



# ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum*

Gabriela Giolo Ramos, Rafael Maldonado e Maria Isabel Rodrigues  
E-mail: gabigramos@yahoo.com.br  
Universidade Estadual de Campinas - Departamento de Engenharia de Alimentos  
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos  
Bolsa SAE - UNICAMP  
Palavras-Chave: Imobilização Enzimática – Lipase – Etanol



## RESUMO

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização de lipases tem sido amplamente estudada nas últimas décadas e a aplicação de lipases imobilizadas nos últimos anos tem se mostrado uma boa alternativa para produção de biodiesel em reações de transesterificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

**1. Imobilização em alginato de cálcio:** 3,5 mL de glutaraldeído + 0,75g de carvão ativo ANFC + 5 mL de lipase *Geotrichum sp.* → alginato de cálcio → gotejamento

### 2. Concentração enzimática

**Precipitação com sulfato de amônio:** sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até 80% de saturação → geladeira 24 horas → centrifugação → diálise → placas de Petri e liofilização por 2 dias.

**Liofilização direta do caldo fermentativo:** placas de Petri e liofilização por 2 dias.

**Precipitação com etanol:** etanol (99%v/v) gotejado → centrifugação → enzima com e sem liofilização para comparação.

**Determinação da atividade enzimática:** 0,1000g do preparado enzimático em 10 mL de solução tampão fosfato 0,1mol/L pH = 7,0 → 1 mL para a análise.

**3. Imobilização com etanol em zeólita:** 1,0036 g de zeólita + 25,11 mg de enzima + 30 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L pH = 7,0 → liofilização por 4 dias → reator com agitação magnética.

**4. Imobilização em nióbio-grafite:** 1 g de nióbio-grafite com soluções de lipase 10 U, 20 U, 30 U, 40 U e 50 U → volume para 5 mL com tampão fosfato 0,1 mol/L pH = 7,0 → overnight por 19 horas, em geladeira → tampão fosfato 0,1 mol/L pH = 7,0.

**5. Determinação da porcentagem de hidrólise:** titulação com hidróxido de sódio 0,05 mol/L + indicador fenolftaleína → % hidrólise = [(V<sub>amostra</sub> - V<sub>branco</sub>) x 1,47] / m<sub>óleo na amostra</sub>

### 4. Imobilização em nióbio-grafite

Pode-se observar na Tabela 2 que mesmo a amostra L10 tendo apresentado 50% de eficiência, o método de imobilização de lipase em nióbio-grafite não se apresentou eficiente. Não se pode garantir sua reprodução, devido aos outros resultados obtidos.

Tabela 1. Atividade enzimática de diferentes lotes de preparados enzimáticos.

Lote de enzima	Atividade do caldo bruto (U/mL)	Método de concentração	Atividade do preparado enzimático (U/g)
1	15,0	Precipitação com sulfato	500
2	15,0	Precipitação com sulfato	477
3	14,0	Precipitação com sulfato	789
4	14,0	Precipitação com sulfato	623
5	8,0	Precipitação com sulfato	407
6	14,6	Precipitação com sulfato sem diálise	438
7	10,0	Precipitação com etanol	632
8	10,0	Precipitação com etanol	570
9	14,6	Precipitação com etanol sem liofilização	300
10	14,0	Precipitação com etanol sem liofilização	165
11	9,9	Precipitação com etanol sem liofilização	135
12	14,0	Liofilização direta	522

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Imobilização em alginato de cálcio

Uma quantia de 100 mg de esferas obteve uma atividade de 0,9 U/g o que é praticamente nula, mostrando que o método não foi eficiente. Concentrou-se a enzima mas ainda não foram obtidos resultados eficientes.

### 2. Concentração enzimática

A concentração enzimática com sulfato de amônio mostrou-se interessante para a lipase, pois resultou em um alto fator de concentração em relação a enzima bruta, no entanto trata-se de um procedimento demorado e que demanda uma grande quantidade de reagente.

A liofilização direta mostrou-se tão eficiente quanto a concentração enzimática via precipitação com sulfato de amônio, mas a variabilidade do caldo fermentado fez com que a reprodutibilidade deste procedimento fosse bem menor do que com a técnica anterior, levando a obtenção de preparados enzimáticos com um aspecto ruim para utilização e com alta umidade.

A enzima obtida após precipitação com etanol obteve fator de concentração inferior ao obtido com a liofilização. O processo combinado de precipitação com etanol e liofilização foi escolhido para continuidade dos estudos pela facilidade de realização do procedimento e pelo fato de que a enzima posteriormente será utilizada em um meio contendo etanol. Todos os resultados podem ser observados na Tabela 1.

### 3. Imobilização com etanol em zeólita

Obteve-se uma porcentagem de enzima imobilizada de 10,2%, um valor muito pequeno, mostrando a não eficiência deste método de imobilização de lipase. A não eficiência do método pode ter ocorrido devido a zeólita possuir cargas e a lipase ser apolar.

Tabela 2. Atividade enzimática e eficiência das amostras.

Amostra	Branco	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>médio</sub>	A (U/100g)	A (U/g)	Eficiência
L10	9,21	9,36	9,66	9,51	0,50	5,0	50%
L20	10,09	9,90	9,56	9,73	0,00	0,0	0%
L30	9,68	9,79	9,85	9,82	0,23	2,3	7,6%
L40	9,64	10,02	9,89	9,96	0,52	5,2	13%
L50	11,51	11,75	11,63	11,69	0,30	3,0	5%

## CONCLUSÕES

Dentre os testes realizados, o método que mostrou melhor resultado foi o da imobilização com etanol em zeólita. Porém, nenhum método atingiu os objetivos desejados, sendo necessária a realização de testes com outros suportes para a imobilização de lipase.

Agradecimento:

