DOI: 10.20396/revpibic2720193003

XXVII Congresso de Iniciação Científica Unicamp
16 a 18 de outubro de 2019 - Campinas | Brasil

Descoberta de uma nova enzima lipolítica capaz de hidrolizar óleo de macaúba com alta acidez

Melque N. P. da Silva*, Letícia L. Rade, Claudia M. de Souza, Ricardo R. Melo, Natalia Milan, Leticia M. Zanphorlin

Resumo

Neste trabalho, uma nova lipase (ReLip) recombinante do fungo Rasamsonia Emersonii foi expressa em plataforma microbiana e sua termoestabilidade foi avaliada em diversas condições de pH e na presença de solventes orgânicos. Avaliou-se também a atividade da enzima em diversos óleos vegetais. Uma vez que a ReLip apresentou maior atividade no óleo de macaúba, uma planejamento composto central foi realizado usando este óleo, a fim de avaliar a influência da concentração enzimática e do tempo de reação sobre o grau de hidrólise. Os resultados demonstraram que a enzima possui alta termoestabilidade em condições ácidas de pH e na presença dos solventes testados. Além disso, no planejamento experimental com óleo de macaúba, a enzima atingiu grau de hidrólise satisfatório. Tais resultados evidenciam seu potencial na produção de hidrocarbonetos renováveis.

Palavras-chave: *Lipase recombinante, biocombustíveis, macaúba.*

Introdução

Devido à crescente preocupação ambiental, a produção de biocombustíveis tem ganhado notoriedade. As lipases catalisam a hidrólise de triglicerídeos e vêm ganhando destaque por poderem atuar na cadeia de produção de biocombustíveis. Nesse sentido, a hidrólise de óleos vegetais seguida de descarboxilação e hidrogenação surge como uma nova rota para a produção de hidrocarbonetos renováveis, precursores dos biocombustíveis *drop-in*[1]. Este trabalho objetiva expressar em plataforma microbiana uma nova lipase recombinante (ReLip) do fungo *Rasamsonia Emersonii*, avaliar sua temperatura de desnaturação (T_m) em diversas condições de pH e na presença de solventes, bem como avaliar a atividade hidrolítica em óleos vegetais.

Resultados e Discussão

A lipase (ReLip) foi expressa em células de *E. coli* (pRARE II) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e exclusão molecular. A enzima foi submetida a análises de dicroísmo circular (CD). Conforme apresentado na Tabela 1, a ReLip apresentou alta termoestabilidade em condições ácidas e na presença dos solventes testados, característica pouco comum a lipases. A atividade hidrolítica da ReLip em óleos vegetais (5% m/m em emulsão) também foi estudada em pH 4,0 e 60 ºC. Conforme apresentado na Tabela 2, a maior atividade da enzima foi observada no óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata*), provavelmente em razão da elevada acidez desse óleo, já que a ReLip apresentou maior termoestabilidade e pH ótimo em condições ácidas. Desse modo, um planejamento central composto (PCC) foi executado a fim de avaliar a influência da concentração de enzima (C) e do tempo reacional (t) sobre o grau de hidrólise (GH) do óleo da polpa de macaúba, a 35 ºC e pH 4,0. Os resultados do planejamento experimental demostraram que o grau de hidrólise variou de 39% a 80%, sendo este obtido com concentração de 1,69 mg/mL e 13,8 h. Observou-se também que o tempo reacional possui maior efeito sobre o grau de hidrólise, seguido do termo quadrático da concentração de enzima e, por fim, da concentração de enzima. Utilizando análise canônica, o ponto ótimo de 3,0 mg/mL e 14,1 h foi sugerido, com GH predito de 84%. Experimentalmente, um GH de 81,5% e hidrolisado com 92% de ácidos graxos foram obtidos, mostrando que a lipase possui desempenho semelhante a lipases vegetais e comerciais[2,3].

Tabela 1. Temperatura de desnaturação proteica da ReLip em diversas condições.

Condição	T_m (ºC)	Condição	T_m (ºC)
pH 3,5	76,7±0,2	etanol 30%*	63,8±0,2
pH 4,0	79,2±0,2	etanol 40%*	61,2±1,2
pH 4,5	84,1±0,3	etanol 50%*	57,9±0,6
pH 5,0	82,7±1,2	etanol 60%*	56,2±0,3
pH 5,5	75,7±0,5	metanol 30%*	68,1±0,5
pH 6,0	72,8±0,4	metanol 40%*	62,5±0,2
pH 6,5	74,2±0,3	metanol 50%*	58,4±0,3
pH 7,4	67,6±1,1	metanol 60%*	53,8±0,8

*Testes realizados em pH 4,5.

Tabela 2. Atividade da ReLip em óleos vegetais

Óleo vegetal	A (U/g de lipase)	Óleo vegetal	A (U/g de lipase)
Soja	544±51	Oliva	811±51
Canola	531±78	Palma	615±26
Girassol	788±26	Macaúba	2000±367
Milho	423±26	Residual	282±26
Coco	562±26		

OBS.: U corresponde à quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições experimentais.

Conclusões

A expressão em plataforma microbiana desta lipase, nunca antes explorada, foi bem-sucedida, demonstrando seu potencial para ser produzida em maior escala. As análises de CD revelaram a alta termoestabilidade da enzima em condições ácidas de pH e na presença de metanol e etanol, solventes muito utilizados na produção de biocombustíveis. O elevado grau de hidrólise obtido no planejamento e otimização utilizando óleo de macaúba, demonstraram sua grande potencialidade em ser aplicada na produção de biocombustíveis a partir do óleo bruto dessa promissora matéria-prima brasileira.

Agradecimentos

Ao CNPq, à FAPESP (processo nº 18/10517-4) e ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR).

[1] Yan, J., Liu, Y., Wang, C., Han, B., Li, S. *Biotech. for Biofuels*, **2015,** *8(1)*, 34.
[2] Aguieiras E.C.G; Cavalcanti-Oliveira E.D.; De Castro A.M.; Langone M.A.P; Freire D.M.G. *Fuel*. **2014,** *135*, 315.
[3] Raspe D.T., Cardozo Filho L., da Silva C. *Int J Chem Eng*. **2013**, *2013*,1.

(cc) BY-NC-ND