

Produção de lipase de *Pseudozyma hubeiensis* e aplicação na biocatálise de biodiesel

Solon A. da Rosa¹, Marilene H. Vainstein^{1,2}

¹ Centro de Biotecnologia, UFRGS;

² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



INTRODUÇÃO

O biodiesel tem se destacado dentre os bicombustíveis por apresentar propriedades físico-químicas similares a de seu equivalente fóssil, além de apresentar vantagens como ponto de fulgor elevado, menor presença de impurezas, entre outras. O mesmo é obtido industrialmente via catálise química ou enzimática, sendo que a segunda se mostra mais sustentável, com eficiência similar e menor demanda energética (Narwal et al., 2015). A levedura *Pseudozyma hubeiensis* produz uma lipase capaz de realizar a catálise com competência (Bussamara et al., 2009), sendo vantajosa frente as demais enzimas por ser secretada pelas células e não precisar de processos de purificação ou produção heteróloga, além disso, produz uma boa eficiência de reação, reduzindo custos e etapas.

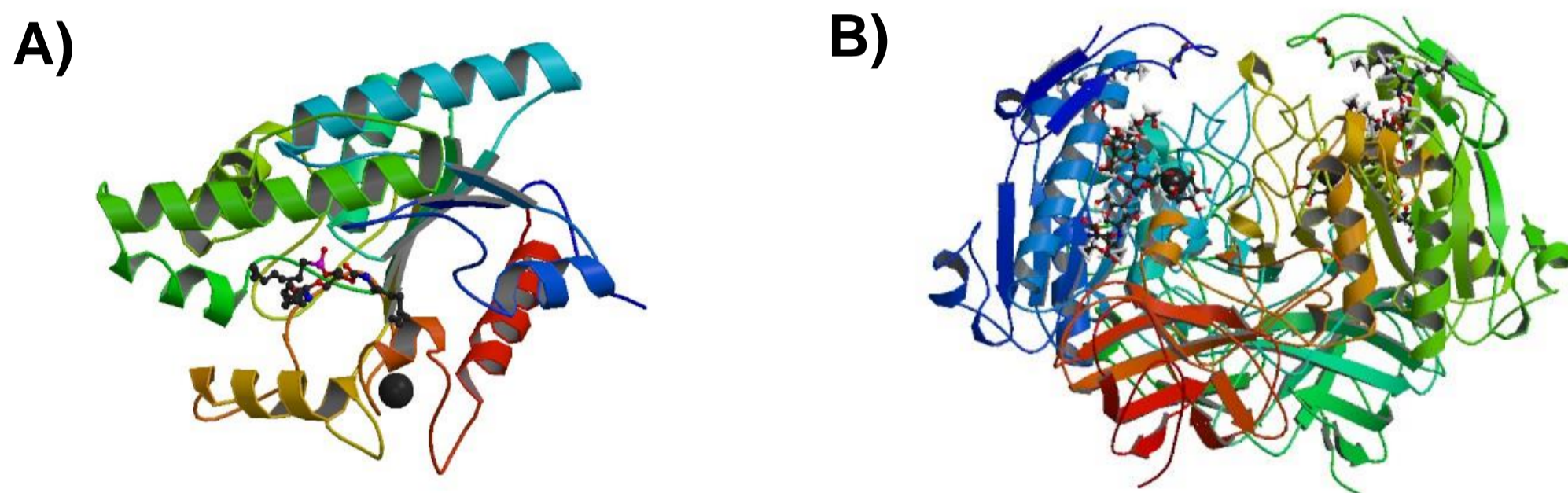
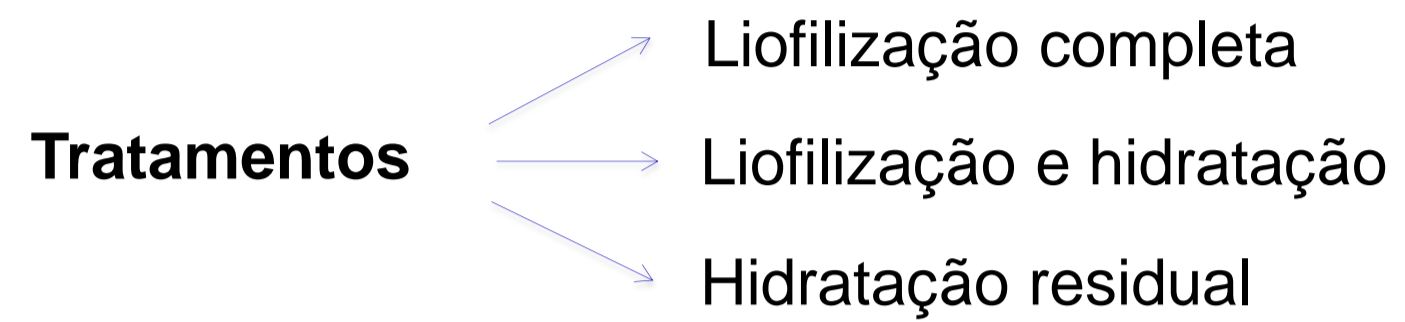


Fig. 1: Estruturas 3D conhecidas de lipases comerciais bem caracterizadas, mostrando a diversidade das enzimas que compõe a classe das triacilhidrolases. A) lipase *Pseudomonas aeruginosa* (Nardini et al., 2000). B) lipase de pâncreas suíno (Hermoso et al., 1996).

