

Produção de lipases bacterianas e aplicação à síntese de biodiesel

*Pedro Alves Martins¹, Karoline Costa Almeida², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Thályta Fraga Pacheco⁴, Janice Lisboa de Marco⁵,
Thaís Fabiana Chan Salum⁶*

Resumo

O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por meio da reação de transesterificação por catálise enzimática. Para isso, empregam-se lipases, que, em ambiente aquorrestrito, são capazes de sintetizar monoalquil ésteres tanto a partir de triacilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, tornando o processo mais atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado. A versatilidade e a alta eficiência catalítica das lipases representam alguns dos motivos de sua grande aplicabilidade industrial. Entretanto, o custo de obtenção desses biocatalisadores ainda tem sido um grande limitante à utilização destes em processos de produção de biodiesel por catálise enzimática. Assim, este trabalho visou à produção dessa enzima por meio do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 por fermentação em estado sólido em farelo de trigo e a sua aplicação à síntese de biodiesel. Após a avaliação de quatro composições de meio distintas, observou-se que não houve diferença estatística entre os cultivos, sugerindo que a composição do meio pode ser a mais simples e barata, para ser utilizado para o cultivo da bactéria para a produção das lipases (farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 acrescido de 5% óleo de soja). Em testes preliminares, tanto os sólidos fermentados quanto os extratos enzimáticos obtidos do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 foram capazes de sintetizar ésteres etílicos a partir de óleo de soja. O maior índice de conversão encontrado foi de 95,1% para a reação conduzida em *n*-heptano e onde foram utilizados sólidos fermentados como catalisador da síntese.

Palavras-chave: lipase, fermentação em estado sólido, biodiesel.

Introdução

A crescente escassez e crise dos combustíveis fósseis revelou a necessidade da busca por fontes de energia renováveis. Assim, os biocombustíveis surgem como tecnologias alternativas mais sustentáveis e eficientes que visam tanto a baixos impactos ambientais quanto a benefícios econômicos.

¹ Graduado em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular, doutorando em Biologia Microbiana, Universidade de Brasília, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

² Graduada em Biotecnologia, Universidade de Brasília, karoline.almeida@colaborador.embrapa.br

³ Graduada em Química, mestre em Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Graduada em Engenharia Química, mestre em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, thalyta.pacheco@embrapa.br

⁵ Graduada em Ciências Biológicas, mestre em Biologia Molecular, doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, janicedemarco@unb.br

⁶ Graduada em Farmácia, doutora em Ciências (Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, thais.salum@embrapa.br

O biodiesel é um biocombustível composto por ésteres de ácidos graxos e pode ser utilizado tanto na forma de misturas quanto em sua forma pura, sendo um substituto do diesel derivado de petróleo e totalmente compatível com motores a combustão interna. Atualmente, esse combustível é produzido por meio de um processo de catálise alcalina que, apesar de proporcionar altos índices de conversão, apresenta uma série de desvantagens, como a geração de grande quantidade de efluentes alcalinos, a necessidade da utilização de óleos com baixa acidez, um alto consumo energético e a produção de um glicerol de baixa qualidade e de difícil recuperação (SALUM et al., 2013). Uma alternativa mais promissora será a utilização de lipases para realizar as reações de transesterificação dos triacilgliceróis.

As lipases são enzimas da família 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. Dentre diversas aplicações, as lipases podem ser utilizadas na produção do biodiesel por meio da reação de transesterificação (MA; HANNA, 1999). A vantagem de se utilizar lipases em relação à catálise alcalina está na capacidade catalítica dessas enzimas em produzir ésteres tanto a partir de triacilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, tornando o processo de produção do biodiesel atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado. Outras vantagens em relação à catálise alcalina são o menor consumo de água em etapas de lavagem, o menor consumo de energia no processo e obtenção de um glicerol de alta qualidade e de fácil recuperação (SOARES et al., 2013).

Apesar de tudo, a produção de biodiesel por catálise enzimática ainda é um processo dispendioso devido ao alto custo de obtenção dessas enzimas. Desse modo, extensos trabalhos de prospecção têm sido conduzidos de forma a isolar microrganismos produtores de lipases a fim de se obter enzimas novas e mais eficientes (CIUDAD et al., 2011; ADRIO; DEMAIN, 2014).

