

LIPASE DE *Aspergillus niger* OBTIDA DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL ENCAPSULADA EM MATRIZ SOL-GEL: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

C. ZUBIOLO¹, R.T. FIGUEIREDO², C.M.F. SOARES², e L.C.L de AQUINO SANTANA¹

¹ Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Programa de pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP)/Universidade Tiradentes
E-mail para contato: aquinoluciana@hotmail.com

RESUMO –A lipase de *Aspergillus niger* produzida por fermentação em estado sólido de sementes de abóbora foi imobilizada por encapsulação em sílica obtida pela técnica sol-gel. As enzimas na forma livre e encapsulada em matriz sol-gel foram caracterizadas quanto à morfologia e propriedades físico-química e demonstraram área superficial de 224 e 108 m²/g, volume de poro de 0,21 e 0,7 cc/g e diâmetro de poro de 35Å e 20Å respectivamente, sendo ambas classificadas como sólidos mesoporosos. O biocatalisador apresentou maior porosidade do que a sílica sol-gel (Análise MEV). A enzima livre demonstrou perda de massa de 95% à 350°C, e o biocatalisador encapsulado manteve 60% de sua massa em temperatura superior à 1000°C (análise termogravimétrica). Foi observado para ambos a formação de picos de transição endotérmica com temperaturas muito próximas (Análise DSC). O biocatalisador apresentou um segundo pico sugerindo a presença da enzima dentro dos poros, o que não ocorreu com a matriz pura. A lipase de *Aspergillus* obtida de resíduo agroindustrial foi eficientemente encapsulada em matriz sol-gel demonstrando potencial para futuras aplicações futuras em processos de biocatálise.

1. INTRODUÇÃO

Lipases (triacylglycerolacylhydrolases, EC 3.1.1.3) são usadas largamente em reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Vários resíduos agroindustriais têm demonstrado eficiência para a produção de lipase através de fermentação em estado sólido. Em geral os resíduos oleaginosos, devido ao elevado teor de lipídeos em sua composição, são os de maior interesse industrial, pois servem como indutores naturais para a produção das lipases (Salihu *et al.*, 2012). Santos *et al.* (2012) têm demonstrado que as sementes de abóbora, as quais apresentam cerca de 43% de lipídeos, apresentam potencial para a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* através de fermentação em estado sólido.

As lipases quando utilizadas na forma livre são facilmente inativadas e de difícil separação para a reutilização, sendo portanto, limitadas para uso industrial (Yilmaz, *et al.* 2011). Os processos envolvendo matrizes sol-gel estão ganhando uma importância crescente como suporte sólido para a imobilização de biomoléculas a ser usado em biocatálise, biossensores e aplicações biomédicas,

oferecendo uma alternativa à tradicional tecnologia de polímeros (Pirozzi *et al.* 2009). O processo sol-gel envolve em primeira etapa, a hidrólise de um metal de baixo peso molecular, precursor alcóxido como tetrametoxissilano (TMOS), ou tetraetoxissilano (TEOS) na presença de água em pH ácido (ou alcalino), o que resulta na formação de grupos reativos do tipo silanol (Si-OH). Na segunda etapa ocorre a reação de condensação entre grupos silanol em presença de grupos alcalinos (ou ácidos) resultando na formação de polímeros siloxano (Si-O-Si), formando uma matriz na qual uma enzima pode ser aprisionada com sucesso (Sassolas *et al.* 2012).

