

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Fibra de Manga (*Mangifera indica* L.) como Suporte para Imobilização de Lipases de *Thermomyces Lanuginosus* e *Candida antarctica*: Aplicação em Batelada e em Fluxo Contínuo

Eduardo M. Frangelli^{1,2}, Stefânia P. de Souza², Luiz F. C. Andrade³, Rodrigo O. M. A. de Souza², Gizele C. Fontes³ e Ivaldo I. Junior^{1*}

¹Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909. *Email: ivaldo@eq.ufrj.br

²Grupo de Biotecnologia e Síntese Orgânica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-910

³Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos - Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, CEP 20550-900

RESUMO

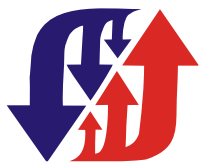
*O presente trabalho teve por objetivo a extração de material lignocelulósico de resíduos de processamento (casca e caroço) da manga (*Mangifera indica* L.). Por métodos extrativos químicos, foram obtidas fibras brutas, ricas em lignocelulose, além da fração tratada, rica em celulose, obtida após etapas de clareamento. Resultados de imobilização por ligação covalente demonstraram que a celulose tratada foi o suporte onde as enzimas imobilizadas demonstraram maior atividade hidrolítica, quando comparada com a celulose comercial. Para a lipase TL, foram encontrados 28,06 U/mg, contra 1,02U/mg para a lipase B de *Candida antarctica*. Ensaios de esterificação demonstraram que os derivados da manga foram capazes de aumentar as velocidades iniciais de formação de oletato de etila em batelada e em fluxo contínuo, com resultados de conversão superiores aos apresentados pelas respectivas lipases comerciais, com valores próximos a 100% em torno de 5min de reação.*

Palavras-chave: lipase, imobilização, fibra de manga, manga, celulose, lignocelulose, biocatálise, fluxo contínuo.

INTRODUÇÃO

Enzimas são tidas como os catalisadores sustentáveis da natureza. Seu potencial para atuar em diversos processos em condições brandas e elevada biocompatibilidade é altamente conhecido (Sheldon e Van Pelt, 2013). Produzir grandes quantidades de um biocatalisador eficiente e estável ainda é um desafio, mesmo com os avanços da engenharia de proteínas, que tem fornecido ferramentas para a descoberta e aperfeiçoamento de enzimas por meio de manipulações genéticas (Bornscheuer et al, 2012). A aplicação de enzimas imobilizadas hoje tem sido prejudicada pela utilização de suportes caros, limitando o processo. Portanto, encontrar um suporte barato e prontamente disponível para a imobilização da enzima é essencial para o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados (Bornscheuer, 2003). A celulose é o biopolímero mais abundante e consiste de uma cadeia de polissacarídeo linear constituído por unidades de D-glucose unidas por ligações β ,(1-4) glicosídicas, totalmente envolta com grupos hidroxila (Eichhorn et al, 2010). Desde sua descoberta este biopolímero natural tem sido usado em muitas aplicações diferentes que vão desde polímeros termoplásticos de nanofibras de celulose.

A manga, *Mangifera indica* L., é uma fruta tropical proveniente do Sul da Ásia, da família da Anarcadiaceae. A importância do aproveitamento de seu resíduo se dá pelo fato de que é uma fruta amplamente consumida no mundo todo. O resíduo do processamento agroindustrial da manga Ubá, constituído da casca e do caroço, corresponde entre 30 a 40% do volume total da fruta. Os



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

materiais lignocelulósicos provenientes desses resíduos representam uma potencial fonte sustentável para produção de biopolímeros, como a celulose, sendo uma matriz interessante para imobilização de enzimas representando um biocatalisador imobilizado acessível para operações de grande escala. Deste modo, este trabalho teve por objetivos extrair a nanocelulose proveniente do tegumento fibroso da manga, um resíduo do processamento agroindustrial, e sua funcionalização, seguida de imobilização de lipases comerciais, como continuação de trabalhos publicados por nosso grupo.

