

Characterization of the activity and stability conditions of a commercial lipase solution.

Caracterização das condições de atividade e estabilidade de uma solução comercial de lipase.

RESUMO

Os detergentes são produtos que possuem a propriedade de diminuir a tensão superficial da água, facilitando as operações de limpeza. A eficácia dos detergentes modernos depende de compostos que sejam apropriados para uma lavagem mais eficiente e rápida, não diminuam a vida útil do produto tratado e sejam ambientalmente seguros. As enzimas vêm sendo utilizadas para aumentar a eficiência desses produtos desde 1930, com destaque para as lipases, que atuam na interface orgânica-aquosa da molécula, catalisando a hidrólise de lipídeos e liberando em solução ácidos orgânicos e glicerol. O objetivo do presente estudo foi caracterizar uma solução enzimática comercial de lipase que será utilizada para a formulação de um novo detergente enzimático. Para tanto, avaliou-se a atividade lipídica em diferentes condições de pH e temperatura ao longo de sete horas, utilizando o método da reação de hidrólise do substrato *p*-nitrofenil palmitato. Os resultados obtidos mostraram que a maior atividade para lavagens de 15 minutos, tempo de lavagem sugerido na indústria, foi obtida a 55°C. No entanto, em maiores períodos de tempo as condições de 44°C e pH 9,16 propiciaram melhores atividades, com uma energia de ativação de 143,133 KJ/mol.

PALAVRAS-CHAVE: Enzimas. Temperatura. pH

ABSTRACT

The detergent are products that have the property of reducing water's superficial tension, facilitating cleaning operations. The effectiveness of modern detergents depends on the compounds that might be appropriate for a more efficient and fast washing, don't reduce the life cycle of the treated product and be secure for the enviroment. The enzymes are being used for increasing the efficiency of these products since the 1930s, highlighting the lipases, that act on molecule's organic-aqueous interface, catalysing lipid hydrolysis and releasing on organic acids and glycerol. The aim of this study was to characterize a comercial enzymatic solution of lipase that may be used for the formulation of a new enzymatic detergent. Therefore, lipidic's activity has been evaluated in different conditions of pH and temperature along seven hours, using the method of *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis reaction. The results showed that the biggest activity level for whashes of 15 minutes, time suggested by industries, was obtained at 55 degrees. However, at longer periods under conditions of 44 degrees and pH of 9,16, provided better activities, with an activation energy of 143,133 KJ/mol.

KEYWORDS: Enzymes. Temperature. pH.

[Maria Heloisa Heiss](#)

Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

[Ana Maria Velez Escallon](#)

Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

[Patrícia Dayane Carvalho Schaker](#)

Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de lipídeos com a liberação de ácidos orgânicos e glicerol, além de possuírem potencial de realizar a síntese, reação inversa a hidrólise, em ambientes aquosos (Mendes, 2013, p.245).

Devido a sua capacidade de ligar-se a diversos substratos, e apresentar estabilidade em solventes orgânicos, a lipase possui grande aplicabilidade na indústria, de modo que o número de estudos ligados a sua produção por vias microbiológicas, sua purificação e sua estabilidade tem crescido de maneira exponencial. Os estudos buscam obter enzimas purificadas, com características compatíveis com o uso industrial. Atualmente soluções enzimáticas comerciais são produzidas por empresas como a Novozymes, Genencor e Amano (Girelli, 2013). A lipase já vem sendo utilizada na produção de fármacos, emulsificantes, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, entre outras. Outro setor industrial com altas demandas de lipase é na produção de detergentes enzimáticos, aplicação essa que vêm sendo realizada desde os anos de 1930 promovendo a redução dos tempos de lavagem, e do consumo de água e energia. Essas características proporcionaram lavagens mais sustentáveis, tornando o pH em resíduos da lavagem neutro, com níveis limpeza satisfatórios, especialmente em indústrias que processam matérias-primas com alto conteúdo lipídico, como por exemplo frigoríficos, e sem prejudicar as superfícies. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar uma solução de lipase comercial, obtendo dados que darão suporte para o desenvolvimento de um detergente enzimático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foi utilizada uma amostra de solução de lipase comercial imobilizada, que por questões de sigilo, de marca desconhecida para os autores, fornecida pela empresa Quimitol, empresa apoiadora deste trabalho.

Para análise da pureza da solução enzimática, realizou-se uma eletroforese SDS-PAGE. Para isso, a amostra da lipase comercial foi diluída 100 vezes e preparada uma solução 1:1 (v:v) em tampão de carregamento, fervida por 5 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970) sob condições desnaturantes em um sistema Hoefer mini VE (Amershan Pharmacia Biotech). Após a corrida, o gel foi corado utilizando Azul Coomassie brilhante. Como marcador de peso molecular utilizou-se o *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa* (Thermo Scientific).

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizada a metodologia descrita por Stukmann (1979) e modificado por Krieger (1995), baseando-se na hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato em meio aquoso, contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. Realizou-se leituras de absorbância a cada 30 segundos por 5 minutos em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda fixo de 410 nm, em cubetas de vidro (1 cm).