A caracterização morfológica e físico-química de biocatalisadores imobilizados em diferentes suportes sólidos é de fundamental importância para explicar e prever algumas de suas principais propriedades bioquímicas, como atividade, seletividade e estabilidade. Uma das medidas fundamentais é área superficial específica, a qual tem sido usualmente obtida através do método desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller, conhecido pelo nome de BET. Nesta técnica, a quantidade de gás adsorvido por um sólido é medida, que por sua vez está diretamente relacionado com as propriedades e a estrutura do material poroso (Groen *et al.* 2003). Outra técnica utilizada para a avaliação da morfologia do suporte é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a lipase de *Aspergillus niger* foi produzida através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora e encapsulada em sílica obtida pela técnica de sol-gel. O biocatalisador encapsulado demonstrou pH ótimo de 3,0 e maior estabilidade térmica nas temperaturas de 45°C e 60°C do que a enzima livre. O processo de encapsulação foi eficiente resultando na obtenção de um biocatalisador com boas propriedades catalíticas e boa estabilidade operacional, visto que a atividade relativa foi mantida acima de 50% até seis ciclos de reutilização em pH 3,0 e temperatura de 37°C (Zubiolo *et al.*, 2014).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfológica e determinar as características físico-químicas da lipase de *Aspergillus niger* livre e encapsulada em matriz hidrofóbica obtida a partir da técnica sol-gel.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Enzima

O micro-organismo *Aspergillus niger* IOC 3677 foi adquirido da coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz (Rio de Janeiro, Brasil), mantido em tubos inclinados em Agar nutriente e estocado à temperatura de 4°C.

A enzima foi obtida por fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora, conforme descrito por Santos *et al.* (2012). As fermentações foram conduzidas à temperatura de 30°C em placas de petri contendo 10 g da farinha de sementes de abóbora (com umidade ajustada para 30%) e 10^5 esporos/g de *Aspergillus niger*. Após 168 h de fermentação, a extração da enzima foi realizada adicionando-se aos fermentados tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,0, na proporção 1:5 (massa de resíduo:volume de tampão), mantendo-se sob agitação à temperatura de 30°C durante 15 min. Em seguida, o material foi centrifugado (centrífuga Eppendorf 5804R) durante 10 min à 120 x g,

obtendo-se o extrato bruto enzimático. O extrato foi parcialmente purificado por precipitação com sulfato de amônio 80%, mantendo-se à 4°C durante 30 min. Em seguida centrifugou-se à 120 x g durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado, dialisado e liofilizado.

2.2 Encapsulação de lipase de *Aspergillus niger* em matriz sol-gel

A imobilização por encapsulação da lipase foi realizada segundo a patente de Nº PI0306829-3 e Zubiolo *et al.* (2014) e foi descrita como segue: 30 mL de TEOS foi diluído em 36 mL de álcool etílico absoluto em atmosfera inerte. Esta solução foi transferida para um balão de três bocas, acoplado ao condensador de refluxo, mantendo-se sob agitação constante em banho-maria a temperatura de 35°C. Após 5 min, adicionou-se lentamente 0,22 mL de ácido clorídrico diluídos em 5 mL de água ultra pura, gotejada pelo funil de adição, mantendo-se sob agitação à 35°C, durante 90 min. Em seguida, adicionou-se 2,7 g de enzima dissolvida em 10 mL de água ultra pura e solução de polietilenoglicol (PEG-1500) à 4,0% p/v. Por fim, adicionou-se 1 mL de hidróxido de amônio (28% P.A.) diluído em 6 mL de etanol absoluto, mantendo-se em repouso à 35°C durante 60 min. A mistura foi mantida em condições estáticas por 24h para a completa policondensação. O material foi lavado com hexano (60 mL) e acetona (20 mL), secado à vácuo, temperatura ambiente durante 72 h. O rendimento de imobilização foi de 71,4% conforme previamente demonstrado por Zubiolo *et al.* (2014).

2.3 Caracterização morfológica

As áreas superficiais da sílica pura e do biocatalisador encapsulado foram calculadas segundo o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938). O volume de poros (V_p) e diâmetro médio dos poros (D_p) foram calculados segundo o método desenvolvido por Barret, Joyner e Halenda (BJH) (Ramos *et al.*, 1998), sendo em seguida analisados pelo software BET (Modelo NOVA 1200e - Área de Superfície e Analisador de Tamanho de Poro, Quantschome Instruments, versão 11.0), utilizando adsorção de N_2 à 77 K. Previamente, as amostras foram submetidas a tratamento térmico em estufa à 120°C por 48h, para eliminar a água existente no interior dos poros dos sólidos.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a superfície da sílica pura, lipase livre e biocatalisador encapsulado. As micrografias foram obtidas através do microscópio eletrônico de varredura marca JEOL modelo JSM6510 LV (Centro multiusuário de nanotecnologia/CmNano, Universidade Federal de Sergipe).