MATERIAL E MÉTODOS

EXTRAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO DA MANGA

Para a extração de celulose, primeiramente foi realizado um processo de purificação para a remoção de lignina. Inicialmente, o tegumento fibroso cominuído da manga foi tratado com solução aquosa de NaOH (2% m/m) por 4 h à 100°C por 4 vezes (Fibra bruta). Após secagem à 40°C por 24 h, as fibras foram branqueadas com uma solução 1:1 de tampão acetato (pH 4,5) e NaClO₂ (1,7% m/v) à 80°C por 6 h, sendo o procedimento realizado 2 vezes. Decorrida a purificação, foi realizada a hidrólise ácida com ácido sulfúrico (11,21 M) à 40°C por 10 min. O material foi lavado e seco à temperatura ambiente (Fibra tratada).

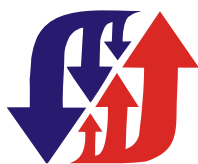
FUNCIONALIZAÇÃO DAS FIBRAS

500mg das fibras brutas, tratadas e de celulose comercial foram ressuspensas em THF, seguido da adição de 5mL de APTES (3-aminopropil-trietoxissilano). A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 3h. A suspensão obtida foi filtrada, e ao sólido foram adicionados 35 mL de tampão fosfato pH 7,0 e 2mL de glutaraldeído. A nova mistura foi, então mantida sob agitação por 24h, sendo filtrada 3 vezes com 25mL de água destilada. Os novos suportes foram secos sob temperatura ambiente.

IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES DE *THERMOMYCES LANUGINOSUS* E *CANDIDA ANTARCTICA*

2mL de lipase B de *Candida antarctica* (5,7mg/mL) e de *Thermomyces lanuginosus* (5,4mg/mL) foram diluídas em 10mL de tampão fosfato pH 7 (0,025mol/L) e adicionadas a cada 2g dos suportes obtidos. A imobilização também foi realizada com amostra de celulose comercial. As misturas dos suportes com as enzimas foram mantidas sob agitação de 200rpm por 4h a temperatura ambiente. Eficiências de imobilização foram calculadas pelas diferenças de Atividades hidrolíticas das soluções de início e após a imobilização, assim como a quantificação de proteínas. A atividade hidrolítica foi determinada pelo método titulométrico, utilizando como substrato óleo de oliva (5% p/v) emulsionado em goma arábica (5% p/v) e tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) (Freire et al., 1997). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo livre por min de reação nas condições do ensaio.

Para a atividade de esterificação, foi estudada a reação de formação de oleato de etila, onde soluções de ácido oleico e etanol (1:1 – 100mM) em n-heptano foram testadas em etapa de batelada e em fluxo contínuo. Na etapa em batelada, as reações foram realizadas em criotubos contendo 1mL de meio reacional com 10mg de cada enzima, a 200rpm e 40°C. Sob fluxo contínuo, uma coluna Omnifit de 2,57mL de volume foram completamente preenchidos por cada enzima (50mg). Fluxos variando de 0,1 – 1mL/min foram testados a 40°C. Todos os resultados foram comparados com as enzimas comerciais correspondentes, assim como as enzimas livres comerciais imobilizadas em celulose comercial.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Iniciamos este trabalho avaliando as atividades de hidrólise dos biocatalisadores obtidos (tabela 1).

Como observado, os novos suportes promoveram um expressivo aumento de atividade quando aplicada para a enzima Cal B, sendo a celulose tratada a melhor fibra. Já no caso da lipase TL, esta mesma matriz foi a que mais se aproximou do valor encontrado pela enzima comercial. Pelo fato de a celulose ser um polímero volumoso, a lipase de TL pode ter encontrado maior dificuldade de reação, já que seu volume é superior ao da CaL B. Além disso, a fibra tratada apresenta tamanho de partículas inferior ao da celulose comercial, favorecendo a imobilização.

