



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Hidrólise enzimática do óleo de soja empregando células íntegras de *Penicillium citrinum* imobilizadas em espumas de poliuretano visando a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados

Rafaela Lima¹, Amanda B. Arcas¹, Rafael M. Pereira¹, Heizir F. de Castro²
e Grazielle S. S. Andrade¹

¹Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciência e Tecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 Poços de Caldas – MG - E-mail: rafalima073@gmail.com

²Universidade São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena
12606810-Lorena – SP

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar as propriedades morfológicas, bioquímicas e cinéticas da lipase do fungo Penicillium citrinum imobilizada em espumas de poliuretano, bem como avaliar a potencialidade do biocatalisador na hidrólise de óleos vegetais ricos em ácidos poli-insaturados. As células imobilizadas foram obtidas por cultivo submerso do fungo em meio contendo azeite de oliva como agente indutor e suporte visando promover a imobilização in situ do micélio. O comportamento frente a valores de pH entre 6 a 8,5 e temperatura (30-45 °C) revelaram atividades máximas, respectivamente, em 8,0 e 35 °C. A estabilidade térmica a 60 °C foi demonstrada, obtendo-se tempo de meia-vida de 3,1 h. O efeito da concentração do substrato na atividade enzimática sugere que o biocatalisador obedeceu à cinética de Michaelis-Menten. O potencial catalítico do biocatalisador foi avaliado na reação de hidrólise do óleo de soja, obtendo-se valor máximo de 55,7% em 12 h de reação.

Palavras-chave: *Penicillium citrinum*, Células íntegras; Imobilização; Espuma de poliuretano; Hidrólise.

INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados são um importante grupo de compostos da dieta de seres humanos e outros animais, em que se destacam os ácidos do tipo ômega 3 e 6, que são elementos lipídicos estruturais de importância vital para as membranas celulares e influenciam uma ampla variedade de funções biológicas. As principais fontes desses ácidos são os óleos marinhos, embora também sejam encontrados em alguns óleos vegetais, tais como soja e canola (Vianni et al., 1995).

A obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados por hidrólise enzimática fornece um processo com vantagens econômicas e técnicas, podendo ser realizada em condições amenas e com menor gasto energético comparado aos processos físico-químicos (Freitas et al., 2007).

Diversos estudos têm sido realizados utilizando lipases extracelulares na hidrólise de óleos vegetais. No entanto, o emprego de células íntegras imobilizadas em suportes de baixo



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

custo tem se tornado uma alternativa atrativa, visto que as células podem ser utilizadas diretamente na reação, não sendo necessárias etapas de purificação e extração da lipase, diminuindo os custos do processo (Andrade et al., 2012).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o desempenho de células do fungo filamentosso *P. citrinum*, com elevada atividade lipolítica, imobilizadas em espumas de poliuretano na hidrólise do óleo de soja visando à obtenção de concentrados de ácidos poli-insaturados.

MATERIAL E MÉTODOS

O micro-organismo utilizado foi o fungo filamentosso *Penicillium citrinum* (URM 4216). Como matriz de imobilização foi empregada espuma de poliuretano comercial cortada em cubos de 6 mm. Óleo de soja refinado comercial obtido no mercado local foi utilizado nas reações de hidrólise, apresentando as seguintes características: índice de acidez (0,35 mg KOH/g), índice de saponificação (199 mg KOH/g) e ácidos graxos livres (0,02%).

As células íntegras imobilizadas foram preparadas pelo cultivo do fungo em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva (comercial) 30g/L, peptona (Himedia) 70g/L, NaNO₃ (Vetec) 1g/L, KH₂PO₄ (Synth) 1g/L e MgSO₄.7H₂O (Vetec) 0,5g/L, previamente autoclavados (121°C/15 min). Um inóculo de 10⁶ esporos do fungo foi transferido assepticamente para Erlenmeyers de 250 mL, contendo volume final de meio de cultura de 100 mL e 0,7 gramas de suporte. Em seguida, os frascos foram incubados por 96 h a 30°C sob agitação (Andrade et al.; 2012). A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração à vácuo, lavada com água e seca em bomba de alto vácuo.

