

Potencial utilização em biocatálise de lipases ligadas ao micélio

Potential use in biocatalysis of mycelium-bound lipases

RESUMO

Camila T. Cardoso dos Santos
camila.taynara@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Alessandra Machado Baron
alessandrab@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Gabriella Sadako Igarashi
gabriellaiigarashi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Milena Martins Andrade
milenaandrade@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Patrícia Salomão Garcia
p.salomaogarcia@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



O objetivo deste trabalho foi otimizar a síntese do oleato de etila utilizando micélio contendo lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas (ML) e hexano como co-solvente iniciada por Igarashi (2018). Aplicou-se a ferramenta estatística da desejabilidade (FED), com a finalidade de maximizar a variável resposta (rendimento da reação %). As condições sugeridas pela FED foram temperatura (T) de 45 °C; quantidade de micélio (QML) acima de 1 g e razão molar ácido:álcool (RM) entre 1:1 e 1:2. Por isso, alguns experimentos foram realizados com a finalidade de validar as condições sugeridas pela FED, sendo eles: (1) 45 °C, 1 g de QL e RM 1:2 (90%; 24 h); (2) 40 °C, 1 g de QL e RM 1:2 (90%, 24 h); (3) 40 °C, 1,6 g de QL e RM 1:2 (álcool adicionado em 1 etapa), (90%, 12 h) e (4) 40 °C, 1,6 g de QL e RM 1:2 (álcool adicionado em 3 etapas) (rendimento próximo a 90%, 12 h). A cinética da reação foi acompanhada nos intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12 e 24 h. Os resultados mostraram que foi possível reduzir o tempo da reação à metade (12 h), mantendo o mesmo rendimento (90%) para as condições (3) e (4).

PALAVRAS-CHAVE: Biotransformação. Enzimas. Esterificação.

ABSTRACT

The objective of this work was to optimize ethyl oleate synthesis using mycelium-linked *Botryosphaeria ribis* EC-01 lipases (LM) and hexane as co-solvent initiated by Igarashi (2018). The statistical desirability tool (EDF) was applied to maximize the response variable (reaction yield %). The conditions suggested by the EDF were temperature (T) of 45 °C; amount of mycelium (QLM) above 1 g and acid: alcohol (RM) molar ratio between 1:1 and 1:2. Therefore, some experiments were performed with the purpose of validating the conditions suggested by the EDF, as follows: (1) 45 °C, 1 g of QLM and 1:2 RM (90%; 24 h); (2) 40 °C, 1 g QLM and 1:2 RM (90%, 24 h); (3) 40 °C, 1.6 g QLM and 1:2 RM (1-step alcohol), (90%, 12 h) and (4) 40 °C, 1.6 g QLM and RM 1:2 (alcohol added in 3 steps) (yield close to 90%, 12 h). The reaction kinetics were monitored at 3, 6, 9, 12 and 24 h. The results showed that it was possible to reduce the reaction time in half (12 h), maintaining the same yield (90%) for conditions (3) and (4).

KEYWORDS: Biotransformation. Enzymes. Esterification.

INTRODUÇÃO

Com vasta aplicação no setor biotecnológico as lipases (EC 3.1.1.3) são utilizadas em reações como a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e reações de síntese realizadas *in vitro* como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e aminólise.

A obtenção de lipases pode ocorrer através de tecidos de animais e vegetais ou pela produção envolvendo o processo de fermentação submersa (FS) ou sólida (FES) de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras). Na FS, as lipases podem ser extracelulares (normalmente as empregadas na indústria), ou seja, que é secretada no meio de cultivo, e intracelular ou presente em células inteiras, neste caso, a enzima está no interior da célula ou na parede celular (CANELA-GARAYOA et al., 2014). Na maioria dos casos, o extrato bruto é purificado, sendo a enzima concentrada e/ou imobilizada em suportes inertes. A biomassa (micélio) é um subproduto da fermentação e pode ser empregada como fertilizantes, complemento de ração animal (SILVA, 2010) e em biotransformação, caso haja enzimas ligadas ao micélio (BIROLI et al., 2015). Compreende-se por biotransformação, as reações químicas catalisadas por microrganismos ou preparações que derivam da biomassa, podendo ser realizada em meio aquoso ou orgânico.

