

Fungo filamentososo CANA175: produção e caracterização bioquímica de enzimas lipolíticas

Débora Lo Sciuto¹, Pedro Alves Martins², Thaís Demarchi Mendes³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Félix Gonçalves de Siqueira⁵, Dasciana de Sousa Rodrigues⁶

Resumo

O fungo filamentososo CANA175 (FF-CANA175) foi cultivado em estado sólido por 7 dias a 30 °C em quatro diferentes substratos: torta de dendê (TD), torta de palmiste (TP), borra do decantador de óleo de dendê (BD) e farelo de trigo (FT). Atividade de lipase, avaliada pelo método de hidrólise do palmitato de ρ -nitrofenila (ρ NPP), foi observada nos extratos brutos de FF-CANA175 provenientes dos cultivos em farelo de trigo (102,4 U/gSS) e torta de palmiste (25,7 U/gSS). A atividade de lipase apresentou os melhores resultados a 40 °C e pH 9,0. Os íons metálicos (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) e EDTA na concentração de 10 mmol/L não apresentaram efeitos significativos sobre a atividade lipolítica. Testou-se o extrato bruto liofilizado de FF-CANA175 em reações de transesterificação de óleo de soja com álcool etílico (razão molar 1:3), entretanto não houve conversão durante o tempo de reação de 168 h.

Introdução

Os frutos de dendê são utilizados na produção de dois tipos de óleo: óleo de dendê (extraído do mesocarpo do fruto) e óleo de palmiste (da amêndoa), ambos apresentam amplo emprego alimentar e industrial. Em contrapartida, elevada quantidade de resíduos é gerada nas agroindústrias de dendê, tais como: cachos vazios, fibra de prensagem do mesocarpo (torta de dendê), casca que recobre a amêndoa, fibra da prensagem da amêndoa (torta de palmiste), cinzas da queima das fibras, borra do decantador de óleo de dendê e o efluente líquido (POME, do

¹ Bióloga, mestre em Biologia Microbiana, bolsista DTI-B, LPB, debora.sciuto@colaborador.embrapa.br

² Biólogo, mestre em Biologia Molecular, bolsista DTI-B, LPB, pedro.alves@colaborador.embrapa.br

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁴ Farmacêutica, doutora em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁶ Química Industrial, doutora em Engenharia Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, dasciana.rodrigues@embrapa.br

inglês: *Palm Oil Mill Effluent*). A utilização desses subprodutos como substrato para o cultivo de microrganismos capazes de produzir enzimas e biomoléculas de interesse industrial pode agregar valor a esses resíduos lignocelulósicos e efluentes.

As enzimas lipolíticas podem ser classificadas em três principais grupos com base na especificidade pelo substrato: lipases (EC 3.1.1.3), esterases (EC 3.1.1.1) e fosfolipases (EC 3.1.1.4). As lipases catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis (TAG) de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) em ácidos graxos livres e glicerol; em contrapartida, as esterases atuam sob acilgliceróis de cadeia curta (TIRAWONGSAROJ et al., 2008). Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como a esterificação, transesterificação e interesterificação, sendo a atividade de água (a_w) do meio reacional um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise ou da síntese. As enzimas lipolíticas são produzidas por vegetais, animais e diversos microrganismos, sendo os fungos amplamente utilizados em decorrência da produção de enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas do meio de cultivo (MESSIAS et al., 2011).

As lipases microbianas apresentam grande potencial biotecnológico por diversas razões: 1) são estáveis em solventes orgânicos; 2) não requerem cofatores; 3) possuem ampla especificidade por substrato; 4) apresentam elevada enantiosseletividade; 5) atuam em ampla faixa de temperatura e pH. Por conseguinte, são utilizadas em diversas indústrias, como alimentícia, têxtil, farmacêutica, polpa e papel, detergentes, entre outras (HASAN et al., 2006). Em virtude dessa variedade de aplicações, a prospecção de lipases com características específicas, mais eficientes e estáveis continua sendo uma importante linha de pesquisa. Dessa forma, FF-CANA175 foi cultivado em quatro diferentes substratos: torta de dendê (TD), torta de palmiste (TP), borra do decantador de óleo de dendê (BD) e farelo de trigo (FT), visando à produção e caracterização bioquímica de enzimas lipolíticas.

Materiais e métodos

Fermentação em estado sólido e atividades lipolíticas

O FF-CANA175, pertencente à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorefinarias, da Embrapa Agroenergia, foi cultivado a 30 °C por 7 dias em estado sólido nos substratos: TD, FT, TP e BD, umedecidos

com tampão fosfato de sódio 100 mmol/L pH 7, de forma a apresentarem teor de umidade de aproximadamente 60%.

