

Área: Engenharia de Alimentos

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE NÃO COMERCIAL

P. brevicompactum EM PROPANO PRESSURIZADO

Mara Cristina P. Zenevicz, Marceli Fernandes Silva, André Polloni, Débora de Oliveira,
José Vladimir de Oliveira, Graciele de Oliveira Kuhn*

Laboratório de Termodinâmica, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de
Alimentos, URI - Campus de Erechim

*E-mail: gracielekuhn@hotmail.com

RESUMO

A literatura indica que o emprego de fluidos pressurizados, sub ou supercríticos, na área da biotecnologia, mais especificamente em tecnologia enzimática, é assunto de intensa exploração científica durante a última década. O objetivo de tal estudo é a utilização de fluidos pressurizados como meio reacional alternativo para reações enzimáticas, explorando propriedades singulares de tais fluidos. Lipases constituem os mais importantes grupos de biocatalisadores para a síntese de biopolímeros e de biodiesel, na produção de fármacos enantiomericamente puros, compostos aromáticos, e outros. Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar a influência do Propano no tratamento sobre a atividade de esterificação da lipase não comercial *Penicillium brevicompactum* imobilizada, avaliando o efeito da pressão, tempo de exposição e taxa de despressurização em um desenho experimental 23 completo. Para tal, os experimentos foram realizados utilizando uma célula de aço com volume interno de 3mL, na temperatura de 35°C, variando a pressão (30–270bar), os tempos de exposição (1–6h) e taxas de descompressão (20–100bar/min). A atividade foi determinada como a taxa inicial das reações de esterificação entre o ácido oléico e o etanol. Os resultados obtidos mostram que as alterações da atividade enzimática dependem da fonte da enzima, e das condições experimentais do tratamento, apresentando um ótimo comportamento diante a lipase.

Palavras-chave: lipases; atividade de esterificação; propano comprimido; atividade relativa.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as lipases são produzidas a partir de microorganismos e constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e

facilidade de produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan et al., 2006). Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, cuja principal função biológica é a catálise da hidrólise de triacilgliceróis insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilglicerol, e glicerol. Além de sua função natural, as lipases podem catalisar as reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos (Houde et al., 2004; Laane et al., 1987). As lipases são biocatalisadores eficazes devido à sua alta atividade específica, baixo impacto ao meio ambiente, grupo funcional e estereoespecificidade (Knez e Habulin 2002; Cernia et al., 1998).

O alto custo da produção de enzimas é o principal obstáculo para a comercialização destas como catalisadores, os recentes avanços em biotecnologia tais como o uso de lipases solvente tolerantes e lipases imobilizadas, torna possível a reutilização do catalisador, desenvolvendo um sistema de custo-benefício (Fukuda et al., 2001). A aplicação destas enzimas imobilizadas como catalisador de reações envolvendo triglicerídeos apresenta uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água e possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em batelada (Novo Nordisk, 1992). O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (Burkert, 2002; Burkert et al., 2004).

Por esta razão, justifica-se os estudos utilizando lipases não comerciais, para assim, viabilizar o custo e tornar o processo competitivo comercialmente.

O uso de fluidos comprimidos na realização de reações químicas pode ser uma rota promissora para eliminar completamente os traços de solvente da reação. Além disso, processos de fabricação nestes fluidos podem ser vantajosos em termos de consumo de energia, mais fácil recuperação do produto, ajustável capacidade de hidratação, e redução de reações colaterais. O dióxido de carbono supercrítico tem características especiais, como baixa temperatura, baixa toxicidade e propriedades de transporte favoráveis que podem acelerar a transferência de massa limitada nas reações enzimáticas (Knez e Habulin 2002; Kumar et al., 2004; Jessop e Leitner, 1999).

