

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Leito Fixo

Sabrini Natali da Silva Ávila¹, Elisa D'Avila Cavalcanti-Oliveira¹, Melissa Limoeiro Estrada Gutarra^{2,3} e Denise Maria Guimarães Freire¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química – Departamento de Bioquímica

²Universidade Federal do Rio de Janeiro - Escola de Química - Departamento de Engenharia Bioquímica

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro – Polo Xerém

RESUMO

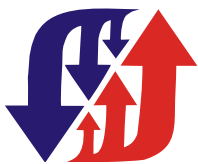
Lipases constituem um grupo de enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise de ligações ésteres, esterificação e transesterificação. Lipases comercialmente disponíveis apresentam um custo muito elevado, não favorável para muitas aplicações industriais, portanto o emprego de tecnologia de baixo custo, como a fermentação em estado sólido (FES), se faz necessária com intuito de obter um biocatalisador mais acessível a aplicações industriais. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo produzir lipase por fermentação em estado sólido utilizando biorreator de leito fixo. A produção de lipase foi avaliada nas diferentes alturas do biorreator de leito fixo. A produção de lipases com capacidade de síntese foi acompanhada por meio da reação de esterificação e, paralelamente, foi acompanhada a atividade hidrolítica. Neste trabalho, foi possível obter um biocatalisador de baixo custo com capacidade de 80% de conversão a ésteres etílicos em 8h de reação, com amostra fermentada por 48h em biorreator de leito fixo.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido, Lipase, *Rhizomucor miehei*, biorreator de leito fixo

INTRODUÇÃO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são hidrolases que interagem em interface orgânico aquosa, e catalisam reações como hidrólise de ligações ésteres bem como reações de esterificação e de transesterificação, com alta estabilidade e eficácia. Possuem propriedades quimo-, régio-, e/ enantiosseletivas, o que torna estas enzimas altamente específicas, favoráveis em certas aplicações de nível industrial (FREIRE & CASTILHO, 2008).

O interesse na utilização de lipases para a síntese de biodiesel é justificado pelo fato destas enzimas permitirem o emprego de matérias-primas de baixo custo (óleos e gorduras com qualquer teor de ácidos graxos livres e água) (NIELSEN et al., 2008 *apud* FREIRE et al., 2011). Entretanto, as lipases comercialmente disponíveis apresentam um preço muito elevado e por isso a busca de novos biocatalisadores, obtidos por tecnologia de baixo custo, como a fermentação em estado sólido (FES), se faz necessária. Como subproduto da extração de óleos vegetais, é gerado a torta, que pode ser utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de lipase por FES (SILVA et al., 2013). O emprego de biorreatores de leito fixo na produção de lipase por FES pode proporcionar um maior controle de parâmetros com temperatura e teor de umidade do leito e o aumento de produtividade em relação ao biorreator de bandeja.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Por isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipase de *Rhizomucor miehei* com capacidade de síntese de biodiesel por FES em biorreator de leito fixo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado, *Rhizomucor miehei*, pertence à coleção de micro-organismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da UFRJ e foi armazenada em tubo inclinado com meio de cultura PDA (Potato Dextrose Ágar), mantido a 4°C. A solução de esporos foi obtida de acordo com metodologia descrita por GUTARRA (2007).

Fermentação em Estado Sólido (FES)

As FESs foram realizadas utilizando 30g de torta de babaçu (tamanho de partícula inferior a 1,18 mm) inoculada com o micro-organismo *Rhizomucor miehei* (10^7 esporos/g de torta). As fermentações foram conduzidas em biorreatores de leito fixo com 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro, com temperatura igual a 35°C, umidade inicial da torta de 65% e vazão de ar igual a 0.3 L/min, nos tempos de fermentação de 24h até 96h. Ao final da fermentação, o leito fermentado foi separado em três partes iguais (topo, meio e base) e estas foram liofilizadas para serem analisadas.