A legislação brasileira atual estabelece uma adição obrigatória de 7% de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2016) e chegará a 10% em 2019, enfatizando, assim, a importância do estudo e da produção desse biocombustível de forma cada vez mais sustentável.

Materiais e Métodos

Cultivo da bactéria por fermentação em estado sólido

A bactéria CNPAE 99 (579) A3 foi isolada a partir do mesocarpo de frutos de dendê em um trabalho prévio de seleção de microrganismos produtores de lipase (dados não apresentados). Para a obtenção das lipases, a bactéria foi estriada em meio Luria-Bertani Ágar e cultivada a 28 °C até a obtenção de colônias puras. Em seguida, uma colônia foi selecionada da placa e repicada para um cultivo submerso em meio Luria-Bertani, etapa denominada de pré-inóculo. Os frascos foram condicionados em mesa agitadora a uma temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm até que a cultura atingisse uma densidade ótica de 0,6 de absorbância a 600 nm, ponto em que a bactéria se encontra na fase exponencial de crescimento. A bactéria foi, então, submetida a uma fermentação em estado sólido utilizando 4 g de farelo de trigo como substrato com 65% de umidade, adição de 5% (m/m) de indutor e 1 mL de pré-inóculo em frascos do tipo Erlenmeyer, variando-se as soluções utilizadas para umedecer o material e os óleos indutores. As soluções utilizadas para umedecer os cultivos foram

um tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 e um meio sintético (KNO_3 3,54 g/L; K_2HPO_4 0,7 g/L; KH_2PO_4 0,4 g/L; NaCl 0,38 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L; Extrato de levedura 5,0 g/L; pH 7,0). Os óleos indutores avaliados foram o Óleo de Oliva (Borges) e o Óleo de Soja (Soya), perfazendo um total de 4 combinações. Com os cultivos preparados, os frascos foram condicionados em ambiente com temperatura controlada de 30 °C e sem agitação por 96 horas. Para todas as etapas de cultivo, os meios de cultura e materiais utilizados foram autoclavados por 30 minutos a 121 °C e pressão de 1 atm para garantir condições estéreis de cultivo.

Extração das lipases e determinação de atividade lipolítica (p-NPP)

Após a etapa de cultivo, 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, incubando-se a 25 °C com agitação de 150 rpm por 1 hora. Após o período de incubação, coletaram-se os sobrenadantes obtidos da centrifugação do material em rotação de 10.000 rpm e temperatura de 4 °C por 10 minutos. 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 μmol do produto (*p*-nitrofenol) por minuto.

Reação de síntese de ésteres etílicos

O extrato enzimático e os sólidos fermentados (material resultante do cultivo da bactéria sobre o suporte sólido durante a etapa de fermentação) resultantes do cultivo com maior atividade lipolítica foram 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). Adicionou-se *n*-heptano P.A. totalizando um volume de 10 mL por reação. Concomitantemente, avaliou-se a capacidade de conversão do óleo de soja em ésteres etílicos em reação sem adição de solvente ao meio reacional. Nesse caso, foram utilizados óleo de soja (10 mmol) e etanol P.A. (30 mmol). Considerou-se ainda ao volume total, em ambas as reações, 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 e foram vedados com rolha de borracha para Erlenmeyers. A cada Erlenmeyer foi adicionado o sólido fermentado liofilizado ou o extrato enzimático liofilizado. O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional incubado sem adição de enzima. As reações foram realizadas em triplicata. Os Erlenmeyers foram, então, incubados a 37 °C com agitação de 120 rpm por 120 horas e foram retiradas alíquotas de 500 μL para determinação da quantidade de ésteres etílicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Quantificação de ésteres etílicos por HPLC

A conversão de óleo de soja a ésteres etílicos foi quantificada por meio de análise por HPLC. Foram pesados 5 mg de amostra e diluídos em 1 mL de solvente

isopropanol:hexano (5:4 v/v). Aplicaram-se 10 μL de amostra diluída em coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) a uma temperatura de 40 °C e fluxo de 1 ml/min da fase móvel. A eluição foi feita com gradiente binário da seguinte forma: 100% metanol por 10 minutos, seguido de 50% metanol/50% isopropanol:hexano (5:4 v/v) por mais 10 minutos e, por fim, 100% metanol até totalizar 25 minutos. O detector utilizado foi o de arranjo de fotodiodos (PDA) com comprimento de onda de 205 nm. O cálculo da conversão foi realizado comparando-se as áreas relativas aos picos de ésteres entre as amostras obtidas e um padrão de biodiesel metílico de óleo de soja.