Em comparação com outros gases, o dióxido de carbono tem sido o fluido mais amplamente estudado como solvente para reações catalisadas por enzimas. No entanto, um inconveniente em suas aplicações pode surgir devido a não-polaridade do mesmo, ocasionando uma dissolução não adequada de ambos os compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (Knez e Habulin 2002; Kumar et al., 2004; Jessop e Leitner 1999; Oliveira e Oliveira 2000)

Todavia, o CO₂ não é o único gás para o qual propriedades parecem ser adequadas para biocatálise. O propano pressurizado também pode ser apropriado como um meio de reação para bioconversões catalisadas por enzimas, uma vez que o propano, próximo ao seu ponto crítico tem uma constante dielétrica comparável a do CO₂ (Habulin e Knez et al., 2002) e as pressões de transição de fase com o propano, geralmente encontradas em sistemas formados por compostos de alto peso molecular (triglicerídeos, por exemplo), são muito mais baixas do que aquelas encontradas em sistemas com CO₂ (Lanza et al., 2005; Ndiaye et al., 2006).

A partir disto, e com base no grande potencial de aplicação de lipases como catalisadores em diversas reações de interesse, principalmente na área de Biodiesel, se considera objetivo principal deste trabalho a avaliação da influência do Propano pressurizado no tratamento sobre a atividade de esterificação da lipase não comercial *Penicillium brevicompactum* imobilizada, uma vez que, para realizar reações catalisadas por enzimas em altas pressões, o comportamento da mesma em fluidos comprimidos é de fundamental importância, pois a perda da atividade da enzima pode levar a indesejáveis taxas de reação e baixo rendimento em produtos (Kasche et al., 1988; Steinberger et al., 1999). Deste modo, foram avaliados o efeito da pressão, tempo de exposição e taxa de depressurização na atividade da lipase utilizando a técnica de planejamento de experimentos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Para desenvolver este trabalho foi utilizado o solvente propano de procedência White Martins S.A (com 99,5% pureza, fase líquida). As propriedades críticas do solvente utilizado, segundo Reid et al. (1987), são as seguintes: pressão crítica = 42,49bar, temperatura crítica =

96,6°C e densidade crítica = 0,22g/cm³. A lipase não comercial *Penicillium brevicompactum* imobilizada foi produzida em farelo de babaçu com 80% de umidade, suplementada a 3% em óleo de soja em 72hs e precipitada com sulfato de amônio com 70% de saturação, sendo a imobilização feita com Alginato de Sódio e Carvão Ativado (Silva et al., 2011).

2.1.1 Tratamento da Enzima em Propano Pressurizado

O equipamento utilizado em todos os experimentos consiste basicamente de um cilindro de Propano, uma bomba de alta pressão (ISCO 260D), uma célula de 3mL, um transdutor de pressão (Smar, LD 301 Sertãozinho SP/Brasil) e dois banhos termostáticos. O diagrama esquemático do equipamento é apresentado na Figura 1.

Duas outras válvulas micrométricas (HIP 15-11AF2 316SS) completaram o aparato experimental, uma localizada após a bomba de seringa, na entrada da célula de alta pressão, para permitir o carregamento de solvente e a outra logo após a célula para realizar a descarga do solvente. A célula de alta pressão encontrava-se submersa em banho de água e apoiada por um dispositivo simples, enquanto que as válvulas micrométricas ficavam localizadas fora do banho.

A lipase (aproximadamente 0,4g) foi colocada na célula e o reator mergulhado no banho com a temperatura já estabelecida (40°C). Após esta etapa, o sistema foi pressurizado e mantido à pressão e temperatura constantes por um tempo de exposição pré-estabelecido. Tipicamente, o tempo de pressurização era menor que 0,5 minutos, não sendo este incluído no tempo definido devido à sua pouca significância quando comparado ao tempo de exposição estabelecido. A seguir, nas taxas de descompressão pré-definidas (20–100bar/min), o sistema era despressurizado e a atividade lipásica determinada. A atividade relativa da lipase foi determinada em relação à atividade antes e após o tratamento. O tempo de exposição, a taxa de despressurização e a pressão foram seguidas conforme o planejamento de experimentos. A atividade relativa da lipase foi definida como $A_f/A_0 \times 100$, em relação a atividade específica antes e após o tratamento.

Uma vista geral da unidade e da célula utilizada nos experimentos pode ser verificada na Figura 1.

