



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE DE *ASPERGILLUS NIGER* C E 11T53A14 IMOBILIZADAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

TAVARES HG¹, TERZI SC², SOUZA EF², GOTTSCHALK LMF², TONON RV² e
BRIGIDA AIS^{2,3*}

¹ Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste-UEZO

² Embrapa Agroindústria de Alimentos

³ Embrapa Agroindústria Tropical

E-mail para contato: ana.iraiddy@embrapa.br

RESUMO – *O presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar lipases de Aspergillus niger C e 11T53A14 immobilizadas por gelificação iônica. Utilizando p-nitrofenil octanoato como substrato, foram avaliados o pH ótimo de reação, especificidade frente a p-nitrofenil ésteres e estabilidade operacional. A lipase de A. niger C immobilizada só apresentou atividade para pH 7 e 6, teve maior afinidade para C4 e perdeu 60% da atividade inicial após o 1º ciclo e posteriormente manteve constante. Quanto a lipase de A. niger 11T53A14 immobilizada esta apresentou atividade para pH 7 e 6, teve maior afinidade para C4 e C18 e perdeu cerca de 95% da atividade inicial após o 5º ciclo.*

1. INTRODUÇÃO

As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais de diversas áreas e podem ser encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Castro,2004), além do que, possuem ampla especificidade para substratos (Dalla-Vecchia, 2004). Enzimas isoladas ou purificadas possuem muitas propriedades que tornam seu uso atrativo, dentre eles: alta eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de uma reação a 10 vezes), seletividade, atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C) e em pressão atmosférica, sendo preferível para uso como catalisadores em biotransformações (Castro,2004).

As enzimas estão sujeitas à inativação quando estocadas ou durante o uso, por alguns fatores como químicos, físicos ou biológicos. Para que não ocorra inativação da lipase, fazendo com que diminua a eficiência de um determinado processo, tem-se estudado métodos de imobilização que promovam a estabilidade das enzimas, facilitando as reações e facilitando também sua recuperação e reutilização (Dalla-Vecchia, 2004).

Neste cenário, o presente trabalho teve por objetivo obter e caracterizar lipases de *Aspergillus niger* C e 11T53A14 immobilizadas por gelificação iônica quanto ao pH ótimo de reação, especificidade e estabilidade operacional, esperando-se obter um derivado ativo e estável para aplicar em reações de hidrólise.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Produção de lipase

Os extratos enzimáticos lipolíticos foram produzidos através de fermentação em estado sólido (utilizando torta de dendê como substrato) pelos fungos *Aspergillus niger* C e *Aspergillus niger* 11T53A14, da Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia, da Embrapa Agroindústria de Alimentos. A fermentação foi conduzida em colunas aeradas, incubadas em banho-maria a 32 °C e com entrada controlada de ar não umedecido de 1,0 vvm por 96 horas. Os fungos foram inoculados em cada coluna contendo 40g de meio (torta de dendê umidificada com 80 mL de solução de sulfato de amônio e com adição de 3% de borra de dendê como indutor). A enzima foi extraída com a adição de 2,5 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por grama de meio fermentado, permanecendo por 1 hora sob agitação de 90 rpm a 32 °C. O extrato enzimático bruto foi obtido após filtração com papel de filtro seguido de filtração em membrana de microfiltração (0,45 µm) para posterior determinação da atividade enzimática.

2.2. Método de Imobilização

Para a formação das micropartículas por gelificação iônica (formação do encapsulado) foi adicionado 1,8% (m/v) de alginato de sódio em pó, sob agitação magnética e em temperatura ambiente, aos extratos enzimáticos líquidos. Em seguida, as micropartículas foram formadas a partir do gotejamento das soluções biopoliméricas utilizando uma seringa de 12 mL e *scalp* com calibre de 25 G (dispositivo de infusão intravenosa) sobre uma solução aquosa de CaCl₂ a 4% (m/v) adicionada de duas gotas de Tween 80 sob mínima agitação, com auxílio de um agitador magnético. Os géis recém-formados ficaram imersos sob agitação na solução de CaCl₂ durante 30 min para completa gelificação. Após este período as micropartículas foram coletadas por filtração e lavadas com cerca de 500 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7 para a remoção do excesso de cálcio e retirar possíveis lipases que não foram imobilizadas.

