

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos  
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

**INAFERM 2011**

## Imobilização da lipase *Candida rugosa* em poli(3-hidroxitirato-co-hidroxitirato) e caracterização bioquímica

<sup>1</sup>Rebeca Yndira Cabrera Padilla; <sup>1</sup>Milena Chagas Lisboa; <sup>1,2</sup>Alini Tinoco Fricks; <sup>1,2</sup>Elton Franceschi; <sup>1,2</sup>Alvaro Silva Lima; <sup>1,2</sup>Daniel Pereira da Silva; <sup>1,2</sup>Cleide Mara Faria Soares.

<sup>1</sup>Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Bairro Farolândia, CEP: 49032-490, Aracaju-SE - E-mail: yndiracp@yahoo.com

<sup>2</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP - Bairro Farolândia, CEP: 49032-490, Aracaju-SE.

### RESUMO

Neste trabalho foi realizada a imobilização da lipase *Candida rugosa* (LCR) em biopolímero poli (3-hidroxitirato-co-hidroxitirato) PHBV em meio aquoso e avaliação das propriedades bioquímicas. A lipase imobilizada foi obtida por adsorção física em hexano como meio de dispersão. A eficiência de imobilização foi de 25%. Realizou-se um estudo comparativo entre LCR livre e imobilizada. Em virtude do procedimento de imobilização, comparada à enzima livre, ocorreu pequena modificação relacionada à temperatura ótima de atividade hidrolítica (37 para 45°C), porém o pH ótimo de atuação foi similar (faixa de 7,0). A constante de inativação para enzima imobilizada a 40°C foi de 0,009 h<sup>-1</sup> e 77 h para o tempo de meia-vida. Os parâmetros cinéticos obtidos foram: constante de Michaelis-Menten ( $K_m=213,18$  mM) e velocidade máxima de reação ( $V_{max}=318,62$  U/g). A estabilidade operacional da LCR imobilizada foi testada em 12 ciclos de reutilização com manutenção de 50 % de sua atividade inicial.

**Palavras-chave:** LCR, imobilização, PHBV, parâmetros cinéticos

### INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas desempenha um papel importante no âmbito da biotecnologia aplicada. A principal motivação para a imobilização de enzimas é a capacidade de isolar o biocatalisador do produto de reação e reutilizá-la, a fim de aumentar a sua produtividade (Persson, *et al.*, 2002). O procedimento mais comum de imobilização é a adsorção física devido a sua facilidade e baixo custo.

As características da matriz ou do suporte são de grande importância no desempenho das enzimas imobilizadas. Embora ainda não exista um suporte universal que seja adequado para todas as enzimas e todas as suas aplicações, os requisitos básicos para que um material seja utilizado como suporte para imobilização são: alta afinidade por proteínas, disponibilidade de grupos reativos funcionais, estabilidade mecânica, rigidez, viabilidade de regeneração e capacidade de carga (Foresti, *et al.*, 2007).



Nesse sentido vários suportes ecológicos são potenciais a serem utilizados para imobilização de enzimas mas ainda não foram estudados para este fim, dentre eles destacam-se: poli (hidroxibutirato) (PHB) e poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV). Estes biopolímeros disponíveis comercialmente têm atraído grande atenção para o uso em aplicações agrícolas, marítimos e médicos. As principais vantagens destes polímeros termoplásticos são a biocompatibilidade e biodegradabilidade (Steinbuechel, 1996).

No entanto, o PHB é rígido e frágil, restringindo sua faixa de aplicação. Por outro lado, os copolímeros do PHB como 3-hidroxivalerato (PHBV) são menos rígidos, mais resistentes e cristalinos (Costa *et al.*, 2007). Desta forma, PHBV constitui uma boa alternativa a ser usada como suporte, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência, facilidade de reabsorção, propriedades não-tóxicas e pelo fato de ser ecologicamente correto.

Os objetivos do presente trabalho foram: imobilizar a enzima LCR no suporte PHBV por adsorção física; avaliar as propriedades bioquímicas da enzima imobilizada e compará-las com a enzima livre, avaliar a estabilidade operacional, determinar a constante de inativação, tempo de meia-vida e parâmetros cinéticos da LCR imobilizada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Determinação da Atividade Hidrolítica.

A atividade hidrolítica da LCR na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares *et al.* (1999), com modificações. O substrato foi preparado pela emulsão de 50 ml de azeite de oliva e 50 ml de goma arábica a 7% em solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). Em frascos Erlenmeyer foram adicionados: 5 ml de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio e 0,1g de lipase. Os frascos foram incubados a 37°C por 5min para a LCR livre, 10min para o LCR imobilizado em banho termostatizado com agitação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,01M, utilizando fenolftaleína como indicador.