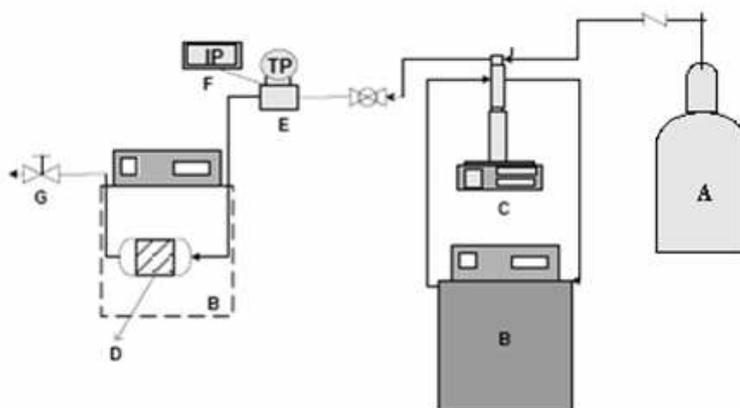


Figura 1 - Diagrama esquemático do aparato utilizado no tratamento da enzima com o propano pressurizado. A- reservatório de solvente; B- banho termostatizado; C- bomba de seringa; D- reator/célula de aço; E- indicador de pressão; F- transdutor de pressão; G- válvula micrométrica.

2.1.2 Determinação da Atividade de Esterificação da lipase

A atividade da enzima *P. brevicompactum* foi quantificada pelo consumo de ácido oléico na reação de esterificação entre o ácido oléico e o etanol com razão molar ácido-álcool de 1:1 à temperatura de 40°C, com a enzima a 2% (p/p) mantida sob agitação por 50 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em shaker sob agitação. Alíquotas de 500mL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero (antes de colocar a enzima) e após 50 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1). A quantidade de ácido oléico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,045N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1mmol de ácido oléico por minuto nas condições experimentais descritas (Langone et al., 2002; Bernardes et al., 2007, modificado).

Todas as determinações das atividades enzimáticas foram repetidas pelo menos três vezes.

A atividade relativa foi calculada através da equação abaixo:

Atividade Relativa (%) = (Atividade (U/g) após a pressurização / Atividade (U/g) antes da pressurização) x 100.

2.1.3 Condições Experimentais

Um planejamento experimental 2^3 , com dois níveis e três variáveis foi adotado. As variáveis avaliadas foram pressão (30-270 bar), tempo de exposição (1-6h) e taxa de despressurização (20-100bar/min). Foi realizada a triplicata do ponto central para a avaliação do erro experimental. Os resultados foram analisados usando o software Statística 6.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a lipase tratada em Propano pressurizados são apresentados na Tabela 1. O experimento 2 (pressão de 30bar, tempo de exposição de 1 h e taxa de despressurização de 100 bar/min), foi o que obteve a maior atividade relativa de 177,97%. Já o experimento 7 (pressão de 270bar, tempo de exposição de 6h e taxa de despressurização 20bar/min), foi o que teve a perda maior de atividade relativa.

Após a análise estatística dos dados experimentais apresentados na Tabela 1 foi possível a construção do gráfico de Pareto (Figura 2), que apresenta os efeitos estimados para cada variável estudada na atividade relativa para a lipase *P. brevicompactum* imobilizada tratada com Propano Pressurizado.

Observando o gráfico de Pareto para a *P. brevicompactum* tratada com Propano pressurizado observa-se que a Pressão foi a variável que mais influenciou na atividade enzimática, tendo esta um efeito positivo, ou seja, quanto maior a Pressão, maior é o ganho de atividade. Já a interação Tempo de exposição x Taxa de despressurização e o Tempo de exposição tiveram efeito significativo negativo.

Diversos estudos disponíveis na literatura relacionados ao tema atual referem-se à utilização de CO₂ como solvente e na maioria dos casos, o uso deste solvente levou à perdas na atividade enzimática, principalmente devido às características hidrofílicas do CO₂. Segundo muitos autores, CO₂ supercrítico poderia ser responsável pela retirada da água essencial responsável pela manutenção da atividade enzimática (Oliveira et al., 2006ab; Fricks et al., 2006; Primo et al., 2007).

Por outro lado, alguns estudos anteriores mostram que os solventes com baixa constante dielétrica, tais como o propano, poderiam manter, ou mesmo aumentar a atividade e

estabilidade enzimática (Knez e Habulin, 2002; Oliveira et al., 2006ab; Fricks et al., 2006; Primo et al., 2007).

