

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**Christian Oliveira Reinehr^a, Juliana Rizzardi^a, Marcell Fernandes Silva^a, Débora de Oliveira^a, Helen Treichel^b e Luciane Maria Colla^{*c}**^aUniversidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Av. Sete de Setembro, 1621, 99700-000 Erechim – RS, Brasil^bUniversidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Erechim, Av. Dom João Hoffmann, 313, 99700-000 Erechim – RS, Brasil^cUniversidade de Passo Fundo, BR 285, Bairro São José, 99052-900 Passo Fundo – RS, Brasil

Recebido em 11/07/2013; aceito em 14/11/2013; publicado na web em 10/02/2014

PRODUCTION OF LIPASES WITH *Aspergillus niger* AND *Aspergillus fumigatus* THROUGH SOLID STATE FERMENTATION: EVALUATION OF SUBSTRATE SPECIFICITY AND USE IN ESTERIFICATION AND ALCOHOLYSIS REACTIONS. Filamentous fungi were cultured under solid state fermentation of soybean residues to produce lipases. Enzymes produced by *Aspergillus niger* esterified oleic and butyric acids in the presence of ethanol, while enzymes produced by *Aspergillus fumigatus* demonstrated no esterification activity toward lauric acid. In case of *A. niger*, direct lyophilization of fermented bran led to higher esterification activity. The esterification of oleic acid by enzymes of *A. fumigatus* was neither influenced by pH adjustment nor by the extraction process. Conversions to ethyl esters were higher after pH adjustment with lyophilized liquid extract of *A. niger*.

Keywords: lipase; specificity; esterification.

INTRODUÇÃO

O mercado industrial de aplicação de enzimas continua a crescer devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, ao uso da engenharia genética durante a produção e à emergência de novos campos de aplicação.¹ Dentre as enzimas, as lipases são muito utilizadas. Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água.^{2,3}

Lipases são aplicáveis a diversos setores, como as indústrias de tecidos, detergentes, polpa e papel, gorduras, óleos, tratamento de efluentes, polímeros biodegradáveis, fármacos, testes de diagnóstico, cosméticos, chás, aplicações médicas, biossensores, couro, alimentos e biodiesel, como revisado por Singh e Mukhopadhyay,⁴ Kapoor e Gupta⁵ e anteriormente por Contesini *et al.*⁶ e Hasan *et al.*⁷

Alguns exemplos podem ser observados nos trabalhos conduzidos por Dors *et al.*,⁸ no tratamento de efluentes da indústria de aves; Bai *et al.*⁹ e Chakraborty *et al.*¹⁰ na produção de lipídios desenhados; Macario e Giordano¹¹ na comparação entre biocatalisadores e catalisadores inorgânicos para a produção de biodiesel; Thakur *et al.*¹² e Radzi *et al.*¹³ na síntese de aromas utilizando lipases; Pilissão *et al.*¹⁴ na imobilização de lipases e uso sob irradiação por micro-ondas; Silva *et al.*¹⁵ na imobilização de lipases por adsorção em Celite.

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade.¹⁶ De acordo com Shukla e Gupta,¹⁷ as lipases fúngicas são preferidas em comparação às bacterianas por atuarem em faixas mais amplas de processo, além de serem geralmente produzidas no meio extracelular. A maior utilização industrial dessas enzimas, entretanto, está condicionada à diminuição dos custos de produção. Estratégias para este fim incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização de meios de cultivo de baixo

custo. Neste sentido, o uso da fermentação em estado sólido para a produção de lipases fúngicas é apropriado, já que utiliza resíduos agroindustriais na composição dos meios de cultivo.^{18,19}

Lipases provenientes de distintas fontes microbianas normalmente apresentam uma ampla faixa de propriedades dependentes da fonte produtora, relacionada ainda com a especificidade posicional, especificidade ao substrato, estabilidade em solventes orgânicos, termoestabilidade, pH ótimo, entre outros.²⁰

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo a seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação, além do estudo das condições de produção, a determinação da especificidade por diferentes substratos e a aplicação dos extratos enzimáticos liofilizados como catalisadores em reações de síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos.

PARTE EXPERIMENTAL**Microrganismos e preparo do inóculo**

Foram utilizados 16 fungos filamentosos isolados por Colla *et al.*,²¹ sendo 1 proveniente do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo (*Aspergillus fumigatus*), 5 oriundos de solo contaminado com óleo diesel e 10 oriundos de efluente de laticínios, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

Dos isolados estudados, o microrganismo que apresentou os melhores resultados nas etapas posteriores foi submetido à identificação genética utilizando a metodologia citada por Smaniotto *et al.*,²² no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose (ABD) inclinado, sendo realizada a repicagem das cepas a cada três meses. Para o preparo do inóculo foram adicionados 10 mL de solução de Tween 80 (0,1%) aos tubos de ensaio com ágar, realizando-se a raspagem dos esporos com alça de platina. O inóculo foi preparado adicionando-se 2,5 mL da suspensão

*e-mail: lmcolla@upf.br

de esporos obtida em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de ABD, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico na superfície do ágar adicionaram-se 50 mL de Tween 80 (0,1%), seguido de uma raspagem dos esporos e filtração em gaze estéril para retenção das hifas.

