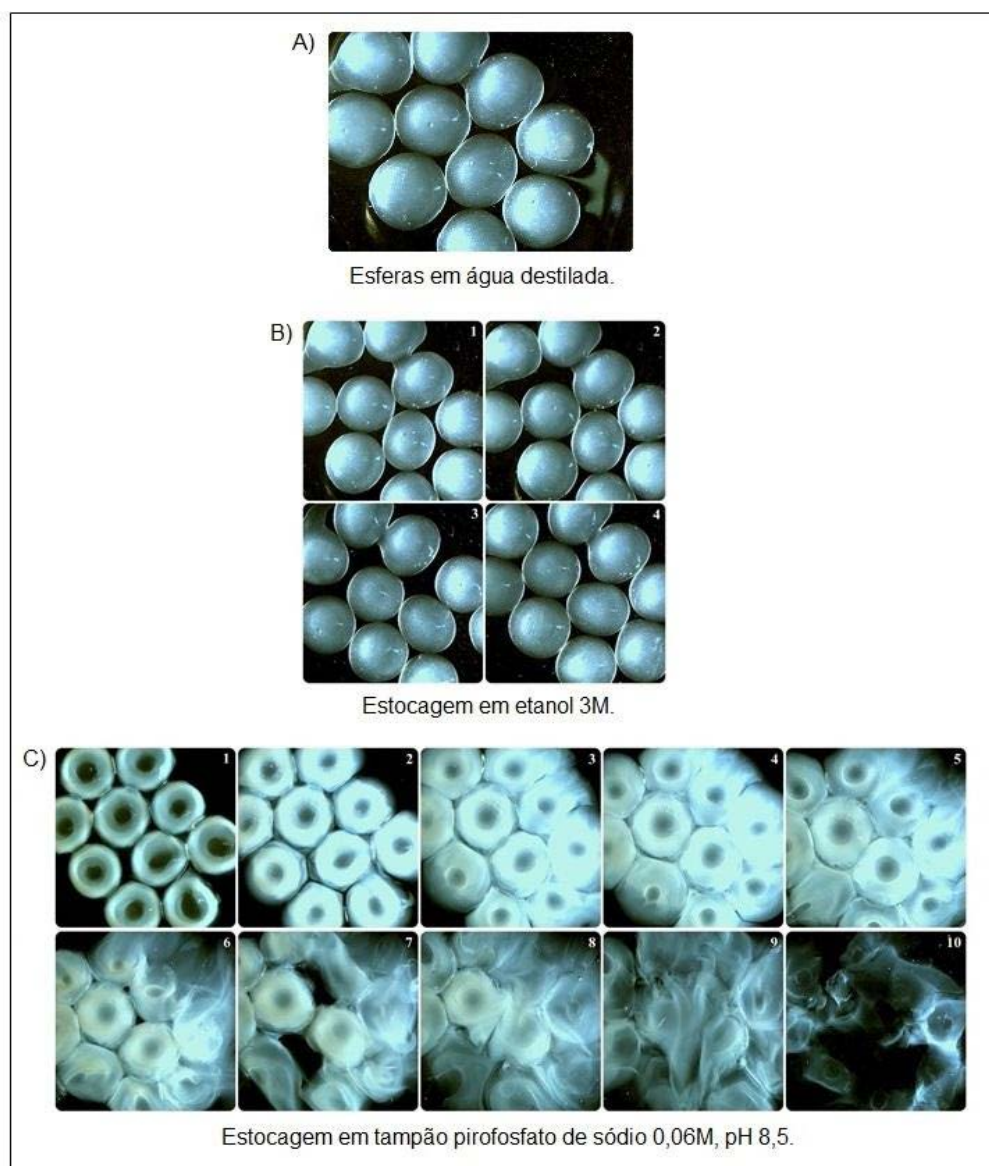


Figura 3 – Imagem das fotografias das esferas de alginato-quitosana, com ADH imobilizada, A) em água destilada, B) incubadas em etanol 3M e C) incubadas em solução tampão pirofosfato de sódio pH 8,5, para teste de estabilidade nas soluções. A numeração representa a ordem das fotos, tiradas a cada 10 minutos após incubação.