Exp	P (bar)	t (h)	R (bar/min)	Propano
1	30 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	147,17
2	30 (-1)	1 (-1)	100 (1)	177,97
3	30 (-1)	6 (1)	20 (-1)	102,1
4	30 (-1)	6 (1)	100 (1)	100,5
5	270 (1)	1 (-1)	20 (-1)	125,32
6	270 (1)	1 (-1)	100 (1)	110,67
7	270 (1)	6 (1)	20 (-1)	95,1
8	270 (1)	6 (1)	100 (1)	98,25
9	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	104,92
10	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	108,87
11	150 (0)	3,5 (0)	60 (0)	107,55

P = pressão, t = tempo de exposição e R = taxa de depressurização
 Atividade relativa definida como: (atividade final/atividade inicial) x 100
 Atividade inicial *P. brevicompactum* = 109,51 U/g

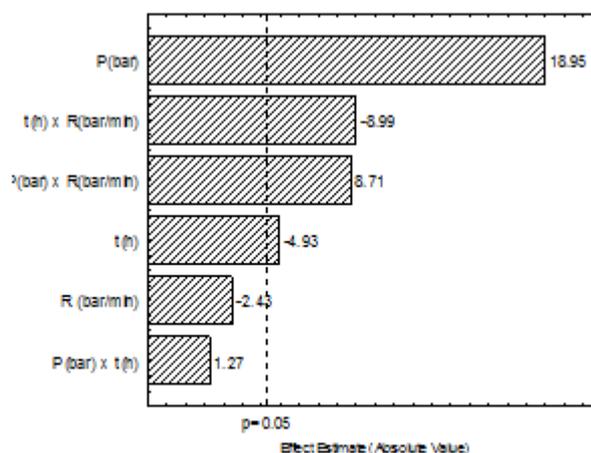


Figura 2. Gráfico de Pareto
lipase *P. brevicompactum* imobilizada tratada com Propano pressurizado.

As propriedades do solvente afetam sua interação com enzimas específicas e diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo da enzima estudada (Kasche et al., 1988; Fricks et al., 2006). Além disso, o gás propano tem relativa baixa solubilidade em água, podendo-se especular que o mesmo poderia atuar como um fluido pistonado, aumentando a atividade enzimática.

Kuhn et al.,(2010) realizou estudos utilizando enzimas não-comerciais nas suas formas liofilizada e imobilizada, utilizando o Propano como solvente, o trabalho relata que

houve um aumento na atividade de esterificação das lipases para a grande maioria das condições testadas, sendo o melhor resultado encontrado para a enzima liofilizada *P. simplicissimum*, que obteve uma atividade relativa de 427%. Com relação a enzima *A. parasiticus* na forma imobilizada, a atividade relativa foi de 258,6%. Compreende-se, no mesmo, a partir dos resultados, que a atividade da enzima após o tratamento com propano pressurizado, depende significativamente da natureza estrutural da enzima e a sua forma, como também das condições experimentais impostas.

Por fim, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser bastante relevantes para o desenvolvimento de novas aplicações e/ou processos para o uso destes catalisadores de baixo custo em reações de interesse.

3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se entender que a atividade da enzima após o tratamento com Propano depende muito da espécie e forma como a enzima se encontra, do conteúdo de água da enzima/suporte/meio reacional e das variáveis de processo envolvidas, significando que diferentes efeitos podem ser obtidos dependendo das características do sistema investigado.

Portanto, o uso do Propano pressurizado no tratamento de enzimas, mostra-se um ótimo solvente a ser aplicado em reações de biocatálise, uma vez que conferiu excelente comportamento diante a lipase estudada.

REFERÊNCIAS

BERNARDES, O.L., BEVILAQUA, J.V., LEAL, M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., LAGNONE, M.A.P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.136-140, 105-114, 2007.

BURKERT, J.F. DE M. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BURKERT, J.F.M., MAUGERI F., RODRIGUES M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p.77-84, 2004.