Produção de lipases com atividade de esterificação e avaliação da especificidade por substrato

Os microrganismos mencionados foram utilizados para a seleção de fungos produtores de lipases com atividade de esterificação, uma vez que em estudos anteriores apresentaram-se bons produtores de lipases com atividade de hidrólise.²¹ Foram utilizadas nas fermentações em estado sólido as condições de cultivo estudadas por Colla *et al.*,²³ com pequenas modificações. O meio de cultivo utilizado na etapa de seleção de microrganismos foi preparado a partir da mistura de 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja. 25 g da mistura foram adicionados em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. O meio de cultivo foi autoclavado a 121 °C por 20 min, com posterior ajuste do pH do meio em 4,5 através da adição de uma solução de H₂SO₄ 1,5 mol/L. A umidade foi ajustada para 60% com água destilada estéril. Aos meios adicionaram-se 2% de óleo de soja como indutor para a produção de lipases. A inoculação foi realizada com a adição de 1 mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de esporos de 10⁷ esporos/g de substrato. Os experimentos foram incubados em estufa a 30 °C, sendo realizada a coleta das amostras para a determinação das atividades de esterificação nos tempos inicial e após 4 dias de fermentação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para a segunda etapa foram selecionadas as cepas que apresentaram maior atividade enzimática. Realizou-se a modificação do meio de produção de lipases, utilizando-se 80% de farelo de soja e 20% de casca de soja, 65% de umidade final e adição de óleo de soja e ureia como indutor e fonte de nitrogênio, respectivamente, na concentração de 1%. Essas modificações foram realizadas com base em estudos conduzidos por Rizzardi.²⁴

A partir desta composição de meio foram realizados novos ensaios, com a finalidade de avaliar: a influência do ajuste de pH do meio na produção de lipases, a necessidade da extração das enzimas do farelo fermentado anteriormente à liofilização e a especificidade das lipases produzidas frente a diferentes ácidos graxos (butírico, láurico e oléico), utilizados como substrato na reação de esterificação. As enzimas foram testadas utilizando o processo convencional (extração seguida de liofilização) e realizando-se a liofilização direta do farelo fermentado, a fim de propor-se uma etapa a menos no processo de *downstream* da enzima. Um planejamento fatorial misto 2².3¹ foi conduzido para cada cepa fúngica selecionada na primeira etapa, conforme apresentado na Tabela 1.

Determinação da atividade de esterificação

Os farelos fermentados foram adicionados de tampão fosfato de sódio 0,100 mol/L e pH 7,0 na razão 1:5 (10 g de meio fermentado para 50 mL de tampão) e incubados em banho termostático a 35 °C por 20 min e agitação de 160 rpm. Após a incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se funil de tecido de nylon e pressão manual para a obtenção do extrato enzimático bruto.²⁵ Como fase preparatória do procedimento de liofilização, os extratos enzimáticos brutos foram distribuídos em camadas de 1 cm de espessura em placas de Petri e submetidos ao congelamento em liofilizador a -80 °C por 24 h.²⁶ As amostras secas foram acondicionadas em frascos de vidro, lacrados, codificados e vedados com Parafilm, sendo armazenadas sob refrigeração (4 °C).

A atividade de esterificação foi quantificada através da reação entre ácido graxo e etanol na razão molar de 1:1 (mistura padrão).²⁷ A reação foi conduzida em erlenmeyers contendo 5 mL da mistura padrão e 0,1 g do farelo fermentado liofilizado (FFL) ou do extrato líquido liofilizado (ELL), após foram incubados em banho a 40 °C por 40 min e agitação de 160 rpm. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e para extração do ácido graxo. Após, a quantidade de ácido graxo consumido foi determinada através da titulação com NaOH 0,035 mol/L até atingir o pH 11,0. Os ensaios controles continham 20 mL da solução de acetona-etanol (1:1) e 500 µL da mistura padrão.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo por minuto e calculada utilizando a Equação 1.

$$AE = \left[\frac{(V_b - V_a) \times M \times V_f \times 1000}{t \times m \times V_c} \right] \quad (1)$$

onde: AE = atividade de esterificação (U/g); V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL); V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra do ensaio controle (mL); M = concentração molar da solução de NaOH (mol/L); V_f = volume final de meio reacional (mL); t = tempo (min); m = massa do extrato enzimático bruto liofilizado (g); V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Uso das enzimas em reação de alcoólise de óleo vegetal

As enzimas obtidas nas condições determinadas anteriormente foram utilizadas para a reação de esterificação de óleo vegetal. O óleo de soja refinado (Bunge) foi escolhido como substrato a ser utilizado na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico (Merck, 99% de pureza) e n-hexano PA (Merck, 99% de pureza) foram utilizados nos experimentos como substrato e solvente orgânico, respectivamente.²⁸

Para a reação de alcoólise foram utilizados 1 g de óleo de soja, 40 mL de solvente (n-hexano), 150 mg de etanol (razão molar óleo-álcool de 1:3) e 250 mg de extrato enzimático liofilizado ou farelo fermentado liofilizado. Os erlenmeyers contendo os reagentes foram colocados em agitador rotativo (*shaker*) a 200 rpm por 8 h, após, as amostras foram filtradas em papel filtro e levadas a evaporação do solvente em estufa na temperatura de 65 °C.

