

PRODUÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Botryosphaeria ribis* EC-01 EM RESÍDUO TÊXTIL

RESUMO

Jéssica Borges de Oliveira
jessicao@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná
Apucarana, Paraná, Brasil

Rafael Block Samulewski
samulewski@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná
Apucarana, Paraná, Brasil

Aneli M. Barbosa-Dekker
anelibarbosa@gmail.com
Universidade Estadual de Londrina,
Londrina, Paraná, Brasil

Robert F. H. Dekker
xylanase@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná
Londrina, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade
milenaandrade@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná
Apucarana, Paraná, Brasil

As lipases são enzimas que apresentam diversas aplicações industriais e quando comparadas a catalisadores químicos apresentam vantagens como maior seletividade e melhor separação dos produtos. Apesar disto, o custo elevado destas enzimas desfavorece sua aplicação. Uma alternativa para contornar este inconveniente é a imobilização destas enzimas que permite a sua reutilização. Portanto, este trabalho teve o objetivo de desenvolver um biocatalisador de baixo custo produzido a partir de resíduos agroindustriais e imobilizado em resíduo têxtil. A lipase foi produzida pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, sob fermentação submersa, utilizando-se torta de soja em condição previamente otimizada. Em seguida, a lipase foi parcialmente purificada por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 %, m/v) e imobilizada em resíduo têxtil com partículas magnéticas (TEPM) e sem (TE) utilizando-se planejamentos fatoriais 2^2 . A pré-purificação demonstrou ter sido eficiente visto que a atividade específica passou de 154 para 383 U/mg. A máxima atividade de lipase imobilizada obtida foi 46,8 U/g_{TE} quando as variáveis tempo e temperatura foram 90 min e 18 °C, respectivamente. O modelo utilizado, embora não tenha sido conclusivo, foi útil para direcionar futuros experimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Torta de soja. Fermentação submersa. Adsorção

INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol acilhidrolases) têm se destacado entre as enzimas mais utilizadas industrialmente por atuarem em reações de hidrólise, interesterificação, transesterificação, aminólises, entre outras. Estas enzimas são sintetizadas por plantas, animais e micro-organismos e sua principal aplicação comercial tem sido em detergentes, mas também têm sido utilizadas na produção de biodiesel (SHARMA et al., 2001; JEAGER; EGGERT, 2004).

Entretanto, a utilização de lipases como biocatalisadores na produção de biodiesel é desfavorecida pelo seu custo elevado. Portanto, estratégias para contornar este inconveniente como o uso de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de lipases têm sido empregadas. A torta de soja, por exemplo, é uma excelente fonte de nutrientes para o cultivo de micro-organismos e produção de lipases, pois pode conter até 50% de proteína, juntamente com carboidratos e lipídeos residuais (BARBOSA et al., 2011; RAMACHANDRAN et al., 2007).

A otimização da produção de lipase por *B. ribis* EC-01 foi recentemente descrita utilizando-se planejamento fatorial e análise por Metodologia de Superfície de Resposta. Altos títulos de lipase foram obtidos na condição otimizada ($76,57 \pm 7,97$ U/mL) utilizando-se torta de soja como substrato e glicerol, em água destilada. O custo de produção baseando-se nos nutrientes utilizados foi de apenas US \$ 0,42 por litro de meio (ANDRADE et al., 2013). Outra alternativa para diminuir o custo da aplicação de lipase é imobilizá-la em suportes baratos como resíduo têxtil. No Brasil, a geração destes resíduos é estimada em 175 mil toneladas/ano e somente 36 mil toneladas são reaproveitados na produção de barbantes, novas peças de roupas e fios (ALENCAR et al., 2015). O método de imobilização mais usado é a adsorção, pela facilidade e baixo custo (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Portanto, este trabalho objetivou produzir lipase por *B. ribis* EC-01, sob fermentação submersa utilizando-se torta de soja como substrato e imobiliza-la em resíduo têxtil utilizando planejamentos fatoriais 2^2 para futuro uso como um biocatalizador.

METODOLOGIA

Materiais

A torta de soja foi doada pela IMCOPA Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A (Cambé-PR). Palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) foi adquirido de Sigma-Aldrich (EUA). Os resíduos têxteis foram provenientes dos Laboratórios da Pesquisa e Desenvolvimento e de Produção do Vestuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana.

