

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SOLON ANDRADES DA ROSA

**CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE UMA LIPASE OBTIDA A PARTIR DA
LEVEDURA *Pseudozyma hubeiensis* E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE DE
BIODIESEL**

Porto Alegre

2016

Solon Andrades da Rosa

**CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE UMA LIPASE OBTIDA A PARTIR DA
LEVEDURA *Pseudozyma hubeiensis* E APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE DE
BIODIESEL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de habilitação:

Biotecnologia Molecular

Orientador:

Professora Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Silvia, por todo apoio que ofereceu durante toda vida, por ter aceitado minhas decisões e por ser meu braço direito, sem a qual, nada seria possível. Obrigado por todos os conselhos, força e por sempre estar ao meu lado me incentivando, possibilitando com que alcançasse objetivos dos quais nem acreditei que fosse capaz. Essa conquista é nossa.

Ao meu pai, Fernando, que por casualidade da vida teve que me deixar tão cedo, por ter permitido, antes mesmo de eu saber, que eu pudesse ter a oportunidade de realizar meus sonhos e se fazer presente, mesmo que de maneira indireta. Agradeço por ser a pessoa maravilhosa da qual todos falam.

À minha orientadora, Dra. Marilene Vainstein, por todos os ensinamentos, questionamentos e conhecimentos passados. Obrigado por me proporcionar esta oportunidade que abriu meus olhos para a ciência e me mostrou um caminho o qual sinto que tenho grande

Aos meus colegas de laboratório, que me conheceram muito jovem e inexperiente e me ajudaram a crescer. Em especial aos doutorandos Amanda e Evandro, por terem me acompanhado e ensinado os princípios mais básicos do trabalho em laboratórios, bem como por todo incentivo e auxílio. Também, não posso esquecer dos demais: Fran, Alicia, Ane, Julia, Heryk, Glaci, Jackson, Eamim, Vanessa, Camila, Rafa, Uriel e Nicole. Foram muito importantes pela boa amizade, caronas, risadas, protocolos e ajuda nos experimentos.

À minha amiga Maria Eduarda (Dufa), por toda a amizade, companheirismo, sextas, segundas, terças, todos os dias. Obrigado por estar fielmente comigo, nas horas boas e ruins e por ser minha família longe de casa. Com certeza está presente direta ou indiretamente em cada página deste trabalho.

Aos meus colegas, que em tantos anos de risadas e choros se tornaram mais que amigos. Obrigado por terem compartilhado cada momento comigo e por termos juntos superado barreiras e obstáculos e chegarmos mais próximos de sermos cientistas. Não posso deixar de citar: Alexia, Barbara e Renato. Em especial: Karina e Gabi, por terem estado comigo no grupo mais especial de todos e por estarem comigo nos mais diversos momentos.

Aos meus amigos da vida, que mesmo trilhando diferentes caminhos sempre estão comigo. Bruna, KK, Dani, Alana e Krug vocês merecem um destaque especial.

À Capes e ao CNPQ pelo apoio financeiro e pelas bolsas oferecidas.