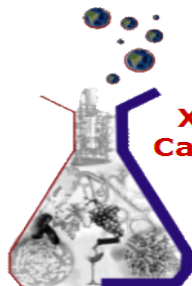
### Imobilização da Enzima em PHBV por Adsorção Física

LCR foi imobilizada em poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV, por adsorção física, de acordo ao método de Soares *et al.*, 2004 com modificações. O procedimento consiste na mistura de 20 ml de hexano com 2 g do suporte em agitação vigorosa a temperatura ambiente durante 2 h, em seguida, 20 ml da solução enzimática (0,6g de LCR solubilizada em 20 ml de solução tampão fosfato pH 7,0) é adicionada à suspensão hexano-suporte e mantida em agitação por mais 2 h. Após o término deste período, o sistema enzima-suporte foi incubado por 24 h a 4°C. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo através de repetidas lavagens com hexano. A secagem da LCR imobilizada foi realizada a vácuo por 1 h e estocada a 4°C. Para a obtenção da quantidade ótima de enzima, foram realizados ensaios de imobilização com diferentes carregamentos de LCR em 2g de suporte PHBV, relação enzima/suporte (0,15; 0,225; 0,3; 0,375; 0,45).

### Propriedades Bioquímicas da Lipase Imobilizada

#### Atividade em função do pH e da temperatura

A atividade hidrolítica da LCR imobilizada foi estudada utilizando-se azeite de oliva como substrato na faixa de pH entre 3,0 a 9,0. A influência da temperatura na atividade da LCR imobilizada foi determinada em pH 7,0 nas temperaturas de 30 a 70°C.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos  
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

# INAFERM 2011

## Estabilidade térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da LCR imobilizada foi determinado por meio da incubação da LCR (0,1 g massa seca) a 40 e 60°C em meio-aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0) por 3 horas. Em tempos pré-estabelecidos, foram retiradas alíquotas e imediatamente resfriadas. Em seguida, a atividade hidrolítica residual foi determinada a 37°C (10 min), como descrito anteriormente.

A constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), para a LCR imobilizada, foram calculadas pelas equações 1 e 2, respectivamente (Zanin, 1989).

$$A_{in} = A_{ino} \exp(-k_d \cdot t) \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \ln(0,5) / -k_d \quad (2)$$

onde:  $A_{in}$  = atividade residual após tratamento térmico durante um período de incubação (U/g);  $A_{ino}$  = atividade enzimática inicial (U/g);  $k_d$  = constante de desativação ( $h^{-1}$ );  $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida (h).

## Estabilidade operacional em meio aquoso

A estabilidade operacional da LCR imobilizada foi determinada em reações de hidrólise em bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado. Neste estudo empregou-se, em todas as bateladas, a mesma massa de biocatalisador imobilizado (0,1 g). Foram realizadas bateladas de 10 min a 37°C e pH 7,0. A cada batelada LCR imobilizada foi lavada com o hexano para remoção dos reagentes e produtos eventualmente retidos no suporte. Após 30 minutos, tempo necessário para a evaporação do solvente, a lipase imobilizada era reutilizada em outra reação com um novo substrato.

## Determinação dos parâmetros cinéticos

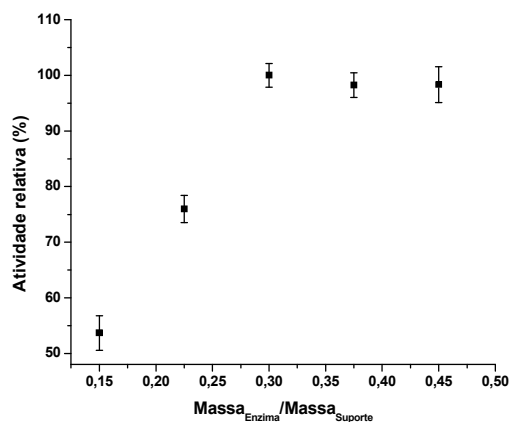
Para a determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações entre 37 e 2232 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas com diferentes proporções de azeite de oliva (1 a 60%) e solução aquosa de goma arábica (7% p/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela LCR imobilizada foram determinadas. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes foram calculados mediante ajuste não linear com o auxílio do programa Origin<sup>®</sup> 8,0.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Imobilização da LCR em PHBV por Adsorção Física

A influência do carregamento de enzima foi verificada mediante imobilizações com diferentes razões mássicas de enzima/suporte (0,15; 0,225; 0,3; 0,375; 0,45).

