

AVALIAÇÃO DA BIOMASSA DE FUNGOS AMAZÔNICOS COMO FONTE DE LIPASES PARA BIOCATALÍSE

Israel P. Romano^{a,*}, Vanderlei S. dos Santos^b, Ana Carolina de Lima Paes Louzada^c, Raimundo C. Pereira Junior^d, Edson J. do Carmo^e, Adolfo José da Mota^e, Hiléia dos S. Barroso^f, Ivaldo Itabaiana Junior^g, José Odair Pereira^e, Spartaco Astolfi Filho^e e Sandra Patrícia Zanotto^b

^aDepartamento de Pesquisa, Ensino e Pós-graduação – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Parintins – AM, Brasil

^bCentral de Análise Química, Centro de Biotecnologia da Amazônia, Manaus – AM, Brasil

^cEscola Superior Batista do Amazonas, Manaus – AM, Brasil

^dUniversidade do Estado do Amazonas, Campus Tefé, Tefé – AM, Brasil

^eInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM, Brasil

^fDepartamento de Pesquisa, Ensino e Pós-graduação, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Manaus – AM, Brasil

^gEscola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 25/06/2019; aceito em 06/11/2019; publicado na web em 03/02/2020

EVALUATION OF AMAZONIAN FUNGI BIOMASS AS A SOURCE OF LIPASES FOR BIOCATALYSIS. We evaluated the biomass of twenty Amazonian fungal isolates as a potential source of mycelium-bound lipases with hydrolytic, synthetic or enantioselective activity for biocatalysis application. We compared the hydrolytic activity of three biomass treatments (delipidated, non-delipidated and cultivated in medium without inducer). Delipidated biomass showed better results in the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate compared to the other two treatments for fifteen isolates. Delipidated biomass of six *Aspergillus* strains and UEA_115 strain showed a high synthesis activity of ethyl palmitate by transesterification in organic medium. Results were confirmed by spectrophotometry (410 nm) and gas chromatography. In this reaction, the isolate DPUA_1539 *A. flavo-furcatis* reached a maximum value of 668.5 ± 23.5 mU g⁻¹. Enantioselective activity assays indicated that biomass-bound lipases from UEA_115 isolate ($E = 3.58$; $ee_s = 7 \pm 0$) and in particular from the DPUA_1539 *A. flavo-furcatis* isolate ($E = 24.15$; $ee_s = 91 \pm 1$) have the ability to discriminate enantiomers of the drug ibuprofen by ester synthesis, preferably with (*R*)-enantiomer. These results encourage further investigations of these fungi as potential lipase suppliers for biocatalytic processes such as biodiesel production and enantiopure drugs.

Keywords: lipase; biocatalysis; biomass; enantioselectivity; transesterification; amazonian fungi.

INTRODUÇÃO

A biocatálise tem se tornado uma ferramenta cada vez mais importante da biotecnologia. Esse campo de pesquisa, em alguns casos, possibilitou reações que não são facilmente conduzidas pela química orgânica clássica e, em outros casos, promoveu reações que podem substituir etapas químicas de alto custo energético e/ou ambiental. Cerca de dois terços da pesquisa em biotransformação envolvem hidrolases, com especial destaque para as lipases.^{1,2}

Lipases são triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) cuja capacidade de realizar tanto reações hidrolíticas como de síntese - conforme o meio reacional seja aquoso ou não-aquoso - tem sido extensivamente estudadas e empregadas na indústria já por várias décadas.³⁻⁵ Detergentes, desengordurantes e outros agentes de limpeza são algumas das aplicações consolidadas da atividade hidrolítica destas enzimas. A atividade sintética de lipase, por sua vez, tem aplicações de grande interesse econômico e alto impacto na qualidade de vida, como a produção de cosméticos, de alimentos funcionais enriquecidos com ácidos graxos poli-insaturados e de biodiesel a partir de resíduos oleaginosos.⁵⁻⁷ O biodiesel é um combustível líquido composto por monoalquil ésteres e pode ser obtido por transesterificação biocatalisada. Em ambientes aquorrestritos, lipases podem sintetizar monoalquil ésteres a partir da transesterificação de triacilgliceróis, tornando o processo mais atrativo para o uso com matérias-primas de baixo valor agregado.^{6,8,9}

