PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA

Leonardo P. Goulart (IC)[1], José Renato Guimarães (PQ)[1]
[1] *Universidade Federal de Itajubá*

Palavras-chave: Enzima**.** Esterificação. Glutaraldeído. Imobilização. Polietilenimina.

Introdução

As enzimas são catalisadores biológicos altamente eficientes, oferecendo processos significativamente mais competitivos em comparação aos catalisadores químicos. Diversos processos enzimáticos já foram comercializados para a produção de uma ampla gama de produtos de valor agregado. No entanto, apesar do grande potencial das enzimas, suas aplicações industriais ainda apresentam limitações, como baixa estabilidade, dificuldade de recuperação e reutilização em bateladas sequenciais (CHOI; HAN; KIM, 2015). Para superar essas limitações, diversas abordagens têm sido testadas, sendo a imobilização enzimática uma das mais promissoras. Essa estratégia tem se mostrado uma ferramenta eficaz para melhorar as propriedades das enzimas, proporcionando maior estabilidade, atividade, especificidade e seletividade quando adequadamente projetada (MATEO et al., 2007). Existem diferentes métodos de imobilização de enzimas, e neste estudo, a imobilização foi realizada por meio da adsorção interfacial da enzima a um suporte hidrofóbico. Esse tipo de ligação física, no entanto, pode ser insuficiente para manter a enzima fixada ao suporte em condições industriais rigorosas, como altas concentrações de reagentes e produtos, além de alta força iônica. Suportes típicos para imobilização incluem resinas sintéticas e biopolímeros, como polissacarídeos (SHELDON; VAN PELT, 2013).

As lipases são biocatalisadores de grande relevância industrial, com aplicações promissoras na produção de diversos produtos. Suas propriedades únicas, como maior estabilidade e seletividade de substrato, as tornam uma das enzimas mais utilizadas no setor industrial (SARMAH et al., 2018). As lipases são caracterizadas pelo fenômeno da ativação interfacial, que lhes permite existir em duas conformações: uma configuração em que uma cadeia polipeptídica (tampa) cobre o sítio ativo da enzima, impedindo o acesso do substrato; e uma configuração em que a tampa interage com uma superfície hidrofóbica, permitindo o acesso ao sítio ativo (ZISIS et al., 2015).

Esse fenômeno de ativação interfacial tem sido explorado para imobilizar seletivamente muitas lipases em diferentes suportes hidrofóbicos, mantendo-as em sua conformação aberta. Esse método de imobilização é relativamente simples em comparação aos métodos de imobilização iônica e covalente (MANOEL et al., 2016). No entanto, a enzima adsorvida pode sofrer dessorção do suporte. Uma estratégia para minimizar esse problema é a modificação superficial da enzima imobilizada com agentes físicos ou químicos, como polietilenimina (PEI) e glutaraldeído. O PEI é amplamente utilizado devido à sua funcionalidade química, conferida pela presença de aminas catiônicas primárias, secundárias e terciárias (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). Esse polímero é capaz de revestir completamente a superfície da enzima, promovendo ligações cruzadas intermoleculares que dificultam a liberação da enzima do suporte (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017). O glutaraldeído, por sua vez, é um reagente bifuncional com a capacidade de reticular moléculas de proteína (BARBOSA et al., 2012). A modificação superficial com PEI e/ou glutaraldeído pode alterar as propriedades físicas da superfície da enzima imobilizada e suas características catalíticas.

Dessa forma, o presente estudo busca expandir o conhecimento sobre a imobilização de lipases, abordando aspectos ainda pouco explorados. Embora diversos estudos já tenham investigado o processo de imobilização de lipases em Purolite C18 (polímeros metacrílicos funcionalizados com grupos octadecil) e a modificação superficial da enzima imobilizada, as reações catalisadas por esses biocatalisadores permanecem pouco estudadas. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o desempenho catalítico de lipases imobilizadas e/ou modificadas física ou químicamente em reações de hidrólise e esterificação.