RESUMO

O mundo tem experienciado uma série de problemas ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis que há muitos anos alimentam os setores industrial e de transportes em escala global. Os biocombustíveis são alternativas renováveis e sustentáveis tão eficientes quanto os análogos de origem fóssil, apresentando propriedades semelhantes em relação a rendimento e potencial energético, bem como características superiores como a biodegradabilidade e a possibilidade de aplicação de diversas matérias-primas em sua produção. Um biocombustível que merece destaque é o biodiesel, tanto por suas qualidades próximas ao diesel comum, como por suas qualidades superiores como combustível. O mesmo é obtido por reações de esterificação/transesterificação de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta, por via química ou enzimática. A catálise enzimática apresenta vantagens em relação a catálise química: necessitando de condições menos extremas, possibilitando a recuperação e reutilização das enzimas e não necessitando de matérias-primas purificadas. Por sua vez, a lipase obtida da levedura *Pseudozyma hubeiensis*, se comparada a biocatalisadores comerciais, apresenta a vantagem de ser produzida em grandes quantidades pelo microrganismo, sendo secretada pelas células, não necessitando de extração, e também demonstrando-se capaz de realizar a catálise sem purificação, reduzindo os custos do processo, principal barreira encontrada no mesmo. Dadas tais qualidades, o objetivo do projeto é caracterizar tal enzima e aplicar a mesma à síntese de biodiesel. A produção de lipase foi realizada por incubação da levedura em meio indutor, em plataforma rotatória e em biorreator. O cultivo foi centrifugado, o sobrenadante recuperado e submetido a diferentes tempos de liofilização. A atividade enzimática para cada tempo possui resultados variando de 6 a 87 U/mg de proteína. Análises por SDS-PAGE revelaram a presença de diversos componentes proteicos na amostra, no entanto, também demonstraram a presença de impurezas proteicas na lipase controle (*lipase from porcine pancreas* - Sigma – Aldrich). A identificação das proteínas está em andamento por espectrometria de massas. Os parâmetros avaliados durante a catálise foram: relação enzima:substrato, temperatura da reação, possibilidade de solvência da enzima, razão molar álcool:óleo, tempo reacional e agitação. A análise via cromatografia gasosa revelou, para a avaliação da relação enzima/substrato, a existência de ésteres etílicos de biodiesel, com conversão de 10% da matéria-prima. A enzima mostrou-se capaz de realizar as reações necessárias ao processo e produziu uma catálise com um rendimento superior a enzima comercial (máximo de 8,2%, neste trabalho).

ABSTRACT

The world has experienced a series of environmental problems due to the constant use of fossil fuels, which supply for several years the industrial and transports sectors. Biofuels are renewable and sustainable alternatives, as efficient as the similar fossil fuels, showing resembling properties for productivity and energetic potential. Besides, they have superior characteristics like biodegradability and possibility for application of several raw materials in their production. Biodiesel is a biofuel that deserves considerations, not only for its qualities diesel-like but also for the high qualities as a fuel. It is produced by oil and fats transesterification/esterification with short chain alcohols, by chemical or enzymatic way. The enzymatic way shows advantages above chemical catalysis: doesn't need extreme conditions, making possible the recuperation and reuse of enzymes and no need for purified raw materials. The *Pseudozyma hubeiensis*'s lipase, compared with commercial biocatalysts, shows the advantage of being produced in large scale by the yeast, without further step of enzyme extraction, because it is secreted by the cells. Besides, the enzyme is capable of catalyzing the reaction without purification, which reduces the process costs, which are the biggest issue. Due to these qualities, the aim of this work is to characterize the enzyme and apply it at biodiesel synthesis. The lipase was produced by incubation of the yeast on inductor media, in shaker and bioreactor. This cultivation was centrifuged and the supernatant was collected and lyophilized in different times. SDS-PAGE analysis showed several proteic products in the samples, but also revealed some interferers on the commercial control lipase (lipase from porcine pancreas – Sigma – Aldrich). Proteins identification by mass spectrometry are ongoing. Reaction parameters evaluated during the catalysis was: enzyme:substrate ratio, temperature, solvent possibilities, alcohol:oil ratio, reaction time and mass flux. The gas chromatography analysis revealed, concerning the enzyme:substrate ratio, the existence of biodiesel esters, with maximum yield of 10% from the raw-material. The enzyme shows capable of catalyzing the reaction and produced a catalysis with higher yield than the commercial lipase (8,2% maximum, in this study).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Aspectos gerais.....	1
1.2.	Biocombustíveis	2
1.3.	Catálise de Biodiesel.....	5
1.3.1.	Fatores que influenciam a catálise enzimática	8
1.4.	Levedura <i>Pseudozyma hubeiensis</i> e lipase derivada.....	11
2.	JUSTIFICATIVA	12
3.	OBJETIVO	13
3.1.	Objetivos específicos.....	13
4.	METODOLOGIA	13
4.1.	Lipase <i>P. hubeiensis</i> e lipase controle	13
4.2.	Indução da produção de lipase	14
4.3.	Tratamentos do produto cultivado	14
4.4.	Ensaio bioquímico.....	14
4.5.	Purificação proteica e espectrometria de massas	15
4.6.	Aprimoramento dos parâmetros reacionais da síntese de biodiesel	17
4.7.	Avaliação do biodiesel produzido através da catálise enzimática	18
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1.	Produção e caracterização bioquímica da enzima.....	18
5.1.1.	SDS-PAGE.....	21
5.2.	Síntese de biodiesel e avaliação dos parâmetros reacionais	22
5.3.	Purificação proteica.....	25
5.4.	Espectrometria de massas e caracterização proteica.....	28
6.	CONCLUSÕES	31
7.	PERSPECTIVAS	32
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa da poluição atmosférica gasosa em CO₂ equivalente.	1
Figura 2 – Estimativa do consumo de petróleo no Brasil a partir dos dados registrados..	2
Figura 3 - Reações necessárias à síntese de biodiesel. 3.	6
Figura 4 - Fluxograma representativo das etapas que compõem o processo e afetam a síntese de biodiesel.	10
Figura 5 - Microscopia das células vegetativas de <i>P. hubeiensis</i>	11
Figura 6 - Resolução eletroforética das amostras com diferentes constituições aquosas.	21
Figura 7 – Cromatograma representativo da purificação proteica na coluna Q sepharose.	26
Figura 8 – Cromatograma representativo da purificação proteica na coluna SP sepharose.	27
Figura 9 – SDS-PAGE dos produtos de purificação (item 5.3).	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação do biodiesel como fonte energética no Brasil.	4
Tabela 2 - Caracterização bioquímica dos diferentes tratamentos utilizados no estudo, via atividade enzimática.	19
Tabela 3 - Porcentagem de conversões obtidas através do teste do parâmetro concentração enzimática frente ao substrato para reações laboratoriais..	23
Tabela 4 - Porcentagem de conversões obtidas através do teste do parâmetro concentração enzimática frente ao substrato para reações semi-industriais.....	23