Lipases com atividade enantiosseletiva são de grande interesse para resolução de racematos e obtenção de blocos quirais para síntese

química. O mercado para compostos enantiopuros está em crescimento, tornando a obtenção destas moléculas um atrativo campo de pesquisa.^{10,11} Por exemplo, o ibuprofeno – um dos medicamentos mais consumidos no mundo – é uma molécula quiral cuja atividade farmacológica reside majoritariamente no (*S*)-enantiômero, o qual é 160 vezes mais ativo que o correspondente (*R*)-enantiômero. Assim, a obtenção do (*S*)-enantiômero opticamente puro é de grande relevância.¹¹⁻¹³

As numerosas aplicações industriais das lipases têm estimulado o interesse no isolamento de novas lipases a partir de novas fontes. O desenvolvimento de metodologias e estratégias para seleção de lipases com atividade sintética e enantiosseletiva continua sendo um tópico relevante.¹⁴⁻¹⁶ Rapidez, confiabilidade e baixo custo são as principais características almejadas, mas é difícil combiná-las numa única metodologia.

As lipases microbianas têm sido mais amplamente empregadas em processos industriais do que as derivadas de plantas e animais devido à sua maior termoestabilidade, tolerância a variações de pH e estabilidade em solventes orgânicos. Além disso, elas têm maiores rendimentos de produção, facilidade de manipulação genética e crescimento rápido em meios de baixo custo. Entre as fontes microbianas, os fungos filamentosos se destacam como fornecedores de lipases para uma ampla - e sempre crescente - gama de aplicações.^{17,18}

A imobilização enzimática possibilita a manutenção da atividade catalítica por mais tempo, além de facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador. Inúmeras estratégias têm sido propostas para a imobilização de enzimas extracelulares. Por outro lado, a biomassa fúngica, também chamada micélio, possui toda uma maquinaria enzimática própria. As enzimas ligadas ao micélio