Produção do inóculo e obtenção das enzimas lipases

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) que foi mantido em BDA inclinado a 4 °C e foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio mínimo de Vogel (1956), glucose 1% (m/v) e ágar 2 % (m/v) e incubadas à 28 ± 2 °C por 5 dias. Esferas de 0,7 cm de diâmetro foram cortadas e inoculadas em frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL com 25 mL de meio otimizado por Andrade et al. (2013) composto por 2,37% (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA. Os cultivos foram mantidos sob agitação, em *shaker* (180 rpm) por 5 dias a 28 °C, e

interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min). Os extratos brutos livres de células foram parcialmente purificados por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20 %, m/v), dialisados e armazenados a 4 °C.

Imobilização de lipases

A imobilização da lipase produzida foi realizada em resíduos têxteis sem (TE) e com partículas magnéticas (TEPM) pelo método de adsorção. O suporte (50 mg) foi deixado em contato com 5 mL de solução enzimática em tampão fosfato (37 U/mL) a 150 rpm de acordo com planejamentos fatoriais 2^2 (7 experimentos), avaliando-se temperaturas (18 a 32 °C) e tempo de contato (90 a 300 min). O imobilizado foi lavado duas vezes com tampão fosfato pH 8,0 (0,2 M) e água destilada. A atividade enzimática foi determinada no derivado e no sobrenadante. Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 5 ou 10 % de significância utilizando o programa STATISTICA 8.0®.

Determinação da atividade de lipase e determinação da concentração de proteínas

As atividades das lipases livres e imobilizadas foram determinadas espectrofotometricamente, utilizando-se *p*-NPP como substrato, em pH 8,0, 55 °C, 2 min e 410 nm (MESSIAS et al., 2009). A unidade de lipase foi definida como a liberação de 1 µmol de *p*-NP por min, por mL da solução de enzima. A concentração de proteínas extracelulares foi determinada pelo método de Bradford (1976).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01

A produção de lipases foi avaliada em condição previamente otimizada por Andrade et al. (2013) que utiliza 2,4 % (m/v) de torta de soja e 4,5 % (v/v) de glicerol PA. A Tabela 1 mostra os resultados da atividade de lipase antes e após a purificação parcial com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e após a diálise contra água deionizada.

Tabela 1 – Atividade enzimática antes e após a purificação parcial

Amostra	U/mL	U/mg
Lipase antes da purificação parcial	47,6 ± 1,63	154 ± 5,29
Lipase após purificação parcial (20%, m/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	85,0 ± 4,66	231 ± 12,7
Lipase após purificação parcial e diálise	133 ± 0,05	383 ± 4,31

Fonte: Autoria própria (2017).

Após a adição de 20 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a atividade enzimática passou de 47,6 para 85,0 U/mL, revelando que a lipase foi precipitada. Após a diálise, a atividade enzimática quase dobrou (133 U/mL). A eficiência do processo foi confirmada com a dosagem das proteínas extracelulares: a atividade específica passou de 154 U/mg no extrato bruto inicial para 383 U/mg ao final do processo, ou seja, seu valor quase triplicou. Uma solução desta enzima (37,5 U/mL) foi utilizada para posterior imobilização nos suportes produzidos.

Imobilização de lipases

A imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em TE e TEPM foi estudada utilizando-se planejamentos estatísticos. A Tabela 2 apresenta os níveis e os ensaios experimentais do delineamento fatorial (2^2) e a variável dependente avaliada foi a atividade da enzima imobilizada (U/g_{suporte}). Em relação à enzima imobilizada em TE houve variação de 31,8 a 46,8 U/g_{TE} dependendo do tempo e da temperatura empregados e a atividade máxima (46,8 U/g_{TE}) foi alcançada quando os fatores tempo (X_1) e temperatura (X_2) foram de 90 minutos e 18 °C, respectivamente.