A análise morfológica das células imobilizadas foi realizada por microscopia de varredura eletrônica (MEV) utilizando microscópio eletrônico LEO 440i Oxford (Cambridge, Inglaterra) com ampliação de 100 vezes. A atividade enzimática do biocatalisador imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme descrito por Andrade et al. (2014). Os valores de pH e temperatura ótimos foram avaliados e os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten; k_M e velocidade máxima de reação, $V_{máx}$) determinados pelo ajuste da equação de Michaelis-Menten e linearização de Lineaweaver-Burk, a partir da curva de concentração substrato *versus* atividade. A estabilidade térmica foi avaliada por meio de tratamento térmico do biocatalisador a 60 °C por um período máximo de 150 min, com retiradas periódicas a cada 30 min para quantificação da atividade residual e cálculo da constante de inativação térmica (k_D) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) determinados, conforme descrito por Andrade et al. (2014).

A reação de hidrólise enzimática do óleo de soja foi realizada conforme descrito por Freitas et al. (2007). Em Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 g do substrato (25% do óleo de soja em tampão pH 7,0) contendo agente emulsificante goma arábica a 2,5% m/m. Após a adição de 20% m/m de biocatalisador, os Erlenmeyers foram incubados a 37 °C e 170 rpm por um período máximo de 24h. Periodicamente foram retiradas amostras de 1 mL do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,025 M. A conversão foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos formados durante a hidrólise (Freitas et al., 2007).



RESULTADOS E DISCUSSÕES

A imobilização do fungo *P. citrinum* em espumas de poliuretano ocorreu como consequência natural do crescimento celular durante o cultivo, resultando na forte adesão das células no suporte, conforme pode ser observado na Figura 1. A atividade hidrolítica média em azeite de oliva foi de $143,1 \pm 5,1$ U/g e a concentração média de biomassa seca foi da ordem de $37,7 \pm 1,3$ g/L.

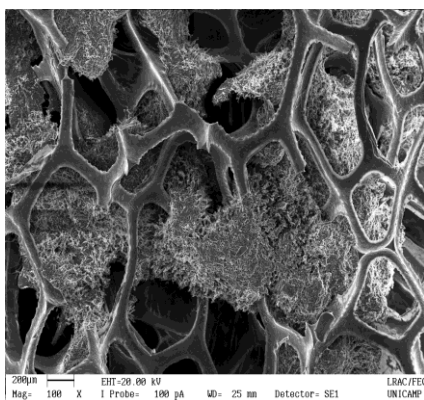


Figura 1. MEV das células de *P. citrinum* imobilizadas em espumas de poliuretano (100X).

Os resultados referentes à caracterização bioquímica e cinética das células imobilizadas estão ilustrados nas Figuras 2 (A-D). A melhor faixa de atuação das células imobilizadas foi em pH 8,0 e temperatura de 35°C, conforme ilustrado nas Figuras 2A e 2B. O efeito da concentração do substrato (150 a 1860 mM) na atividade hidrolítica das células imobilizadas foi determinado pela variação da porcentagem de azeite de oliva (5 a 50%) na emulsão, conforme ilustrado na Figura 2C, obtendo-se como parâmetros cinéticos os valores de 303,6 mM (k_M) e 256,4 U/g ($V_{máx}$).