Botryosphaeria ribis EC-01 foi preliminarmente selecionado como um bom produtor de lipases quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol através de fermentação submersa (FS) dentre outros isolados fungicos do gênero *Botryosphaeria*, por ser endofítico e conhecido por secretar diferentes enzimas. (MESSIAS et al., 2009). Em resultados anteriores (IGARASHI, 2018), o micélio contendo lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas, apresentaram boa eficiência catalítica na síntese do oleato de etila quando realizada com co-solvente (hexano). Um planejamento experimental 2^3 (temperatura-T, quantidade de micélio contendo lipases ligadas massa do micélio-QLM e Razão molar ácido: álcool-RM), com triplicata no ponto central, analisando a variável resposta, rendimento da reação (%), foi realizado. O melhor rendimento (90%) foi obtido nas seguintes condições 40 °C; 1 g de micélio e RM de 1:1. Por isso, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade à otimização da síntese do oleato de etila utilizando micélio lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (LLM) tendo o hexano como co-solvente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Depois do cultivo do microrganismo e a produção das lipases, as células (micélio) foram separadas por filtração e secas em liofilizador.

A atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) catalisada pelas lipases ligadas ao micélio foi determinada baseado no método de Winkler e Stuckmann (1979) ($2,71 \pm 0,27$ U mg^{-1}).

Após, aplicou-se a ferramenta estatística da desejabilidade (FED), com a finalidade de maximizar a variável resposta (rendimento da reação %) analisando os resultados obtidos por Igarashi (2018). As condições sugeridas pela FED foram temperatura (T) de 45 °C; quantidade de micélio (QLLM) acima de 1 g e razão molar

ácido:álcool (RM) entre 1:1 e 1:2. Por isso, alguns experimentos foram realizados com a finalidade de validar as condições sugeridas pela FED (Tabela 1):

Tabela 1. Condições reacionais para otimização da síntese do oleato de etila catalisada por lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio.

Experimento	Temperatura (°C)	QML ⁽¹⁾	RM ⁽²⁾
1	45	1,0	1:2
2	40	1,0	1:2
3	40	1,6	1:2 (adição em 1 etapa)
4	40	1,6	1:2 (adição em 3 etapas)

⁽¹⁾QML: quantidade de micélio contendo lipases ligadas; ⁽²⁾RM: razão molar ácido álcool. Fonte: Autoria própria.

Para todos os casos, utilizou-se 10 mL de hexano, 120 rpm, 240 µL de ácido oleico, 90 µL de etanol (RM 1:2), para o experimento (4), adicionou-se 30 µL a cada 3 horas, iniciando no tempo zero. A cinética da reação foi acompanhada nos intervalos de tempo de 3, 6, 9, 12 e 24 h. As reações (triplicata) foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 100 µL e o rendimento em éster (%) foi realizado pelo método de Lowry-Tinsley (1976).

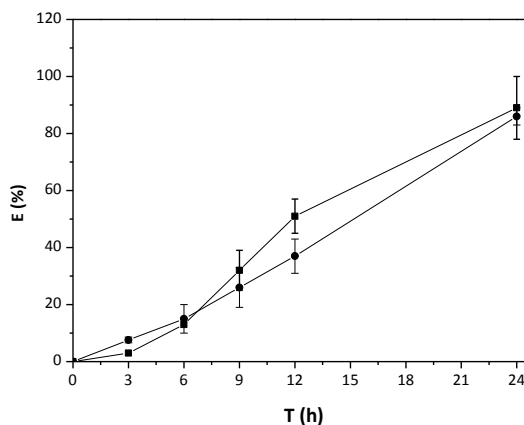
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de validar a ferramenta estatística de desejabilidade(FED), que indicou maximização do rendimento da esterificação para as condições: (T) de 45 °C, quantidade de micélio (QLLM) acima de 1 g e razão molar ácido:álcool (RM) entre 1:1 e 1:2, os resultados obtidos para o primeiro experimento (45°C, 1 g de QLLM e RM 1:2) podem ser observados na Figura 1. O rendimento da reação foi próximo a 90% (24 h), resultado semelhante ao obtido por Igarashi (2018) (90% de rendimento a 40 °C; 1 g de micélio e RM de 1:1), porém, a referida autora utilizou menor temperatura e RM. Em seguida, a temperatura foi alterada para 40 °C, e as demais condições foram mantidas (Figura 1). Neste caso, o rendimento em éster foi também próximo a 90%, ou seja, é possível diminuir a temperatura de 45 para 40 °C sem prejuízos no rendimento da reação.

