



Reutilização de lipases ligadas ao micélio em reações de esterificação

Reuse of mycelium-bound lipases in esterification reactions

Camila Taynara Cardoso dos Santos*, Alessandra Machado Baron[†],
Milena Martins Andrade[‡], Patrícia Salomão Garcia[§]

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a possibilidade de reutilizações da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligada ao micélio, em reações de síntese do oleato de etila. A síntese foi realizada em condições otimizadas anteriormente (2 g de micélio contendo lipase, 40 °C, razão molar ácido carboxílico:álcool-1:1, 15 h e 95% de rendimento em éster). Em cada reutilização, o micélio contendo lipase foi lavado com 20 mL de *n*-hexano, seco em dessecador por 16 h e pesado. Este procedimento foi repetido por 8 vezes. As reutilizações foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 100 µL e o rendimento em éster (%) foi feito pelo método de Lowry-Tinsley (1975). Os resultados mostraram que houve decréscimo do rendimento em éster de aproximadamente 30% na primeira reutilização, porém entre a segunda e a quarta reutilização o rendimento em éster foi equivalente às condições otimizadas (95%). Em seguida, da quinta à sétima reutilização, o rendimento em éster foi próximo a 60% e na oitava o rendimento decresceu para 30%. A perda de massa do micélio contendo a lipase até a oitava reutilização foi 24,4%. Os resultados indicam a fácil recuperação do micélio contendo lipase de *B. ribis* e reutilização eficiente quando comparada a outros trabalhos.

Palavras-chave: biocatálise, esterificação, lipase, micélio, reutilização

ABSTRACT

The aim of this work was to study the possibility of reusing the lipase from *Botryosphaeria ribis* EC-01 bound to the mycelium in ethyl oleate synthesis reactions. Synthesis was performed under previously optimized conditions (2 g of mycelium containing lipase, 40 °C, molar ratio carboxylic acid: alcohol-1:1, 15 h and 95% yield in ester). At each reuse, the mycelium containing lipase was washed with 20 mL of *n*-hexane, dried in a desiccator for 16 h and weighed. This procedure was repeated 8 times. Reuses were monitored by removing 100 µL aliquots and the yield in ester (%) was done by the method of Lowry-Tinsley (1975). The results induced that there was a decrease in the yield in ester of approximately 30% in the first reuse, however between the second and the fourth reuse the yield in ester was equivalent to the optimized conditions (95%). Then, from the fifth to the seventh reuse, the ester yield was close to 60% and in the eighth the yield decreased to 30%. The loss of mass of the mycelium containing the lipase until the eighth reuse was 24.4%. The results indicate the easy recovery of the mycelium containing lipase from *B. ribis* and efficient reuse when compared to other works.

Keywords: biocatalysis, esterification, lipase, mycelium, reuse

1 INTRODUÇÃO

* Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; camila.taynara@hotmail.com

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana; alessandrab@utfpr.edu.br

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; milenaandradd@utfpr.edu.br

[§] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil; p.salomaogarcia@gmail.com



Com a função biológica de catálise, as lipases (EC 3.1.1.3) são empregadas em reações como, hidrólise de ésteres de ácidos graxos e reações de síntese realizadas *in vitro* como esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise), interesterificação e aminólise (DUARTE et al, 2016). Nos últimos anos, pesquisas envolvendo as reações de esterificação catalisadas por enzimas têm despertado atenção, sendo consequência da ascendência do uso de ésteres orgânicos nos setores industriais (TORRES, 2004), frisando que o rendimento do éster é influenciado por alguns fatores, por exemplo, concentrações da enzima e dos substratos, relação molar, valor de pH da reação (para meios bifásicos) e temperatura, taxas de mistura e teor de água (ZAKS, 1988).

As lipases podem ser obtidas por meio de tecidos animais e vegetais (SILVA, 2010) ou pela produção envolvendo o processo de fermentação submersa (FS) ou sólida (FES) de bactérias, fungos e leveduras. Possuindo destaque as fontes de obtenção provenientes dos microrganismos devido a estabilidade e facilidade de aquisição (CASTRO, 2004), assim como, no geral são produzidas através da FS, pela maior facilidade de controle do processo e maiores rendimentos. O subproduto dessa fermentação é a biomassa (micélio), com uso em fertilizantes, complemento de ração animal e biotransformação, caso tenha enzimas ligadas ao micélio (BIROLLI et al., 2015). A biotransformação designa as reações químicas catalisadas por microrganismos ou preparações derivadas da biomassa, realizadas em meio aquoso ou orgânico. No último meio citado, há possibilidade do uso de lipases em reações de síntese de ésteres. A estabilidade e possibilidade de reutilização do biocatalisador são parâmetros que interferem na viabilidade do processo (OGNJANOVIC; BEZBRADICA; KNEZEVIC-JUGOVIC, 2009).