Resultados e Discussão

Em estudos anteriores (dados não apresentados), a bactéria CNPAE 99 (579) A3 vinha sendo utilizada para a produção de lipases por meio do cultivo da mesma por fermentação em estado sólido com farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A fim de selecionar as melhores condições de cultivo para obtenção de maior atividade lipolítica com menor custo de produção, optou-se por avaliar a utilização de um meio mais rico em fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes para umedecer o farelo de trigo, bem como de diferentes óleos indutores. Assim, como teste preliminar a um estudo de otimização da produção de lipases por planejamento fatorial, decidiu-se por avaliar inicialmente se havia diferença na resposta de atividade lipolítica observada entre um cultivo umedecido com meio sintético ou com tampão e induzido pela presença de óleo de oliva ou óleo de soja. Decorridas 96 horas de fermentação, avaliaram-se as atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos obtidos das combinações dos fatores propostos (Figura 1).

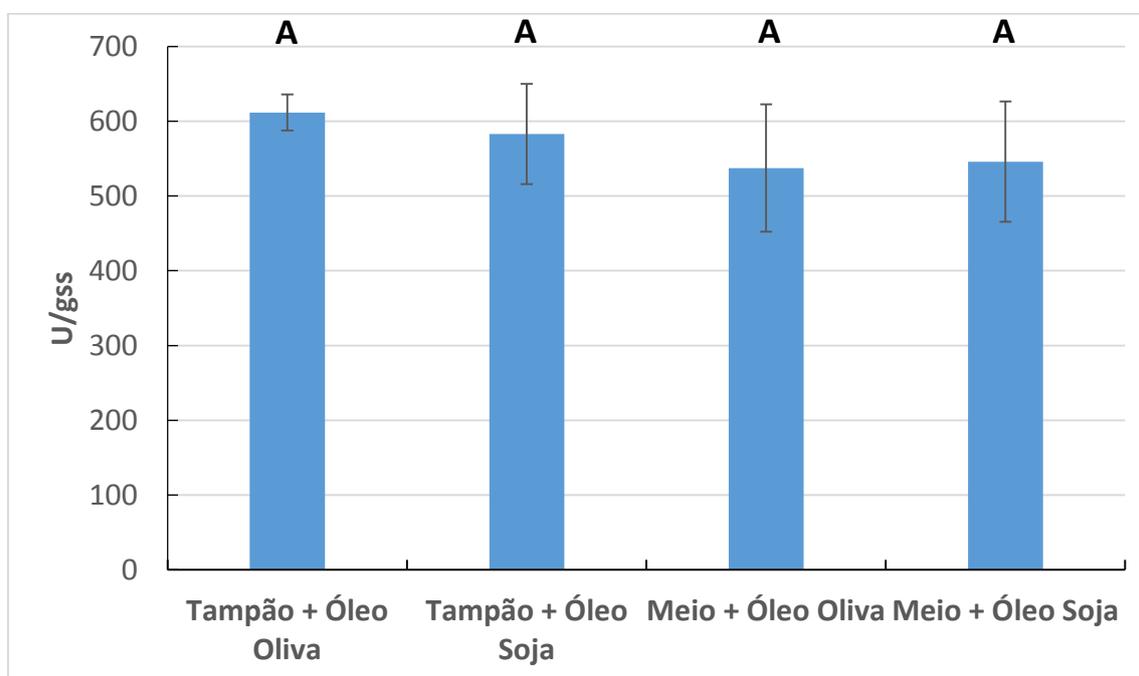


Figura 1. Atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos obtidos dos cultivos da bactéria CNPAE 99 (579) A3. Os valores são apresentados em Unidade Internacional ($\mu\text{mol}/\text{min}$) por grama de substrato seco. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%).