2.3. Atividade enzimática e características avaliadas

A reação de hidrólise de p-nitrofenil octanoato foi definida como a metodologia padrão para a medida de atividade hidrolítica no presente trabalho. Para tanto, acompanhou-se a hidrólise de uma solução de octanoato a 560 µM em tampão fosfato de sódio a 50 mM e pH 7 (BRÍGIDA et al., 2014). A reação foi monitorada em espectrofotômetro com absorvância a 410nm.

Para avaliar o efeito de pH na atividade do derivado obtido, soluções tampões com pH variando de 6 a 8 foram utilizadas para preparar o substrato. Quanto à especificidade, determinou-se a atividade hidrolítica dos derivados em 560 µM de p-nitrofenil acetato, butirato, octanoato, laurato ou palmitato a pH 7, 25°C. E quanto à estabilidade operacional, foi realizado ciclos de hidrólise de p-nitro fenil octanoato em pH 7 com uma determinada massa do imobilizado. A mesma massa foi recuperada, lavada com tampão, submetido a secagem a vácuo e reusada a cada ciclo. A atividade foi expressa em percentual frente a atividade obtida no primeiro ciclo de hidrólise.

3. RESULTADOS

A especificidade quanto a cadeia carboxílica da lipase de *A. niger* C livre e a encapsulada foi avaliada utilizando p-nitrofenil ésteres como mostra a Figura 1a. Para o extrato rico em lipase de *A. niger* C, maior afinidade foi para o substrato com 8 carbonos na cadeia carboxílica. Já para o derivado obtido a partir do encapsulamento das enzimas presentes no extrato, maior afinidade foi para o substrato com 4 carbonos na cadeia carboxílica. Para os substratos com cadeia carboxílica de 12 e 18 carbonos não se observou atividade.

A especificidade quanto a cadeia carboxílica da lipase de *A. niger* 11T53A14 livre e encapsulada foi avaliada utilizando p-nitrofenil ésteres como mostra a Figura 1b. Para o extrato rico em lipase de *A. niger* 11T53A14, maior afinidade foi para o substrato com 8 carbonos na cadeia carboxílica. Quanto ao extrato 11T53A14 encapsulado, foi observado maior afinidade para o substrato de 4 carbonos, porém, o derivado também obteve uma boa atividade no substrato com 18 carbonos.

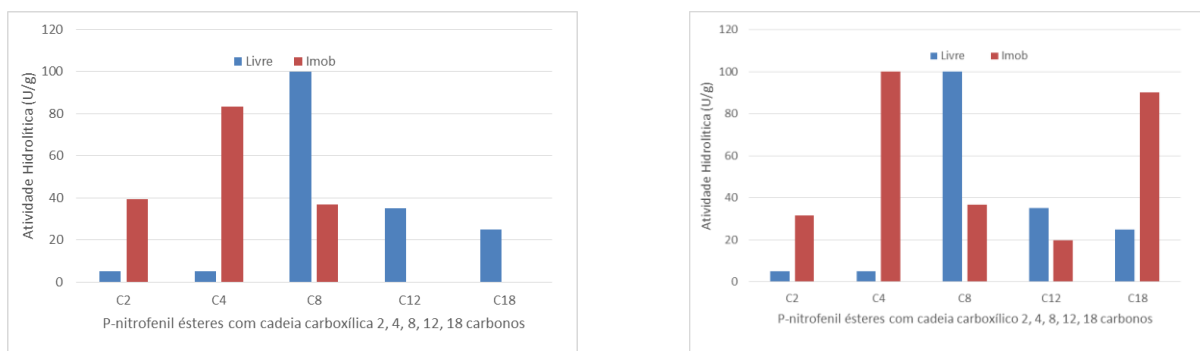


Figura 1 – Especificidade em diferentes p-nitrofenil ésteres da lipase de *A. niger* C imobilizada por gelificação iônica (a) e lipase de *A. niger* 11T imobilizada por gelificação iônica (b)

O efeito do pH na atividade das lipases de *A. niger* 11T53A14 e C encapsuladas foram avaliadas utilizando p-nitrofenil octanoato como mostra a Figura 2a. Tanto a lipase encapsulada do extrato da cepa C quanto do extrato da cepa 11T53A14 de *A. niger* mostraram atividade para o tampão citrato-fosfato 50mM no pH 7 e para o tampão fosfato 50mM nos pH 6 e 7, sendo o tampão citrato-fosfato 50mM no pH 7 o pH ótimo para a lipase de *A. niger* C e 11T. Também foram realizadas análises nos pH 4, 5 e 8, porém, as lipases encapsuladas em alginato, tanto a C quanto a 11T, não apresentaram atividade nesses valores de pH estudados.