Dosagem da atividade lipásica dos Preparados Enzimáticos Sólidos (PES)

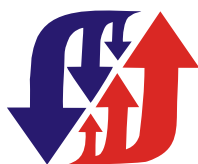
A determinação da atividade lipásica foi realizada pela reação de hidrólise, utilizando como substrato óleo de soja (5% m/v), emulsionado em tampão fosfato de sódio pH 7.0 (100mM) com goma arábica (5% m/v). O PES liofilizado (0.2 g) foi adicionado à emulsão (20 mL) e a reação foi incubada por 20 minutos a 35°C / 200 rpm. A reação foi interrompida com a adição de 20 mL da solução de acetona/etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos livres foram titulados com solução 0,04 mol.L de NaOH em titulador automático Mettler modelo DG20 até o pH 11. O branco reacional foi obtido adicionando o preparado enzimático após a adição de 20 mL da solução acetona/etanol.

Atividade de síntese de ésteres etílicos dos PES produzidos

Nas reações de esterificação, foi empregado como substratos ácido oleico (0,06 mols) e etanol (0,06 mols). A amostra liofilizada (10% m/m) foi adicionada e as reações foram conduzidas à 40°C sob agitação constante. Foram retiradas alíquotas no tempo de 6 horas e no final da reação, 24 horas. A capacidade de conversão a ésteres etílicos foi determinada através de titulação automática (Mettler modelo DG20).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi realizada a cinética de produção de lipase de *R. miehei* por FES no reator de leito fixo e foram analisadas tanto a atividade hidrolítica como a capacidade de síntese (pela reação de esterificação), em diferentes alturas do leito – topo, meio e base. Baseado no trabalho de CASTRO et al.(2015) que observou diferença significativa na produção de hidrolases de



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

acordo com a altura do leito, neste trabalho, ao realizar a cinética, foram analisadas diferentes alturas do leito – topo, meio e base – afim de verificar possíveis diferenças no perfil de produção de lipases.

O resultado da atividade hidrolítica dos PESs produzidos (Figura 1) mostrou que as amostras fermentadas no tempo de 48h atingiram o máximo de atividade e que, após esse período, esta estabilizou. Não foi observada diferença na produção de lipase nas diferentes alturas do biorreator de leito fixo.

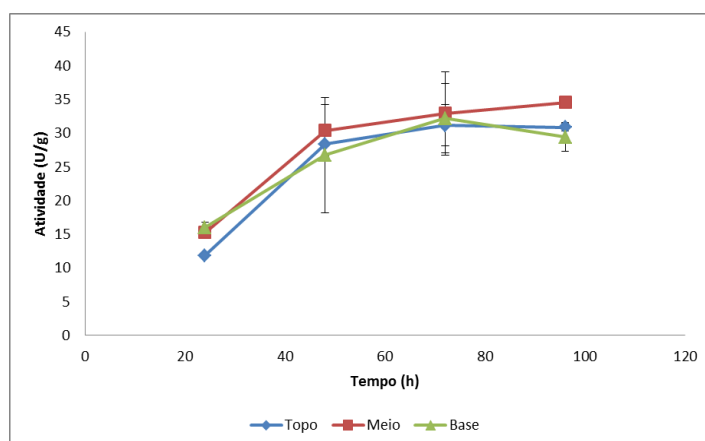


Figura 1: Atividade hidrolítica do PES produzido em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min, nas três alturas da coluna – Topo, Meio e Base, nos tempos de 24h até 96h.

Com o intuito de avaliar a produção de lipases com capacidade de síntese de biodiesel, foram realizadas reações de esterificação catalisadas pelo PES. O teor dos ésteres etílicos produzidos foi avaliado nos tempos de 6 e 24h de reação (Figura 2).

