



CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE DE *Rhizopus oryzae* QUANTO AOS VALORES ÓTIMOS DE PH E TEMPERATURA UTILIZANDO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

B. M. SILVA¹, V. G. BATISTA¹, J. B. B. LASCHI¹, M. O. CERRI¹ e A. V. PAULA¹

¹ Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”

E-mail para contato: beatriz.m.silva@unesp.br, ariela.veloso@unesp.br

RESUMO – Atualmente, os processos catalisados por enzimas são amplamente utilizados, principalmente pelo fato de oferecerem maior estabilidade reacional e especificidade quando comparados às reações químicas. Nesse contexto, uma bioconversão que pode ser citada é de obtenção de triglicerídeos dietéticos do tipo MLM, que são óleos e gorduras estruturados para conter ácidos graxos de cadeia média (M) nas posições sn-1 e sn-3 e de cadeia longa (L) na posição sn-2. Tais modificações podem ser feitas empregando biocatalisadores, nesse caso lipases 1,3 específicas, aplicadas em reações de acidólise enzimática, sendo importante estudar as características da enzima livre para a posterior comparação com os derivados imobilizados. Portanto, o presente trabalho caracterizou a enzima livre de *Rhizopus oryzae* quanto aos valores ótimos de pH e temperatura utilizando planejamento experimental do tipo DCCR, os resultados obtidos de temperatura ótima em 39°C e do pH 6,8 foram próximos aos descritos pela literatura.

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas da classe das hidrolases (EC 3.1.1.3, triacilglicerol acilhidrolases) que atuam na hidrólise de óleos e gorduras para liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Podem ser obtidas de fontes animais, vegetais ou microbianas, e são amplamente utilizadas em sínteses orgânicas e processos biotecnológicos. Dessa forma, essas enzimas merecem destaque por serem as únicas capazes de hidrolisar triacilgliceróis, incluindo as reações inversas, que podem ser combinadas e classificadas em reações de transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação) (BASSAN, 2017; CIPOLATTI, 2015).

Ademais, possuem alta especificidade, fator relacionado à sua quimio-regio e enantiosseletividade, o que resulta em melhor desempenho em reações de síntese quando comparadas a processos químicos (BASSAN, 2017). Nesse contexto, o estudo dessas enzimas em sua forma livre é interessante para que seja possível comparar suas características nativas com as observadas quando imobilizadas.



2. OBJETIVO

O presente trabalho caracterizou a enzima de *Rhizopus oryzae* em sua forma livre quanto a pH e temperatura ótima por meio de planejamento experimental, utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Os experimentos do presente trabalho foram efetuados utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, de grau alimentício (Prozyn, São Paulo). Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Determinação de atividade hidrolítica

Foi determinada pelo método de retrotitulação, empregando-se emulsão de azeite de oliva (PAULA, 2012). Tal emulsão foi preparada com 50% (m/m) de azeite, 50% (m/m) de água destilada e 7% (m/m) em relação à massa de água de goma arábica. A reação ocorreu em banho-maria com agitação suave, a 37°C por 5 minutos. A reação foi paralisada adicionando 10 mL de solução de etanol, acetona e água, 1:1:1 (v/v/v). Após, foi adicionado 10 mL de KOH (0,05 M). Foi realizada a titulação com HCl (0,05 M). A atividade hidrolítica foi determinada de acordo com a equação 1:

$$A(\mu\text{mol} / \text{g min}) = \frac{(V_{\text{branco}} - V_{\text{amostra}}) * C_{\text{HCl}} * 1000}{\text{tempo} * \text{massa}} \quad (1)$$

Onde V_{branco} = volume de HCl utilizado no branco da reação (mL), V_{amostra} = volume de HCl utilizado na amostra contendo enzima (mL), C_{HCl} = concentração real de HCl (Mol/L), tempo = tempo de reação (min), massa = massa de enzima adicionada ou massa de derivado imobilizado (g).