Tabela 1: Atividade de hidrólise demonstrada pelos novos biocatalisadores obtidos, em comparação às lipases comerciais

Lipase	Atividade na fibra (U/mg)		Atividade na celulose comercial (U/mg)	Atividade enzima comercial (U/mg)
	Tratada	bruta		
<i>Candida antarctica</i>	1,02	0,69	0,17	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	28,06	7,27	15,46	-
Novozyme 435 (Novozymes®)	-	-	-	0,62
TLIM (Novozymes®)	-	-	-	76,49

Os novos biocatalisadores obtidos da fibra de manga, de acordo como demonstrado no gráfico 1, foram capazes de promover um aumento nas velocidades iniciais de conversão de oleato de etila em condições de batelada, segundo as condições descritas anteriormente. Entretanto, acredita-se que a celulose bruta contenha resquícios alcalinos, o que pode catalisar parte da conversão. Entretanto, a fibra tratada demonstrou elevado desempenho.

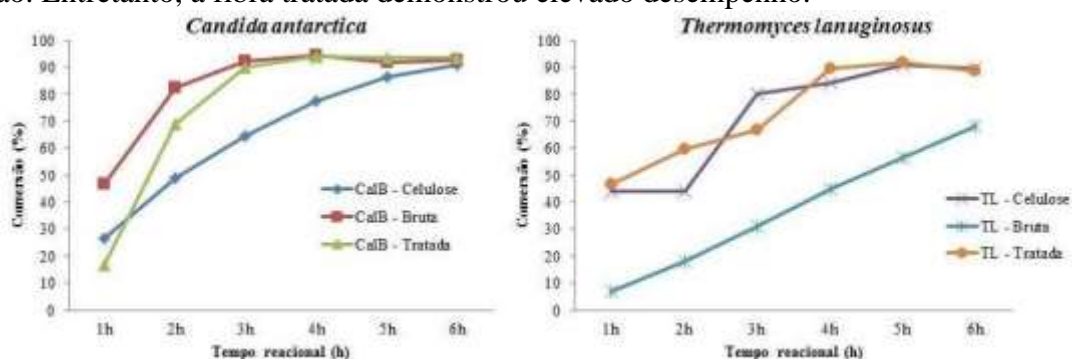
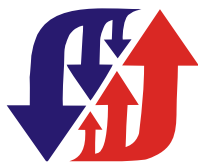


Figura 1: Perfis de conversão apresentados pelos novos biocatalisadores.

Os mesmos suportes foram testados na conversão de oleato de etila sob condições de fluxo contínuo.

Lipase	Fibra/Fluxo (mL/min)		
	Bruta	Tratada	Comercial



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

	<i>0,1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>	<i>0,1</i>	<i>0,5</i>	<i>1</i>
TL	33,2	0	0	96,5	57	35,5	49,1	36	22
CalB	26,5	17,94	11,93	59,35	40,88	40,45	96,5	34,9	22

De forma geral, os menores fluxos proporcionaram maiores conversões em produto. Entretanto, neste sistema, a celulose comercial apresentou as maiores conversões. Esta resposta pode estar na estrutura do polímero e dos biocatalisadores finais. Para isto, análises morfológicas, tais como MEV, MET e BET estão sendo realizados para melhor entender os suportes obtidos.

CONCLUSÕES

As frações ricas em celulose obtidas por beneficiamento dos resíduos de manga foram suportes promissores para a imobilização das lipases em estudo, demonstrando ótimas conversões, estabilidade se comparadas às enzimas comerciais, além de serem de baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bornscheuer, UT. 2013. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 3336-3337;

Bornscheuer, UT; Huisman, GW; Kazlauskas, RJ; Lutz, S; Moore, JC and Robins, K. 2012. *Nature*, 485: 185-194.

Eichhorn, SJ; Dufresne, A; Aranguren, M; Marcovich, N E; Capadona, JR; Rowan, SJ; Weder, C; Thielemans, W; Roman, M; Renneckar, S; Gindl, W; Veigel, S; Keckes, H; Yano, K. Abe, M. Nogi, A. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, A. S. Benight, A. Bismarck, L. A. J. Berglund and T. Peijs, J. 2010. *Mat. Sci.* 45: 1-33.

Freire DMG, Teles EMF, Bon EPS, Sant'Anna Jr. GL. 1997. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63, pp. 421-429;

Sheldon RA and. van Pelt, S *Chem. 2013. Soc. Rev.*42: 6223-6235.