3.3. Imobilização da ADH em suporte glioxil-agarose

Houve queda de 20% da absorbância do controle no final dos 70 minutos de imobilização. As absorbâncias finais do controle e do sobrenadante obtiveram valores em faixas próximas (Figura 4). Esta queda da atividade da enzima pode ter relação com o fato do pH 10,0 do tampão utilizado na imobilização ter influenciado a estrutura e estabilidade da enzima. No ensaio de estabilidade em diferentes pHs,

mostrado posteriormente, a enzima sofreu queda de 46% na atividade nesta faixa de pH 10,0 (Figura 5-A), portanto, quando a ADH foi imobilizada em pH 10, a enzima pode ter perdido parcialmente a atividade.

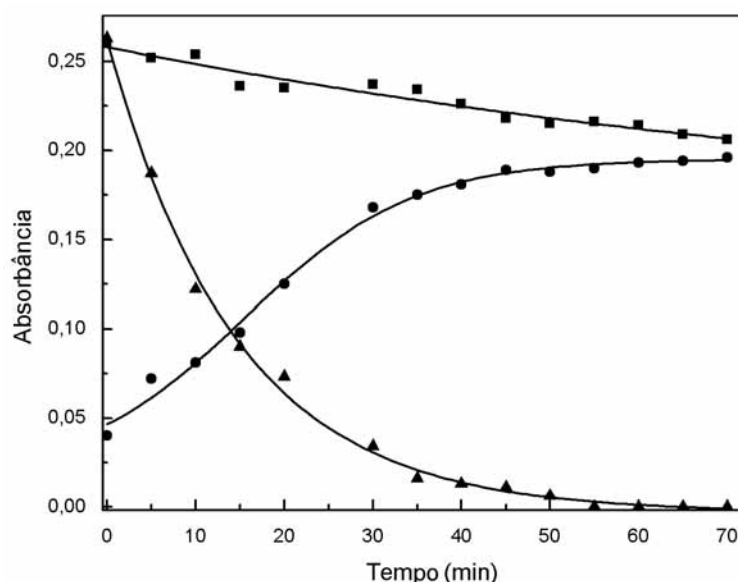


Figura 4 – Leituras de absorbância do processo de imobilização, de 5 em 5 minutos, do (■) Controle, (●) Suspensão e (▲) Sobrenadante.

3.4. Efeito do pH e temperatura

A figura 5 mostra as curvas de temperatura e pH ótimos para o ensaio de atividade da ADH livre e imobilizada. A atividade mais alta foi obtida na faixa de pH de 8-9 da ADH livre e 9-10 da ADH imobilizada em glioxil-agarose. Os resultados de pH coincidem com os dados reportados na literatura para enzima livre (ZANON; PERES e GATTAS, 2007) e da enzima imobilizada com a formação de um platô ótimo de pH (9-10), que também foi reportado por Bolívar et al. (2006). Segundo Cea et al. (2009), o aumento da atividade em pH próximo à 9 indica que, nessa faixa, a ADH produz uma reação de oxidação de prótons e como consequência, a redução de NAD^+ oxidado.

A temperatura ótima foi de 35°C e 55°C da ADH livre e imobilizada, respectivamente, em ensaios com temperaturas de 10 a 65°C.