Para a determinação da conversão da reação transferiram-se 250 µL da amostra para balão volumétrico de 10 mL completando o volume com n-heptano. Após, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL, a fim de obter uma concentração próxima a 1000 mg/L e adicionaram-se 50 µL de padrão interno (heptadecanoato de metila), obtendo-se uma concentração de 250 mg/L, utilizando como solvente n-heptano.

Esta solução (1 µL) foi injetada em duplicata em um cromatógrafo gasoso (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010), com detector de ionização de chama equipado com injetor automático AOC-20i e uma coluna capilar RTX-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120 °C, permanecendo por 1 min nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15 °C/min até 180 °C, permanecendo assim por 2 min, e aumentando novamente a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C permanecendo 2 min nesta condição. Ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gases de arraste e a temperatura do injetor e detector foram de 250 °C e a taxa de split de 1:50.

As amostras referentes a cada experimento foram preparadas em triplicata conforme descrito anteriormente. Utilizou-se a mesma

metodologia de preparo das amostras para análise descrita por Silva.²⁹ As adaptações, em relação ao método oficial,³⁰ foram testadas com base na amostra de biodiesel etílico de soja obtido pelo método de catálise alcalina utilizando hidróxido de sódio como catalisador, em condições de reação otimizadas por Faccio.²⁸ O cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra foi obtido através da Equação 2 com base no método.

$$\text{Conversão (\%)} = \left[\frac{\Sigma A - API}{API} \times \frac{CPI}{C_{\text{amostra}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

onde: ΣA = Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14:0 a C24:0) e do padrão interno (C17:0 – heptadecanoato de metila); API = Área do padrão interno (C17:0); CPI = Concentração do padrão interno na amostra injetada (mg/L); C_{amostra} = Concentração da amostra injetada (mg/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de microrganismos produtores de lipases com atividade de esterificação

Dos 5 fungos isolados de solo contaminado com óleo diesel apenas a cepa O-4 apresentou atividade de esterificação (reação entre ácido graxo e etanol), de $364,58 \pm 0,30$ U/g. Os fungos isolados de efluente da indústria de laticínios não produziram lipases com atividade de esterificação, enquanto que o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou atividade de esterificação de $182,92 \pm 0,47$ U/g.

As sequências de bases nitrogenadas da cepa O-4 foram comparadas aos dados (18S rRNA) obtidos no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A cepa foi identificada como *Aspergillus niger* cepa DAOM (100% de identidade, código de acesso no *GenBank*: KC545858.1).

Colla *et al.*²¹ estudaram a seleção de fungos filamentosos (a partir de efluente de laticínios e solo contaminado com óleo diesel) produtores de lipases com atividade hidrolítica através de fermentação em estado sólido. O fungo *Aspergillus niger* (O-4) foi um dos melhores microrganismos produtores de lipases com atividade hidrolítica, com máxima atividade lipolítica de 45,49 U/g. No presente estudo observou-se que o fungo *Aspergillus niger* (O-4) também foi o

microrganismo que se apresentou como o melhor produtor de lipase com atividade de esterificação.

Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido citados como produtores de lipases.²⁰ Entre as cepas de *Aspergillus* estudadas neste trabalho o *Aspergillus niger* tem sido estudado para a produção de lipases com mais frequência que o *Aspergillus fumigatus*. O estudo de lipases produzidas por *Aspergillus fumigatus* é mais recente, sendo citado como produtor de lipases por Brooks e Asamudo,³¹ Rajan e Nair³² e Krikstaponis *et al.*³³

A partir dos ensaios de seleção dos microrganismos potenciais foi realizada a modificação do meio do cultivo em virtude de no processo de seleção terem sido utilizadas condições de cultivo previamente otimizadas para a produção de lipases com atividade de hidrólise.²¹ Rizzardi²⁰ obteve resultados significativos de atividade enzimática para as condições de 65% de umidade, proporção farelo:casca de 80:20 e adição de 1% de óleo de soja e ureia, sendo estas condições de cultivo, portanto, utilizadas na sequência dos experimentos.

Avaliação da especificidade por diferentes ácidos graxos

A Tabela 1 apresenta as atividades de esterificação das enzimas produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* (O-4) e *Aspergillus fumigatus* em 96 h de fermentação, nos planejamentos fatoriais utilizados para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, do método de extração da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação. Os experimentos realizados sem ajuste de pH apresentaram valor igual a 6,2.

As enzimas produzidas a partir do *Aspergillus niger* (O-4) (Tabela 1) apresentaram atividade frente aos ácidos oléico (C18:1) e butírico (C4:0) na presença de etanol, não apresentando atividade com a utilização do ácido láurico (C12:0). As enzimas produzidas pelo *Aspergillus fumigatus* não apresentaram atividades de esterificação frente ao ácido láurico, assim como as enzimas produzidas pelo *Aspergillus niger* (O-4), apresentando atividade frente ao ácido de cadeia curta somente no experimento 1, realizado sem o ajuste do pH do meio de cultivo para 4,5 e utilizando o farelo fermentado liofilizado sem a etapa de extração como fonte de enzimas.

