

Área: Engenharia de Alimentos

ESTUDO DO RENDIMENTO NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B (CALB) PELA TÉCNICA DE SOL-GEL

Aline Matuella Moreira*, Nádia Nyari, Ilizandra A. Fernandes, Juliana Zanatta, Lenir Ferraz, Jamile Zeni, Rogério Dallago, Marcelo Mignoni.

Laboratório de Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI- Erechim, RS

**E-mail: alinematuella@gmail.com*

RESUMO – A imobilização de enzimas permite obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre, o que possibilita uma operação contínua do processo e facilita o controle e separação do produto final. Entre as técnicas de imobilização utilizadas, destaca-se a imobilização de enzimas pela técnica de sol-gel, que consiste em reter a enzima no interior da matriz ou em sua superfície a fim de conferir estabilidade mecânica e bioquímica superior às técnicas convencionais. Porém, esta técnica apresenta alguns inconvenientes durante a etapa de formação do gel. A enzima pode perder seu potencial catalítico e estabilidade, desta maneira, são utilizados aditivos a fim de minimizar estes efeitos. O emprego de macromoléculas como o polietilenoglicol (PEG) aumenta a potencialidade do processo de imobilização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da massa de enzima e de aditivo em relação ao rendimento do suporte imobilizado da enzima lipase por um planejamento fatorial completo 2^2 com repetição no ponto central. Os resultados demonstram que o uso de aditivo PEG 1500 influencia no aumento da atividade de esterificação da enzima lipase e consequentemente no rendimento do imobilizado. Os melhores resultados de rendimento (111,35 e 184,09 %) foram obtidos nos experimentos em que foi utilizada a menor massa de enzima (0,05 g) com e sem o uso de aditivo, onde consequentemente houve um ganho no rendimento no suporte imobilizado quando adicionado aditivo.

Palavras-chave: Lipase, sol-gel, aditivo, imobilização.

1 INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas de grande interesse devido ao seu potencial industrial. Essas enzimas, na forma livre, podem ser usadas apenas uma vez em solução aquosa, além de apresentarem elevado custo comercial. A imobilização pode auxiliar nesse aspecto, pois permite a sua reutilização, facilidade na separação do produto da reação, uso em batelada e estabilidade mecânica, térmica e armazenagem (ZANIN e MORAES, 2004).

Dentre as técnicas de imobilização de enzimas, o encapsulamento obtido pela técnica sol-gel tem sido explorado e é indiscutivelmente a técnica mais utilizada para preparo de uma matriz híbrida, na qual a enzima fica retida no interior da matriz e forma um reticulado tridimensional (gel). Pode estar localizada na superfície do suporte, no seu interstício e totalmente encapsulada, de forma a torná-la insolúveis em água (JOSE e PRADO, 2005; SOARES et al., 2006; KIM et al., 2006).

A técnica sol-gel apresenta algumas desvantagens decorrentes do processo de encapsulamento, uma destas, trata-se do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada, que pode ser atribuído à estrutura porosa, bem como a inativação ou desnaturação da enzima. Uma alternativa para se contornar estas desvantagens durante o processo de imobilização é a utilização de aditivos. Os aditivos influenciam positivamente o aumento da atividade e da estabilidade de enzimas imobilizadas, pois protegem a enzima contra a inativação durante a etapa de encapsulamento, à retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e aos efeitos dispersantes das moléculas da enzima (SOUZA, 2012).

O objetivo do trabalho foi estudar a influência da massa (g) de enzima e aditivo no rendimento do suporte imobilizado da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) pela técnica de sol-gel.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

A enzima utilizada foi a lipase de *Candida antarctica* B (Novozyme NZL-102-LYO-HQ) adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda. Para a imobilização foram utilizados álcool etílico PA, tetraetilortosilicato, polietilenoglicol, ácido bromídrico e hidróxido de amônio.

2.2 Métodos

Imobilização

A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) foi imobilizada de acordo com o método descrito por Soares et al. (2006), com modificações. Em um béquer adicionou-se 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS) dissolvidos em 5 mL de álcool etílico absoluto e 1,61 mL água destilada em uma proporção molar de (1:4:4). A mistura ficou sob agitação por 90 min, 40 °C, 180 rpm. Em seguida, foram adicionados 3 gotas de ácido bromídrico, solução enzimática e solução do aditivo PEG 1500. Após, foram adicionados 1,75 mL da solução hidrolisante (0,25 mL de hidróxido de amônia dissolvidos em 1,5 mL de álcool etílico). A mistura foi mantida em condições estáticas por 24 h para a completa condensação química. Posteriormente, o suporte foi condicionado em dessecador à vácuo por 24 h para completa secagem. Após a secagem, o suporte foi armazenado em refrigeração (aproximadamente 4 °C) para os posteriores testes.

Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi determinada pela capacidade de síntese do oleato de etila realizada através da reação do ácido oleico e etanol (razão molar 1:1). Esta foi iniciada pela adição da enzima imobilizada (0,1 g de suporte) ao meio reacional. A reação foi conduzida a 40 °C, durante 40 min, em frascos de vidro fechados, mantidos em agitador orbital a 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata. A cada amostra foram adicionados 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação (FERRAZ et al., 2012 com alterações). A quantidade de ácido consumido foi determinado por titulação com NaOH 0,05 M.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os ensaios realizados no experimento obtidos para os diferentes valores de massas de enzima e aditivo PEG 1500 testadas no Planejamento Fatorial Completo 2², bem como as variáveis codificadas (X₁ e X₂) e as respostas obtidas na imobilização.

Tabela 1-Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2² com três pontos centrais e os resultados obtidos da imobilização da enzima lipase de *Candida antarctica* B (CALB) pela técnica de sol-gel

Experimento	X ₁	X ₂	AI	PS	AAI	ATS	RI
1	-1 (0,05)	-1 (0)	194,42	2,74	478,13	532,38	111,35
2	+1 (0,25)	-1 (0)	199,77	5,04	2390,63	1007,25	42,13
3	-1 (0,05)	+1 (0,05)	214,49	4,10	478,13	880,18	184,09
4	+1 (0,25)	+1 (0,05)	252,19	6,56	2390,63	1655,97	69,27
5	0 (0,15)	0 (0,025)	264,73	4,32	1434,38	1143,91	79,75
6	0 (0,15)	0 (0,025)	257,25	4,19	1434,38	1079,19	75,24
7	0 (0,15)	0 (0,025)	286,85	3,76	1434,38	1077,41	75,11

X₁: massa de enzima (g); X₂: massa de aditivo (g); AI: Atividade do suporte imobilizado (U/g de suporte); PS: Peso do suporte imobilizado (g); AAI: Atividade adicionada na imobilização (U/g); ATS: Atividade total do suporte (U/g); RI: Rendimento do imobilizado (%).

Pode-se observar que os maiores valores de rendimento, mais de 100 %, foram encontrados nos ensaios 1 e 3. Nestes ensaios foi utilizada a massa mínima de enzima (0,05 g) e variou-se a massa do aditivo. O rendimento dos ensaios com a massa máxima de enzima (2 e 4) apresentaram valores menores de rendimento quando comparados com os ensaios 1 e 3. Os pontos centrais dos experimentos tiveram rendimento entre 75,11 e 79,75 % de rendimento. Comportamento semelhante foi descrito por Soares et al. (2003) em que a lipase microbiana de *Candida rugosa* foi imobilizada em sílica de porosidade controlada com o uso do aditivo PEG 1500 e obtiveram rendimentos de 59,5 e 41,9 % com 0,1 e 0,3 g de enzima respectivamente.

O uso de aditivo aumentou o rendimento dos suportes imobilizados em todos os ensaios. Com base nos resultados obtidos a utilização do aditivo PEG aumenta o rendimento de imobilização e aumenta a atividade de

esterificação da enzima. Os valores de rendimento de imobilização dos experimentos 1 e 3 são superiores aos encontrados na literatura. Bayramoglu et al. (2004) e Lim et al. (2003), imobilizaram amilase com rendimentos menores de 80% em seus trabalhos. Day et al. (2003), conseguiram um rendimento de imobilização de α -amilase em alginato de sódio em torno de 75 %. Pereira et al. (2003) imobilizaram lipases em quitosana e obtiveram um rendimento inferior a 17 %.

Tabela 2- Análise de variância dos resultados obtidos através dos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2²

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X ₁	5,679642	1	5,679642	26,50700	0,014203
X ₂	2,087447	1	2,087447	9,74216	0,052421
X ₁ .X ₂	0,006320	1	0,006320	0,02950	0,874569
Resíduos	0,642809	3	0,214270		
SSQ Total	8,416218	6			

X₁: massa enzima (g); X₂: massa PEG

A análise de variância (Tabela 2) e o coeficiente de determinação do modelo ($R^2=0,9236$) representam bem o procedimento de imobilização. Apenas a variável massa de enzima mostrou-se significativa ao nível de 95 % de confiança, enquanto o efeito massa de aditivo PEG 1500 foi significativo ao nível de 90 % de confiança e a interação entre aditivo não foi significativo para a faixa experimental avaliada.

