

Otimização da produção de lipases de *Aspergillus* sp. BDA-FI 7 por fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel

Pedro Alves Martins¹, Débora Lo Sciuto², Léia Cecília de Lima Fávares³,
Thálya Fraga Pacheco⁴, Thais Fabiana Chan Salum⁵

Resumo

O biodiesel é um biocombustível que pode ser obtido por rota enzimática por meio da reação de transesterificação de óleos de origem vegetal e/ou animal com o uso de lipases para catalisar o processo. Neste trabalho, avaliou-se a produção de lipases por cinco fungos filamentosos quando cultivados por fermentação em estado sólido. Dentre estes, o fungo BDA-FI 7, identificado por técnicas moleculares como pertencente ao gênero *Aspergillus*, se destacou quanto à atividade lipolítica dos extratos enzimáticos obtidos, alcançando $68,53 \pm 5,41$ U/gss. Os sólidos fermentados oriundos do cultivo do fungo BDA-FI 7 em farelo de trigo se destacaram quanto à capacidade de transesterificar óleo de soja e etanol em ésteres etílicos quando a reação foi conduzida em solvente orgânico (*n*-heptano). A fim de otimizar a produção de lipases para sua aplicação na síntese de biodiesel, foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) considerando temperatura, umidade e quantidade de inóculo como variáveis de cultivo. O experimento foi conduzido com 7 dias de incubação e foi gerado um modelo para explicar o comportamento da produção de lipases.

Introdução

Lipases são enzimas da família das carboxil-éster hidrolases capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis, produzindo glicerol e ácidos graxos, bem como promover as reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e aminólise. Diferenciam-se das esterases, dentre outras classificações, por sua

¹ Biólogo, mestre em Biologia Molecular, bolsista DTI-B, LPB, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, bolsista DTI-B, LPB, debora.sciuto@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favares@embrapa.br

⁴ Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

especificidade de atuação sobre o substrato de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do mesmo. Assim, consideram-se esterases as enzimas que são capazes de atuar apenas sobre triacilgliceróis de cadeia curta (solúveis em água) e lipases verdadeiras aquelas capazes de atuar tanto sobre triacilgliceróis de cadeia curta quanto longa (insolúveis em água) (VERGER, 1997).

Dentre diversas aplicações, as lipases podem ser utilizadas como catalisadoras da rota enzimática de produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação (MA; HANNA, 1999). A legislação brasileira atual estabelece uma adição obrigatória de 7% de biodiesel ao óleo diesel comercializado, enfatizando, assim, a importância do estudo e da produção desse biocombustível, sobretudo quando produzido de forma sustentável. Tendo em vista este panorama socioeconômico, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de lipases por fermentação em estado sólido para sua utilização em reações de transesterificação para produção de biodiesel.

Materiais e métodos

Após etapa de isolamento de microrganismos produtores de lipase a partir de diferentes amostras ambientais, foram selecionados cinco fungos filamentosos promissores (dados não mostrados). Estes foram avaliados quanto à produção de lipases quando submetidos à fermentação em estado sólido utilizando três substratos distintos: farelo de trigo, fibra de prensagem (torta) de dendê e uma mistura 1:1 destes. A extração das lipases foi realizada incubando 5 mL de solução extratora (Tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7,0, Goma arábica 1,11 g/L e Triton X-100 4,44 g/L) por grama de substrato seco. Os extratos enzimáticos obtidos foram, então, avaliados conforme método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (KRIEGER, 1995). As atividades foram expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato seco (U/gss). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μ mol do produto (*p*-nitrofenol) por minuto.

Aqueles que apresentaram atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila tiveram seus extratos enzimáticos e sólidos fermentados (material resultante do cultivo do fungo sobre o suporte sólido durante a etapa de fermentação) obtidos do cultivo em farelo de trigo submetidos a uma etapa de liofilização e, em seguida, à reação de transesterificação. Esta foi realizada com razão óleo:álcool 1:3. Assim, foi utilizado óleo de soja (2 mmol) e etanol P.A. (6 mmol). Para a proteção da