A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus niger* demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste

Tabela 1. Planejamento Fatorial misto 2².3¹ utilizado para avaliar a influência do ajuste de pH do meio de cultivo, a forma de obtenção da enzima e do ácido graxo utilizado na reação de esterificação sobre a atividade de esterificação das lipases produzidas para os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	AE (U/g)*	
				<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
1	Sem	FFL	Butírico	661,43 ± 15,93 ^d	410,75 ± 25,88 ^b
2	Com	FFL	Butírico	125,47 ± 16,73 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a
3	Sem	ELL	Butírico	514,19 ± 52,29 ^{cd}	0,00 ± 0,00 ^a
4	Com	ELL	Butírico	78,04 ± 24,53 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^a
5	Sem	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
6	Com	FFL	Láurico	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
7	Sem	ELL	Láurico	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
8	Com	ELL	Láurico	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
9	Sem	FFL	Oléico	451,50 ± 0,00 ^c	374,55 ± 0,00 ^b
10	Com	FFL	Oléico	185,52 ± 56,09 ^b	395,43 ± 8,41 ^b
11	Sem	ELL	Oléico	450,59 ± 17,46 ^c	374,88 ± 7,97 ^b
12	Com	ELL	Oléico	119,39 ± 59,69 ^{ab}	375,48 ± 12,65 ^b

X₁: ajuste de pH a 4,5; X₂: forma de obtenção da enzima; X₃: ácido graxo; AE: atividade de esterificação; FFL: farelo fermentado liofilizado; ELL: extrato líquido liofilizado. *Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

de pH, forma de extração e ácido graxo) foi significativa ($p < 0,0001$), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 1 que o ajuste do pH do meio de cultivo ocasionou diminuição na atividade frente ao ácido butírico e frente ao ácido oléico. A liofilização direta do farelo fermentado e o uso deste na reação de esterificação permitiu maiores atividades de esterificação frente aos ácidos butírico e oléico, significativamente ($p < 0,05$) diferentes dos valores de atividade obtidos com o pH do meio ajustado a 4,5 (Tabela 1). A atividade de esterificação obtida para o ácido butírico (661,43 U/g) foi significativamente superior ($p = 0,0099$) à obtida para o ácido oléico (451,50 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste de pH.

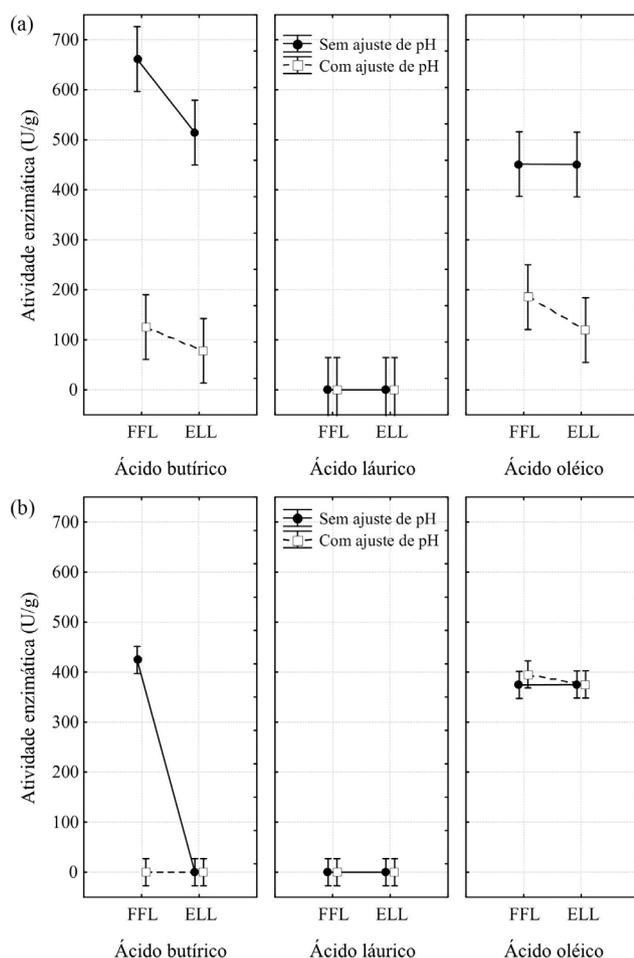


Figura 1. Atividade enzimática das enzimas liofilizadas produzidas por (a) *Aspergillus niger* e (b) *Aspergillus fumigatus*, em condições de produção com pH do meio de cultivo ajustado ou não e a partir de diferentes formas de obtenção da enzima liofilizada (FFL: farelo fermentado liofilizado, ELL: extrato líquido liofilizado)

A análise de variância dos resultados para o fungo *Aspergillus fumigatus* também demonstrou que a interação dos três fatores estudados (ajuste de pH, forma de extração e ácido graxo) foi significativa ($p < 0,0001$), devendo ser analisada. Verifica-se na Figura 1 que utilizando o ácido butírico como substrato na reação de esterificação, somente foi observada atividade (410,75 U/g) na condição de cultivo sem o ajuste do pH do meio de cultivo e utilizando-se o farelo fermentado liofilizado diretamente na reação, sem a etapa prévia de extração da enzima, sendo esse resultado semelhante ($p > 0,05$) aos obtidos com a utilização do ácido oléico como substrato, independente das condições de cultivo utilizadas (atividades em torno de 380 U/g).