2.4. Propriedades físico-químicas

As curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas através do equipamento Shimadzu DTG-60H (DTA-TG simultâneo) sob atmosfera de nitrogênio, iniciando as curvas a partir da temperatura ambiente até 1000°C a uma taxa de aquecimento de 20°C/min. As curvas DSC foram obtidas no equipamento Shimadzu DSC-60, sob atmosfera de nitrogênio, iniciando à temperatura ambiente até atingir 500°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Área superficial e propriedades dos poros

Os resultados em relação à área específica de superfície (método BET), volume de poros e diâmetro médio de poros da sílica pura e biocatalisador encapsulado estão apresentados na Tabela 1. A área superficial do biocatalisador foi de 108 m²/g, menor que a obtida para a sílica pura (224 m²/g). Comportamento similar foi observado por Soares *et al.*, (2004), os quais obtiveram área específica de superfície de 348 e 607 m²/g para a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel e sílica pura, respectivamente. Por outro lado, observou-se que o volume de poros do biocatalisador foi maior e o diâmetro de poros menor ($V_p = 0,70$, $D_p = 20\text{\AA}$) que os obtidos para a sílica pura ($V_p = 0,21$, $D_p = 35\text{\AA}$). Souza, *et al.* (2013) obtiveram para a lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em sol-gel, valores de volume (0,05cm³/g) e diâmetro de poros (19 Å) menores do que os obtidos neste trabalho.

BET é uma técnica para avaliar a ocupação dos poros através das medidas de adsorção de N₂ antes e após o processo de imobilização. Menor adsorção de N₂ pode ser traduzido em menores volumes e tamanhos de poros e menor área específica disponível. Isto significa que os poros estão ocupados com a enzima (Carlsson *et al.*, 2013). Em relação ao volume de poros, segundo Kovalenko *et al.* (2013), se a taxa de reação é limitada pela difusão do substrato dentro dos poros em direção a enzima imobilizada, a diminuição do volume total dos poros resulta na diminuição da taxa de reação aparente. Consequentemente, o maior volume de poros do biocatalisador como obtido neste trabalho facilita a difusão do substrato dentro dos poros.

Tabela 1- Propriedades texturais de adsorção-dessorção de nitrogênio da sílica pura e biocatalisador encapsulado

| Amostras | Área superficial (m ² g ⁻¹) | Volume do poro (cm ³ g ⁻¹) | Diâmetro do poro (Å) |
|----------------------------|---|--|-------------------------|
| Sílica pura | 224 | 0,21 | 35 |
| Biocatalisador encapsulado | 108 | 0,70 | 20 |

3.2. Microscopia eletrônica de varredura

Analisando a micrografia da sílica pura (Figura 1A), pôde-se observar a presença de uma estrutura rígida superficial, provavelmente formando um único bloco. Já o biocatalisador encapsulado (Figuras 2C e 2D) demonstrou uma estrutura superficial com maior rugosidade, com formato de poros irregulares. A lipase livre (Figura 2B) apresentou estrutura bem diferenciada do biocatalisador imobilizado, o que era esperado já que não passou pelo processo de encapsulação. Estas características morfológicas são típicas de biocatalisadores imobilizados em matriz sol-gel como também foi observado por Souza *et al.* (2012) para lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em sol-gel utilizando líquidos iônicos como aditivo.