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

A partir do início do século 20, o mundo presenciou um aumento muito significativo nos processos industriais, bem como nas plantas de produção de empresas e na disseminação desse conhecimento e expansão dos polos de produção para todo globo (Cheon *et al.*, 2016). Em conjunto a essa expansão, um dos setores que mais se desenvolveu foi o de veículos automotores, tanto para usos de transporte e circulação, como para uso de escoamento de produção e abastecimento de indústrias (Koppulu e Vasigala, 2016).

Dada essa enorme expansão, o consumo energético também cresceu exacerbadamente, como forma de suprir a demanda do setor industrial e de transportes. A fonte primária de energia utilizada, além da madeira, foi a de combustíveis derivados de petróleo. Só a pouco tempo que fontes não fósseis foram ganhando espaço e substituindo em parte as primeiras (Poggi – Varaldo *et al.*, 2014).

Todavia, além da rápida expansão, o grande aumento da atividade dos setores da indústria e transportes, e do elevado consumo de fontes de energia para mantê-los, tal progresso trouxe graves consequências ambientais (Fig. 1) (MCT, 2014). Nos últimos anos, tem-se presenciado o resultado de tais processos, com evidências ambientais muito fortes para o aumento do efeito-estufa, causado principalmente pelo CO₂, um dos principais produtos liberados na expansão citada anteriormente, bem como a poluição dos ambientes que compõem todos os ecossistemas terrestres (MME – 2015).