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela adição de 5 mL de solução B por grama de sólido seco fermentado (solução B: goma arábica 0,11% (m/m) e triton X100 0,44% (m/m) em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7). As amostras foram homogeneizadas a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 60 minutos e, então, centrifugadas (4 °C/10.000 rpm/10 minutos). Os sobrenadantes obtidos, denominados extratos brutos, foram utilizados para determinação da atividade lipolítica pelo método colorimétrico de hidrólise do palmitato de ρ -nitrofenila (ρ NPP) (KRIEGER, 1995). O ensaio enzimático padrão foi realizado em meio aquoso a 40 °C pH 8,0. As atividades lipolíticas foram expressas em U/g de substrato seco (U/gSS), em que U foi definido como a quantidade de ρ -nitrofenol, em μ mol, liberada por minuto.

Caracterização enzimática

Foram avaliados os efeitos da temperatura, pH e íons metálicos na atividade de lipase presente nos extratos brutos de FF-CANA175 oriundos dos cultivos em farelo de trigo (eb-FT) e torta de palmiste (eb-TP). Dessa forma, ensaios enzimáticos foram realizados em um intervalo de temperatura de 30 °C a 60 °C ($\Delta = 5^\circ\text{C}$) em pH 8,0. O efeito do pH foi aferido na faixa entre 4,0 e 11,0 ($\Delta = 1,0$) a 40 °C, sendo utilizado tampão universal 0,12 mol/L.

O efeito de íons metálicos (Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Zn^{2+}) e EDTA sobre a atividade de lipase foi avaliado pela pré-incubação dos extratos brutos por 20 minutos na presença desses compostos em concentração final de 10 mmol/L. Como controle, substituiu-se o volume dos reagentes por água milli-Q. A termoestabilidade da lipase foi averiguada incubando-se alíquotas dos extratos brutos nas temperaturas de 30 °C e 40 °C por 24 h e 4 h, respectivamente. A atividade lipolítica residual foi quantificada pelo método colorimétrico padrão (ρ NPP) e expressa como atividade percentual em relação ao controle.

Ademais, foi avaliada atividade enzimática pelo método titulométrico sobre tributirina, trioleína e três diferentes óleos: de oliva, pinhão-manso e dendê; emulsificados com goma arábica (3% m/v) em tampão tris-HCl 2,5 mmol/L pH 7,0 contendo NaCl 150 mmol/L. Nesse método, a atividade enzimática é percebida pela titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima na hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão. Para cada ensaio, são

incubados 20 mL de substrato e 1 mL de extrato enzimático em um vaso de reação com temperatura controlada (37 °C) e com agitação magnética, por 5 minutos.

Reações de transesterificação enzimática e cromatografia em camada delgada (CCD)

A dosagem de proteínas presentes nos extratos brutos de FF-CANA175 foi realizada pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando *Kit Protein Assay* (Sigma-Aldrich Inc.) e albumina sérica bovina como padrão. Após a determinação da concentração proteica de cada extrato enzimático, alíquotas apresentando 20 mg de proteína total foram congeladas com nitrogênio líquido e submetidas ao processo de liofilização.

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se 2 mmol de óleo de soja e 6 mmol de álcool etílico (previamente seco com sulfato de sódio anidro) em *n*-heptano, totalizando 5 mL de meio reacional. Os extratos previamente liofilizados foram, então, adicionados ao meio; a reação foi mantida em agitador orbital a 120 rpm e 37 °C por 7 dias. O controle positivo foi realizado pela adição de 20 mg de lipase comercial de *Pseudomonas cepacia* e, para o controle negativo, não foi adicionada enzima. Foram coletadas alíquotas do meio reacional após 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 144 h e 168 h de reação.

A avaliação qualitativa dos produtos de transesterificação foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizada como fase móvel uma solução de hexano:éter etílico:ácido acético (70:29:1); a placa de sílica gel foi revelada com iodo ressublimado. Ácido oleico, biodiesel e óleo de soja foram utilizados como padrões.

Resultados e discussão

A maior atividade de lipase (102,4 U/gSS), determinada pela hidrólise de ρ NPP, foi obtida quando utilizado o farelo de trigo como substrato do cultivo. O extrato bruto de FF-CANA175, proveniente do cultivo em torta de palmiste, apresentou atividade lipolítica de 25,7 U/gSS. Em contrapartida, não foi observada atividade de lipase no extrato enzimático oriundo da fermentação em torta e borra de dendê.

O efeito da temperatura, pH, íons metálicos e EDTA na atividade lipolítica dos extratos brutos de FF-CANA175 está representado na Figura 1.