As enzimas produzidas pelos dois fungos apresentaram comportamento semelhante em relação à especificidade pelos ácidos graxos, ou seja, a especificidade em ordem decrescente foi para o ácido oléico (C18:1) > ácido butírico (C4:0) > ácido láurico (C12:0). Considera-se que ao justificarem-se estes resultados deva-se levar em consideração o tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e a presença da insaturação. Neste sentido verifica-se a maior afinidade das enzimas pelo ácido graxo de cadeia longa. No entanto, este efeito pode estar sendo influenciado pela presença da insaturação do ácido oléico. No estudo da influência da dupla ligação (comparando os rendimentos do C18:0 e C18:1), Bezbradica *et al.*,³⁴ utilizando a lipase produzida pela *Candida rugosa* em meio reacional com 2,2,4 trimetilpentano, em condições equimolares dos substratos (álcool utilizado: 3-metil-butanol), verificaram que a síntese do éster de ácido graxo foi duas vezes mais rápida, demonstrando uma afinidade maior dessa lipase por ácidos graxos insaturados, cuja solubilidade é maior em comparação com ácidos graxos saturados. No entanto, deve-se considerar que a solubilidade dos ácidos graxos é também dependente do número de carbonos das moléculas, sendo que quanto menor o comprimento da cadeia, maior a sua solubilidade em água.

Em estudo realizado por Sun *et al.*³⁵ a não linearidade da especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica foi demonstrada em resultados obtidos somente com ácidos graxos saturados. A lipase utilizada foi produzida por *Rhizopus chinensis* em fermentação em estado sólido e o sistema reacional consistiu na utilização de n-heptano, ácidos e álcoois em concentrações de 0,6 mol/L. Os ácidos graxos utilizados foram de C4:0 a C16:0 e os álcoois primários do metanol ao 1-octanol. Os resultados obtidos para os ésteres etílicos formados indicaram maior afinidade da enzima pelos ácidos graxos na seguinte ordem, considerando-se as conversões no tempo final de reação: Caprilato (C8:0) > Laurato (C12:0) > Miristato (C14:0) > Palmítico (C16:0) > Caprato (C10:0) > Caproato (C6:0). Verifica-se, no entanto, que nesse estudo o ácido láurico foi o que apresentou a segunda maior atividade, utilizando como aceptor de elétrons o mesmo álcool deste trabalho (etanol).

Resultado semelhante ao anterior em relação à especificidade pelos ácidos graxos foi obtido por Vaidya *et al.*,³⁶ os quais relataram estudo de especificidade utilizando enzimas comerciais imobilizadas. A enzima de *Candida antarctica* imobilizada em resina de acrilato apresentou melhores resultados de atividade específica quando o ácido graxo utilizado foi o ácido láurico, o que foi explicado pela resistência da difusão de substratos de cadeia longa na estrutura mais rígida das enzimas imobilizadas.

Bezbradica *et al.*³⁴ mencionam que vários fatores podem influenciar na afinidade por ácidos graxos de cadeia curta e longa, como os relacionados à termodinâmica da reação, visto que a formação do éster, obtida após a clivagem do complexo acil-enzima pelo etanol, pode apresentar uma conversão baixa, ou ainda pela premissa de que as lipases possuem regiões hidrofílicas (para ácidos graxos de cadeia curta, com até 6 átomos de carbono) e hidrofóbicas (para ácidos graxos de cadeia longa, com mais de 6 átomos de carbono) ao redor do sítio catalítico.

Segundo Zaidi *et al.*,³⁷ Naik *et al.*³⁸ e Pleiss *et al.*³⁹ cada lipase pode ter um comportamento diferenciado. A especificidade enzimática está relacionada com o caráter eletrofílico do carbono na molécula doadora de acila, da acidez, do efeito estérico, da proporção dos substratos e da hidrofobicidade do grupo carboxílico. Assim, a fonte de lipases, o método de imobilização, a natureza do solvente e as propriedades dos substratos podem explicar, segundo os autores, as tendências conflitantes encontradas na literatura para os estudos de especificidade.

Silva *et al.*,²⁷ em estudo da especificidade em termos de atividade de esterificação das enzimas produzidas por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido, relataram que o ácido oléico

(em combinação com o etanol) apresentou melhores resultados do que com o uso de outros álcoois (metanol, propanol e butanol), enquanto que o ácido butírico apresentou maiores atividades com etanol e butanol. O ácido láurico, por sua vez, apresentou melhores resultados quando do uso do butanol como álcool na reação de esterificação.²⁹ Verifica-se desta forma que as baixas atividades de esterificação obtidas neste trabalho, quando utilizado o ácido láurico, podem estar relacionadas ao uso do etanol.