O teste de desejabilidade sugeriu ainda que, quantidades de micélio superiores a 1 g poderia aumentar o rendimento da reação. Por isso, a quantidade de micélio foi aumentada de 1 g para 1,6 g (Experimento 3) (Figura 2).

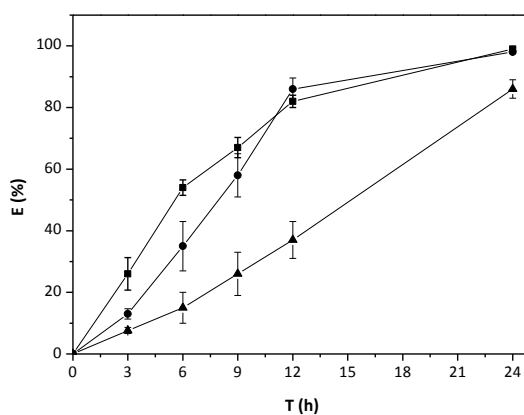
Outro fator importante estudado neste trabalho, está relacionado a utilização de etanol como reagente, sendo hidrofílico, pode favorecer a desnaturação da enzima devido à remoção da água de hidratação necessária para a manutenção da estrutura cataliticamente ativa (VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). A inativação da enzima pode ocorrer também por inibição competitiva, onde moléculas do álcool se ligam de forma reversível ao sítio ativo da enzima, diminuindo o acesso do substrato hidrofóbico (PEREZ et al., 2014). Para minimizar este inconveniente, o experimento 4 foi importante para avaliar a influência da adição do etanol em etapas.

Figura 1 – Cinética de esterificação entre ácido oleico e etanol empregando lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (●) 45 e (■) 40 °C. Condições: Razão molar ácido:álcool (1:2); 120 rpm; 1 g de micélio; 10 mL de hexano.



Fonte: Autoria própria.

Figura 2 – Cinética de esterificação entre ácido oleico e etanol empregando lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio (▲) 1 g de micélio; (●) 1,6 g de micélio e etanol adicionado em 3 etapas e (■) 1,6 g de micélio e etanol adicionado em 1 etapa. Condições: 40 °C; Razão molar ácido:álcool (1:2); 120 rpm; 10 mL de hexano.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados indicaram (Figura 2) que foi possível reduzir o tempo da reação à metade (12 h), mantendo o mesmo rendimento (90%) para as condições (3) e (4). Além disso, em 6 h de reação, a produção de éster foi aproximadamente 30% superior para a reação onde o etanol foi adicionado em etapas. Após este tempo, ambas reações (3) e (4) atingiram rendimento muito próximos a 100% em 24 h. Estes resultados indicam a importância do referido estudo e sugere que o rendimento de 100% possa ser atingido possivelmente em 15 h para a reação onde o etanol foi adicionado em etapas.

CONCLUSÃO

Lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligadas ao micélio, na reação de ácido oleico e etanol, demonstraram resultados próximos a 90% de rendimento, nas condições: 40 °C; Razão molar ácido:álcool (1:2) e quantidade de micélio 1,6 g.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser considerados promissores e contribuíram para o aproveitamento do micélio contendo lipases na área da biocatálise.

AGRADECIMENTOS

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

REFERÊNCIAS

BIROLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview . **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 481–510, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.001>. Acesso em: 30 jul. 2019.

CANELA-GARAYOA, R. et al. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.

DUARTE, J. G.; LEONE-IGNACIO, K.; DA SILVA, J.A.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. FREIRE, D.M.G. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**. v. 177, p. 123–129, 2016. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S001623611630014X?token=44A585F5E4E217D6D4659FE380B941C64FDEE9085D778C5B8E2DDA01B52018544C554A1D5AFD42DF5BD81767DE290843>. Acesso em: 5 ago. 2019.

IGARASHI, G. S. Biotransformação empregando lipases ligadas ao micélio. 2018. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2018.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MESSIAS, J. M. **Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008, 229 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008. Disponível em: <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp123462.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2019.

PEREZ, Victor H. et al. Biocatálise heterogênea em fase sólido/gás: princípios e aplicações. **Química Nova**, n. 2, 2014. Disponível em:

http://www.quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=21. Acesso em: 2 ago. 2019.

SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-13122010-162349/publico/13122010.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2019.

VERDASCO-MARTÍNA, C.M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. *Biochemical Engineering Journal*. v. 111, p. 75-86, 2016.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol*, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC218088/pdf/jbacter00283-0017.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2019.