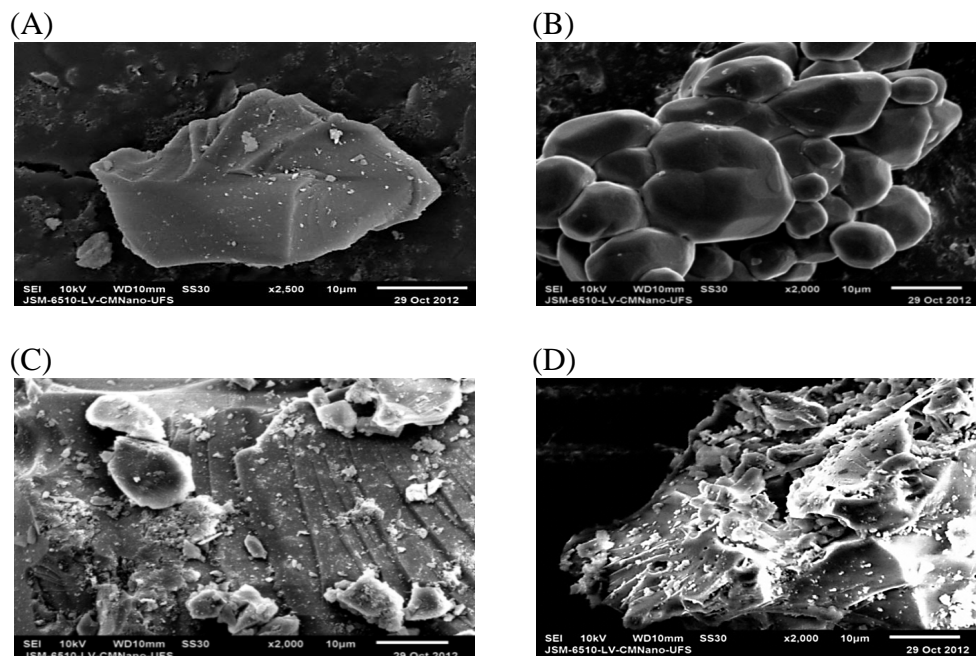


Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura para: (A) Sílica pura (x 2500), (B) Lipase livre (x 2000) (C e D) Biocatalisador encapsulado (x 2000).

3.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A perda de massa da sílica pura, lipase livre e biocatalisador encapsulado (BI) após aquecimento até 1000 °C foi determinada por análise termogravimétrica (TG) e os resultados estão demonstrados na Figura 2. A sílica pura apresentou diminuição de perda de massa de cerca de 20% quando atingido a temperatura de 100°C, totalizando 25% de perda ao atingir a temperatura de 1000°C. O BI também apresentou perda inicial de 20% atingindo perda de 38% de massa inicial na temperatura de 1000°C. Já a lipase livre manteve massa praticamente constante até atingir a temperatura de 300°C, apresentando a máxima degradação em 450°C, com perda de 95% de sua massa inicial.

As perdas de massa da enzima livre e encapsulada foram obtidas principalmente na região II do termograma, a qual compreende temperaturas entre 200°C e 600°C. A perda de massa nesta região está associada com a condensação de grupos silanol e alguma perda de constituintes orgânicos (C, H, O e N) sob a forma de produtos voláteis presente ou formado no início de decomposição orgânica, incluindo a lipase (Souza, *et al.* 2013). De acordo com os resultados, verificou-se que as menores perdas de massa obtidas para o BI em relação a enzima livre, confirmam a presença da enzima encapsulada na sílica sol-gel, como também observado por Soares *et al.* (2004).

A lipase de *Aspergillus niger* encapsulada em sol-gel tem demonstrado menores perdas de massa do que os biocatalisadores obtidos por Souza *et al.* (2012) e Pirozzi *et al.* (2009), cujas perdas de massa foram de 45% e 44,4% para a lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em sol-gel e

lipase de *Rhizopus oryzae* encapsulada em zircônio pela técnica sol-gel, respectivamente. Por outro lado, Soares *et al.* (2004) tem obtido para a lipase de *Candida rugosa* encapsulada em matriz sol-gel perda de massa de aproximadamente 25%, inferior à obtida neste trabalho.