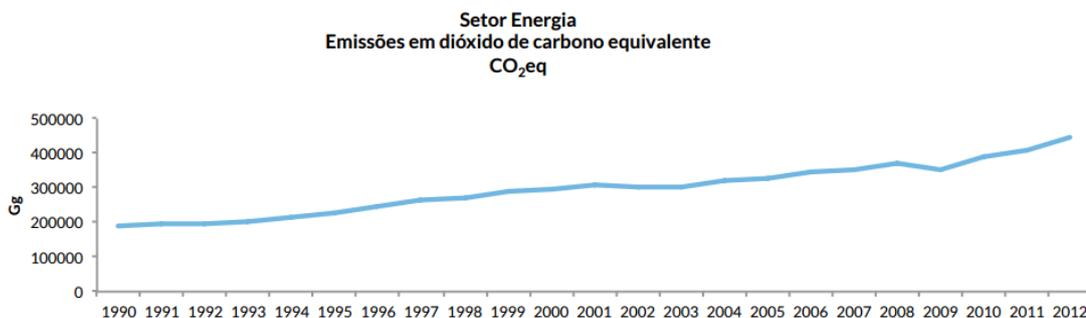


Figura 1 – Estimativa da poluição atmosférica gasosa em CO₂ equivalente. Fonte: Estimativas anuais das emissões de gases do efeito estufa no Brasil – MCT, 2014.

Alguns avanços têm sido feitos na área de produção energética verde e sustentável, no entanto, o petróleo e seus derivados continuam como uma das principais fontes energéticas que alimentam os setores previamente citados (Fig.2).

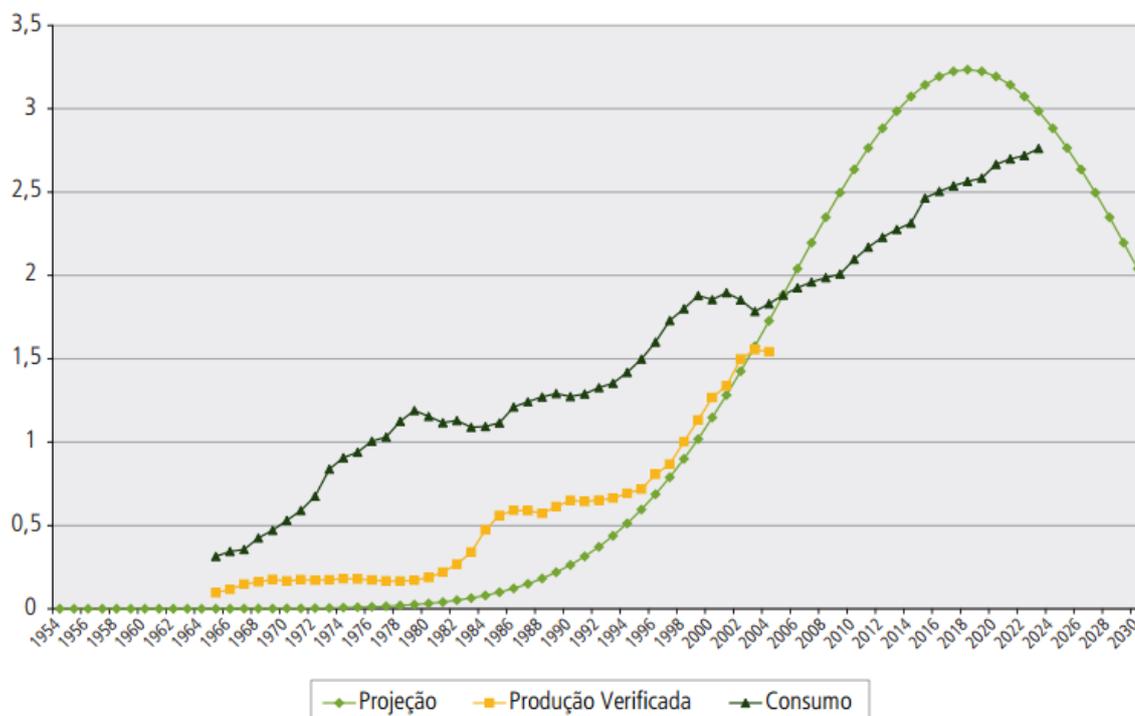


Figura 2 – Estimativa do consumo de petróleo no Brasil a partir dos dados registrados. Fonte: Plano Nacional de Energia 2030 – MME, 2016.