A relevância na catálise enzimática está relacionada às vantagens que as enzimas possuem quando comparado aos catalisadores químicos, com aplicabilidade em variados setores e processos industriais (IGNÁCIO, 2013; CARVALHO, 2019). Contudo, aumentar o emprego industrial está relacionado à diminuição dos custos de produção (REINEHR et al., 2014). Neste sentido, a utilização da biomassa ou micélio contendo lipases, considerado um subproduto, vem ganhando destaque, por poderem ser utilizadas sem a necessidade de isolamento, purificação, imobilização e recuperação da enzima, reduzindo assim a perda da atividade enzimática pelo privilégio do uso direto, aumentando o interesse industrial por esse tipo de lipase, favorecendo a redução do custo global do processo (MAROTTI, 2016).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar a possibilidade de reutilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 ligada ao micélio para reações da síntese do oleato de etila.



2 MÉTODO

Após o cultivo do microrganismo e a produção das lipases (ANDRADE, 2013), as células (micélio) foram separadas por filtração e secas em liofilizador (SL-404, Solab). Em seguida, a síntese do oleato de etila foi realizada nas seguintes condições anteriormente otimizadas: 2 g do micélio contendo lipase, 10 mL de *n*-hexano, 240 µL de ácido oleico e 45 µL de etanol (Razão molar ácido: álcool 1:1); 120 rpm e 40°C durante 15 h. As reações foram acompanhadas retirando-se alíquotas de 100 µL e o rendimento em éster (%) foi feito pelo método de Lowry-Tinsley (1975).

Em cada reutilização, o biocatalisador foi separado do meio reacional por filtração, lavado com *n*-hexano e seco em dessecador por 16 h, 25°C.

Esse procedimento foi repetido por 8 vezes. Para cada reutilização, o micélio contendo a lipase foi pesado e o volume do solvente e dos reagentes da reação foram adaptados para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, devido às pequenas perdas do micélio no processo.

A primeira reutilização foi realizada em quintuplicata as demais em triplicata. Os resultados da síntese do oleato de etila foram analisados também através da análise estatística, para verificar diferenças significativas na análise do rendimento em éster. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (TUKEY, 1953).

A perda de massa do biocatalisador em cada reutilização foi avaliada através da pesagem em balança analítica (AUY220, Shimadzu).

3 RESULTADOS

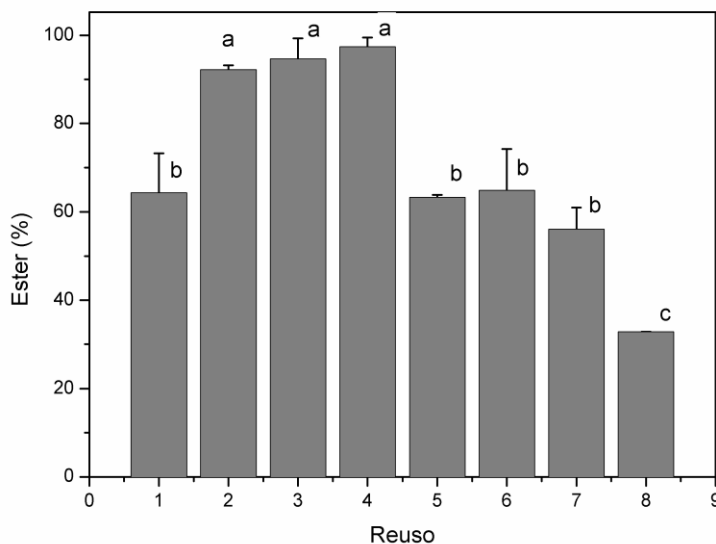
Os resultados obtidos (Figura 1) demonstraram que houve decréscimo do rendimento em éster de aproximadamente 30% na primeira reutilização ou reuso, porém entre a segunda e a quarta reutilização o rendimento em éster foi equivalente às condições otimizadas (95%). Como na primeira reutilização houve o referido decréscimo na atividade, o experimento, inicialmente realizado em triplicata, foi realizado em seguida em uma duplicata (totalizando 5 experimentos para a primeira reutilização) e os resultados foram muito próximos ($64 \pm 9\%$). Este resultado pode estar associado à variação da água de hidratação ao redor do biocatalisador, importante para a manutenção da atividade catalítica (RIOS et al., 2018). Em seguida, da quinta à sétima reutilização, o rendimento em éster foi próximo a 60% e na oitava o rendimento decresceu para 30%.

De acordo com a análise estatística (Tukey), observa-se que não há diferenças significativas entre a primeira, quinta, sexta e sétima reutilização do micélio contendo lipase na síntese do oleato de etila. Assim como para o grupo amostral da segunda à quarta reutilização também não há diferenças estatísticas significativas. A oitava reutilização é estatisticamente diferente de todas as anteriores.