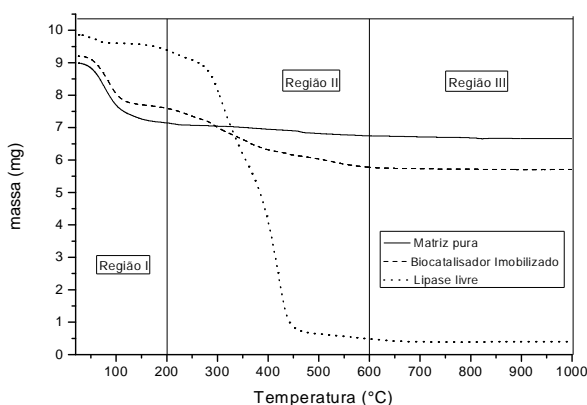


Figura 2 - Curva termogravimétrica da sílica pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre sob atmosfera de N_2 à $20^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas DSC, para sílica pura, BI e lipase livre estão representadas na Figura 3. A sílica pura apresentou apenas um pico de transição endotérmica na temperatura de 156°C e entalpia de $280,53 \text{ J/g}$. O BI apresentou dois picos de transição endotérmica, o primeiro na temperatura de $153,45^\circ\text{C}$, entalpia de $271,63 \text{ J/g}$ e o segundo à $344,51^\circ\text{C}$ com entalpia de $39,70 \text{ J/g}$, evidenciando a imobilização da lipase no suporte. A sílica pura e o BI apresentaram o primeiro pico em temperaturas e entalpia muito próximas, este resultado foi associado à perda de água presente nos poros dos suportes (Guan-Sajonz *et al.* 1997) e sugeriu a presença da sílica nas duas amostras. A formação do segundo pico apenas na amostra do BI sugeriu a presença da enzima encapsulada no suporte.

A enzima livre apresentou três picos de transição endotérmica, sendo o primeiro em $67,99^\circ\text{C}$ com entalpia de $5,35 \text{ J/g}$, o segundo em $206,61^\circ\text{C}$ com entalpia de $19,62 \text{ J/g}$ e o terceiro pico em $370,56^\circ\text{C}$ com entalpia de $1,07 \times 10^3 \text{ J/g}$. O último pico da enzima livre ($370,56^\circ\text{C}$) foi próximo ao último pico do BI ($344,51^\circ\text{C}$), porém com entalpia maior. A enzima livre por não estar protegida pelo processo de imobilização, quando submetida a elevadas temperaturas sofre processos de decomposição de compostos orgânicos, bem como desnaturação enzimática, além disto, a maior entalpia também pode estar relacionada ao desdobramento da estrutura terciária da enzima em altas temperaturas (Nelson e Cox, 2006).

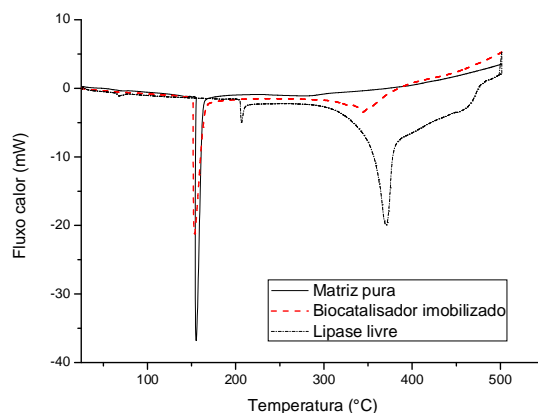


Figura 3 - Curvas DSC obtidas à 10°C/min sob atmosfera de N₂ para sílica pura, biocatalisador imobilizado e lipase livre.