Metodologia

A imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foi realizada em esferas de Purolite C18, previamente umedecidas. As esferas foram suspensas em uma solução enzimática (1 mg/mL) preparada em tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7,0), na proporção de 1:10 (m/v). A suspensão foi mantida sob agitação leve à temperatura ambiente por 2 horas. Após a imobilização, as esferas foram filtradas e lavadas. Para a modificação superficial com PEI, a enzima imobilizada

foi suspensa em uma solução contendo 10% de PEI (pH 7,0), também na proporção de 1:10 (m/v). A suspensão foi agitada a 100 rpm a 25 ºC por 24 horas. Após esse período, a enzima modificada foi filtrada e lavada. A modificação superficial com glutaraldeído foi realizada posteriormente, suspendendo a enzima previamente modificada com PEI em solução de glutaraldeído (1%) preparada em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0). A suspensão foi agitada sob as mesmas condições da modificação anterior.

A atividade enzimática dos três biocatalisadores (enzima imobilizada e/ou modificada) foi avaliada utilizando 0,025 g de enzima imobilizada, 8,25 mL de água e 3 mL de tampão fosfato. Diferentes quantidades de tributirina foram testadas: 0,18 mL, 0,37 mL, 0,74 mL, 1,10 mL e 1,48 mL. A reação foi realizada em um reator encamisado ligado a um banho termostático a 35 ºC, sob agitação de 500 rpm por 5 minutos. O consumo de KOH foi utilizado para medir a atividade enzimática.

Para a avaliação da termoestabilidade, eppendorfs contendo a enzima imobilizada ou modificada foram preparados em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0). Cada eppendorf foi incubado em banho termostático a 70 ºC, com amostras coletadas nos tempos de 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos. A atividade enzimática das alíquotas foi medida utilizando a tributirina como substrato. A reação de hidrólise foi conduzida em shaker a 35 ºC, com agitação de 250 rpm por 5 minutos.

Nos experimentos de hidrólise, foram selecionados quatro tipos de óleos: soja, linhaça, coco e mamona. Para cada óleo, uma solução foi preparada na proporção mássica de 2:1 (óleo:água), e 5% de enzima (com base na massa do óleo) foi adicionada. A mistura foi transferida para um erlenmeyer e agitada em um shaker a 35 ºC e 250 rpm por 30 minutos. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos, resultando na separação em duas fases: uma fase superior, contendo ácidos graxos livres (AGLs), e uma fase inferior, contendo água e glicerol. A fase superior foi utilizada para determinar a conversão do óleo em AGLs, medida pelo consumo de KOH.

Nos experimentos de esterificação, quatro tipos de álcoois foram usados como aceptor de acila: octílico, amílico, isoamílico e etílico. Para cada álcool, uma solução foi preparada na proporção molar de 1:3 entre AGLs e o álcool. A enzima foi adicionada na quantidade de 5% em relação à massa total da solução. A mistura foi agitada em erlenmeyer a 35 ºC por 30 minutos a 250 rpm. Após a reação, a solução foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, resultando em duas fases, sendo a fase superior composta por ésteres e AGLs. Esta fase foi usada para determinar a conversão, com base na relação entre os AGLs residuais e a quantidade inicial.

Resultados e discussão

A TLL imobilizada no suporte Purolite C18 apresentou um perfil de imobilização onde a atividade residual da enzima foi reduzida em cerca de 50% ao final do processo. Esse resultado indicou um rendimento de imobilização (atividade enzimática incorporada ao suporte) de aproximadamente 50% em relação à quantidade total de lipase utilizada.

Em relação à atividade específica dos biocatalisadores, a Purolite-TLL apresentou a melhor atividade (2731,17 ± 13,02 U/g) em comparação à enzima imobilizada e modificada com PEI (613,42 ± 50,68 U/g) e glutaraldeído (657,54 ± 1,29 U/g). Esses resultados podem ser atribuídos a problemas de transferência de massa decorrentes das modificações físicas e químicas.