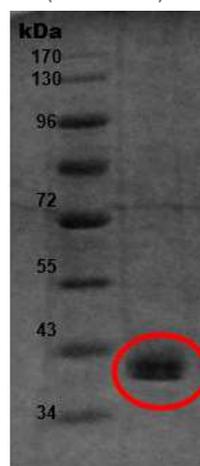
Para determinação da estabilidade em diferentes temperaturas, foram feitas diluições de 1% e 10% (V/V) da solução enzimática comercial utilizando água destilada. As amostras foram mantidas em banho-maria em diferentes temperaturas (44°C, 50°C, 55°C, 70°C), em intervalos de tempo até 180 minutos. Para determinação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da lipase comercial, amostras diluídas em 1% (V/V), foram mantidas em banho-maria por 5 min nas temperaturas de 37°C, 45°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C. Para realização das medidas de atividade enzimática das soluções foi utilizado o método descrito acima.

Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática, a solução de lipase comercial foi diluída 100 vezes, ajustando o pH por meio do uso das seguintes soluções tampão: acetato de sódio pH= 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5; tampão fosfato de sódio: pH= 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; e 8,0; e tampão Tris-HCl: pH=8,5; e 9,0 (Mendes, 2013). As amostras foram mantidas por 24 horas a 37°C e a quantificação da atividade enzimática utilizou-se a metodologia com o substrato *p*-nitrofenil palmitato, conforme descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando o resultado obtido para a eletroforese SDS-PAGE (Figura 1), verifica-se que a enzima comercial possui peso molecular aproximado de 40 kDa, similar ao descrito para a lipase isolada de *B. thermocatenuatus* (Schlieben et al. 2004). Além disso, a solução apresentou uma única banda, indicando sua pureza.

Figura 1 – Eletroforese SDS-PAGE 12% da solução comercial de lipase diluída 100x (vermelho).



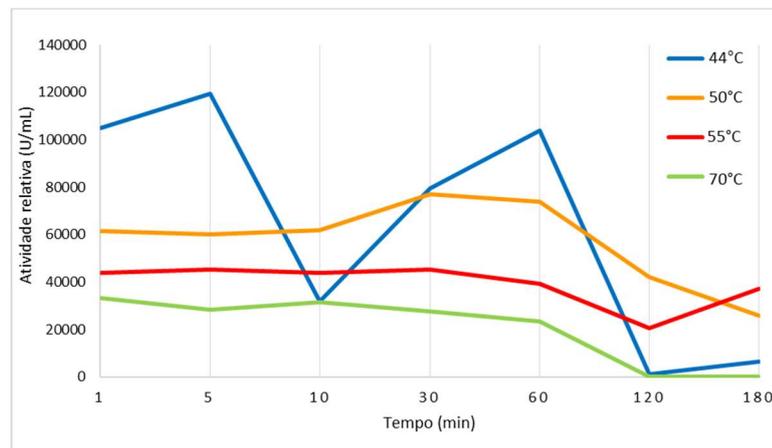
Fonte: Autoria própria (2019).

A partir da análise de estabilidade térmica da solução de lipase comercial (Figura 2), verificou-se maior atividade em 44°C após 5 e 60 minutos de reação, diferente do verificado para outras lipases de origem microbiana, que apresentaram temperaturas ótimas de hidrólise entre 55°C e 70°C (MESSIAS, J. M. et. al., 2011, p.219).

Além disso, observou-se que, apesar de atividade menor, a enzima apresenta estabilidade em temperaturas mais elevadas como 50 e 55°C em até 60 minutos após o início da reação, sendo essa drasticamente reduzida após esse período

principalmente a 70°C e 50°C, provavelmente devido ao processo de desnaturação proteica. Importante salientar que a estabilidade enzimática pode ser aumentada na formulação dos detergentes pela presença de polímeros em sua formulação. Esses polímeros atuam em conjunto com os ativos de limpeza, como os surfactantes, na quebra de ligação sujeira-fibra dos tecidos, e são também utilizados na imobilização de enzimas.

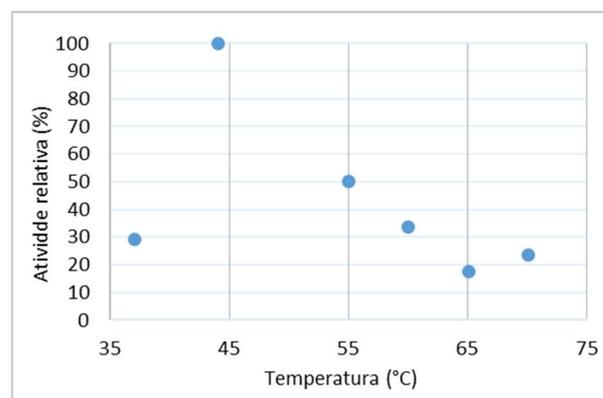
Figura 2- Estabilidade térmica da solução enzimática diluída 1% (V/V).