De acordo com o modelo linear ou de 1ª ordem, menores tempos de reação melhoram a atividade de lipase imobilizada em TE ($p \leq 0,1$). O valor de $R^2 = 0,82$ e $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ ($22,44 > 4,06$) obtidos mostraram que o modelo é confiável e estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$). A equação preditiva (1) é mostrada abaixo, onde os termos significativos estão em negrito:

$$U/g_{\text{TE}} = \mathbf{38,36} - \mathbf{4,26x_1} + 0,01x_2 + 3,24x_1 \cdot x_2 \quad (1)$$

Tabela 2 - Imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em resíduo têxtil

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas	
	X_1	X_2	U/g_{TE}^1	U/g_{TEPM}^2
1	-1	-1	46,8	10,7
2	-1	1	40,3	17,8
3	1	-1	31,8	11,0
4	1	1	38,3	6,33
5	0	0	38,5	7,35
6	0	0	33,7	8,52
7	0	0	39,1	8,52
Fatores		Níveis reais		
		-1	0	1
X_1 (tempo, min)		90	195	300
X_2 (temperatura, °C)		18	25	32

¹ Imobilização em resíduo têxtil sem partículas magnéticas

² Imobilização em resíduo têxtil com partículas magnéticas

Fonte: Autoria própria (2017).

Como pode ser verificado na Tabela 2, a imobilização em TEPM variou de 6,33 a 17,8 U/g_{TEPM} , sendo este maior valor alcançado quando tempo (X_1) e temperatura (X_2) foram de 90 minutos e 32 °C, respectivamente. Para este modelo, também de 1ª ordem, a variável tempo (X_1) e a interação Tempo x Temperatura (X_1X_2) influenciaram negativa e significativamente na melhora da atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 imobilizada em TEPM ($p \leq 0,05$), ou seja, quando a variável X_1 passou para um nível inferior (valor negativo) ocorreu melhora na atividade da lipase imobilizada. Dado a falta de ajuste do modelo ($R^2 = 0,77$) ter sido significativa, a geração de uma nova matriz visando otimizar a atividade da lipase imobilizada em TEPM, certamente apresentará menores tempos de reação.

CONCLUSÃO

A purificação parcial da lipase de *B. ribis* EC-01 com 20% (m/v) de sulfato de amônio foi eficiente visto que sua atividade específica passou de 154 para 383 U/mg. O melhor suporte para imobilizar esta lipase foi o resíduo têxtil sem as partículas magnéticas, sendo que o máximo de atividade alcançado foi de 46,8 U/gTE quando o tempo e a temperatura foram de 90 min e 18 °C; porém, este modelo não é conclusivo, apenas indicativo para novos experimentos.

PRODUCTION AND IMBILITY OF LIPASE OF *Botryosphaeria ribis* EC-01 IN WASTE TEXTILE

ABSTRACT

Lipases are enzymes that have several industrial applications and when compared to chemical catalysts have advantages such as greater selectivity and better separation of products. Despite this, the high cost of these enzymes detracts from its application. An alternative to circumvent this inconvenience is the immobilization of these enzymes that allows their reuse. Therefore, this work had the objective of developing a low cost biocatalyst produced from agroindustrial waste and immobilized in textile waste. Lipase was produced by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01, under submerged fermentation, using soybean cake in a previously optimized condition. Then the lipase was partially purified by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (20%, m / v) and immobilized on textile residue with magnetic particles (TEPM) and without (TE) using 2×2 factorial designs. Pre-purification proved to be efficient since the specific activity increased from 154 to 383 U / mg. The maximum immobilized lipase activity obtained was 46.8 U / gTE when the time and temperature variables were 90 min and 18 ° C, respectively. The model used, although not conclusive, was useful to direct future experiments.

KEY WORDS: Soy cake. Submerged fermentation. Adsorption

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pelo auxílio financeiro

REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. L. S.; SIMONI, J. H.; FIORELLI, M. N.; LINK, P. P.; DE ANGELIS NETO, G. Os efeitos socioambientais causados pelos resíduos sólidos das indústrias de confecções do polo moda de Maringá – PR. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, p. 478-504, 2015.

ANDRADE, M. M.; BARBOSA A. M.; BOFINGER, M. R.; DEKKER R. F. H.; MESSIAS, J. M.; GUEDES, C. L. B. et al.; Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

BARBOSA, A.M.; MESSIAS, J.M.; ANDRADE, M. M.; DEKKER, R.F.H.; VENKATESAGOWDA, B. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. In: **Soybean, Biochemistry, Chemistry and Physiology**. p. 101-118, Tzi Bun Ng, Intech, Rijeka, Croatia, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.305–313, 2014.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426-431, 2009.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

OLIVEIRA, J. B. et al. Produção e imobilização de lipase de *Botryosphaeria ribis* ec-01 em resíduo têxtil. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Jéssica Borges de Oliveira

Rua Marçílio Dias, 635, Apucarana, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