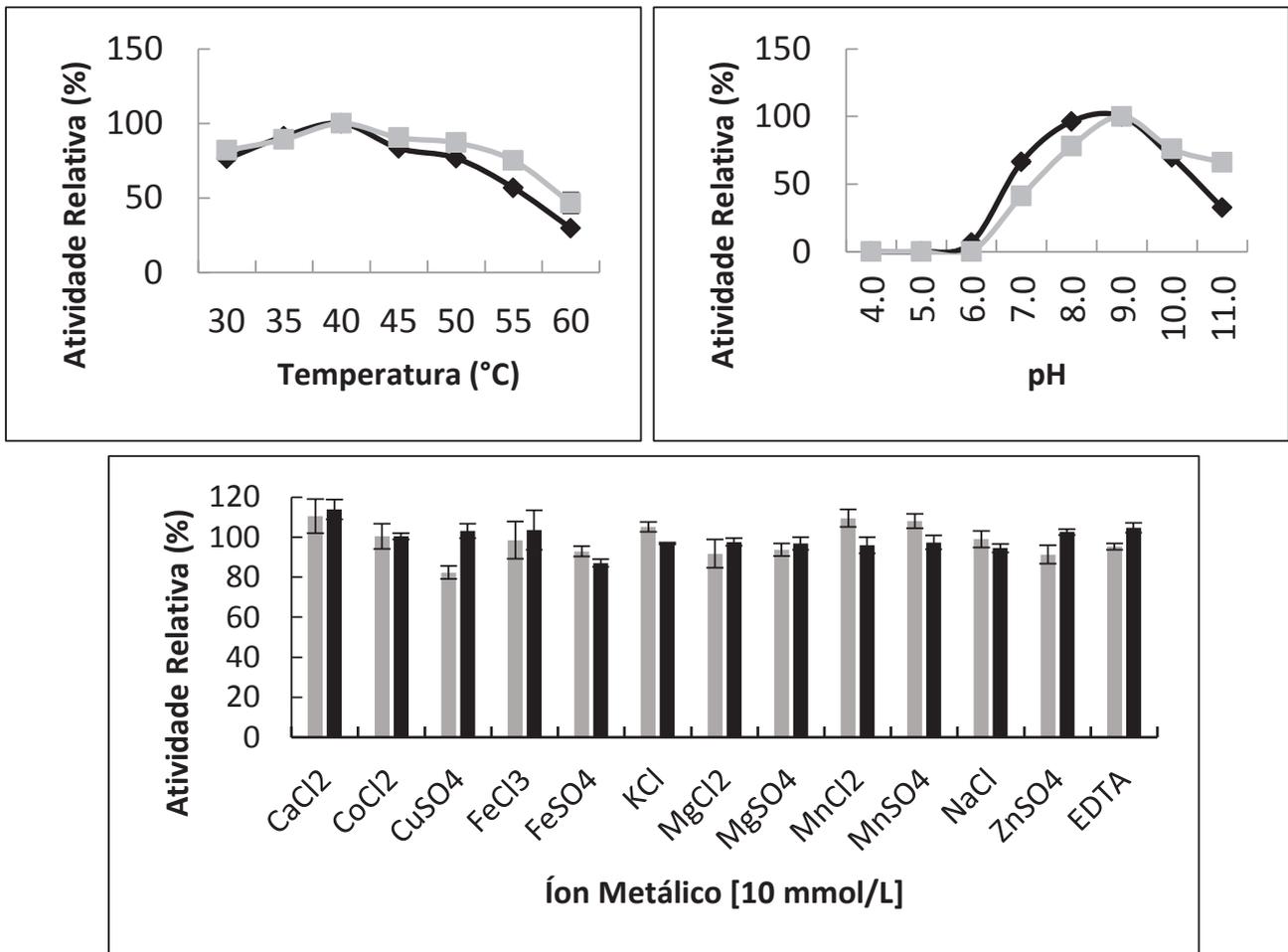


Figura 1. Efeito da temperatura, pH, íons metálicos e EDTA na atividade de lipase presente no extrato bruto de FF-CANA175 cultivado em farelo de trigo (eb-FT) (◆) e torta palmiste (eb-TP) (■).

Observa-se que a maior atividade enzimática foi obtida a 40 °C e pH 9,0 em ambos os extratos brutos averiguados (eb-FT e eb-TP). Foi mantida, pelo menos, 75% da atividade máxima na faixa de temperatura entre 30 °C e 55 °C em eb-TP, enquanto a lipase presente em eb-FT manteve mais de 65% da atividade no intervalo de pH entre 7,0 e 10,0. Enzimas que atuam em uma ampla faixa de temperatura e pH apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica; lipases termoestáveis e que atuam em pH alcalino possuem vasto emprego nas indústrias de detergente e de couro, por exemplo (HASAN et al., 2006).