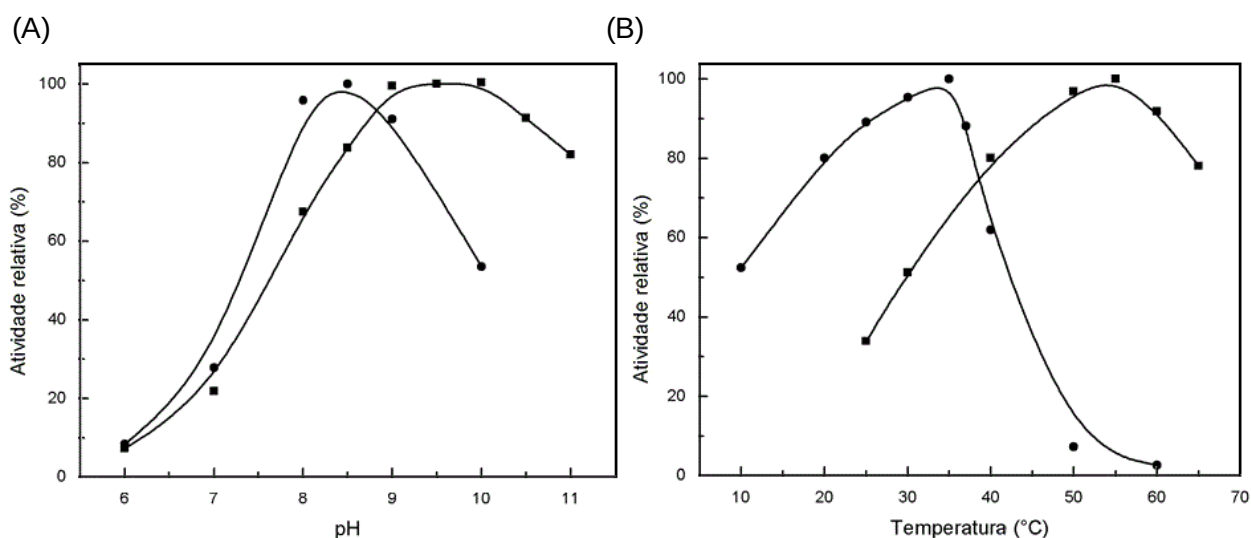


Figura 5 – Atividade relativa da enzima em função: (A) do pH e (B) da temperatura, da (●) ADH livre (■) ADH imobilizada.

A partir dos cálculos da equação de Arrhenius, os valores de energia de ativação encontrados foram 143,1 KJ.mol⁻¹ e 783,7 KJ.mol⁻¹, para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. A energia de ativação elevada da enzima imobilizada demonstra que houve aumento da barreira de energia fazendo com que a enzima imobilizada necessite de uma temperatura elevada para que atinja sua maior atividade (LI et al., 2008).

Os resultados obtidos a partir do teste onde o derivado foi estocado nas temperaturas de incubação separadamente dos demais reagentes estão representados no gráfico da figura 6.

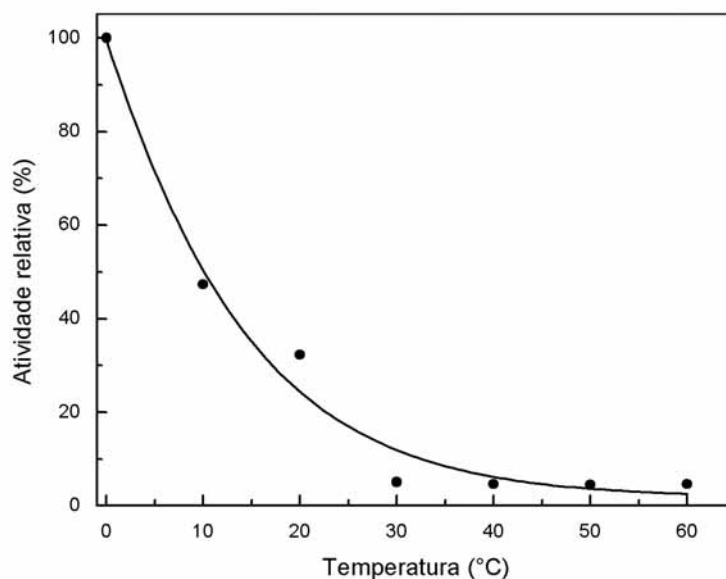


Figura 6 – Atividade relativa da ADH imobilizada em glioxil-agarose após estocagem em temperaturas de 10 à 60°C por 20 minutos.