Fonte: Autoria própria (2019).

Para cálculo da energia de ativação da enzima considerou-se os valores de atividade enzimática em diferentes temperaturas após incubação de 5 minutos (Figura 3). A partir desses dados calculou-se uma energia de ativação de 143,1 kJ/mol, considerado baixo se comparado com o da lipase produzida pela levedura silvestre AC02, que assume valores entre 170 e 400 kJ/mol (GOLDBECK, 2008, p.74-75).

Figura 3- Atividade enzimática em diferentes temperaturas após 5 minutos de incubação em diferentes temperaturas para cálculo da energia de ativação da enzima.

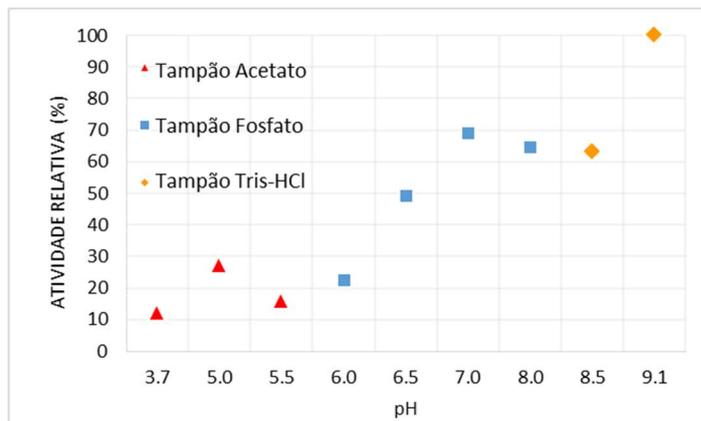


Fonte: Autoria própria (2019).

Em relação ao efeito do pH na atividade enzimática (Figura 4), observou-se que a enzima possui uma melhor atividade em pH acima de 7, ou seja, sua atividade é mais satisfatória em pH de neutro a básico, o que é um ponto muito favorável para a indústria de detergentes, uma vez que pH's ácidos danificam as fibras dos tecidos e das superfícies. O pH ótimo para atividade enzimática foi de 9,16. Esses valores corroboram os valores de pH ótimo encontrados em muitos

estudos sobre essa enzima (MESSIAS, J. M. et. al., 2011, p.221; MENDES, 2013, p.249).

Figura 4- Efeito do pH na atividade enzimática de solução comercial de lipase.



Fonte: Autoria própria (2019).

CONCLUSÃO

A solução de lipase comercial apresentou temperatura ótima de 44°C e pH ótimo de 9,16. Porém melhor temperatura para um ciclo de lavagem de 15 minutos, que é usualmente aplicado na indústria, é de 50°C. Nessa temperatura a enzima apresenta valores elevados de atividade além de alta estabilidade. Estes resultados são importantes para a indústria, embasando a formulação do detergente e sua indicação de uso.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Quimitol Industria e Comércio de Produtos Químicos LTDA pela parceria (n°0009/2018 UTFPR-TD) e a UTFPR pela infraestrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

GIRELLI, C. W. **Formulação de detergentes enzimáticos utilizando o Planejamento de Experimentos**. 2013. p.72 . Monografia (Graduação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013. Disponível em:

<https://sistemas.eel.usp.br/bibliotecas/monografias/2013/MBI13005.pdf>. Acesso em 18 ago. 2019.

MESSIAS, J. M. et. al. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. In. SEMINA: CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. Disponível em:

<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/126837/ISSN1679-0375-2011-32-02-213-234.pdf?sequence=1>. Acesso em 18 ago. 2019.

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. 2008. p.113. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas. 2008. Disponível em:

http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/256541/1/Goldbeck_Rosana_M.pdf. Acesso em 18 ago. 2019.

PASTORE, G. M. *et al.* **Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.*** 2003. p. 135-140. Campinas. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v23n2/v23n2a06.pdf>. Acesso em 18 ago. 2019.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum.*** Curitiba, 1995. p.260. Tese Doutorado em Ciências– Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MENDES, A. A. *et al.* **Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 51(3–4), pp. 100–109. doi: 10.1016/j.molcatb.2007.11.016.

MENDES, A. *et al.* **Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus.*** Química Nova, 36(2), pp. 245–251. doi: 10.1590/S0100-40422013000200008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000200008&script=sci_abstract&tlng=p. Acessado em 18 ago. 2019.

PEREIRA, E. B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas.** 2004. p.171. Trabalho de Conclusão de Pós-Graduação. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88179/207869.pdf?sequence=1>. Acessado em 18 ago. 2019.

SCHLIEBEN, N. H., Niefind, K. and Schomburg, D. (2004) **“Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenuatus,*”** Protein Expression and Purification. doi:10.1016/j.pep.2003.11.014. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/med/14766305>. Acessado em 18 ago. 2019.

OLSEN, H. S. FALHOLT, P. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents.** p. 555–567. doi: 10.1007/s11743-998-0058-7.