

Lipase de *Aspergillus niger* obtida a partir de resíduo agroindustrial como biocatalisador na biossíntese de butirato de butila

Beatriz Medeiros Travália^{1*}, Fernanda Martins de Souza¹, Mércia de Souza Galvão¹, Narendra Narain², Álvaro Silva Lima², Cleide Mara Faria Soares² e Luciana Cristina Lins de Aquino Santana¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Sergipe – CEP 49100-000 São Cristóvão – Sergipe - *E-mail: beatriztravalia@gmail.com

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju, Sergipe Universidade

RESUMO

*Os processos tecnológicos demandam cada vez mais a utilização de catalisadores biológicos nas reações de conversão química. As lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de triacilglicerídeos, esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* via fermentação em estado sólido (FES) da farinha de sementes de abóbora e avaliação do potencial de obtenção de Butirato de Butila. Experimentos de esterificação foram realizados utilizando n-butanol (0,30 M) e ácido butírico (0,45 M) variando-se a massa de lipase (1-5 g). A enzima obtida por FES apresentou atividade hidrolítica de 1.390 U/g seca de resíduo. Através de análise em GC-MS, verificou-se que para as quantidades de enzimas utilizadas, a produção de butirato de butila foi da ordem de 10⁶ count (área do pico). Esta enzima considerada “verde” apresentou potencial para a produção do composto aromático butirato de butila.*

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, enzimas, esterificação, aromas.

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores essenciais em diversos setores industriais cujo mercado mundial foi estimado em US\$ 3,3 bilhões em 2010, com meta de crescimento de 4.400 milhões dólares em 2015 (BINOD et al., 2013). As lipases [triacilglicerol acilhidrolases (E.C. 3.1.1.3)] são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol, esterificação, transesterificação (inter esterificação, alcoolizes e acidólises), aminólise e lactonização (YIN; LIU; TAN, 2006). Particularmente, a esterificação é o processo de obtenção de um éster a partir da reação de um ácido orgânico ou inorgânico com um álcool, pela substituição de uma hidroxila (OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR) do álcool, havendo formação de água na reação (MARCHETTI e ERRAZU, 2008). Estas enzimas podem ser obtidas por fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES) utilizando bactérias e fungos. A FES vem se destacando ao longo dos anos na produção de lipases devido a disponibilidade de substratos para fermentação, favorecendo o aproveitamento de resíduos

agroindustriais (GUPTA et al., 2015). Vários resíduos têm sido utilizados na FES para a obtenção de lipases, tais como cascas de abacate, torta de babaçu, torta de mamona, borra de café (DANTAS; AQUINO, 2010), sementes de algodão, soja e outros (FARIAS et al., 2014). Trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm avaliado a produção de lipase *Aspergillus niger* a partir da FES de sementes de abóbora e a caracterização bioquímica da mesma (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Reações de esterificação catalisadas por enzimas, particularmente por lipases, tem adquirido cada vez mais atenção em muitas aplicações, devido ao aumento da utilização de ésteres orgânicos em biotecnologia e na indústria química (STERGIOU et al., 2013). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de lipase de *Aspergillus niger*, obtida a partir da fermentação de sementes de abóbora, como biocatalisador de reações de esterificação para a obtenção de butirato de butila.

MATERIAIS E MÉTODOS

A enzima foi obtida através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de abóbora, por *Aspergillus niger* conforme metodologia adaptada de Santos et al. (2012). As fermentações foram conduzidas em placas de petri contendo 10g de farinha de sementes de abóbora (70% de umidade) e 10^5 esporos/g de *Aspergillus niger*, sendo incubadas à temperatura de 30°C durante 7 dias. A enzima foi extraída com tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,0, parcialmente purificada com sulfato de amônio 80% e liofilizada.

A atividade hidrolítica do extrato enzimático foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por SOARES *et al.* (1999), com algumas modificações. O substrato foi preparado utilizando azeite de oliva e goma arábica a 7% (p/v). Em frascos Erlenmeyer foram adicionados substrato, solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e o biocatalisador. As amostras foram incubadas a 37°C. Após este tempo a reação foi paralisada pela adição de solução acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,04 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por min de reação, nas condições de ensaio (37°C/pH 7,0/150 rpm). A atividade foi expressa em U por grama seca de resíduo. Para cada análise de atividade foi preparado um branco, substituindo o extrato enzimático por água destilada.

As reações de esterificação foram realizadas em frascos âmbar contendo n-butanol (0,30 M) e ácido butírico (0,45 M) na proporção 1:1 preparados em heptano, obtendo volume de meio reacional de 20 mL. A massa do biocatalisador foi variada para 1, 2, 3, 4 e 5 g e as reações foram conduzidas em agitador orbital à 200 rpm, 37°C durante 48 h. As amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa, em equipamento Agilent GC-7890B equipado com processador de dados. As análises foram realizadas utilizando coluna HP 5 Apolar, detector Agilent 5977 A, com a seguinte programação de temperatura: 60°C (10°C/min) até 150°C e 50°C/min até 250°C, totalizando 11 min, temperatura do injetor de 220°C, modo de injeção

Split, razão de split 1:100, gás de arraste H_2 , com fluxo do gás de arraste de 1 mL/min, e *delay* de 2,5min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lipase parcialmente purificada apresentou atividade hidrolítica de 1.390 U/g do resíduo seco. A produção desta enzima a partir da FES de sementes de abóbora foi superior aos resultados obtidos por Kamini et al. (1998), Mahadik et al. (2002) e Edwinoliver et al. (2010), os quais obtiveram máxima atividade hidrolítica de 169,0 e 198,3; 340,0; e 521,6 U/g seca de resíduo após a fermentação de torta de sésamo e farelo de trigo; farelo de trigo; e uma mistura de farelo de soja, torta de coco e trigo, com *Aspergillus niger*, respectivamente.