Além disso, outro fator que pode justificar as maiores atividades de esterificação obtidas com o ácido oléico é a possível preferência da enzima por ácidos graxos semelhantes aos presentes nos substratos de produção, como é o caso deste trabalho, no qual o óleo de soja foi utilizado como indutor para a síntese de enzimas. Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.*²⁷ e Rigo *et al.*⁴⁰

Alcoólise de óleo vegetal

A Tabela 2 apresenta as conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* (O-4) e *Aspergillus fumigatus*. A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido no experimento que apresentou a maior conversão em ésteres etílicos. Pode-se observar que o primeiro pico apresentado (tempo de retenção de 4,4 min) corresponde ao padrão interno (C17:0) e ao ácido esteárico (C18:0), enquanto que os picos seguintes são relativos aos ácidos oléico (C18:1, tempo de retenção de 5,1 min), linoléico (C18:2, tempo de retenção de 8,0 min) e linolênico (C18:3, tempo de retenção de 9,0 min).

Tabela 2. Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de soja com hexano como solvente orgânico para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*

Experimento	Condições de produção da enzima		Microrganismo	Conversão (%) [*]
	pH do meio	Obtenção da enzima		
1	Sem ajuste	FFL	<i>Aspergillus niger</i>	0,75 ± 0,008 ^a
2	Com ajuste	FFL		1,76 ± 0,012 ^c
3	Sem ajuste	ELL	ELL	2,04 ± 0,004 ^d
4	Com ajuste	ELL		5,32 ± 0,001 ^h
5	Sem ajuste	FFL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,19 ± 0,001 ^e
6	Com ajuste	FFL		2,55 ± 0,007 ^g
7	Sem ajuste	ELL	ELL	1,57 ± 0,005 ^b
8	Com ajuste	ELL		2,28 ± 0,001 ^f

FFL: farelo fermentado liofilizado; ELL: extrato líquido liofilizado. ^{*}Resultados de média ± desvio-padrão. Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa entre si através do teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

Segundo Froehner *et al.*⁴¹ a composição média do óleo refinado de soja apresenta 12,4% de C16:0, 3,7% de C18:0, 27,0% de C18:1; 50,3% de C18:2 e 10,6% de C18:3. Observou-se que houve maior formação de éster do ácido oléico, apesar do óleo original apresentar maior concentração de ácido linoléico. A maior produção de ésteres etílicos de C18:1 e de C18:3 ao invés de ésteres de C18:2 provocou uma menor taxa de conversão, evidenciando uma maior especificidade das enzimas produzidas no processo fermentativo por este ácido graxo insaturado, conforme resultados obtidos na etapa anterior do trabalho.

Em um trabalho realizado por Ferrari *et al.*,⁴² utilizando catalisador alcalino, obteve-se a formação de ésteres etílicos para produção de biodiesel de soja com a seguinte composição: 11,3% de C16:0,

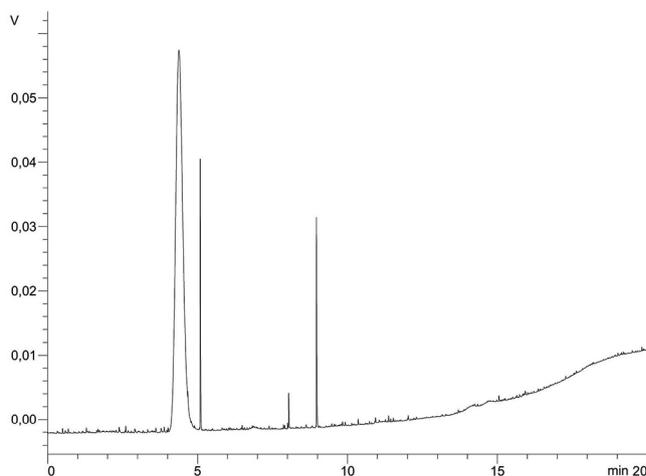


Figura 2. Cromatograma com a identificação dos ésteres etílicos produzidos a partir do experimento 4, utilizando o extrato líquido liofilizado obtido com o fungo *Aspergillus niger* no cultivo sem ajuste de pH

3,5% de C18:0, 22,5% de C18:1, 54,6% de C18:2 e 8,1% de C18:3, apresentando uma composição compatível com o óleo utilizado. Embora o rendimento médio desse processo tenha sido de 57,3%, o uso de catalisadores químicos pode provocar problemas de corrosão e formação de produtos de saponificação quando há ácidos graxos livres, o que não ocorre utilizando catalisadores enzimáticos.

A análise de variância dos resultados de conversão em ésteres etílicos de ácidos graxos demonstrou que todos os fatores foram significativos sobre as conversões ($p < 0,0001$), sendo que a Figura 3 apresenta o gráfico de interação das médias obtidas.