Houve queda da atividade da ADH imobilizada em 52% quando encubada em 10°C, 68% em 20°C, e em 30°C a média de atividade manteve-se em 4,7% até 60°C.

3.5. Estabilidade em temperatura de estocagem

Após a estocagem, a ADH livre perdeu totalmente a atividade em 7 dias quando mantida a 25°C. A atividade relativa da enzima armazenada a 4°C foi de 20% e, quando mantida a -18°C, apresentou 70% da atividade enzimática em 20 dias e manteve-se constante até o final dos 70 dias. A enzima imobilizada em glioxil-agarose mostrou uma atividade relativa de 20% no final dos 35 dias de estocagem à 4°C (Figura 7).

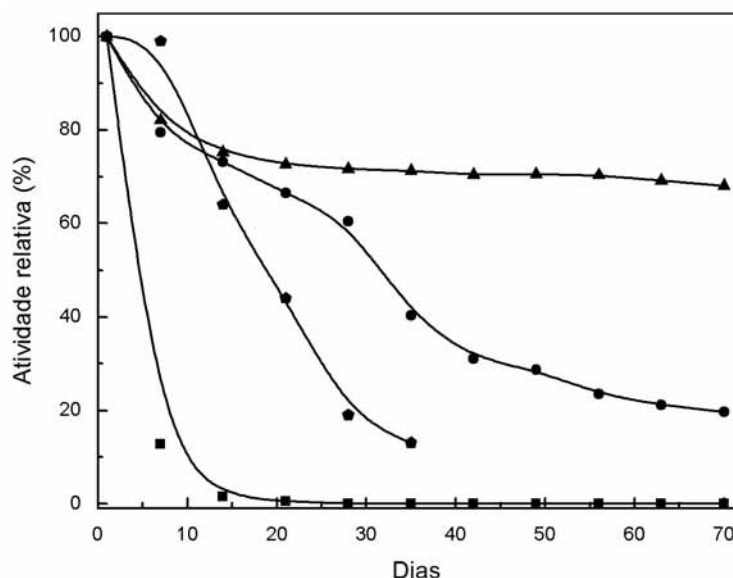


Figura 7 – Atividade relativa das amostras de soluções enzimáticas, estocadas em (■) ADH livre em 25°C, (●) ADH livre no refrigerador à 4°C, (▲) ADH livre no freezer à -18°C e (◆) ADH imobilizado no refrigerador à 4°C.

3.6. Concentração de substratos e parâmetros cinéticos

Os gráficos das concentrações dos substratos, NAD^+ e etanol, foram feitos para enzimas livre em micromol e para enzimas imobilizadas em milimol, devido à maior sensibilidade do método quando a enzima estava livre no meio de reação.