A fim de avaliar a estabilidade operacional dos derivados obtidos, foram realizadas 7 hidrólises sucessivas para a C e 9 hidrólises sucessivas para a 11T53A14 com uma mesma massa de lipase encapsulada como mostra a Figura 2b. Tanto para o extrato de C quanto de 11T, após o primeiro ciclo reacional, foi observada uma queda na atividade dos derivados. O extrato de lipase de *A. niger* C encapsulado, após o primeiro ciclo, manteve sua atividade em 40% frente a atividade inicial durante os 9 ciclos avaliados. Já o extrato de lipase de *A. niger* 11T encapsulado, após o primeiro ciclo, manteve sua atividade em 20% frente a atividade inicial até o 5º ciclo. No 6º ciclo essa atividade caiu para menos de 10% e no 7º ciclo já não se observou atividade. O que mostra uma baixa estabilidade em sistemas aquosos para o encapsulado de 11T53A14. Ressalta-se que o encapsulado da lipase do extrato C ficou cerca de

5 minutos a mais no banho de cálcio, o que pode ter contribuído para uma melhor reticulação e uma maior estabilidade operacional.

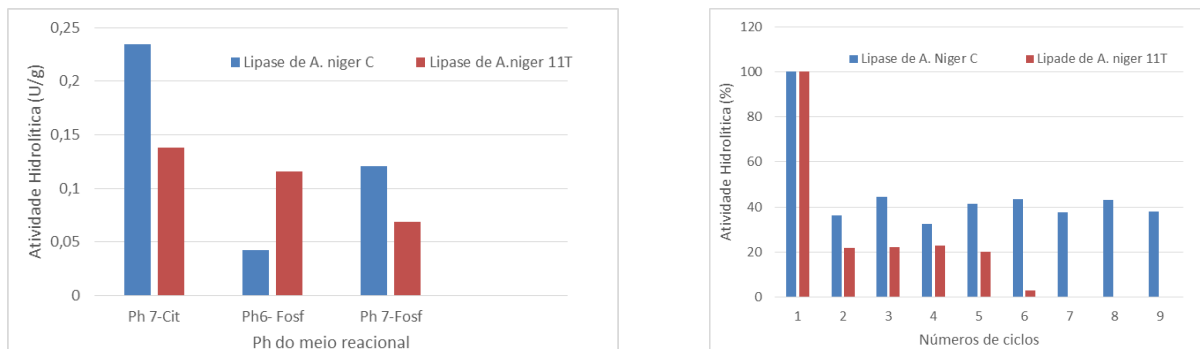


Figura 2 – Efeito do pH na atividade hidrolítica (a) e na estabilidade operacional (b) de lipase de *A. niger* C imobilizada por gelificação iônica e lipase de *A. niger* 11T imobilizada por gelificação iônica na hidrólise de p-nitrofenil octanoato

4. CONCLUSÃO

A lipase de *A. niger* C imobilizada por gelificação iônica possui potencial biocatalisador, especialmente por manter constante sua atividade durante 8 ciclos reacionais. Contudo, sua maior afinidade para ésteres de 4 carbono limita sua aplicação a ésteres de cadeias mais baixas. Estudos ampliando o tempo de reticulação devem ser realizados para verificar se este foi o fator dominante na diferença entre a estabilidade do encapsulado de C e de 11T.

5. REFERÊNCIAS

BRÍGIDA, I. S. A.; AMARAL, P. F. F.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; COELHO, M. A. Z. *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase Production in a Multiphase Bioreactor. *Current Biochemical Engineering*, v. 1, p. 656-661, 2014.

Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, Vol. 27, No. 1, p. 146-156, 2004.

Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicação sintética de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, Vol. 27, No. 4, p. 623-630, 2004.