



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Marriot 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 EM OCTIL SEPHAROSE

TAVARES HG¹, TERZI SC², SOUZA EF², GOTTSCHALK LMF², PENHA EM², BRIGIDA AIS^{2,3*}

¹Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste-UEZO

²Embrapa Agroindústria de Alimentos

³Embrapa 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 imobilizadas em suporte octil sepharose. Utilizando p-nitrofenil laurato como substrato, foram avaliados o pH ótimo de reação, especificidade frente a p-nitrofenil ésteres e estabilidade operacional. A lipase de A. niger C imobilizada só apresentou atividade para pH 7 e 8, teve maior afinidade para C4 e perdeu 80% da atividade inicial após o 5º ciclo. Quanto a lipase de A. niger 11T53A14 imobilizada esta só apresentou atividade para pH 7 e 8 tendo sido influenciada pelo tipo de tampão usado, mostrou perfil similar ao da enzima livre para os p-nitrofenil ésteres estudados e perdeu 100% da atividade inicial após o 5º ciclo.*

1. INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem como principal uso as hidrolases e dentre as diversas enzimas hidrolíticas, pode-se citar, amilases, celulasas, poligalacturonase, polipeptidases e as lipases(glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3), que se destacam por sua consideravelmente importância como biocatalisador industrial (LI et al., 2012), já sendo utilizada na produção de queijo, margarina e síntese enzimática de ômega-3 e obtenção de lipídeos funcionais. Além da função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol, em condições micro-aquosas, as lipases também são capazes de catalisar a síntese de ésteres, estendendo sua aplicação para outros setores, como indústria têxtil, de detergentes e óleos, por exemplo.

Um aumento no número de aplicações de lipases em sínteses e biotransformações tem elevado a demanda por biocatalisadores imobilizados eficientes para uso. A imobilização possibilita o reuso de lipases caras, como também, pode melhorar a estabilidade e a atividade da enzima, elevar o grau de pureza do produto de interesse, além da possibilidade do desenvolvimento de processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (DICOSIMO et al., 2013; FERNANDES, 2010). Processos economicamente importantes, tais como a transesterificação de óleos alimentícios (105 ton por ano), produção de biodiesel de triglicerídeos (104 ton por ano) e resolução quirál de álcoois e aminas (103 ton



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



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

por ano), são exemplos da aplicação industrial de lipases imobilizadas (DICOSIMO et al., 2013).

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

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 imobilização de lipases de *Aspergillus niger* C e 11T53A14, foi utilizado o extrato enzimático diluído em tampão fosfato pH 7 na proporção de 1:2. Utilizou-se 0,3 g de suporte e 12 mL de solução para a imobilização por adsorção que ocorreu à 25°C, sob agitação de aproximadamente 40 rpm, utilizando a técnica de banho finito. Após 2 horas de contato, o sobrenadante foi separado do derivado por filtração e a atividade de ambos foi determinada.

2.3. Atividade enzimática e características avaliadas

A reação de hidrólise de p-nitrofenil laurato (pNFL) 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 pNFL 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 laurato em pH 7 com uma massa determinada do imobilizado. A mesma massa foi recuperada, lavada com tampão, submetido a secagem a vácuo e usada 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 imobilizada em octil-sepharose foi avaliada utilizando p-nitrofenil ésteres (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 da imobilização das enzimas presentes no extrato em octil-sepharose, maior afinidade foi para o substrato com 4 carbonos na cadeia carboxílica. Durante o processo de imobilização pode ter ocorrido uma mudança na conformação das enzimas ou pode de ocorrido uma seleção preferencial de esterases frente as lipases presentes no extrato bruto no processo de imobilização contribuindo para este resultado, já que esterases tem maior afinidade por cadeias carboxílicas menores.

A especificidade quanto a cadeia carboxílica da lipase de *A. niger* 11T53A14 livre e imobilizada em octil-sepharose também foi avaliada utilizando p-nitrofenil ésteres (Figura 1b). Para o extrato rico em lipase de *A. niger* 11T53A14, maior afinidade foi para o substrato com 8 carbonos na cadeia carboxílica, assim como o derivado obtido a partir da imobilização das enzimas presentes no extrato em octil sepharose.