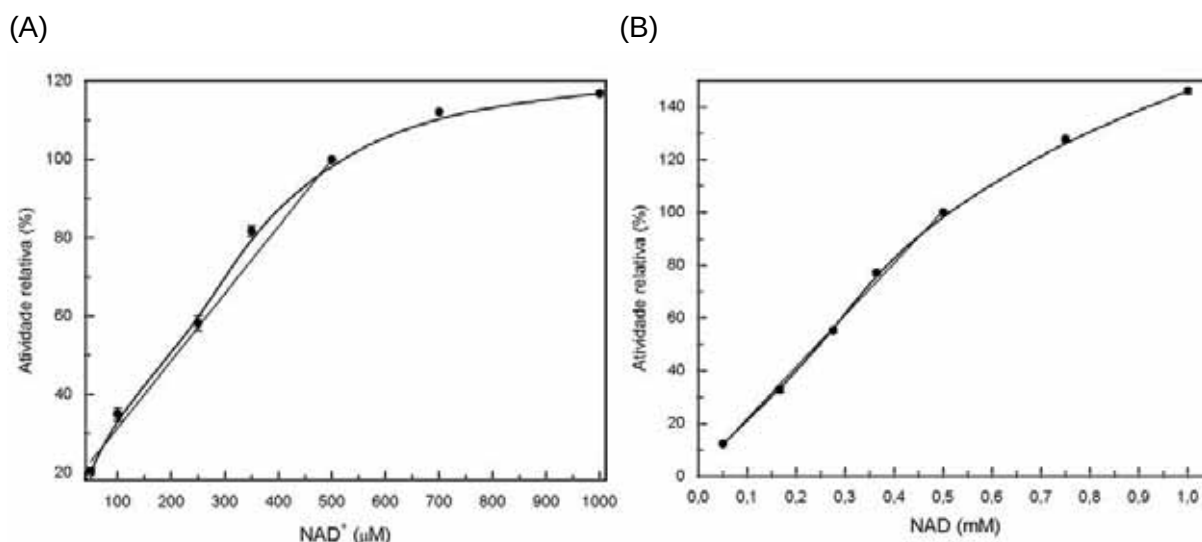


Figura 8 – Efeito da concentração de NAD^+ sobre a atividade da ADH (A) livre e (B) imobilizada.

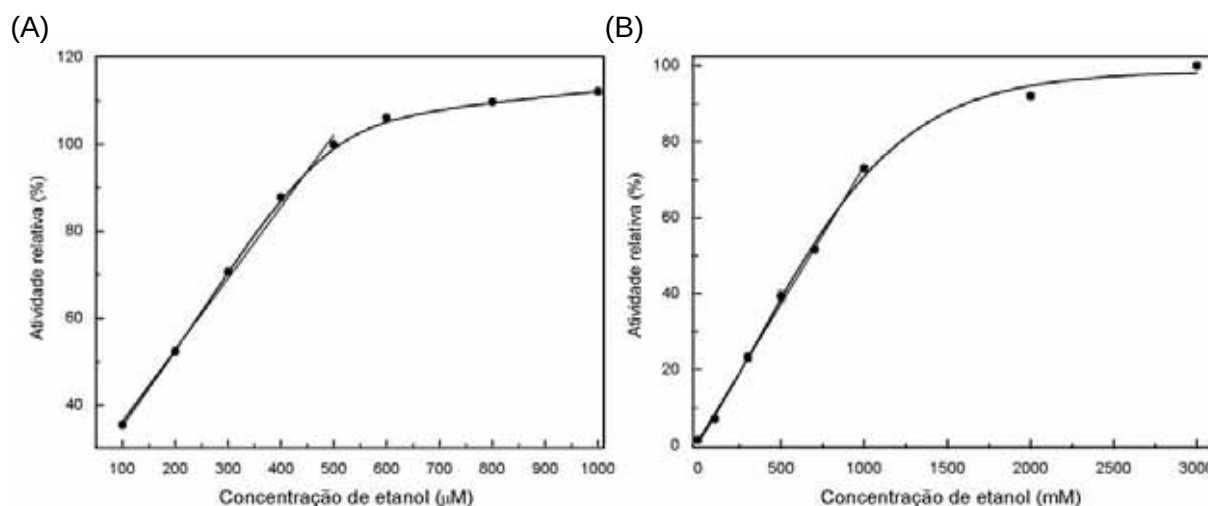


Figura 9 – Efeito da concentração de etanol sobre a atividade da ADH (A) livre e (B) imobilizada.

A determinação de K_m e V_{max} foi feita por meio da constante de Michaelis-Menten e plotados Origem 8 (Tabela 2). Os dados obtidos da cinética enzimática, do NAD^+ e do etanol, através dos valores de K_m , mostraram maior afinidade entre enzima-substrato na enzima livre.