MATERIAIS E MÉTODOS

Enzimas: A lipase foi obtida da levedura *Pseudozyma hubeiensis* HB85A cultivada em biorreator e plataforma rotatória. Lipase from Porcine Pancreas (Sigma – Aldrich) como controle comparativo.



Ensaio bioquímico:

- Proteínas Totais (Bradford)
- Atividade Enzimática (transesterificação do éster PNPP) (Silva et al., 2005)
- SDS-PAGE para resolução dos produtos proteicos

Parâmetros reacionais: (i) relação enzima substrato, (ii) temperatura, (iii) possibilidade de solvência, (iv) razão molar álcool/óleo, (v) tempo reacional e (vi) agitação foram avaliados. As reações ocorreram primeiramente em escala laboratorial (microtubo) e posteriormente em reatores com agitação mecânica, simulando um escalonamento industrial (Ebrahimi et al, 2012).

Análises dos produtos: (i) qualitativa, via cromatografia em camada delgada (Soham et al., 2011) e (ii) quantitativa, através de cromatografia a gás (GC-FID), via método EN 14103, (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

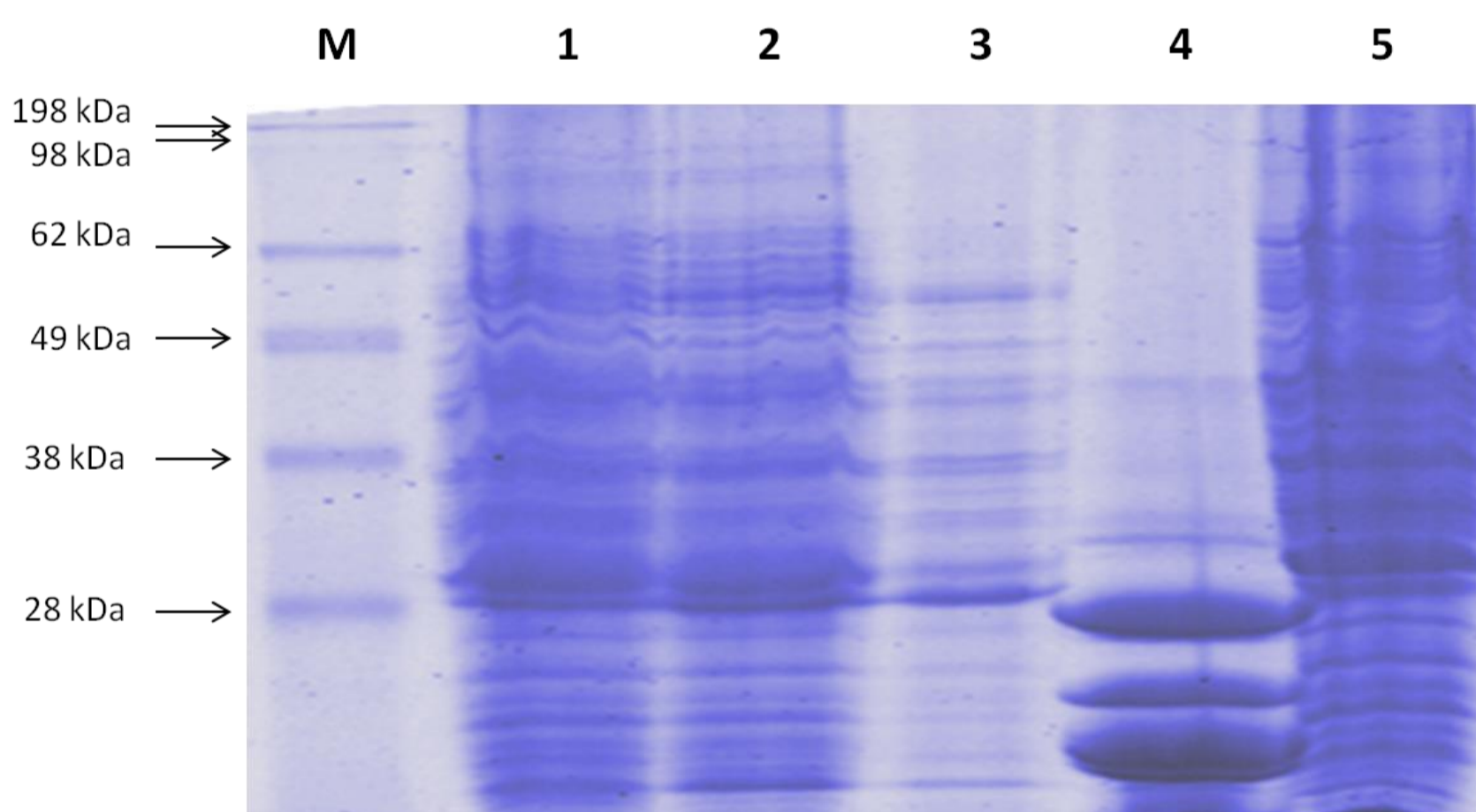


Fig. 2 : Perfil proteico caracterizado via SDS-PAGE, M – marcador de peso molecular, 1- tratamento liofilização e hidratação, 2 – tratamento liofilização completa, 3 – tratamento hidratação residual, 4 – Lipase from porcine pancreas e 5 – tratamento de liofilização da enzima produzida em biorreator.

A análise via SDS-PAGE dos tratamentos revelou a presença de diversas proteínas, como esperado, uma vez que não há purificação nos produtos do cultivo (Fig.2). No entanto, notou-se que a enzima comercial purificada, também não apresenta uma única banda, que seria característica de um produto purificado. Esse resultado demonstra que se determinadas as condições ótimas da lipase *P. hubeiensis*, a mesma apresenta-se como uma alternativa à catálise, com custos reduzidos e qualidade de reação semelhante, uma vez que não necessita de purificação.

Tratamento	Conversão (µmol/mL)	Atividade (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Liofilização e hidratação	400	13,33	1,26	10,57
Liofilização completa	320	11,00	1,67	6,58
Hidratação residual	590	19,50	3,80	5,13
Biorreator (Liofilização)	205,45	6,85	0,60	11,41

Tabela 1: Atividade enzimática dos diferentes tratamentos da lipase de *P. hubeiensis*. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária pra converter 1 µmol do substrato em 1 min. Atividade específica descrita pelo fabricante de lipase from porcine pancreas = 31 U/mg.