De forma geral, a atividade lipolítica apresentou variações pequenas (abaixo de 20%) quando acrescidos os íons metálicos avaliados; Cu²⁺, por exemplo, exibiu o maior efeito inibitório, causando decréscimo de 18% na atividade da enzima em eb-TP. Ademais, pode-se inferir que a atividade dessa enzima não depende da

presença de íons metálicos, visto que o agente quelante EDTA não apresentou efeito inibitório na atividade lipásica nas amostras analisadas. As atividades lipolíticas residuais presentes nos extratos brutos eb-FT e eb-TP mantiveram, respectivamente, 48,3% e 65,5% da atividade original após 24 h de incubação a 30 °C; e 47,6% e 59,3% após 4 h a 40 °C.

A determinação da atividade enzimática pelo método titulométrico sobre tributirina, trioleína, óleos de oliva, de pinhão-manso e de dendê mostrou que os extratos brutos eb-FT e eb-TP apresentaram atividade sobre tributirina: 48,5 U/gSS e 18,2 U/gSS, respectivamente. Os demais substratos não foram hidrolisados por nenhum dos extratos enzimáticos utilizados, inferindo-se que a enzima somente foi capaz de atuar sobre triacilglicerol de cadeia curta.

As reações de transesterificação enzimática de óleo de soja e álcool etílico (razão molar 1:3), catalisadas pelas lipases presentes no extrato bruto liofilizado de FF-CANA175, foram avaliadas qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD). Não foi observada síntese de biodiesel durante avaliação por 168 h de reação (Figura 2).

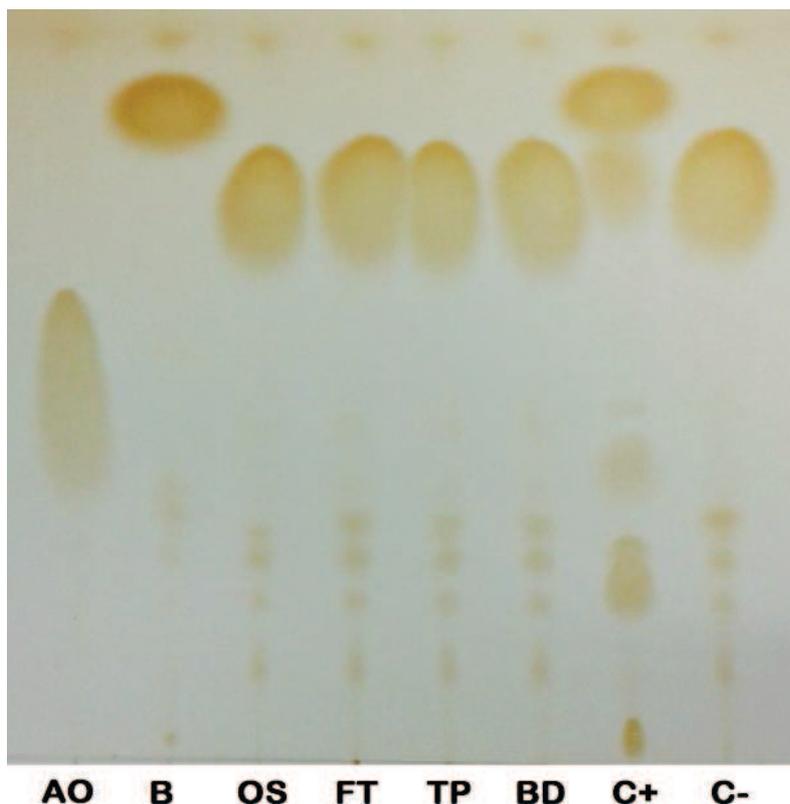


Figura 2. Placa de CCD mostrando os produtos após 168 h da reação de transesterificação enzimática utilizando extrato bruto liofilizado de FF-CANA175 cultivado em farelo de trigo (FT), torta de palmiste (TP) e borra de dendê (BD). AO: ácido oleico; B: biodiesel; OS: óleo de soja; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

Conclusões

Farelo de trigo foi o substrato que induziu maior produção de lipase por FF-CANA175, porém a enzima presente no extrato bruto proveniente do cultivo em torta de palmiste foi mais termoestável a 30 °C e 40 °C. Embora tenha apresentado atividade sob palmitato de *p*-nitrofenila, a lipase foi capaz de catalisar apenas a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia curta (tributirina).

Apoio financeiro

Este trabalho foi financiado com recursos do Projeto DendePalm (Finep).

Referências

- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAMA, T.; CHAMPREDAA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 42-49, 2008.