Tabela 2 – Cálculos da cinética de Michaelis-Menten dos substratos, NAD^+ e etanol.

	NAD^+			ETANOL		
	K_m	V_{max}	R^2	K_m	V_{max}	R^2
Free ADH	0,0119	0,0694	0,9949	0,0083	0,0503	0,9955
Immobilized ADH	0,0114	0,4474	0,9980	0,0580	0,8012	0,9983

3.7. Adição de sais de metais

A adição de diferentes metais no ensaio com a álcool desidrogenase foi realizada, mas não foi observado efeito ativador na enzima livre. A enzima imobilizada foi ativada quando adicionados sais metálicos e promoveu um aumento da atividade com cloreto de potássio, sulfato de manganês e sulfato de magnésio

(Figura 10). O óxido de zinco formou precipitado no teste com a enzima livre, mas pode ser medido no ensaio com a enzima imobilizada.

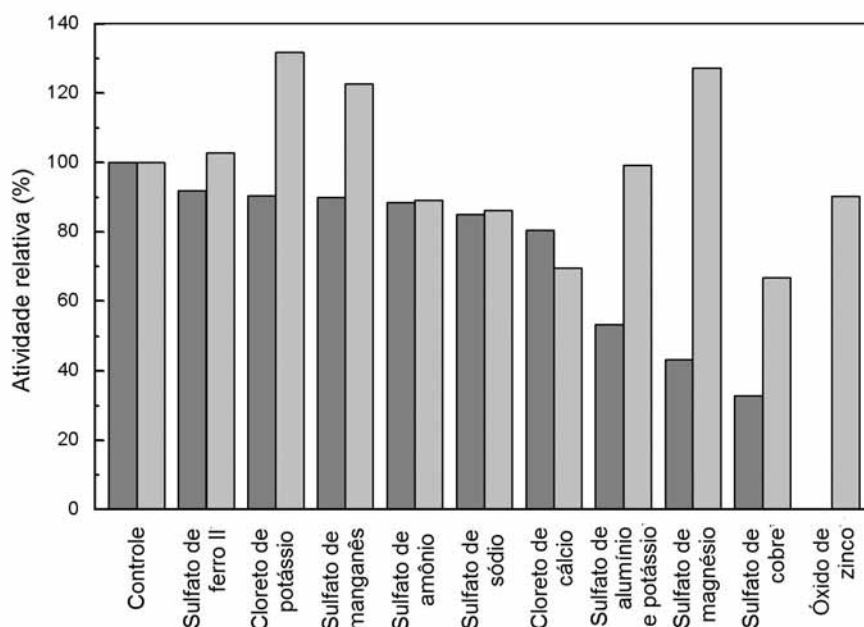


Figura 10 – Atividade relativa do controle (sem adição de sais metálicos) em comparação aos ensaios com adição de sais metálicos: ■ enzima livre e ■ enzima imobilizada.

Os resultados referentes à enzima livre também foram reportados por Zanon et al. (2007) em que cita que também não houve ativação da enzima após adição dos sais metálicos ao ensaio.

3.8. Reutilização de enzima imobilizada

Após 4 ciclos, o derivado manteve-se com 89% da atividade enzimática em relação ao primeiro ensaio. Ao final dos 10 ciclos, 68% da atividade da enzima foi mantida (Figura 11).

