



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 IMOBILIZADO EM MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO EM PROCESSO MICROFLUÍDICO

OLIVEIRA AF¹, BASTOS RG² e DE LA TORRE, LG¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos

² Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural

E-mail para contato: alinefurtado@feq.unicamp.br; latorre@feq.unicamp.br

RESUMO – O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produtividade de lipase por *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato usando microfluídica de gotas. Para isso, este modo de cultivo foi comparado com ensaios com células livres e imobilizadas em macropartículas de alginato obtidas pelo método convencional de gotejamento. Dentre os sistemas de crescimento avaliados, o cultivo com células imobilizadas em micropartículas de alginato apresentou uma produtividade em lipase de até 1,7 vezes superior as demais condições, podendo ser considerada uma estratégia promissora para investigações de otimização de bioprocessos.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas atuam na hidrólise de ligações éster-carboxílicas em lipídios, liberando ácidos e álcoois, com funções relevantes nos mecanismos celulares (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, estas enzimas apresentam uma importância econômica diante de aplicações como síntese de biopolímeros, biodiesel, nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (JAEGER; EGGERT, 2002). Por isso, tem-se explorado diferentes estratégias que resultem numa alta produtividade enzimática por processos biotecnológicos.

Dentre os sistemas de cultivos de células para a obtenção de enzimas, as tecnologias de imobilização para bioprocessos têm contribuído para estudos que visam o aumento de produtividade devido às condições de proteção celular geradas por matrizes poliméricas (PARK, CHANG, 2000). No entanto, as tecnologias convencionais geram partículas de tamanhos milimétricos e polidispersos, o que pode limitar o crescimento celular. Desta forma, como uma inovação na tecnologia para imobilização, a microfluídica de gotas pode contribuir neste âmbito devido a capacidade de produzir partículas micrométricas e uniformes.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo comparar a produção de lipase por células encapsuladas em micropartículas, por microfluídica de gotas e em macropartículas de alginato usando método convencional, tendo como referencial o cultivo com células livres.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

2. METODOLOGIA

2.1. Técnicas de imobilização de *B. subtilis* em partículas de alginato

Imobilização por microfluídica de gotas: uma plataforma microfluídica foi utilizada contendo dois módulos geradores de gotas. Para promover o corte das gotas foi usado o óleo HFE 7500 (3M, EUA) com 1% de (v/v) de 008-fluorosurfactante (Ran Biotechnologies, EUA) e as gotas foram compostas por duas soluções de alginato contendo a suspensão celular (10^7 células por mL). Neste ensaio, a gelificação do alginato foi feita por troca iônica, baseado no trabalho de Bassett *et al.* (2016) e Hati *et al.* (2016). Para isso foi usado uma concentração inicial de alginato de 2% (m/v) e para as soluções de CaEDTA e ZnEDDA, que compõem o processo de troca iônica, foram usadas concentrações de 84 mM em pH 6,7. As gotas foram formadas com vazão de $10 \mu\text{L min}^{-1}$ na corrente de óleo e $2 \mu\text{L min}^{-1}$ nas correntes de solução de alginato. As micropartículas de alginato foram separadas da emulsão pela adição de perfluorooctanol (PFO) 20% (v/v) (Alfa Aesar, EUA), e observadas com microscópio invertido (Nikon Instruments, moledo Eclipse Ti-U, EUA).

Técnica convencional de imobilização por gotejamento: por este processo, a suspensão celular (10^7 cel mL^{-1}) foi misturada na solução de alginato de sódio 2% (m/v) e gotejada num reservatório contendo solução de cloreto de cálcio a 30 mM (pH 6,7).

2.2. Cultivo celular para produção de lipase

Cultivo batelada de *B. subtilis* nas formas livres e imobilizadas: Para a produção de lipase por *B. subtilis* NRRL B 14819 foi usado meio de cultura contendo 0,75% de peptona, 0,75% extrato de levedura, 0,5% de Tween-80 e 0,75% de óleo de milho (pH de 7,0). Os cultivos em batelada foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, tendo um volume de meio reacional de 25 mL. Os cultivos foram realizados com a mesma concentração inicial de células de 10^7 células por mL e conduzidos por 24 h a 37°C e 150 rpm, sendo analisados a cada 3 h.