A perda de massa do micélio contendo lipase foi de 24,4% na oitava reutilização, tendo uma média de 3,05% para cada reutilização.



Figura 1 – Reutilização da lipase ligada ao micélio na reação de esterificação em *n*-hexano. Condições: 2 g de lipase 10 mL *n*-hexano, 240 µL ácido oleico, 45 µL etanol (RM 1:1), 40°C, 15 h, 120 rpm. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%).



Fonte: Autoria própria (2021).

Em relação à reutilização de lipases ligadas ao micélio (ou células inteiras livres), há poucos relatos na literatura (Quadro 1).

Quadro 1 – Trabalhos que reportam a reutilização de lipases ligadas ao micélio.

Microrganismo	Tipo de reação	Condições	Resultados principais	Referências
<i>Aspergillus oryzae</i>	Esterificação	Síntese do acetato de cis-3-hexen-1-ilo: Ácido acético abaixo de 80 mM, 50 mM de cis-3-hexen-1-ol, 5 mL de <i>n</i> -heptano, 30 g/L de micélio, 70 °C, 24 h	98% (24 h) 60% na quinta reutilização	Kirdi et al. (2017)
<i>Serratia marcescens</i> (lipase clonada e expressa em <i>Escherichia coli</i>)	Transesterificação	2,0 g de gordura (oriunda de caixa de gordura), 160 mg de células liofilizadas, 100 µL de água, 98 µL de metanol, 30 °C, 72 h	97% (72 h) 74% na quarta reutilização	Li et al. (2012)
<i>Botryosphaeria ribis</i>	Esterificação	Síntese do oleato de etila: Ácido oléico 240 µL, 45 µL de etanol, 10 mL hexano, 40 °C, 2 g de micélio, 12 h	95% (15 h) 30% na oitava reutilização	Este trabalho

Fonte: Autoria própria (2021).



Por exemplo, lipases ligadas ao micélio de *Aspergillus oryzae*, Kirdi et al. (2017) foi utilizada na reação de esterificação do acetato de cis-3-hexen-1-ilo em *n*-heptano, obteve 98% (24h) de rendimento, nessas condições, o micélio de *A. oryzae* pode ser reciclado cinco vezes, sendo que a conversão foi de 86% após três reutilizações e 60% após cinco reutilizações. Li et al. (2012) utilizou células inteiras contendo lipase de *Serratia marcescens* com 97% (72 h) de rendimento na síntese do biodiesel, a capacidade de reutilização dos biocatalisadores foi de 74% da produtividade após 4 ciclos.

Apesar das diferenças em termos de condições reacionais, pode-se considerar que os resultados obtidos neste trabalho são promissores e inéditos no que diz respeito à reutilização de lipases ligadas ao micélio em reações de esterificação.

4 CONCLUSÃO

Os resultados indicam a fácil recuperação do biocatalisador e reutilização eficiente quando comparada a outros trabalhos. O micélio contendo lipase de *B. ribis* pôde ser utilizado para a reação de esterificação da segunda à quarta utilização sem queda no rendimento e atingiu 50% da sua atividade original após sete utilizações. Foi possível reutilizar as lipases de *B. ribis* ligadas ao micélio, observando queda de 50% após 7 reutilizações. A utilização do micélio evita a necessidade de etapas caras do processo como a recuperação da lipase e sua imobilização e, portanto, tem potencial para reduzir o custo da síntese do oleato de etila ou outros ésteres obtidos enzimaticamente.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR Campus Apucarana (LAMAP)- pela utilização do liofilizador (SL-404, Solab) e UV-vis (Cary 60, Agilent).

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. M. **Produção e imobilização da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01 e aplicações**. Tese de Doutorado em Química, Universidade Estadual de Londrina, 2013.
- BIROLLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 481–510, 2015.
- CARVALHO, Aparecida Selsiane Sousa. **Produção de lipases em cultivo submerso por bactéria termofílica utilizando resíduo e coprodutos agroindustriais**. 2019. 76 f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.
- CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.



- 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.
- IGNÁCIO, Eduardo Oliveira. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo**. 2013. 66 f. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2013.
- KIRDI, R. et al. Mycelium-bound lipase from *Aspergillus oryzae* as efficient biocatalyst for cis-3-hexen-1-yl acetate synthesis in organic solvent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 13-19, 2017.
- LI, A. et al. Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 725-729, 2012.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **J. Am. Oil Chem. Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.
- MAROTTI, B. S. **Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009.
- REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *aspergillus niger* e *aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, 454-460, 2014.
- RIOS, N. S., et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p.99-120, 2018.
- SILVA, T. A. C. **Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2010.
- TORRES S, CASTRO GR. Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. **Food Technol Biotechnol** 2004; 42:271–7.
- TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton, NJ: Mimeographs Princeton University, 1953.
- ZAKS A, KLIBANOV AM. The effect of water on enzyme action in organic media. **J Biol Chem** 1988; 263:8017–21.