4 - CONCLUSÃO

A lipase de *A. niger* obtida a partir da fermentação de sementes de abóbora foi eficientemente encapsulada em matriz sol-gel. O biocatalisador encapsulado apresentou maior volume de poros do que a sílica pura, sugerindo que em reações catalíticas a difusão do substrato em direção à enzima será facilitada neste sistema. A presença da enzima no suporte foi constatada através das curvas de DSC, onde obteve-se para o biocatalisador imobilizado um segundo pico endotérmico não detectado para a sílica pura e através da análise termogravimétrica, onde obteve-se menores perdas de massa do BI em comparação a enzima livre. Portanto, foi constatado que a lipase de *Aspergillus niger* produzida através da fermentação de um resíduo agroindustrial, apresenta potencial para futuras aplicações como biocatalisador encapsulado em matriz sol-gel.

5- REFERÊNCIAS

- BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 60, n. 2, p.309-319, 1938.
- CARLSSON, N.; GUSTAFSSON, H.; THÖRN, C.; OLSSON, L.; HOLMBERG, K.; ÅKERMAN, B. Enzymes immobilized in mesoporous silica: A physical-chemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.*, article in press, p.1-22, 2013. DOI: 10.1016/j.cis.2013.08.010
- GROEN, J.C.; PEFFER, L.A.A.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Pore size determination in modified micro and mesoporous materials. Pitfalls and limitations in gas adsorption data analysis. *Microporous Mesoporous Mat.*, v.60, p.1-17, 2003.
- GUAN-SAJONZ, H.G.; GUIOCHON, G.; DAVIS, E.; GULAKOWSKI, K.; SMITH, D.W. Study of the physico-chemical properties of some packing materials: III. Pore size and surface area distribution. *J. Chromatogr. A.*, v.27, 33-51, 1997.

INPI Patent submission No. PI0306829-3, September 11, 2003.

KOVALENKO, G.A.; BEKLEMISHEV, A.B.; PERMINOVA, L.V.; MAMAEV, A.L.; RUDINA, N.A.; MOSEENKOV, S.I.; KUZNETSOV, V.L. Immobilization of recombinant *E. coli* thermostable lipase by entrapment inside silica xerogel and nanocarbon-in-silica composites. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v., 98, p.78– 86, 2013.

NELSON, L.D.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de bioquímica*. 4ª edição, São Paulo, 2006.

PIROZZI, D.; FANELLI, E.; ARONNE, A.; PERNICE, P.; MINGIONE, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol–gel synthesis and catalytic properties. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 59, p. 116–120, 2009.

RAMOS, M.A.; GIL, M.H.; SCHACT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W. FIGUEIREDO, M.M. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. *Powder Technol.*, v.99 , n.1, p.79-85, 1998.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; KARIM, I.A.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour. Conserv. Recy.*, v.58, p.36– 44, 2012.

SANTOS, R.C.A.; ARAÚJO, K.B.; SOARES, C.M.F.; AQUINO, L.C.L. Evaluation of temperature and humidity response surface on the fermentation of lipase pumpkin seeds using *Aspergillus niger*. *Acta Sci. Technol.*, v. 34, n.3, p. 255-260, 2012.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Advances*, v.30, p.489–511, 2012.

SOARES, C.M.F.; SANTOS, O.A.; CASTRO, H.F., MORAES, F.F., ZANIN, G.M. Influence of the alkylsubstituted silane precursor on sol–gel encapsulated lipase activity. *Applied Biochem. Biotechnol.*, v.113, p.307-319, 2004.

SOUZA, R.L.; RESENDE, W.C.; BARAO, C.E.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F.; SANTOS, O.A.A.; FRICKS, A.T.; FIGUEIREDO, R.T.; LIMA, A.S.; SOARES, C.M.F. Influence of the use of Aliquat 336 in the immobilization procedure in sol–gel of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v.84, p.152– 159, 2012.

SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R.T.; FREITAS, L. DOS S.; DURO, M. A. I.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. DOS A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. *Enzyme Microb. Technol.*, v.52, p.141–150, 2013.

YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen methyl ester. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v.69, p.35–41, 2011.

ZUBIOLO, C.; SANTOS, R.C.A.; CARVALHO, N.B.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S.; SANTANA, L.C.L.A. Encapsulation in a sol–gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, p. 1-8, 2014. DOI: 10.1007/s00449-014-1151-3.