Análise de crescimento microbiano e da atividade da enzima lipase: Os perfis de crescimento celular para todas as condições de cultivo foram estimados pela densidade óptica (600 nm), em que se obteve a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) a partir das curvas $\text{Ln}(N/N_0)$ versus tempo, onde é N/N_0 a variação da concentração em número de células (N) com relação ao valor inicial. Para os ensaios com células imobilizadas, as partículas de alginato foram rompidas com adição de EDTA 1 M e determinada a concentração total de células presentes nos meios reacionais. As atividades enzimáticas (U mL^{-1}) e específica (U mg^{-1}) foram determinadas usando Kit Lipase – k025 (Bioclin®, Brasil) e o método de Bradford (1976), respectivamente.

Avaliação estatística: Os perfis de crescimento e produção enzimática foram avaliados quanto à análise de variância (ANOVA) e feita a comparação de médias pelo teste de Tukey, ambos num nível de confiança de 0,05. As análises foram feitas no *software* OriginLab® 2017.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivo de *B. subtilis* nas formas livre e imobilizadas

Os cultivos *Bacillus subtilis* NRRL B 14819 nas condições livre e imobilizadas em macro e micropartículas de alginato foram avaliados quanto os perfis de crescimento microbiano e produção de lipase ao longo de 24 h, como mostra a Figura 1.

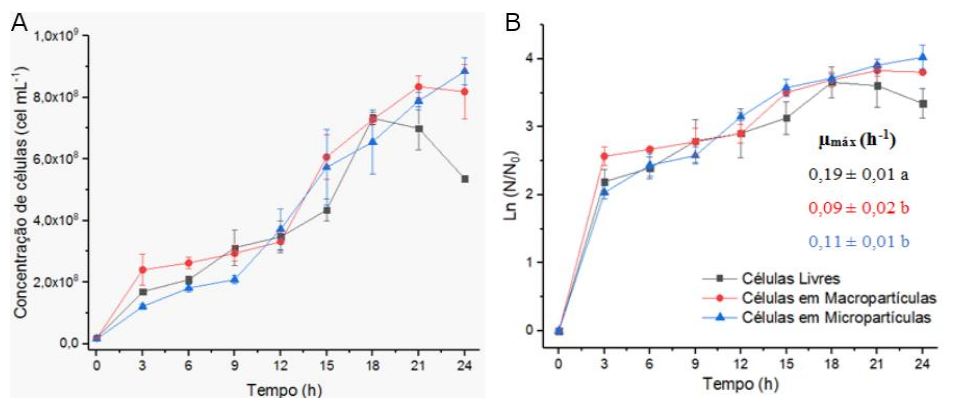


Figura 1 – Perfis de crescimento de células livres e imobilizadas em macro e micropartículas. A) Curva de crescimento em função da concentração celular (N); B) Normalização das curvas de crescimento dadas em Ln (N/N₀), sendo estimadas as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{máx}) de cada condição, onde valores com a mesma letra indica que não são significativamente diferentes, ao nível α 5%, pelo teste de Tukey.

Ao observar os perfis de crescimento celular, nota-se as células livres tiveram uma velocidade de crescimento maior do que as demais formas de cultivo, porém com um declínio no crescimento após 18 h (Figura 1A). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das velocidades das células imobilizadas em macro e micropartículas de alginato (Figura 1B). Apesar disso, as células em micropartículas mantiveram o crescimento até 24 h, enquanto que em macropartículas, o perfil de crescimento encerrou em 21 h de cultivo, como pode ser observado na Figura 1 A. Tal fato pode ser atribuído as condições de cultivo e a diferença de tamanho entre as partículas produzidas por microfluídica (68,35 ± 3,27 μm) e por gotejamento (3,17 ± 0,46 mm).