Quanto à termoestabilidade, a Figura 1 apresenta os resultados obtidos. A Purolite-TLL demonstrou menor estabilidade em comparação aos outros biocatalisadores, devido ao baixo nível de modificações. A Purolite-TLL-PEI apresentou melhor termoestabilidade quando comparada aos outros dois biocatalisadores, Purolite-TLL e Purolite-TLL-PEI-GLU. Esse desempenho superior é consequência da maior tortuosidade da enzima modificada pela camada de PEI adsorvida sobre a enzima imobilizada. O comportamento observado na modificação com PEI deveria ter sido mantido ou intensificado com a modificação subsequente com glutaraldeído. No entanto, devido a erros operacionais, isso não foi observado. Esses resultados são corroborados pelos valores da constante de desativação (kd) (Tabela 1). O valor de kd diminuiu para o biocatalisador modificado com PEI em comparação à enzima apenas imobilizada. Contudo, no caso da Purolite-TLL modificada com PEI e glutaraldeído, o valor de kd voltou a aumentar. O mesmo efeito foi observado nos parâmetros α (razão entre a atividade final e a inicial) e t1/2 (tempo de meia-vida), que deveriam diminuir à medida que o nível de modificação aumentava.

Na hidrólise dos óleos de soja, linhaça, coco e mamona, o biocatalisador Purolite-TLL demonstrou maior eficiência na reação em comparação aos demais (Tabela 2). Esse desempenho superior pode ser explicado pela menor tortuosidade da enzima não modificada, o que facilita a transferência de massa. A tortuosidade está diretamente relacionada à forma como o substrato se difunde no interior dos poros do suporte e, consequentemente, à acessibilidade ao sítio ativo da enzima. No biocatalisador Purolite-TLL, a estrutura porosa do suporte permite uma difusão mais direta e

eficiente das moléculas de substrato até os sítios catalíticos, resultando em maior eficiência catalítica. Para as enzimas modificadas, o aumento da tortuosidade decorre da formação de camadas adicionais de PEI ou glutaraldeído sobre a superfície da enzima, criando barreiras que aumentam o percurso das moléculas de substrato até o sítio ativo. Esse aumento no percurso gera maior resistência à difusão e cria gradientes de concentração de substrato ao longo do raio dos poros, o que reduz a eficiência catalítica. A presença dessas camadas altera a microestrutura do suporte, impactando negativamente a transferência de massa e, consequentemente, o desempenho da reação.

Figura 1. Termoestabilidade para os biocatalisadores imobilizados de TLL na presença e ausência de modificações superficiais.

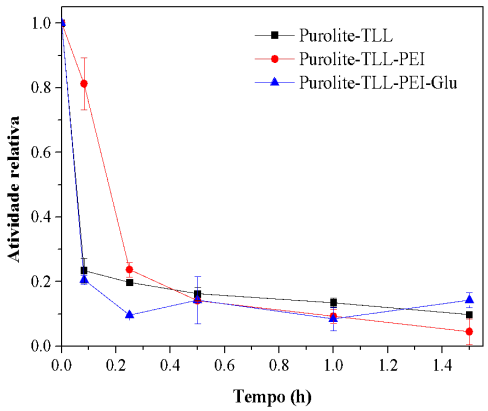

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos, catalíticos e meia vida de biocatalisadores imobilizados de TLL.

Parâmetros	Biocatalisador		
	Purolite-TLL	Purolite-TLL-PEI	Purolite-TLL-PEI-GLU
K_d	27,31	4,83	27,64
A	0,14	0,052	0,12
$t_{1/2}$	0,043	0,18	0,040

Conforme ilustrado na Tabela 2, o óleo de coco, composto majoritariamente por ácidos graxos láuricos, que possuem 12 carbonos em sua estrutura, apresentou a melhor conversão, sugerindo que os biocatalisadores possuem maior facilidade para hidrolisar ácidos graxos de cadeia curta. Por outro lado, os óleos de linhaça e soja, ricos em ácidos graxos insaturados de 18 carbonos, mostraram conversões semelhantes. O óleo de rícino apresentou o pior rendimento, o que pode estar relacionado ao fenômeno de partição, devido à predominância do ácido ricinoleico, que possui um grupamento hidroxila em sua estrutura.