*e-mail: israel.paes@ifam.edu.br

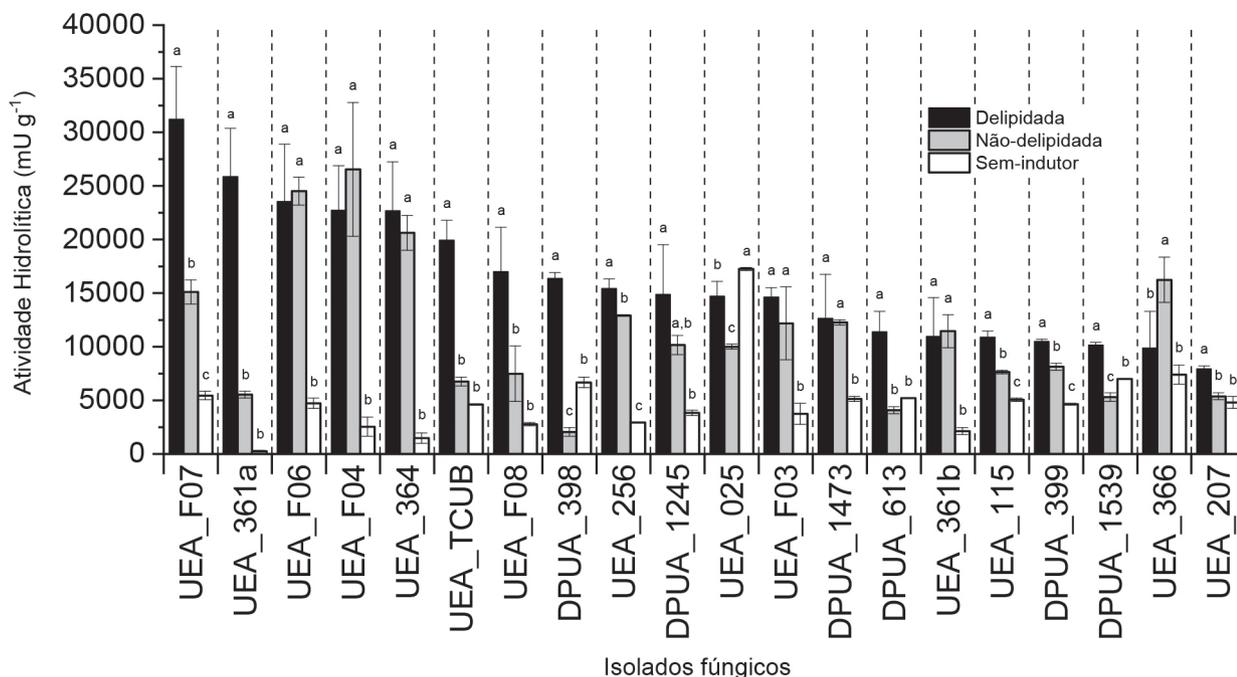


Figura 1. Testes ANOVA de igualdade entre as médias e pós-teste de Tukey da atividade hidrolítica das biomassas delipidada, não-delipidada e crescida em meio sem indutor, de vinte isolados fúngicos. Os testes foram aplicados para as médias dos tratamentos da biomassa de cada isolado fúngico separadamente. Letras iguais entre as médias dos tratamentos de um mesmo isolado representam valores iguais para um nível de significância de 5%. Letras iguais entre médias dos tratamentos de isolados diferentes não implicam em valores estatisticamente iguais

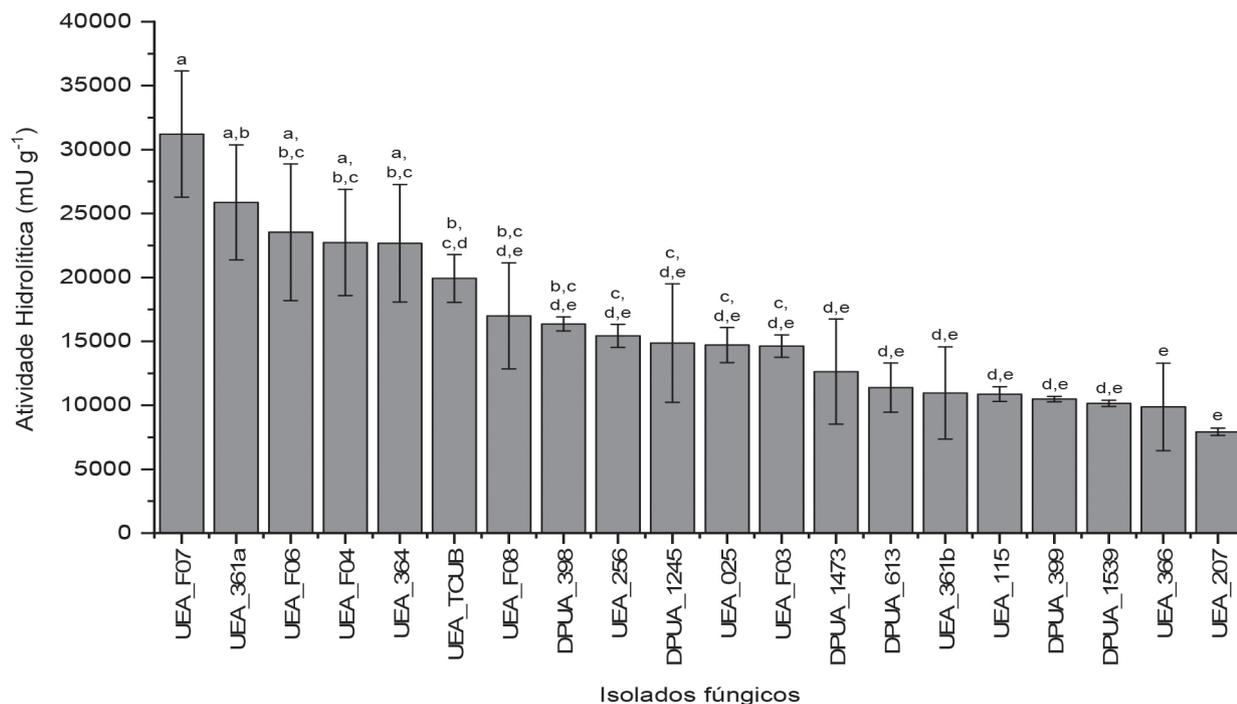


Figura 2. Testes de igualdade entre as médias da atividade hidrolítica da biomassas delipidada de vinte isolados fúngicos. Letras iguais entre as médias representam valores iguais para um nível de significância de 5%