3.2.2 Determinação dos valores ótimos de pH e temperatura

Foram realizados 12 ensaios para o estudo dos valores ótimos de pH e temperatura da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em sabugo de milho, tratando-se de um planejamento fatorial 2^3 com 4 pontos centrais. Para cada ensaio, realizado de maneira aleatória, a influência do pH e da temperatura na atividade da enzima foi determinada pela reação de hidrólise do azeite de oliva de acordo com a metodologia descrita no 3.2.1. A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa computacional Protimiza Experimental Design.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima livre

Para avaliar a influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase de *Rhizopus oryzae* foram realizados 12 experimentos utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR), a matriz experimental está representada na tabela 1.

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental DCCR: variáveis independentes (pH e temperatura) e a variável dependente de resposta (atividade enzimática, U/g) para cada ensaio.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Resposta
	pH	T (°C)	pH	T (°C)	Atividade (U/g)
1	-1	-1	6,0	35	22372,55
2	1	-1	9,0	35	9588,24
3	-1	1	6,0	45	24591,88
4	1	1	9,0	45	7582,78
5	-1,41	0	5,4	40	23240,85
6	1,41	0	9,6	40	4271,29
7	0	-1,41	7,5	33	24276,60
8	0	1,41	7,5	47	15137,96
9	0	0	7,5	40	28265,90
10	0	0	7,5	40	28265,90
11	0	0	7,5	40	26847,06
12	0	0	7,5	40	28420,51

Após o tratamento de dados no Protimiza Experimental Design foi gerada a tabela 2 que apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para a atividade obtida nos ensaios. Os dados tabelados foram utilizados na construção do modelo matemático descrito pela equação 1.

$$Y_1 = 27949,84 - 7077,55 x_1 - 7271,34 x_1^2 - 1588,76 x_2 - 4295,73 x_2^2 \quad (1)$$

Em que x_1 = pH, x_2 = Temperatura(°C) e Y_1 = Atividade (U/g).

Tabela 2 – Resultados dos coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor no estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Nome	Coeficiente	Erro Padrão	t-calculado	p-valor
Média	27949,842	1030,757	27,116	2,38E-08
x_1	-7077,552	728,855	-9,711	2,5957E-05
x_1^2	-7271,339	814,885	-8,923	4,5103E-05
x_2	-1588,765	728,855	-2,180	0,066
x_2^2	-4295,734	814,885	-5,272	0,001



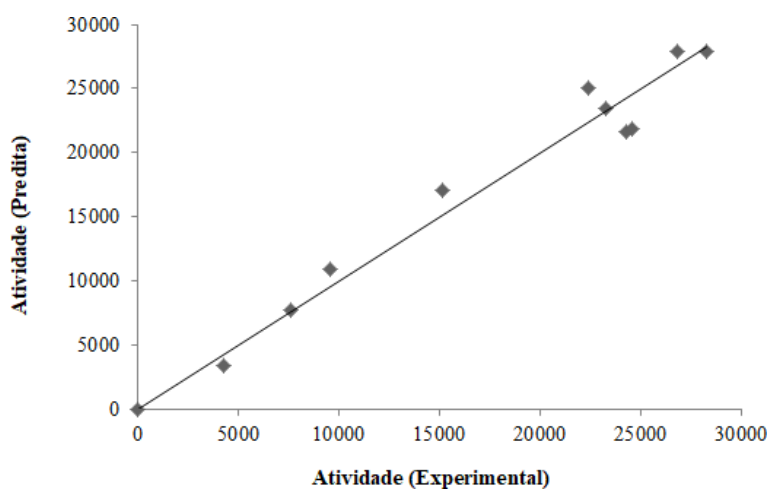
Em seguida, foi realizada a ANOVA com nível de significância $\alpha = 10\%$, apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito do pH e da Temperatura na atividade enzimática da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc	p-valor
Regressão	813136791,59	4,00	203284197,90	47,83	$3,6 \cdot 10^{-5}$
Resíduos	29748897,05	7,00	4249842,44	-	-
Falta de Ajuste	28111455,22	4,00	7027863,81	12,88	0,031
Erro Puro	1637441,82	3,00	545813,94	-	-
Total	842885688,64	11,00	-	-	-