Tabela 2. Hidrólise de diferentes óleos catalisada por biocatalisadores imobilizados de TLL.

Óleos	Biocatalisador		
	Purolite-TLL	Purolite-TLL-PEI	Purolite-TLL-PEI-GLU
Linhaça	27,10 ± 2,60	19,76 ± 2,50	13,72 ± 0,42
Coco	41,97 ± 0,65	30,36 ± 1,04	28,16 ± 2,85
Soja	26,69 ± 2,16	21,20 ± 1,34	10,40 ± 1,08
Rícino	18,78 ± 2,54	9,33 ± 0,27	3,25 ± 0,07

Na reação de esterificação, o biocatalisador Purolite-TLL demonstrou maior eficiência de conversão em comparação aos demais. O biocatalisador modificado com PEI apresentou resultados semelhantes à TLL imobilizada para três dos quatro álcoois testados. Já a modificação com glutaraldeído resultou em uma conversão inferior, sugerindo que essa modificação afeta negativamente a eficiência catalítica na esterificação. Em relação aos álcoois testados, foi observado que os álcoois com menor número de carbonos, como o etílico, apresentaram baixa conversão. Já os álcoois com maior número de carbonos apresentaram conversões significativamente superiores. Embora o álcool isoamílico tenha demonstrado uma eficiência ligeiramente maior, a diferença em relação aos demais foi pequena, não permitindo a identificação de um padrão claro.

Tabela 3. Esterificação de ácidos graxos livre de óleo de soja com diferentes álcoois catalisados por biocatalisadores imobilizados de TLL.

Álcoois	Biocatalisador		
	Purolite-TLL	Purolite-TLL-PEI	Purolite-TLL-PEI-GLU
Etílico	61.16 ± 5,32	25,43 ± 2,20	19,53 ± 1,16
Amílico	84,64 ± 0,57	83,01 ± 0,58	70,17 ± 1,16
Isoamílico	88,90 ± 0,23	87,51 ± 0,23	55,03 ± 1,73
Octílico	85,09 ± 0,58	85,43 ± 0,46	60,34 ± 1,27

Conclusões

Os resultados da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Purolite C18 demonstraram a eficácia do método, com um rendimento de imobilização de aproximadamente 50%. A atividade específica da lipase imobilizada foi cerca de quatro vezes maior na forma não modificada. Em termos de termoestabilidade, o biocatalisador Purolite-TLL-PEI apresentou o menor valor de kd, sendo cerca de 82,4% inferior aos demais biocatalisadores. Na reação de hidrólise, a Purolite-TLL destacou-se em relação aos outros biocatalisadores. Nos testes de esterificação, a

Purolite-TLL mostrou maior eficiência na conversão de álcoois de menor massa molecular, enquanto a Purolite-TLL-PEI apresentou desempenho semelhante nos outros casos. Assim, a pesquisa evidenciou que as modificações físico-químicas em lipases imobilizadas afetam diretamente suas propriedades catalíticas e a estabilidade dos biocatalisadores. No entanto, os efeitos dessas modificações exigem uma análise empírica detalhada.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal de Itajubá pelo financiamento da bolsa de iniciação científica vigente de 2023/2024.

Referências

BARBOSA, O. et al. The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 5, 2012.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 2015.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Reticulação física de lipase de Rhizomucor miehei imobilizada em octyl agarose via revestimento com polímeros iônicos. *Bioquímica de Processos*, 2017.

MANOEL, E. A. et al. Design of a core–shell support to improve lipase features by immobilization. *RSC Advances*, v. 6, p. 62814–62824, 2016.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007.

SARMAH, N. et al. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 2018.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 2013.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017.

ZISIS, T. et al. Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry*, 2015.