Na literatura, entre os estudos que avaliaram a atividade de lipase ligada ao micélio pelo ensaio de hidrólise de pNPP, existem significativas variações no procedimento de ensaio – por exemplo, nas proporções entre pNPP e emulsificante e na composição do tampão utilizado. Há variações também nas formulações dos meios de cultivo da biomassa, bem como nos tratamentos aos quais a biomassa foi submetida (lavagem, filtração, dessecação, liofilização, delipidação etc). Essas diferenças na metodologia sem dúvida relativizam qualquer

comparação dos valores de atividade hidrolítica entre os trabalhos publicados. Ainda assim, tal comparação pode fornecer indícios sobre quais linhagens de microrganismos - e quais condições de cultivo/tratamento da biomassa - são provavelmente mais promissoras na triagem de lipases com elevada capacidade de hidrólise.

Um cotejo dos resultados apresentados nesta seção com os de outros estudos que também avaliaram lipases ligadas ao micélio pela hidrólise de pNPP mostrou que, na maioria dos casos, a atividade

hidrolítica das linhagens amazônicas testadas neste trabalho foi mais alta. Regner *et al.*,³³ trabalhando com *A. niger* (linhagem MYA 135) e testando diversas formulações de meio preparadas a partir de matérias primas e resíduos agro-industriais, obtiveram aproximadamente 850 mU g⁻¹ usando micélio lavado com água e acetona e centrifugado. Anteriormente, Colin *et al.*,³⁴ trabalhando com a mesma linhagem de *A. niger*, mas cultivada em meio suplementado com óleo de oliva e Fe³⁺, relataram atividade hidrolítica de aproximadamente 1.800 mU g⁻¹ utilizando micélio úmido (lavado e centrifugado). Sun *et al.*³⁵ purificaram a lipase ligada ao micélio de *Rizhopus chinensis*. No início de seu trabalho, eles mensuraram a atividade de lipase na biomassa bruta em 4.8 U g⁻¹ (equivalente a 4.800 mU g⁻¹).

Dentre os trabalhos que localizamos, apenas dois relataram atividades maiores dos que as obtidas em nosso estudo. De Castro *et al.*,

trabalhando com o micélio liofilizado de *A. westerdijkiae*, relataram o excepcional valor 40.000 U g⁻¹ (equivalente a 40.000.000 de mU g⁻¹).²⁵ Yadav *et al.*, utilizando micélio ressuscitado em tampão de *Yarrowia lipolytica* (linhagem NCIM 3639), obtiveram 101 U g⁻¹ (o equivalente a 101.000 mU g⁻¹) de atividade.³⁶

Avaliação da atividade sintética

Os tempos médios de retenção para o palmitato de metila (padrão interno), palmitato de etila (produto da transesterificação) e palmitato de p-nitrofenila (reagente limitante) foram, na ordem: 7.98, 8.94 e 15.22 minutos (Figura 3).

A Figura 4 exhibe os percentuais da atividade sintética relativa de cada isolado fúngico, calculados a partir da atividade específica