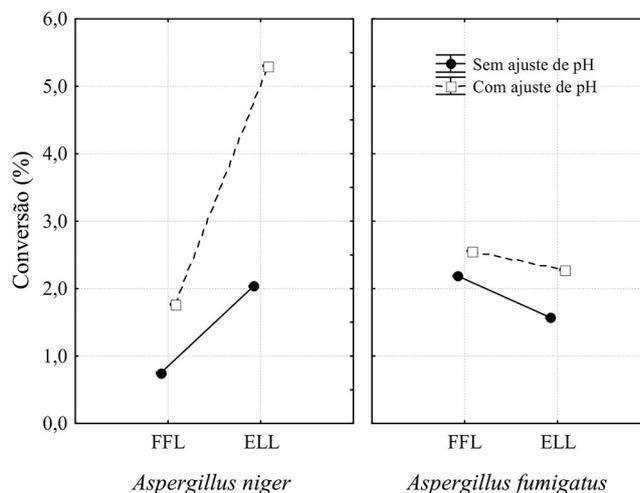


Figura 3. Conversões em ésteres etílicos de ácidos graxos obtidas a partir das lipases produzidas em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* (FFL: farelo fermentado liofilizado, ELL: extrato líquido liofilizado)

As conversões obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com ajuste de pH. Maiores conversões foram obtidas utilizando o extrato líquido liofilizado para o fungo *Aspergillus niger* (O-4) e utilizando o farelo fermentado liofilizado (sem a extração da enzima em meio líquido) para o *Aspergillus fumigatus*.

As conversões em ésteres etílicos foram inferiores às obtidas por outros autores, como Aguiéiras *et al.*⁴³ e Skoronski *et al.*,⁴⁴ os quais obtiveram rendimentos superiores a 90% com enzimas comerciais ou

imobilizadas, respectivamente. Os resultados deste trabalho podem ser atribuídos à utilização das condições de alcoólise otimizadas por Faccio²⁴ para a enzima comercial (Novozym 435). Melhores resultados podem ser obtidos fazendo-se ajustes nesta metodologia, como: aumentar a quantidade de enzima, tipo de triacilglicerol, tempo de reação e solvente. A razão molar óleo:álcool é uma das variáveis mais importantes que afetam o rendimento de ésteres de ácidos graxos. Kusdiana e Saka⁴⁵ sugerem que razões molares mais altas de óleo:álcool resultem em uma reação de transesterificação mais eficiente, devido ao aumento da área de contato entre álcool e triacilgliceróis.

As conversões obtidas por Silva *et al.*²⁷ foram de 15,6%, para uma enzima precipitada obtida a partir da torta de babaçu por *Penicillium brevicompactum*, e 6,5% para uma enzima precipitada a partir de farelo de mamona por *Penicillium brevicompactum*. A purificação da enzima por precipitação, bem como a imobilização das enzimas em alginato de sódio e carvão ativado, podem ter contribuído para as maiores conversões. Dessa forma, para ocorrer um aumento nas conversões das enzimas utilizadas neste trabalho, podem-se empregar métodos como precipitação ou imobilização, os quais podem preservar a atividade da enzima. Diferentes sistemas reacionais também podem ser testados visando ao aumento da conversão do processo.

Predabom⁴⁶ realizou a alcoólise enzimática de diferentes óleos vegetais utilizando lipase de *Penicillium brevicompactum* fermentada em diferentes misturas de farelo. As maiores conversões foram obtidas na amostra de extrato utilizando a mistura de farelo de arroz e casca de arroz (2,88%) e na amostra de extrato da mistura de farelo de soja e casca de soja (2,48%), ambas utilizando óleo de oliva como substrato para a alcoólise. As conversões obtidas neste trabalho foram semelhantes.

Apesar das taxas de conversão obtidas neste trabalho não terem sido tão altas, deve-se salientar que as enzimas não sofreram processos avançados de purificação e/ou imobilização, indicando que é possível otimizar as condições de operação para que a utilização dessas enzimas produzidas por fungos com resíduos agroindustriais possa ser aplicada em processos biotecnológicos, como na produção de biodiesel.

CONCLUSÃO

Dos 16 fungos inicialmente testados, apenas dois (*Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*) apresentaram atividade de esterificação (364,58 U/g e 182,92 U/g, respectivamente).

As enzimas produzidas pelo *A. niger* apresentaram atividade de esterificação frente aos ácidos oléico e butírico na presença de etanol, enquanto que as enzimas produzidas pelo *A. fumigatus* não apresentaram atividade de esterificação frente ao ácido láurico. Em relação à ordem de especificidade, esta foi maior para o ácido oléico, seguido do ácido butírico e do ácido láurico. Para o *A. niger* a liofilização direta do farelo fermentado trouxe aumento na atividade de esterificação, enquanto que para o *A. fumigatus* a atividade frente ao ácido oléico não foi influenciada pelo ajuste de pH nem pelo processo de extração da enzima.

As conversões em ésteres etílicos obtidas pelas enzimas produzidas pelos fungos foram maiores realizando-se a produção da enzima em meio de cultivo com ajuste de pH. Maiores conversões (5,3%) foram obtidas utilizando o extrato líquido liofilizado para o fungo *Aspergillus niger*.

O uso de resíduos agroindustriais para produção de lipases por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido deve ser incentivado, podendo ter suas condições de processo aprimoradas, a fim de viabilizar a utilização das enzimas em aplicações industriais específicas para cada área.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Professora S. M. Tsai pela identificação dos fungos e à FAPERGS, CAPES, URI e UPF pelo auxílio e bolsa concedidos.