A Figura 1 mostra a atividade hidrolítica relativa da LCR imobilizada em função da razão mássica enzima/suporte. Pôde-se constatar que a atividade da enzima aumenta significativamente à medida que aumenta a razão enzima/suporte (0,15-0,3), Carregamento de LCR superior a 0,3 g de enzima / g de suporte não influencia a atividade da LCR, sendo esta a proporção ideal de enzima/suporte para imobilização da LCR em PHBV que representa 926 U<sub>Enzima</sub>/g<sub>Suporte</sub>. O rendimento de imobilização foi de aproximadamente 25%.

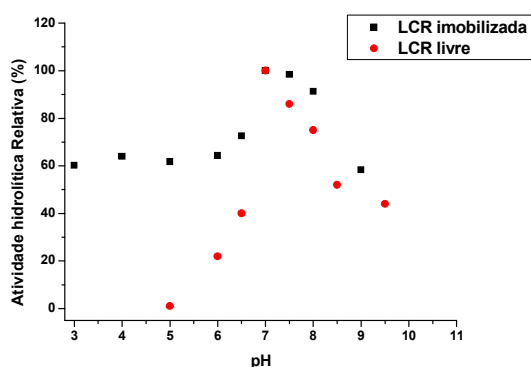


**Figura 1.** Atividade relativa em função da variação da relação enzima/suporte para a imobilização da LCR em PHBV

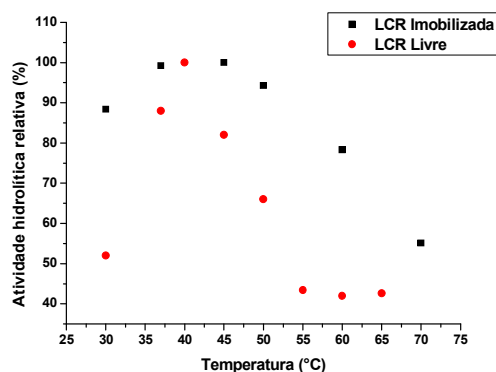
### Efeito do pH e da temperatura

A Figura 2 apresenta o efeito do pH na atividade hidrolítica de LCR livre e imobilizada em suporte PHBV. Em geral enzimas imobilizadas apresentam maior estabilidade frente a pHs extremos, porém em nosso estudo constatou-se que, assim como a LCR livre, a LCR imobilizada apresentou maior atividade hidrolítica em pH 7,0, tal fato sugere que as condições no micro e macroambiente são praticamente as mesmas e que o suporte não induz mudanças conformacionais significativas na enzima.

A Figura 3 mostra os resultados de atividade hidrolítica em diferentes temperaturas para LCR livre e imobilizada. Para LCR livre a atividade máxima foi encontrada a 37°C enquanto para LCR imobilizada os maiores valores de atividade foram obtidas na faixa de 37°C a 45°C. Resultados semelhantes foram reportados por Tutar *et al.*, 2009 imobilizando LCR em Sporopolenina e Li *et al.*, 2009 imobilizando lipase porcina pancreática (LPP) em Rod-like SBA-15.



**Figura 2.** Efeito do pH na atividade hidrolítica relativa da LCR livre e imobilizada em PHBV



**Figura 3.** Influência da temperatura na atividade relativa para a LCR livre e imobilizada. Ensaios realizados em pH 7,0.

## Estabilidade Térmica

A Figura 4 mostra os resultados da atividade relativa em função do tempo de incubação nas temperaturas de 40 e 60°C. Melhor estabilidade térmica foi observada com LCR imobilizada para ambas as temperaturas. A 40°C a atividade relativa da LCR livre foi de 21% enquanto que para a LCR imobilizada foi de 94% após 4 h de exposição nesta temperatura. A 60°C a LCR livre perde praticamente toda a atividade em 3 h enquanto a LCR imobilizada em PHBV, ainda apresenta atividade relativa de 18%.

A temperatura de 40°C para a LCR imobilizada foram calculados os valores da constante de inativação ( $k_d = 0,009 \text{ h}^{-1}$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2} = 77 \text{ h}$ ).

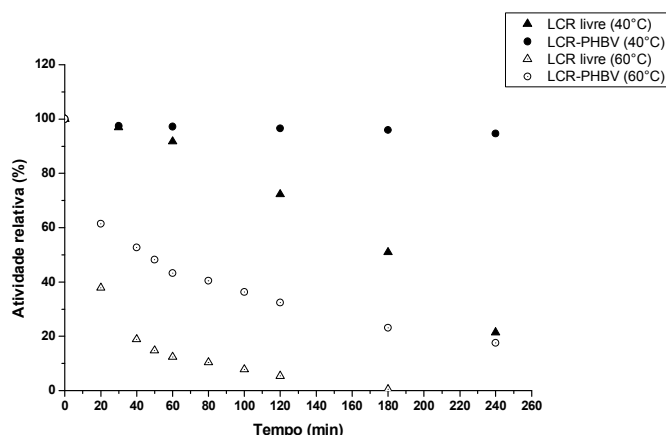


Figura 4. Estabilidade térmica da LCR livre e imobilizada (incubadas em 40 e 60°C).