As análises de atividade enzimática, proteína total e atividade específica revelaram que nas condições teste, todos os tratamentos apresentam potencial de utilização para a catálise (Tabela 1), devido aos valores elevados em todos os testes. Existe uma menor atividade dos tratamentos em relação a enzima comercial, mas os custos de tratamento da lipase de estudo a tornam mais competitiva.

Tratamento	5%	15%	25%
Liofilização e hidratação	0,07	0,07	0,4
Comercial (Porcine)	3,1	8,2	4,6
Biorreator (Liofilização)	0,06	-	0,08

Tabela 2: Comparação da produção de biodiesel obtida em reações de microtubos, análise via cromatografia gasosa. Parâmetro avaliado: concentração enzimática. Condições: 19 horas, álcool razão molar 3:1 (óleo de soja) e 300RPM de agitação.

Tratamento	5%	15%	25%
Liofilização e hidratação	0	0	0
Comercial (Porcine)	2,2	0	0
Biorreator (Liofilização)	10,7	-	-

Tabela 3: Comparação da produção de biodiesel obtida em reações de reatores, análise via cromatografia gasosa. Parâmetro avaliado concentração enzimática. Condições: 19 horas, álcool razão molar 3:1 (óleo de soja) e 200RPM de agitação.

A lipase da levedura *P. hubeiensis* foi capaz de realizar a conversão de 10,7% de óleo em ésteres (biodiesel), em reatores (Tabela 3). O percentual ainda é baixo, porém demonstra um grande potencial dos tratamentos de estudo, visto que ainda há parâmetros a serem avaliados. A lipase de *P. hubeiensis* apresenta-se, como aqui demonstrado, capaz de realizar a catálise de biodiesel a baixo custo, sendo uma alternativa sustentável ao processo químico, porém mais testes precisam ser realizados para que a mesma possa demonstrar-se viável industrialmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- NARWAL, S. K. et al. Production and characterization of biodiesel using nonedible castor oil by immobilized lipase from *Bacillus aerius*. *Biomed Res Int*, v. 2015, p. 281934, 2015.
- Bussamara, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour Technol*, 2010.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem*, 2005.
- Soham & Sen, Ramkrishna. "Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process." *Applied Energy*, Elsevier, 2013.
- EN 14103 – Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization, 2011.
- NARDINI, M. et al. Crystal structure of pseudomonas aeruginosa lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem*, v. 275, n. 40, p. 31219-25, Oct 2000.
- HERMOSO, J. et al. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoocetyl ether complex. *J Biol Chem*, v. 271, n. 30, p. 18007-16, Jul 1996.
- Ebrahimi, S.; Amini, G.; Younesi, H.; Najafpour, G. D. Production of biodiesel using soybean oil catalyzed by porcine pancreas lipase in a solvent free system. *Middle East Journal of Scientific Research*, 2012.