CERNIA, E., PALOCCI, C. AND SORO, S. The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications. *Chem Phys Lipid*, v. 93, p. 157-164, 1998.

FRICKS, A. T., SOUZA, D. P. B., OESTREICHER, E. G., ANTUNES, O. A. C., GIRARDI, J. S., OLIVEIRA, D. ET AL. Evaluation of radish (*Raphanus Sativus* L.) Peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide. *J Supercrit Fluid*, v.38, p. 347-353, 2006.

FUKUDA, H., KONDO, A. AND NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci Bioeng*, v. 92, p.405-412, 2001.

HABULIN, M. AND KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. *J. Chem Technol Biotechnol*, v. 76, p.1260-1265, 2002.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEE, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOUDE., A., KADEMI, A. AND LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, p. 155-170, 2004.

JESSOP, P. G. AND LEITNER, W. Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids. Wiley-VCH, Weinheim, USA, 1999.

KASCHE, V., SCHOLOTHAUES, R. and BRUNNER, G. Enzyme denaturation in supercritical CO₂: stabilizing effect of S-S bonds during the depressurization step. *Biotechnol Letters*, v.10, p.569, 1988.

KNEZ, Z. AND HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic reaction solvents: A short review. *J. Supercrit Fluid*, v. 23, p.29-34, 2002.

KUHN, G., MARANGONI, M., DENISE, M. G., FREIRE, D. M.G., SOARES, V.F., GODOY, M.G., CASTRO A.M., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H., MAZUTTI, M.A., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, V.J., Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane. *J. Chem Technol Biotechnol*, v. 85, p. 839-844, 2010.

KUMAR, R., MADRAS, S. AND MODAK, J. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. *Industrial Engineering and Chemical Research*, v. 43, p. 1568-1573, 2004.

LAANE, C., BOEREN S., VOS, K., VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysts in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng*, v. 30, p. 81-87, 1987.

LANZA, M., PRIAMO, W. L., OLIVEIRA, J. V., DARIVA, C.E. AND OLIVEIRA, D. The effect of temperature, pressure, exposure time and depressurization rate on lipase activity in SC-CO₂. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 113, p. 181–188, 2005.

LANGONE, M. A., DE ABREU, M. E., REZENDE, M. J., SANT'ANNA, JR. G. L. Enzymatic synthesis of médium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.100, p. 987-996, 2002.

NDIAYE, P.M., FRANCESCHI, E., OLIVEIRA, D., DARIVA, C., TAVARES, F.W. AND OLIVEIRA, J.V., Phase behavior of soybean oil, castor oil and their fatty acid ethyl esters in carbon dioxide at high pressures. *J.Supercrit Fluid*, v. 37, p. 29–33, 2006.

NOVO NORDISK. Manual técnico das enzimas Lipozyme IM e Novozym 435. 2001.

OLIVEIRA, J. V. AND OLIVEIRA, D. Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in SC-CO₂. *Ind. Eng. Chem Res*, v. 39, p. 4450–4455, 2000.

OLIVEIRA, D., FEIHRMANN, A.C., DARIVA, C., CUNHA, A.G., BEVILAQUA, J.V. Destain Jet al, Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase. *J. Mol Catal B: Enzym*, v. 39, p. 117–121, 2006 a.

OLIVEIRA, D., FEIHRMANN, A.C., RUBIRA, A.F., KUNITA, M.H., DARIVA, C. AND OLIVEIRA, J.V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *J Supercrit Fluid*, v.38, p. 127–133, 2006 b.

PETROBRAS-CENPES (Centro de Pesquisas e Desenvolvimento), 2010.

PRIMO, M. S., CENI, G. C., MARCON, N. S., ANTUNES, O. A.C., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V. ET AL, Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves. *J Supercrit Fluid*, v. 43, p. 283–290, 2007.

SILVA, M. F., FREIRE, D. M. G., CASTRO, A. M., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M. A., OLIVEIRA, J. V., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng* (2011) 34:145–152.

STEINBERGER, D.J., GAMSE, T. AND MAAR, R. Enzyme inactivation and prepurification effects of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). In *Proceedings of the 5th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications*, Verona, Italy, ed by Bertucco A, pp 339–341 (1999).