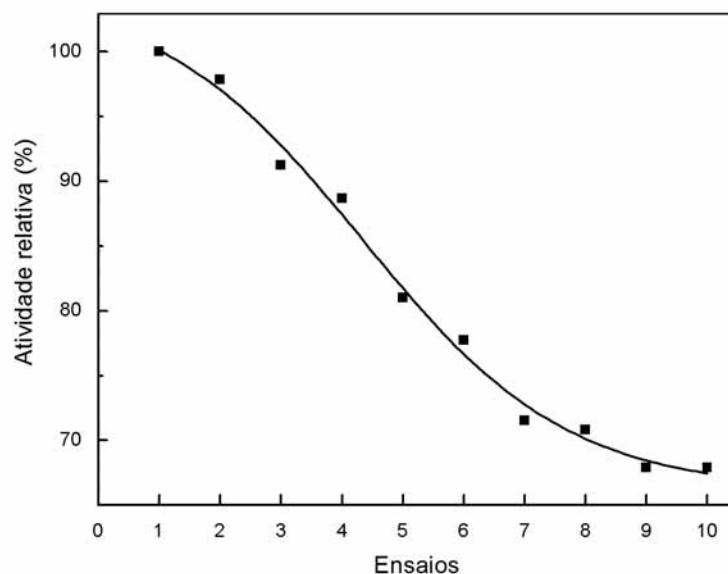


Figura 11 – Atividade relativa após reuso do derivado.

Um dos motivos pelo interesse na imobilização de enzimas, como já dito anteriormente, é em reutilizar o derivado, baixando custos da produção com o reaproveitamento de enzimas. Sendo assim, uma das possibilidades de se manter a atividade da enzima por vários ciclos, seria a utilização de ativadores. O ensaio de adição de sais metálicos (figura 10) pode ser utilizado como referencia à alternativa na ativação da enzima imobilizada, visto que com a adição dos sais de cloreto de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de manganês, o aumento da atividade foi de mais de 20% em relação ao controle.

4. CONCLUSÕES

Todas as características apresentadas pela álcool desidrogenase comercial para determinação de etanol presente no meio de fermentação mostraram boa repetitibilidade e a análise usando o método aqui otimizado, permite a utilização desta enzima em um kit desenvolvido em nosso laboratório. Levando em consideração que os métodos mais comuns para dosagem do etanol são muito mais caros e exigem um maior treinamento e técnica anterior à prática, o kit para dosagem de etanol por espectrometria apresentado no presente trabalho pode ser utilizado de forma rápida, precisa, de baixo custo, facilitando a dosagem de etanol em bebidas e biocombustíveis.

A ADH imobilizada em suporte glioxil-agarose apresentou estabilidade superior em testes de temperatura, pH e adição de sais metálicos ao ensaio, comparada à enzima livre, porém sua estabilidade de estocagem não foi satisfatória, podendo ser testados, em outros estudos, a utilização de estabilizantes/conservantes para aumentar a estabilidade deste derivado, como por exemplo o uso dos sais metálicos que promoveram o aumento da atividade relativa da enzima, como ativadores nos ensaios enzimáticos.

Faixas de pH ácido e básico das soluções de pirofosfato de sódio influenciaram na estrutura e consequente hidrólise das esferas de alginato-quitosana quando colocadas sob contato, mostrando que, para o protocolo utilizado para dosagem de etanol, não é um bom método de imobilização, devido ao pH 10 utilizado no protocolo de imobilização.