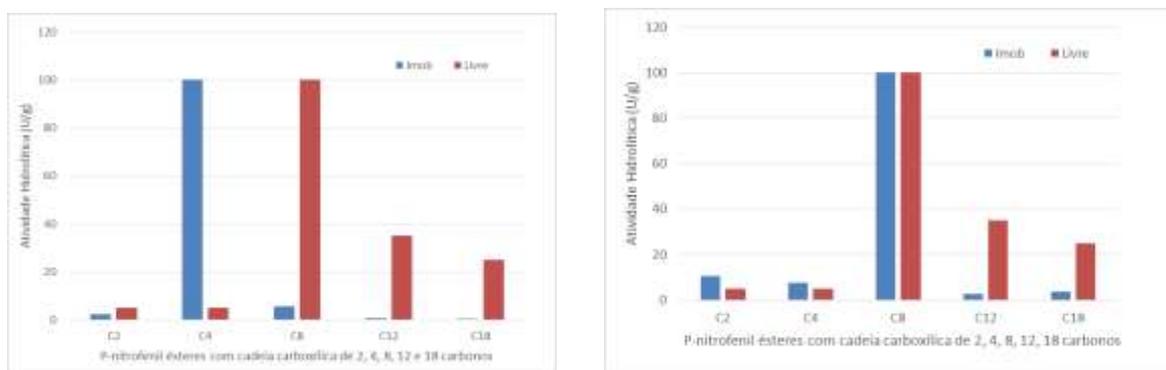


Figura 1 – Especificidade em diferentes p-nitrofenil esterres da lipase de *A. niger* C imobilizada em octil-sepharose (a) e lipase de *A. niger* 11T imobilizada em octil-sepharose (b)

O efeito do pH na atividade das lipases de *A. niger* imobilizadas em octil sepharose também foi estudado (Figura 2a). Para o derivado da lipase do extrato de *A. niger* C pode-se observar que não houve diferença entre as atividades em pH 7 e 8, e para pH 6 e 8 este derivado não apresentou atividade. Quanto ao derivado da lipase do extrato de *A. niger* 11T, este também não teve atividade para pH 6 e 8, e mostrou maior atividade para pH 7. Neste último caso, pode-se observar ainda uma influência quanto ao tipo de tampão, sendo o derivado mais ativo em tampão citrato-fosfato pH 7. Este aumento de atividade no tampão

citrato-fosfato pode estar relacionado à interação do íon citrato com as lipases presentes nesse extrato.

Para avaliar a estabilidade operacional foram realizadas hidrólises sucessivas com a lipase do extrato C e 11T immobilizados em octil como mostra a Figura 2b. O derivado de lipase do extrato C, embora tenha apresentado valores oscilantes entre 80 e 40% durante esses ciclos, perdeu 80% da atividade inicial após o 5º ciclo reações. O derivado de lipase do extrato 11T, embora tenha apresentado valores oscilantes entre 100 e 50% durante esses ciclos, perdeu 100% da atividade inicial após o 5º ciclo reações. Estes dados mostram uma baixa estabilidade a reusos consecutivos dos derivados testados. Pode ter ocorrido inativação da enzima devido às condições reacionais ou dessorção.

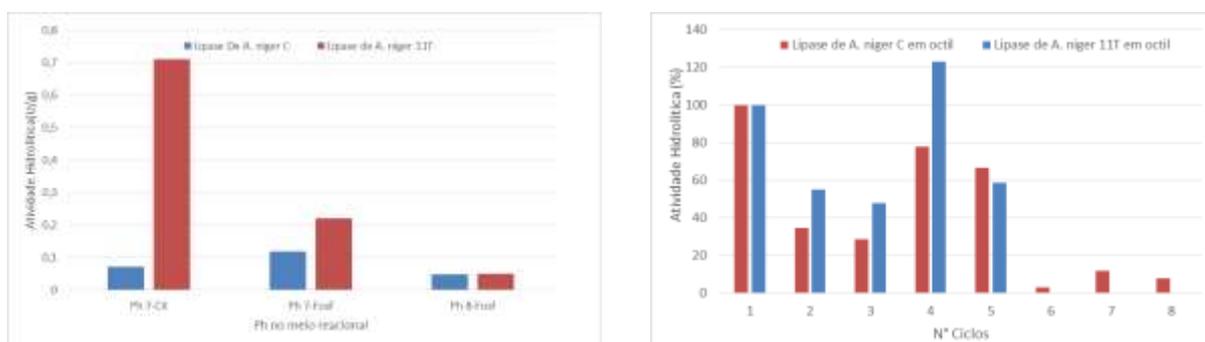


Figura 2 – Efeito do pH na atividade hidrolítica (a) e na estabilidade operacional (b) de lipase de *A. niger* C immobilizada em octil-sepharose e lipase de *A. niger* 11T immobilizada em octil-sepharose na hidrólise de p-nitrofenil laurato.

4. 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.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem Soc Rev**, v. 42, p. 6437 – 6474, 2013.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, 11p., 2012.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, 19p., 2010.