Além disso, os modos de cultivos com células imobilizadas em macropartículas e micropartículas de alginato foram avaliados como estratégia para aumentar a produção de lipase, tendo as células livres como referencial, como mostra a Figura 2.

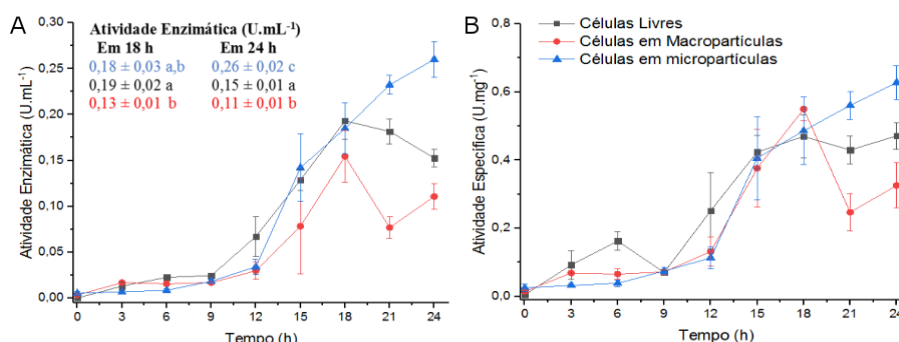


Figura 2 – Produção de lipase por *B. subtilis* nas formas livres e imobilizadas: A) comparação da atividade enzimática entre as três formas de cultivo (valores com letras iguais indicam que não são significativamente diferentes, ao nível α de 5); B) atividade específica



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

relativa à produção de lipase.

Avaliando a produção máxima de lipase em cada condição de cultivo, em 24 h foi obtido pelas células em micropartículas, uma atividade enzimática de $0,26 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$ e atividade específica, $0,63 \pm 0,05 \text{ U mg}^{-1}$. Já para células livres e em macropartículas, a produção máxima de lipase em ambas foi em 18 h, com atividades enzimáticas de $0,19 \pm 0,02$ e $0,13 \pm 0,01 \text{ U mL}^{-1}$, com atividades específicas de $0,47 \pm 0,06$ e $0,55 \pm 0,04 \text{ U mg}^{-1}$, respectivamente. Assim, ao analisar os tempos de produção máxima de lipase, em 18 h houve diferença estatisticamente significativa apenas quanto ao cultivo com células livres e em macropartículas. Já em 24 h, houve diferença estatisticamente significativa na produção de lipase entre todas as formas de cultivo, tal que na condição de células em micropartículas esta produção foi de 2,4 vezes maior que o cultivo com células em macropartículas e 1,7 vezes maior do que as células livres. Tal diferença pode ser explicada pelo melhor desempenho celular observado no cultivo com células em micropartículas, as quais se mantiveram ativas até o tempo de 24 h, o que pode sugerir um consumo mais lento e constante dos substratos.

Sendo assim, a produtividade de lipase por células imobilizadas em micropartículas de alginato foi à observada no cultivo com por células livres, mostrando ser uma estratégia altamente promissora para aplicações industriais e em diversos segmentos biotecnológicos.

4. CONCLUSÃO

Diante disso, a estratégia empregada para aumentar a produtividade de lipase usando *Bacillus subtilis* imobilizado em micropartículas de alginato, sendo o processo de imobilização realizado por microfluídica, apresentou resultados superiores à condição de células livres. Desta forma, a tecnologia microfluídica de imobilização pode contribuir para investigações que visam o aumento de produtividade de enzimas ou outros metabólitos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- BASSETT, D. C. et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation. *J. Mater. Chem. B*, v. 4, n. 37, p. 6175–6182, 2016.
- HÂTI, A. G. et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. *Lab on a chip*, v. 16, n. 19, p. 3718–3727, 2016.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.
- PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology advances*, v. 18, n. 4, p. 303–19, 2000.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro (Processo nº 2014/26814-7).