REFERÊNCIAS

- AMORIM HV, LOPES ML, OLIVEIRA JVC, BUCKERIDGE MS, GOLDMAN GH (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 1267-1275
- BENNETT C (1971) Spectrophometric acid dichromate method for the determination of ethil alcohol. *Am J Med Technol* 37: 217-220
- BOZKURT SS, MERDIVAN E, BENIBOL Y (2010) A fluorescent chemical sensor for ethanol in alcoholic beverages. *Microchim Acta* 168: 141-145
- BRANDÉN CI, JOMVALL H, EKLUND H, FURUGREN B. In: BOYER PD. (1975) *Methods in enzymology*. Elsevier Academic Press 11: 104-190
- BOLÍVAR JM, WILSON L, FERRAROTTI SA, GUISÁN JM, FERNANDEZ-LAFUENTE R, MATEO C (2006) Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalente immobilization on glyoxyl-agarose. *Journal of Biotechnology* 125: 85-94
- BONNICHESEN R in: BERGMAYER U (1965) *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press 285-287
- BOROVIKONA D, SCHERBAKA R, PATMALNIEKS A, RAPOPORT A (2014) Effects of yeast immobilization on biethanol production. *Biotechnol Appl Biochem* 61: 33-39
- CEA G, WILSON L, BOLÍVAR JM, MARKOVITS A, ILLANES A (2009) Effect of chain length on the activity of free and immobilized alcohol dehydrogenase towards aliphatic alcohols. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 135–138
- DEHDAST SA, GHOURCHIAN H, RAFIEE-POUR HA (2010) Alcohol dehydrogenase immobilization on functionalized carbon nano-tubes modified electrode. *Journal of Paramedical Sciences (JPS)* v. 1, nº 3
- GATTAS EAL, RIBEIRO MHL, PERES MFS (2014) Improvement of the alcohol dehydrogenase from baker's yeast using polymers and salts for alcohol determination in beverages. *J Food Agr Env* 12: 80-83
- GONCHAR MV, MAIDAN MM, PAVLISHKO HM, SIBIRNY AA (2001) A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol Biotechnol* 39: 37-42
- GRAHOVAC JA, DODIC' JM, DODIC' SN, POPOV SD, JOKIC' AI, ZAVARGO Zoltan Z (2011) Optimization of bioethanol production from intermediates of sugar beet processing by response surface methodology. *Biomass and Bioenergy* 35: 4290-4296
- GUISÁN JM (1988) Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization–stabilization of enzymes. *Enzyme Microb Technol* 10: 375-382

GUISÁN JM (1997) Immobilization of Enzymes and Cells. New Jersey: Humana Press Inc. 1: 278

KITAGAWA Y, KITABATAKE K, SUDA M, MURAMATSU H, ATAKA T, MORI A, TAMIYA E, KARUBE Isao (1991) Amperometric detection of beer using a flow cell and immobilized alcohol dehydrogenase. *Anal Chem* 63: 2391-2393

LI GY, HUANG KL, JIANG YR, YANG DL, DING P (2008) Preparation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 42: 405–412

LEE SS, ROBINSON FM, WANG HY (1981) Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol Bieng Symp* 11: 641-649

LIMA LD, VIEIRA RS (2013) Estabilidade do alginato: efeitos da força iônica. 12º Congresso Brasileiro de Polímeros (12ºCBPol)

MATAIX E, CASTRO MDL (2000) Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection. *Talanta* 51: 489-496

MILLER GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428

MONOSIK R, STREDANSKY M, TKAC J, STURDIK E (2012) Application of enzyme biosensors in analysis of food and beverages. *Food Anal Methods* 5: 40-53

PETKOVA GA, ZÁRUBA K, KRÁL V (2012) Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 792–801

RACKER E (1955) Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. In: Colowich, S.P., Kaplan N.O (Eds.). *Methods in enzymology* 1: 500-503

SAID S, PIETRO RCLR (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa

SALGADO AM, FOLLY ROM, VALDMAN B, COS O, VALERO F (2000) Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotechnol Lett* 22: 327-330

SEO HB, KIM HJ, LEE OK, HA JH, LEE HY, JUNG KH (2009) Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 285-292

WALKER GM (2010) Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol, 144p, Graeme M Walker & Ventus Publishing ApS

YARITA T, NAKAJIMA R, OTSUKA S, IHARA T, TAKATSU A, SHIBUKAWA M (2002) Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-performance liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as mobile phase. J Chromatography A 976: 387-391

ZANON JP, PERES MFS, GATTAS EAL (2007) Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. Enzyme Microbial Tech 40: 466-470

ZHOU ZD, LI GY, LI YJ (2010) Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. International Journal of Biological Macromolecules 47: 21-26