conformação estrutural da enzima, a reação foi conduzida em solvente orgânico. Deste modo, adicionou-se *n*-heptano P.A. totalizando um volume de 10 mL por reação. A este volume, considerou-se, ainda, a adição de água destilada 0,5% (m/m) de forma que houvesse um mínimo de água necessário à manutenção da conformação estrutural e camada de solvatação da enzima (SALUM, 2010). Cada reação foi preparada, individualmente, em frascos do tipo Erlenmeyer de 100 mL vedados com rolha. A cada Erlenmeyer foi adicionado 1g de sólido fermentado mantendo as duplicatas biológicas separadas. Como controle positivo do experimento, utilizou-se Amano Lipase de *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich) a 4 mg/mL. O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional incubado sem adição de enzima. Os Erlenmeyers foram, então, incubados a 37 °C com agitação de 120 rpm e foram retiradas alíquotas de 50 µL para acompanhamento da reação por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A CCD foi realizada em cromato folhas de alumínio ALUGRAM® XTRA SIL G/UV₂₅₄ (espessura 0,20mm; Macherey-Nagel) nas dimensões de 10 cm x 10 cm com fase móvel constituída de hexano:éter etílico:ácido acético na proporção 70:29:1. Como padrões, utilizou-se biodiesel de óleo de soja, óleo de soja (Soya) e ácido oléico (Dinâmica). Para a revelação, a placa foi incubada com iodo ressublimado.

A etapa de otimização da produção da lipase foi feita por meio de planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), avaliando-se três variáveis de cultivo independentes em cinco níveis: temperatura (20 °C a 35 °C), umidade (45% a 65%) e quantidade de inóculo (10^6 esporos/g a 10^8 esporos/g). As faixas de estudo para cada variável foram escolhidas conforme dados da literatura para cultivo de *Aspergillus sp.* por fermentação em estado sólido e também conforme limitações do substrato (a umidade máxima do farelo de trigo sem que haja água livre é de 65%). O experimento foi conduzido conforme matriz gerada utilizando um valor de alfa de 1,68 (fatorial completo $2^3 + 4$ repetições do ponto central + 6 pontos axiais) por 7 dias de cultivo. A produção de lipase foi avaliada conforme atividade lipolítica determinada pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (KRIEGER, 1995) e, em seguida, analisada estatisticamente pelo *software* Statística (v. 12) considerando um nível de significância de 90% ($p < 0,1$). Para a validação do modelo, o cultivo referente ao ponto de maior atividade (observado na superfície de resposta como sendo o de maior umidade e temperatura) descrito na função obtida foi realizado.

Resultados e discussão

Quando avaliados pelo método de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila, nenhum dos cultivos realizados em torta de dendê foi capaz de produzir lipases. Já os extratos enzimáticos obtidos dos cultivos por fermentação em estado sólido dos fungos filamentosos BDA 24, BDA-FI 8.1 e BDA-FI 7 contendo farelo de trigo apresentaram atividade lipolítica. Sendo assim, deu-se continuidade apenas aos estudos com os cultivos desses fungos exclusivamente em farelo de trigo.

A fim de dar continuidade ao estudo de condições de cultivo de fungos para a produção de lipases, realizaram-se alguns testes preliminares de produção de biodiesel usando as lipases produzidas pelos três fungos. Os extratos enzimáticos liofilizados não foram capazes de catalisar a reação de transesterificação. As amostras de sólidos fermentados, entretanto, foram capazes de produzir ésteres etílicos, e as amostras relativas ao cultivo do fungo BDA-FI 7, quando analisadas por CCD, se destacaram por apresentarem manchas com intensidades semelhantes às obtidas no controle positivo (Figura 1). Uma possível explicação para o fenômeno encontrado seria que a enzima pode estar adsorvida ao sólido fermentado de tal maneira que estabilize a conformação tridimensional da mesma protegendo-a da ação desnaturante do álcool de forma que favoreça a catálise.

Deste modo, selecionou-se o fungo BDA-FI 7 (*Aspergillus sp.*) para a etapa de otimização da produção de lipases e procedeu-se com os cultivos conforme delineamento composto central rotacional (DCCR). Apenas as variáveis temperatura e umidade influenciaram significativamente a atividade lipolítica dos extratos, sendo a quantidade de inóculo indiferente à resposta em atividade lipolítica. Assim, considerando-se as variáveis significativas, obteve-se a função que descreve o modelo:

$$\text{Atividade lipolítica} = -74,417 + 2,863.Temperatura + 0,503.Umidade$$

Quando o cultivo ocorre em temperaturas e umidades mais elevadas a função prevê um potencial aumento de atividade lipolítica, chegando a 58,44 U/gss. Godoy et al. (2011) e Mofteh et al. (2012) observaram que baixas umidades resultam em menor turgescência do substrato o que pode reduzir a acessibilidade de nutrientes pelo microrganismo, resultando em menor crescimento e produção de enzimas e metabólitos, o que pode explicar a preferência desse fungo por umidades mais altas.