A Tabela 3 apresenta os efeitos estimados das variáveis no rendimento da imobilização nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2². Pode-se observar que a variável enzima apresenta efeito negativo, o que confirma os resultados da Tabela 1, na qual há uma redução do rendimento de imobilização quando a concentração da lipase foi aumentada do nível mínimo (0,05 g) para o nível máximo (0,25 g). O aditivo PEG 1500 tem efeito positivo, ou seja, com o aumento de sua massa ocorre o aumento do rendimento do imobilizado. Este comportamento foi similar aos relatados por Soares et al. (2003) onde a variação da massa de enzima apresentou uma redução do rendimento de imobilização quando a concentração da lipase foi aumentada do nível mínimo (0,1 g) para o nível máximo (0,3 g) confirmando o efeito negativo da massa de enzima.

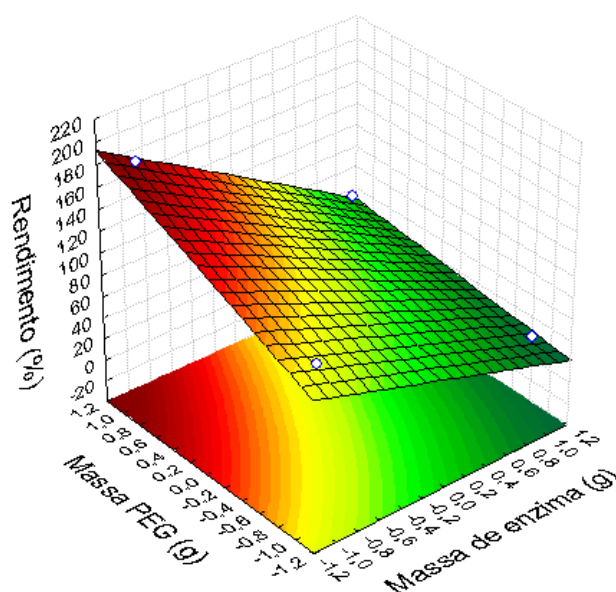
Tabela 3- Efeitos estimados das variáveis nos rendimentos dos suportes imobilizados nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2².

Fonte de variação	Efeitos estimados	P
Média	90,9915	0,0011
X ₁	-92,0172	0,0169
X ₂	49,9397	0,0787
X ₁ .X ₂	-22,8035	0,3168

X₁: massa enzima (g); X₂: massa PEG

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta e as curvas de contorno as quais permitem analisar a influência dos fatores massa de enzima e de aditivo.

Figura 1- Superfície de resposta das variáveis no peso seco do suporte imobilizado nos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2^2



A superfície de resposta apresenta o comportamento da imobilização em relação ao rendimento. Pode-se observar que os pontos ótimos de rendimento encontram-se em valores mínimos de massa de enzima e valores maiores de aditivo PEG 1500. Com base nas características da lipase e em estudos reportados na literatura por Soares et al. (2003) e Carvalho (2011), os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o efeito estabilizante do aditivo PEG. Isto indica que o aumento da atividade e consequentemente do rendimento da imobilização deve-se a provável proteção da enzima contra a agregação ou desnaturação devido à presença de silanos utilizados na formação da matriz sílica.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o uso de aditivo PEG 1500 influencia no aumento da atividade de esterificação da enzima lipase e consequentemente no rendimento do imobilizado. A massa de enzima possui um efeito negativo na imobilização o que indica que quantidades menores de lipase utilizada na imobilização auxiliam no aumento do rendimento da enzima imobilizada. Cabe ressaltar, que na técnica de imobilização utilizada neste trabalho foram obtidos valores de rendimento superiores aos descritos na literatura.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPERGS e URI pelo apoio financeiro e bolsas de estudos disponibilizadas para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591-599, 2004.
- CARVALHO, N. B. Produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes. Aracaju, 2011.
- DAY, G; SINGH, B; BANERJEE, R. Immobilization of α -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 167-177, 2003.
- FERRAZ, L. R; OLIVEIRA, D. S.; SILVA, M. F.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of multifunctional lipases by *Sporobolomyces ruberrimus* using soybean meal, rice meal and sugarcane bagasse as substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 243-252, 2012.
- JOSE, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânicos inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, 28, p. 281-288, 2005.
- KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, 61, p. 1017-1026, 2006.
- LIM, H. L.; MACDONALD, D. G.; HILL, G. A. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 53-62, 2003
- PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343 - 355, 2003.
- SOARES, C. M. F.; SANTANA, M. H. A.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003
- SOARES, C. M.F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization of sol-gel encapsulated lipase using tetraethoxysilane as precursor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 69-76, 2006.
- SOUZA, R. L. Emprego de aditivos na imobilização sol-gel de lipases. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes. Aracajú-SE, 2012.
- ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas imobilizadas**. In: Enzimas como agentes biotecnológicos, Saiad, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, cap. 4, p. 35-85, 2004.