A partir dos resultados dos ensaios enzimáticos obtidos, procedeu-se com a avaliação estatística do teste de hipótese para igualdade de médias dos cultivos. Para essa avaliação, foi aplicado o teste de Tukey considerando um intervalo de confiança de 95%. De acordo com a análise estatística (Tukey), conclui-se que os grupos são iguais entre si quando comparados dois a dois, não havendo diferença estatisticamente significativa da resposta em atividade lipolítica. Desse modo, optou-se pela condição de cultivo umedecida com tampão, pois além de facilitar o processo, ainda é uma forma de baratear a produção das lipases, pois reduz consideravelmente a variedade e a quantidade de reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura do cultivo. Optou-se, ainda, pelo uso do óleo de soja como indutor, pois este é mais barato do que o óleo de oliva.

A fim de dar continuidade ao estudo de condições de cultivo da bactéria para a produção de lipases, realizaram-se alguns testes preliminares de produção de biodiesel usando as lipases produzidas pelo cultivo umedecido com tampão e induzido pela adição de óleo de oliva. Tanto o extrato enzimático liofilizado quanto os sólidos fermentados liofilizados foram capazes de sintetizar ésteres etílicos em ambos os tipos de reação testados, com e sem solvente (Tabela 1).

Tabela 1. Conversão em ésteres etílicos das reações de transesterificação. Condições: razão molar óleo:etanol 3:1, 0,5% água (m/m), temperatura de 37 °C, agitação de 120 rpm, 120 horas de reação.

	Reação com solvente		Reação sem solvente	
	Extrato Enzimático	Sólido Fermentado	Extrato Enzimático	Sólido Fermentado
Conversão (%)	77,6 ± 0,1	95,1 ± 0,4	48,7 ± 4,2	55,8 ± 9,6

As amostras de sólidos fermentados apresentaram maior índice de conversão do que as amostras de extrato enzimático, o que caracteriza uma vantagem para a redução dos custos do processo, pois além de eliminar uma etapa de extração da enzima, esta ainda pode ser recuperada e reutilizada em uma nova reação. 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. Observou-se, ainda, que a reação conduzida em meio com *n*-heptano apresentou maior conversão do que a reação conduzida em meio sem o solvente orgânico. Segundo relatou Bu et al. (2010), a adição de cossolventes, como o *n*-heptano, às reações de transesterificação reduz a polaridade do meio reacional, diminuindo a competição entre o etanol e as enzimas pelas moléculas de água, promovendo, assim, uma melhor manutenção da camada de solvatação da enzima, o que acaba por proteger e estabilizar a conformação estrutural e a consequente atividade catalítica das enzimas.

Conclusões

Não foi observada diferença estatística entre as respostas de atividade lipolítica para as quatro condições de cultivo avaliadas. Sendo assim, a condição escolhida foi de cultivo com farelo de trigo umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7,0 acrescido de 5% de óleo de soja, pois trata-se do meio de composição mais simples e barato, reduzindo assim, os custos associados à produção das lipases. Em testes preliminares, tanto os sólidos fermentados quanto os extratos enzimáticos obtidos do cultivo da bactéria CNPAE 99 (579) A3 foram capazes de sintetizar ésteres etílicos a partir de óleo de soja. O maior índice de conversão encontrado foi de 95,1% para a reação conduzida em *n*-heptano e utilizando sólidos fermentados como catalisador da síntese. A fim de viabilizar o uso da reação de transesterificação sem solvente orgânico, se faz necessária uma etapa de otimização das variáveis do processo.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com recursos do projeto DendePalm (Finep) e com o apoio da Universidade de Brasília.

Referências

- ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139. 2014.
- BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.in.gov.br>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- BU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil. **Energy and Fuels**, v. 24, p. 4646-4651. 2010.
- CIUDAD, G.; REYES, I.; AZÓCAR, L.; BRIONES, R.; JORQUERA, M.; WICK, L. Y.; NAVIA, R. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. **New Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 375-381, 2011.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15. 1999.
- SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos**. 2010. 130 f. il., color. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- SALUM, T. F. C.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; DAMASO, M. C. T. Produção de biodiesel por catálise enzimática. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013. p. 257-276.
- SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23, 2013.