REFERÊNCIAS

- Iyer, P. V.; Ananthanarayan, L.; *Process Biochem.* **2008**, *43*, 1019.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Benerjee, U. C.; *Biotechnol. Adv.* **2001**, *19*, 627.
- Wang, D.; Xu, Y.; Tianyu, S.; *Biochem. Eng. J.* **2008**, *41*, 30.
- Singh, A. K.; Mukhopadhyay, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 486.
- Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555.
- Contesini, F. J.; Lopes, D. B.; Macedo, G. A.; Nascimento, M. G.; Carvalho, P. O.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 163.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 235.
- Dors, G.; Mendes, A. A.; Pereira, E. B.; Castro, H. F.; Furigo Jr., A.; *Appl. Water Sci.* **2013**, *3*, 343.
- Bai, S.; Aziz, S.; Khodadadi, M.; Mitri, C. B.; St-Louis, R.; Kermasha, S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90*, 377.
- Chakraborty, K.; Vijayagopal, P.; Chakraborty, R. D.; Vijayan, K. K.; *Food Chem.* **2010**, *120*, 433.
- Macario, A.; Giordano, G.; *Catal. Lett.* **2013**, *143*, 159.
- Thakur, A.; Kumar, A.; Kanwar, S. S.; *Current Biotechnology* **2012**, *1*, 234.
- Radzi, S. M.; Mustafa, W. A. F.; Othman, S. S.; Noor, H. M.; *World Academy of Science, Engineering and Technology* **2011**, *59*, 677.
- Pilissão, C.; Carvalho, P. O.; Nascimento, M. G.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 1688.
- Silva, V. C. F.; Contesini, F. J.; Carvalho, P. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 1468.
- Nagarajan, S.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 1163.
- Shukla, P.; Gupta, P.; *J. Appl. Sci. Environ. Sanitation* **2007**, *2*, 35.
- Couto, S. R.; Sanromán, M. A.; *J. Food Eng.* **2006**, *76*, 291.
- Pandey, A.; *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 81.
- Treichel, H.; Oliveira, D.; Mazutti, M. A.; Di Luccio, M.; Oliveira, V. J.; *Food Bioprocess Technol.* **2010**, *3*, 182.
- Colla, L. M.; Rezzadori, K.; Câmara, S. K.; Debon, J.; Tibolla, M.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Z. Naturforsch., C: J Biosci.* **2009**, *64*, 131.
- Smaniotta, A.; Skovronski, A.; Rigo, E.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L.; Di Luccio, M.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D.; Treichel, H.; *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 1490.
- Colla, L. M.; Rizzardi, J.; Pinto, M. H.; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V.; *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8308.
- Rizzardi, J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2012.
- Vargas, G. D. L. P.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Beneti, S. C.; Freire, D. M. G.; Di Luccio, M.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 47.
- Persson, M.; Mladenoska, I.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 833.
- Silva, M. F.; Freire, D. M. G.; Castro, A. M.; Di Luccio, M.; Mazutti, M. A.; Oliveira, J. V.; Treichel, H.; Oliveira, D.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2011**, *34*, 145.
- Faccio, C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2004.
- Silva, M. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2010.
- European Standard EN 14103:2011. Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. Brussels, 2011.

31. Brooks, A. A.; Asamudo, N. U.; *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* **2011**, *3*, 311.
32. Rajan, A.; Nair, A. J.; *Turk. J. Biol.* **2011**, *35*, 569.
33. Krikstaponis, A.; Lugauskas, A.; Krysinska-Traczyk, E.; Prazmo, Z.; Dutkiewicz, J.; *Ann. Agric. Environ. Med.* **2001**, *8*, 227.
34. Bezbradica, D.; Karalazic, I.; Ognjanovic, N.; Mijin, D.; Siler-Marinkovic, S.; Knezevic, Z.; *J. Serb. Chem. Soc.* **2006**, *71*, 31.
35. Sun, S. Y.; Xu, Y.; Wang, D.; *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 2607.
36. Vaidya, A.; Gera, G.; Ramakrishna, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2987.
37. Zaidi, A.; Gainer, J. L.; Carta, G.; Mrani, A.; Kadiri, T.; Belarbi, Y.; Mir, A.; *J. Biotechnol.* **2002**, *93*, 209.
38. Naik, S.; Basu, A.; Saikia, R.; Madan, B.; Paul, P.; Chatterjee, R.; Brask, J.; Svendsen, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 18.
39. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.; *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *93*, 67.
40. Rigo, E.; Ninow, J. L.; Tsai, S. M.; Durrer, A.; Foltran, L. L.; Remonato, D.; Sychoski, M.; Vardanega, R.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Di Luccio, M.; *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 1592.
41. Froehner, S.; Leithold, J.; Lima Jr., L. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 2016.
42. Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 19.
43. Aguiéiras, E. C. G.; Souza, S. L.; Langone, M. A. P.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 646.
44. Skoronski, E.; João, J. J.; Cechinel, M. A. P.; Fernandes, M.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 364.
45. Kusdiana, D.; Saka, S.; *J. Chem. Eng. Jpn.* **2001**, *34*, 383.
46. Predabon, S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2011.