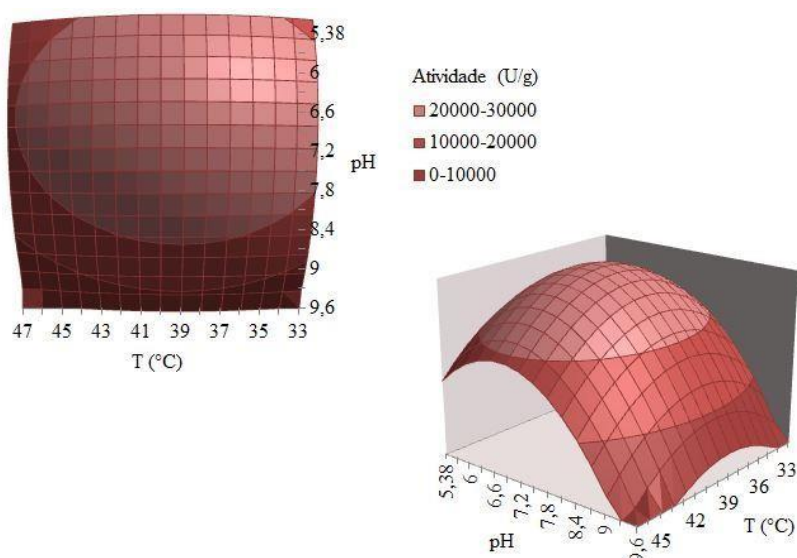
Como Fregressão/resíduos (47,83) > Ftabelado (2,96) e $R^2 = 96,47\%$ o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, ou seja, os valores experimentais se ajustam aos valores preditos (Figura 1).

Figura 1 – Valores experimentais e valores previstos para o modelo de atividade enzimática.



Assim, após a validação do modelo matemático para a variável de atividade enzimática, foram geradas as superfícies de respostas representadas pela Figura 2.

Figura 2 – Superfícies obtidas no planejamento experimental DCCR para a atividade enzimática da Lipase de *Rhizopus oryzae* como resposta da variação de pH e Temperatura



A Figura 2 indica que os valores de maior atividade para a Lipase de *Rhizopus oryzae* em sua forma livre são obtidos próximos ao ponto central, em que foi utilizada a temperatura de 40°C e o pH 7,5. O aumento dos valores de pH e da temperatura que se distanciam desse ponto, assim como a diminuição, ocasiona uma queda significativa de atividade.

Esse resultado se aproxima do observado no trabalho de HIOL e colaboradores (2000), que obtiveram valores de pH 7 e temperatura 40°C como ótimos para a lipase de *Rhizopus oryzae*, com queda de atividade nas temperaturas superiores e inferiores à 40°C e pH acima e abaixo de 7,5. Além disso, KHARRAT et al (2011) obteve um valor de temperatura ótima de 39°C em seus estudos e BEER et al (1998) valores ótimos de pH na faixa de 7, pra o mesmo biocatalisador. Ambos descreveram decaimento de atividade para valores inferiores ou superiores aos ótimos.

Portanto, de acordo com as superfícies de resposta e as predições representadas pelo modelo da equação 1, o ponto que apresenta a melhor resposta é o de temperatura igual a 39°C e pH 6,8 com um valor de atividade previsto em 29818,79 U/g.

5. CONCLUSÃO

A lipase de *Rhizopus oryzae* livre apresentou características comuns aquelas descritas na literatura em relação aos valores ótimos de pH e temperatura. Assim, com a análise



estatística foi possível caracterizar o biocatalisador e, a partir do modelo matemático gerado, prever quais seriam as melhores condições de aplicação dessa lipase. Por fim, os objetivos desse trabalho foram alcançados, já que foi possível realizar a caracterização da enzima livre utilizando planejamento experimental do tipo DCCR.

6. AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2018/10194-0 e 2017/11482-7).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSAN, N. **Modificação enzimática de óleos vegetais visando à obtenção de triglicerídeos dietéticos através do emprego de reatores de tanque agitado e leito fixo.** 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2017.

BEER, H. D., MCCARTHY, J. E., BORNSCHEUER, U. T., SCHMID, R. D. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Structure And Expression**, v. 1399, n. 2-3, p.173-180, ago. 1998.

CIPOLATTI, E. P. **Imobilização de Lipases em Suportes Poliméricos.** 2015. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

HIOL, A., et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 26, n. 5-6, p.421-430, mar. 2000.

KHARRAT, N., SANA, M. Y. B. A.; GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHÂABOUNIA, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.1083-1089, maio 2011.

PAULA, A. V. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais.** 2011. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.