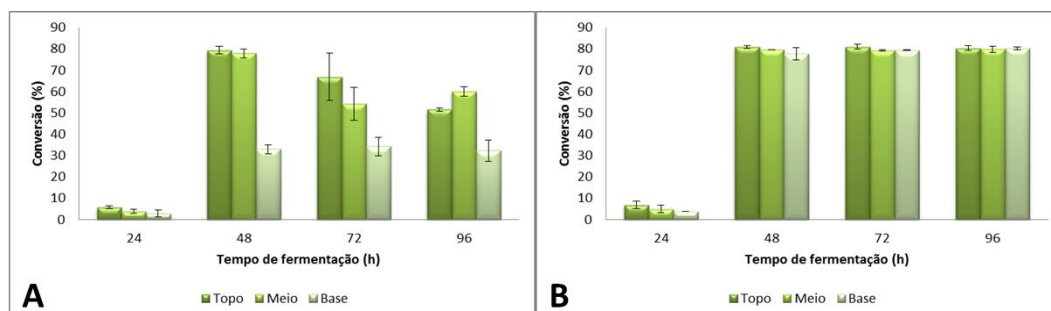
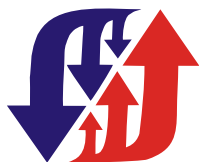


Figura 2: Produção de lipase com capacidade de síntese por FES em leito fixo realizada à 35°C, com umidade inicial de 65% e vazão de ar igual à 0,3 L/min. Tempo de reação de esterificação de 6h (A) e 24h (B), avaliando três alturas da coluna de leito fixo - Topo, Meio e Base.

No tempo de 6h de reação, a conversão máxima obtida foi de 80%, para as amostras de topo e meio do biorreator da fermentação de 48h. Este resultado apresentou-se promissor quando comparado ao trabalho de AGUIEIRAS et al. (2014), que utiliza como biocatalisador para síntese de biodiesel PES de babaçu com *Rhizomucor Miehei* fermentado em biorreator do tipo bandeja que apresenta o máximo de produção de ésteres etílicos por reação de esterificação igual à 40% em 8h de reação.

No tempo de reação de esterificação de 6 h, foi possível observar diferença na produção de lipase com capacidade de síntese nas diferentes alturas do biorreator. Na amostra



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

fermentada em 48h, o topo e o meio do biorreator atingiram os 80% de conversão, enquanto a amostra referente a base do biorreator atingiu o máximo de 40% de conversão. Para os outros tempos de fermentação, as amostras referentes a base também apresentaram resultado inferior quando comparado as amostras do topo e do meio.

No tempo de 24h de reação, foi observado que na amostra fermentada à 48h, todas as alturas do leito – topo, meio e base – atingiram o máximo de conversão de 80% que se manteve até a fermentação de 96h, nos mostrando que o máximo de conversão deste novo biocatalisador, sem otimização da reação de esterificação foi de 80% de conversão à ésteres etílicos.

CONCLUSÃO

A partir da tecnologia de baixo custo de FES, foi possível obter um biocatalisador de baixo custo com alta capacidade de síntese de biodiesel empregando resíduo industrial como matéria- prima e fungo filamentoso, em reator de leito fixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIEIRAS, E. C. G., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D., CASTRO, A. M., LANGONE, M. A. P., & FREIRE, D. M. G. (2014). Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel*, 135, 315–321.

CASTRO, A. M., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G. (2015). Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. *Biochemical Engineering Journal* 93 (2015) 303–308

FREIRE, D. M. G., SOUSA, J. S., & CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.. (2011). Biotechnological methods to produce biodiesel. In: Pandey A., Larroche C., Ricke S.C, Dussap C-G., Gnansounou E., *Biofuels*, Ed. Academic Press, p. 315–337.

FREIRE, D. M. G., & CASTILHO, L. D. R. (2008). Lipases em biocatálise. In: Bon, E.P.S., Ferrara, M.A., CORVO, M. L., *Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicação E Mercado*, Ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 369–385.

GUTARRA, M.L.E. Produção de lípase pelo fungo *Penicillium simplicissimum*: Caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 156pp. 2007.

SILVA, C. A. D. A., LACERDA, M. P. F., LEITE, R. S. R., & FONSECA, G. G. (2013). Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16.