## Estabilidade Operacional

A Figura 5 mostra a atividade hidrolítica em função dos ciclos de reutilização. Os dados mostram que LCR imobilizada em PHBV pode ser reutilizada até doze vezes com manutenção de 50% de sua atividade inicial. A literatura relata para LPP imobilizada em SBA a utilização de forma eficiente durante apenas cinco ciclos de reutilização o que sugere que a LCR imobilizada em PHBV poderia ser mais adequada para aplicações industriais devido à sua fácil recuperação a partir do sistema de reação e reutilização eficiente (Li *et al.*, 2009).

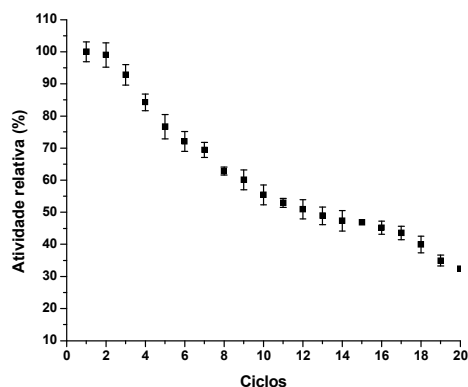


Figura 5. Estabilidade operacional da LCR imobilizada em suporte PHBV.



### Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Utilizando o programa Origin<sup>®</sup> 8, mediante um ajuste não linear foram calculadas a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ). O ajuste do modelo cinético (Michaelis-Menten) aos pontos experimentais forneceu os valores dos parâmetros da LCR livre ( $K_m=835,59\text{mM}$ ,  $V_{max}=4354,61\text{U/g}$ ) e LCR imobilizada ( $K_m=213,18\text{mM}$ ,  $V_{max}=318,62\text{U/g}$ ). Nota-se que as constantes cinéticas ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) obtidas para o biocatalisador imobilizado são inferiores aos valores obtidos para a LCR livre. Este fato sugere que há limitações difusionais que dificultam o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e/ou restrições estéricas. Resultados similares foram reportados na literatura envolvendo a diminuição nos valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  após a imobilização (Tutar *et al.*, 2009; Dandavate *et al.*, 2008).

### CONCLUSÕES

Neste estudo a lipase *Candida rugosa* (LCR) foi imobilizada com sucesso por adsorção física em biopolímero PHBV (*poli (3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)*). A melhor razão mássica enzima/suporte, para imobilização foi 0,3 (p/p) com rendimento de imobilização de 25%. A estabilidade térmica da LCR imobilizada e pH ótimo de atuação estão em concordância com a literatura. A partir dos resultados apresentados pôde-se concluir que LCR imobilizada em PHBV constitui um biocatalisador promissor para diversas aplicações industriais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa, M. S.; Duarte, A. R. C.; Cardoso, M. M., Duarte, C. M. M. (2007), Supercritical antisolvent precipitation of PHBV microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 328, p. 72-77.
- Dandavate, V.; Keharia, H.; Madamwar, D. (2008), Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 349-352.
- Foresti, M. L. e Ferreira, M. L. (2007), Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. *Enzyme Microbial Technology*, v. 40, p.769-777.
- Li, Y.; Zhou, G.; Li, C.; Qin, D.; Qiao, W.; Chu, B. (2009), Adsorption and catalytic activity of *Porcine pancreatic* lipase on rod-like SBA-15 mesoporous material. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 341, p. 79-85.
- Persson, M.; Mladenoska, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P. (2002), Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microbial Technology*, v. 31, p. 833-841.
- Soares, C. M. F.; de Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 77-79, p. 745-758.
- Soares, C. M. F.; Santos, O. A.; de Castro H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M. (2004). Studies on lipase immobilization in hydrophobic sol-gel matrix. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 307-319.
- Steinbuechel, A. (1996), *PHB and other polyhydroxyalkanoic acids*. In: Rehm HJ, Reed G, Roehr M. editors. *Products of primary metabolism*. 2 ed., vol. 6, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Tutar, H.; Yilmaz, E.; Pehlivan, E.; Yilmaz, M. (2009), Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, p. 315-320.
- Zanin, G. M. (1989), Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglucosidase imobilizada. *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.