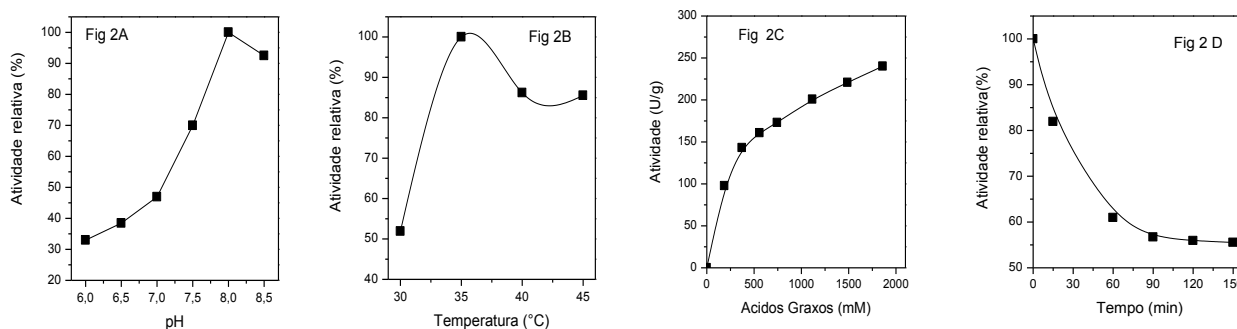


Figura 2. A atividade hidrolítica da lipase de *P. citrinum* imobilizada em espumas de poliuretano em função do pH (A); da temperatura (B) e da concentração de substrato (C). Estabilidade térmica do biocatalisador a 60 °C (D).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A Figura 2D indica que as células imobilizadas possuem boa estabilidade térmica, pois mantiveram mais de 50% da atividade inicial após incubação por 150 min a 60 °C, revelando um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 3,1 h e constante de inativação térmica (k_D) de 0,23 h⁻¹.

O potencial do biocatalisador na reação de hidrólise do óleo de soja foi ainda verificado adotando as condições propostas por Freitas et al., 2007. A Figura 3 apresenta a evolução da hidrólise enzimática do óleo de soja ao longo de 24h e indica que as células de *P. citrinum* imobilizadas foram eficientes na hidrólise do óleo de soja, alcançando grau de hidrólise máximo de 55,7% em 12 h de reação, não sendo observada reversibilidade da reação por um período adicional de 12h. Esses resultados se comparam favoravelmente aos descritos na literatura empregando lipases parcialmente purificadas e de baixo custo, como lipase de pâncreas de porco (Freitas et al., 2007).

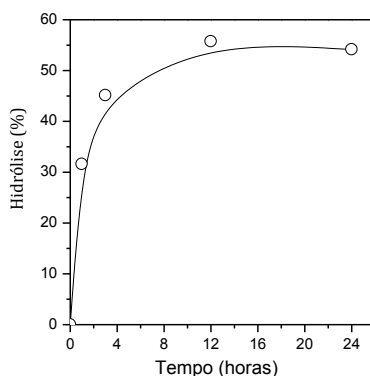


Figura 3- Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras de *P. citrinum* imobilizadas em poliuretano (T=37 °C, pH 7,0)

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são promissores e sugerem a potencialidade da aplicação de células de *P. citrinum* imobilizadas para mediar reações de modificação e óleos e gorduras, em particular, reações de hidrólise de óleos vegetais ricos em ácidos graxos poli-insaturados, como óleo de soja (54% de ácido linoleico). Estudos adicionais são ainda necessários visando estabelecer as condições otimizadas da produção de ácidos graxos poli-insaturados a partir do óleo de soja, adotando para esse propósito planejamento experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade GSS, Freitas L, Oliveira PC, De Castro HF. 2012 Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. J Mol Catal B: Enzym 84:183–188.

Andrade, GSS, Carvalho, AKF, Romero, CM, Oliveira, PC, de Castro, HF, 2014. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. Bioprocess Biosyst Eng 37:2539-2548.

Freitas L, Bueno T, Perez VH, Santos JC, De Castro HF. 2007 Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. World J Microbiol Biotechnol 23:1725–1731.

Vianni R, Braz-Filho R. 1996 Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. Quim Nova 19:400-407.