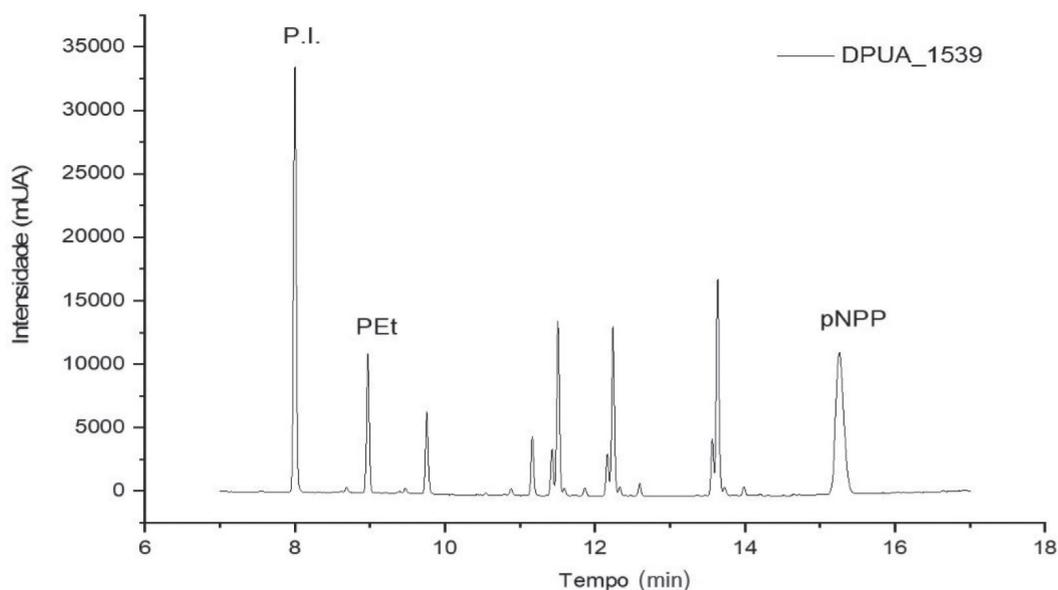


Figura 3. Cromatograma da transesterificação biocatalisada pelo isolado DPUA_1539, indicando os picos correspondentes ao padrão interno palmitato de metila (PI), ao produto (PET) e ao reagente limitante (pNPP)

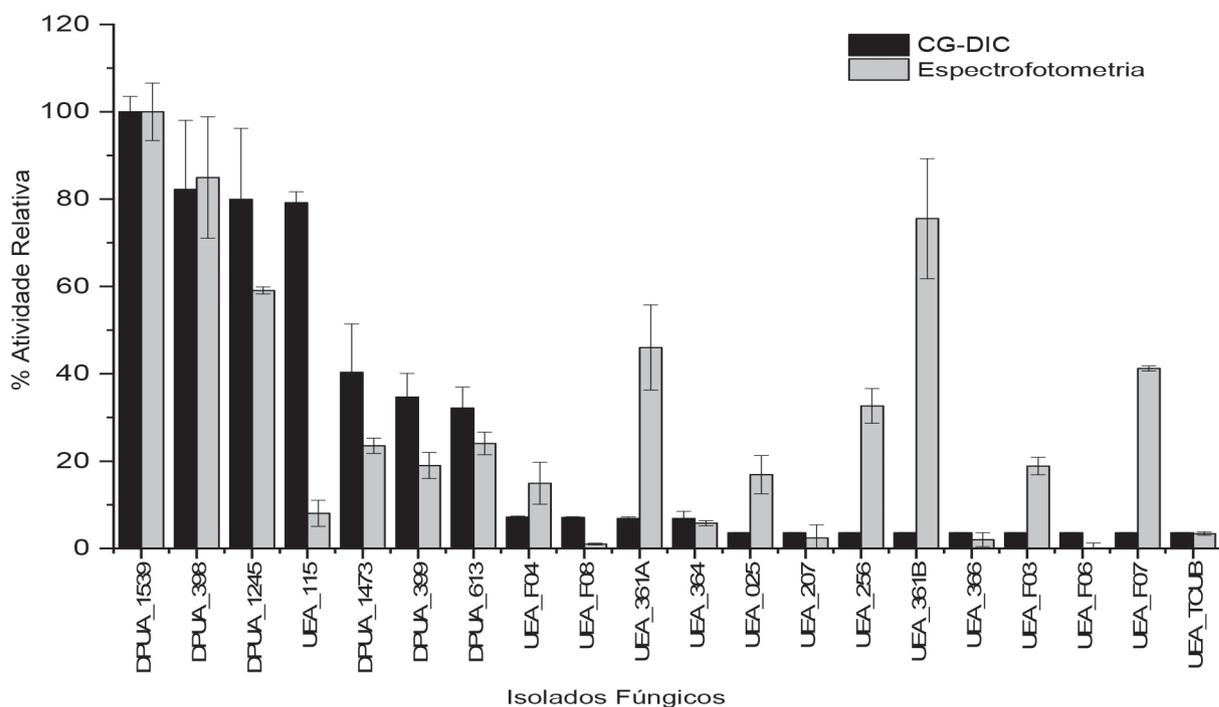


Figura 4. Atividade sintética relativa dos isolados fúngicos, calculada a partir da atividade específica determinada por CG-DIC e por espectrofotometria

