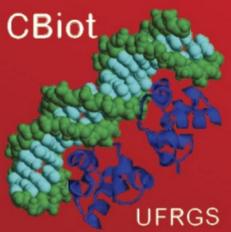


APRIMORAMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE OBTIDA DA LEVEDURA *PSEUDOZYMA HUBEIENSIS* E APLICAÇÃO EM BIOCATALÍSE DE BIODIESEL



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

¹ Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica - Centro de Biotecnologia, UFRGS;
² Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia - Instituto de Biociências, UFRGS.



paz no plural

INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são alternativas renováveis e sustentáveis tão eficientes quanto os análogos de origem fóssil, apresentando propriedades físico-químicas semelhantes e características superiores como a biodegradabilidade, baixa concentração de compostos tóxicos e possibilidade de aplicação de uma grande gama de matérias-primas na sua produção (ANP 2016). Um biocombustível que merece destaque é o biodiesel. O mesmo é obtido por reações de esterificação/transesterificação de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta como metanol e etanol, por catálise química ou enzimática. A catálise enzimática apresenta vantagens em relação à química, necessitando de condições menos extremas nos parâmetros de reação. Além disso, as enzimas utilizadas podem ser recuperadas e reutilizadas e não necessitam de matérias-primas purificadas para realização da reação, uma vez que o catalisador é seletivo ao seu substrato (Narwal *et al.*, 2015).

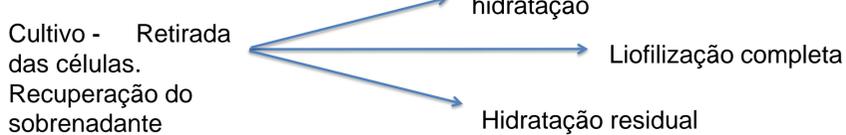
Por sua vez, a lipase obtida da levedura *Pseudozyma hubeiensis*, se comparada a biocatalisadores comerciais, apresenta a vantagem de ser produzida em grandes quantidades pelo microrganismo, sendo secretada pelas células, não necessitando de extração, e também demonstrando-se capaz de realizar a catálise sem purificação, reduzindo os custos do processo (Bussamara *et al.*, 2009).

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.

Tratamentos:



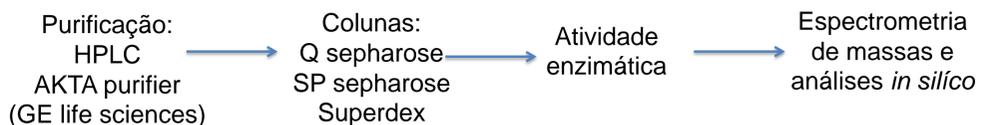
Parâmetros reacionais:

- relação enzima substrato
- temperatura
- tempo reacional
- possibilidade de solvência
- razão molar álcool/óleo
- agitação

Ensaio bioquímico:

- Proteínas totais (Bradford);
- Atividade enzimática (transesterificação do éster PNPP)(Silva *et al.*, 2005);
- SDS-PAGE para resolução dos produtos proteicos;
- Zimograma (Silva *et al.*, 2005).

Caracterização proteica:



Análises dos produtos:

- qualitativa, cromatografia em camada delgada (Soham *et al.*, 2011);
- quantitativa, cromatografia a gás (GC-FID) (método EN 14103, 2011)..

As reações ocorreram primeiramente em escala laboratorial (microtubo) e posteriormente em reatores com agitação mecânica, simulando um escalonamento industrial (Ebrahimi *et al.*, 2012).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

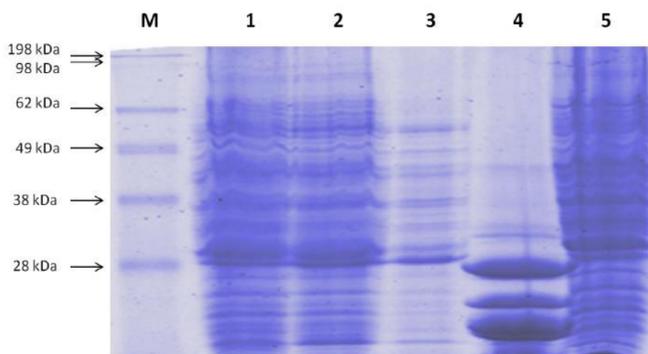


Figura 1: Perfil proteico caracterizado via SDS-PAGE, M – marcador de peso molecular, 1- tratamento liofilização e hidratação, 2 – tratamento liofilização completa, 3 – tratamento hidratação residual, 4 – Lipase from porcine pancreas e 5 – tratamento de liofilização da enzima produzida em biorreator.

A análise dos resultados obtidos via SDS-PAGE (Figura 1) determinou que a lipase de estudo, em todos os tratamentos utilizados, apresenta uma série de constituintes proteicos em sua composição, o que era esperado de um extrato bruto não purificado. No entanto, também demonstra que a enzima suína comercial não possui uma única banda, esperada de um produto purificado, o que reforça a ideia de que se determinadas as condições corretas de reação, a lipase de *P. hubeiensis* pode ser uma alternativa, com alta capacidade convertiva, mas com custos muito reduzidos, sem a necessidade das etapas de purificação, extração e expressão heteróloga, das enzimas atualmente disponíveis.

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.

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade enzimática revelam um alto potencial para o biocatalisador de estudo. Como vemos na tabela 1, atingiu-se um valor máximo de 11,41 U/mg de proteína no melhor resultado. Mesmo que tal valor seja inferior ao da enzima comercial de controle, a maior facilidade de obtenção e o menor valor atrelado ao processo de produção compensam uma possível maior utilização do catalisador, quando aplicado em reações de síntese de biodiesel.

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

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

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

As reações conduzidas tanto em microtubo, como em escala semi-industrial demonstram-se promissoras. Como vemos na tabela 3, obteve-se uma conversão de 10,7% da matéria-prima em ésteres de biodiesel. Apesar do valor ainda ser muito baixo, um único parâmetro de reação foi testado, apresentando resultados consideráveis. Dada a otimização dos demais parâmetros, espera-se que seja possível obter uma catálise de alta eficiência e um produto com alta concentração de ésteres que se encaixe nas normas de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>. Acesso em Fevereiro 2016.
- BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour Technol.*, v. 101, n. 1, p. 268-75, Jan 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.
- DEUTSCHER, M. *Methods in enzymology: guide to protein purification*. San Diego: Academic Press Inc. 1990. Volume 182.
- 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.
- 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.
- 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.
- NASARUDDIN, R. R.; ALAM, M. Z.; JAMI, M. S. Evaluation of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol-based biodiesel from sludge palm oil (SPO). *Bioresour Technol.*, v. 154, p. 155-61, Feb 2014.
- PEREIRA, E. Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática. 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de engenharia, Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul. 2013.
- 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, Elsevier, 2013.
- VON DER HAAR, D. et al. Enzymatic esterification of free fatty acids in vegetable oils utilizing different immobilized lipases. *Biotechnol Lett.*, v. 37, n. 1, p. 169-74, Jan 2015.