Em relação a produção de butirato de butila verificou-se que não houve diferença significativa ao variar as massas do biocatalisador na reação de esterificação (Figura 1 e Tabela 1). Em geral tem sido relatado na literatura a produção de butirato de butila utilizando-se lipases comerciais (MARTINS et al., 2011; MARTINS et al. 2014). Neste trabalho obteve-se a produção deste composto utilizando como biocatalisador lipase de *Aspergillus niger* obtida a partir de resíduo agroindustrial.

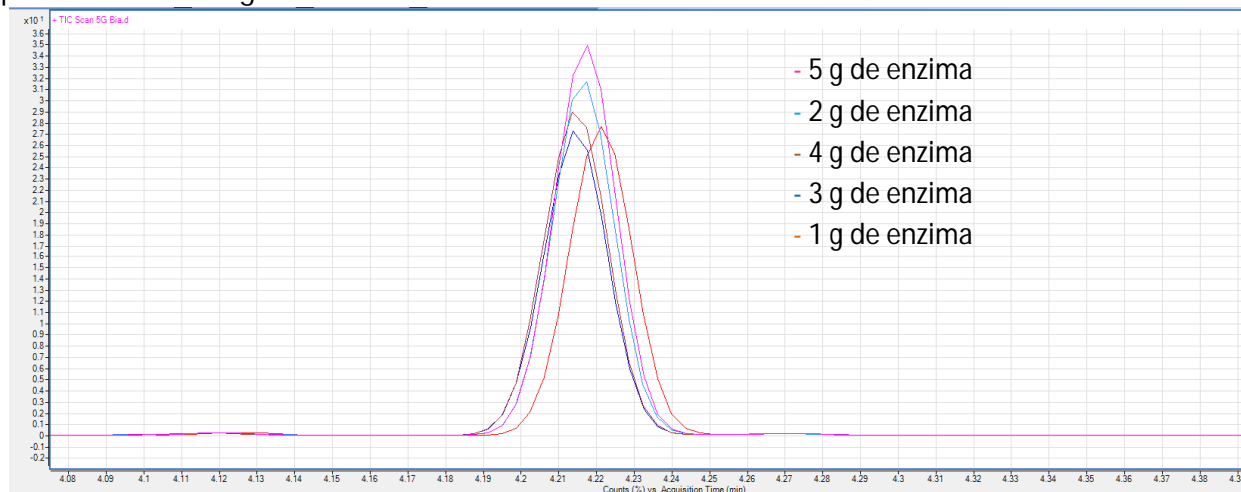


Figura 1: Cromatogramas de Butirato de Butila obtidos por reações de esterificação catalisadas por lipase de *A. niger* proveniente da FES de sementes de abóbora, utilizando diferentes massas de biocatalisador.

Tabela 1 Área referente ao composto Butirato de Butila

Massa de lipase (g)	Tempo de Retenção (min)	Área do pico (count)
1	4,221	$3,03 \times 10^6$
2	4,214	$2,62 \times 10^6$
3	4,214	$2,68 \times 10^6$
4	4,217	$2,86 \times 10^6$
5	4,218	$3,05 \times 10^6$

CONCLUSÕES

A lipase de *Aspergillus niger* obtida através da fermentação em estado sólido de sementes de abóbora apresentou potencial para catalisar reações de esterificação destinadas a obtenção do composto de aroma butirato de butila, sendo, portanto, uma alternativa para utilização em biocatálise como biocatalisador “verde”.

REFERÊNCIAS

- BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. **Industrial enzymes: present status and future perspectives for India: present scenario and perspectives.** Journal of Scientific & Industrial Research, p. 271–286, 2013.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L.C.L. **Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 12, p. 81-87, 2010.
- EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T. N.; KAMINI, N. R. **Scale-up of a novel of a tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis.** Bioresource Technology, v. 101, p. 6791-6796, 2010.
- FARIAS, M. A.; VALONI, E. A.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z. **Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation Using Different Agro Industrial Residues.** Chemical engineering transactions, v. 38, 2014.
- GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. **Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology.** Progress in Lipid Research, v. 57, p. 40–54, 2015.
- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake.** Process Biochemistry, v. 33, p. 505-511, 1998.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** Process Biochemistry, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F., **Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides.** Biomass and Bioenergy, v. 32, p.892-895, 2008.
- MARTINS, A. B.; DA SILVA, A. M.; SCHEINA, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; AYUB, M. A. Z, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE; RODRIGUES, R.C. **Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 105, p. 18–25, 2014.
- MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; R., FERNANDEZ-LAFUENTE; AYUB, M. A. Z, R; RODRIGUES, R. C. **Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology.** Process Biochemistry 46, 2311–2316, 2011.
- SANTOS, R. C. A.; ARAUJO, K. B.; SOARES, C.M.F.; AQUINO, L. C. L. **Evaluation of temperature and moisture response surface on the fermentation of lipase pumpkin seeds using *Aspergillus niger*.** Acta Scientiarum Technology, 34(3):255–260, 2012.
- SANTOS, R. C. A.; ARAUJO, K. B.; ZUBIOLLO, C.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; AQUINO, L. C. L. **Microbial lipase obtained from the fermentation of pumpkin seeds: immobilization potential of hydrophobic matrices.** Acta Scientiarum Technology, 2014.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77-79, p. 745-758, 1999.
- STERGIOU, P.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. M. **Advances in lipase-catalyzed esterification reactions.** Biotechnology Advances, p. 1846–1859, 2013.
- YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. **Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candia* sp. Lipase in organic media.** Chinese Journal of Chemical Engineering, v. 14, n. 1, p. 81-86, 2006.