A função que codifica o modelo em questão foi utilizada para determinar o ponto de máxima atividade e o cultivo do fungo BDA-FI 7 em tais condições foi realizado, exibindo atividade de $68,53 \pm 5,41$ U/gss. Sendo assim, em virtude da boa correlação entre os valores preditos e os resultados empíricos obtidos e, segundo a análise de variância do modelo, o mesmo foi considerado validado.

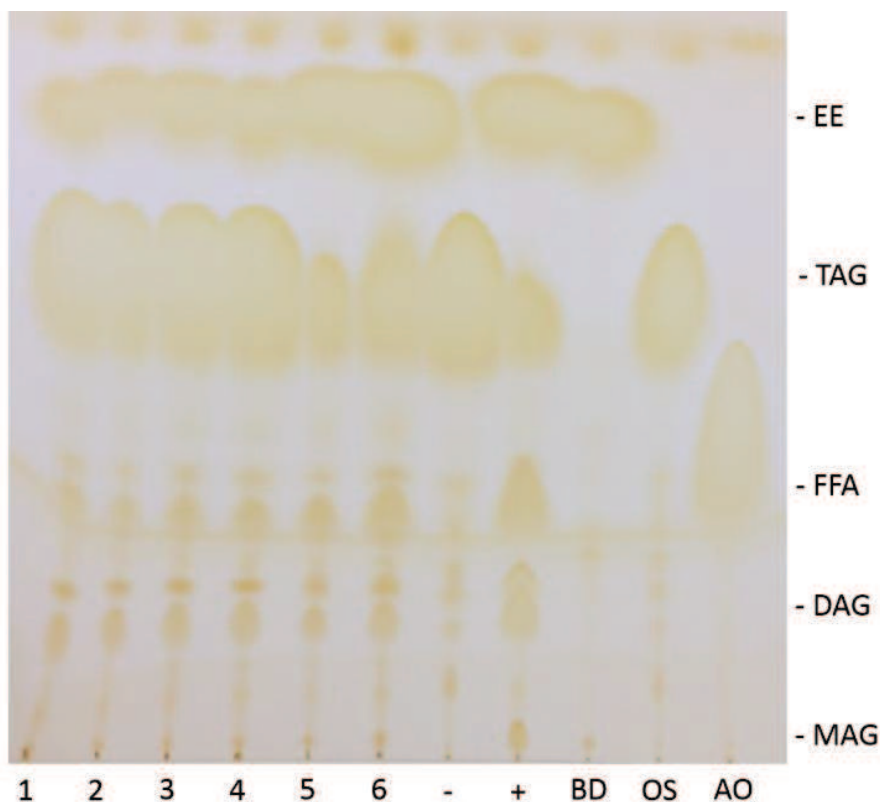


Figura 1. Avaliação qualitativa da produção de ésteres etílicos por cromatografia em camada delgada utilizando os sólidos fermentados (120h). A produção de ésteres etílicos (EE) é acompanhada da diminuição da quantidade de triacilgliceróis (TAG) e do aumento da quantidade de diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (FFA). 1 e 2: sólidos fermentados de BDA 24; 3 e 4: sólidos fermentados de BDA-FI 8.1; 5 e 6: sólidos fermentados de BDA-FI 7; - : controle negativo; + : controle positivo; BD: padrão de biodiesel de óleo de soja; OS: padrão de óleo de soja; e AO: padrão de ácido oleico.

Conclusões

Quando cultivados em farelo de trigo por fermentação em estado sólido, os fungos BDA 24, BDA-FI 7 e BDA-FI 8.1 foram capazes de produzir lipases.

As amostras de extrato enzimático liofilizado não apresentaram atividade de transesterificação, sendo incapazes de produzir biodiesel. Entretanto, as amostras de sólido fermentado dos cultivos das linhagens BDA 24, BDA-FI 8.1 e BDA-FI 7

realizados em farelo de trigo como substrato foram capazes de converter o óleo de soja em ésteres etílicos. A lipase do fungo BDA-FI 7 teve uma maior eficiência em produzir ésteres etílicos.

O fungo BDA-FI 7 foi o microrganismo isolado com maior capacidade de produção de lipases quando cultivado em farelo de trigo. O DCCR mostrou que as variáveis temperatura e umidade apresentaram efeito significativo sobre a atividade lipolítica, enquanto a quantidade do inóculo foi indiferente em relação à atividade lipolítica. A maior atividade lipolítica obtida foi de 68,53 U/gss em 7 dias de cultivo com temperatura de 35 °C e umidade de 65%.

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos do projeto DendePalm (Finep).

Referências

- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 38, n. 8, p. 945-953, 2011.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PR.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
- MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 166, n. 2, p. 348-364, 2012.
- SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba, PR.
- VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, Oxon, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.