Dadas as grandes consequências observadas pelo impacto das atividades industrial e de transportes humana, diferentes áreas do conhecimento tem associado seus esforços para a produção de alternativas tecnológicas eficientes e também ambientalmente seguras e corretas, nas áreas de química, física e biologia e mais atualmente, juntando e aplicando esses conhecimentos na área de biotecnologia, como é o foco deste trabalho (Koppulu e Vasigala, 2016).

1.2. Biocombustíveis

Para mitigar os efeitos climáticos causados pela queima de combustíveis fósseis, além de se obter fontes limpas e sustentáveis de energia, muita pesquisa tem sido feita na área e um dos setores que ganha destaque é o de biocombustíveis (ANP, 2016). Os mesmos se apresentam como fontes alternativas de energia, renováveis e sustentáveis tendo se demonstrado altamente capazes de substituir ou serem utilizados em conjunto das fontes

energéticas que abastecem os setores de transporte e termoelétricos mundialmente (Cheon *et al.*, 2016).

Os biocombustíveis têm se destacado como formas energéticas tão eficientes quanto os combustíveis análogos fósseis, apresentando propriedades semelhantes em relação a rendimento e potencial energético, sendo por isso alternativas à sua utilização (Cheon *et al.*, 2016). Além desse fato, apresentam uma série de características superiores que atraem a atenção para os mesmos, como: a biodegradabilidade, tornando seu uso ambientalmente seguro e propício para a manutenção dos ecossistemas, a ausência de impurezas tóxicas, que no caso fóssil agravam não só o efeito-estufa, mas também contribuem para a poluição aérea, e a aplicação de variadas matérias-primas na produção, criando uma maior gama de possibilidades para a substituição de produtos destinados a alimentação humana e proporcionando o uso de produtos considerados resíduos da indústria e das atividades humanas (MME, 2015). Tais características proporcionam a possibilidade de explorar a capacidade energética desses combustíveis, sem o grande impacto ambiental atrelado ao uso de análogos fósseis, bem como a possibilidade de utilizar diferentes materiais como fonte de matéria-prima (ANP 2016).

Alguns biocombustíveis têm ganhado destaque, pela sua capacidade de aplicações, bem como a presença de matéria-prima abundante para sua produção em alguns países. Dentre os mesmos, pode-se citar o bioetanol, o propanol, o biohidrogênio, o biogás e o biodiesel (Cheon *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Aplicação do biodiesel como fonte energética no Brasil. Fonte: Balanço energético nacional – MME, 2015.

Tabela 2.19 – Biodiesel

Table 2.19 - Biodiesel

	10 ³ m ³										
FLUXO	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	FLOW
PRODUÇÃO	1	69	404	1.167	1.608	2.397	2.673	2.717	2.917	3.420	PRODUCTION
VARIAÇÃO DE ESTOQUES, PERDAS E AJUSTES	0	0	0	-46	-50	-51	-126	36	-33	-29	STOCK VARIATIONS, LOSSES AND ADJUSTMENTS
CONSUMO TOTAL	1	69	404	1.121	1.558	2.347	2.547	2.754	2.885	3.391	TOTAL CONSUMPTION
TRANSFORMAÇÃO ¹	0	0	0	54	70	121	55	121	105	557	TRANSFORMATION ¹
CONSUMO FINAL ²	1	69	404	1.067	1.489	2.226	2.492	2.632	2.780	2.834	FINAL CONSUMPTION ²
CONSUMO FINAL ENERGÉTICO ³	1	69	404	1.067	1.489	2.226	2.492	2.632	2.780	2.834	FINAL ENERGY CONSUMPTION ³
COMERCIAL	0	0	0	2	2	2	1	1	0	0	COMMERCIAL
PÚBLICO	0	0	0	3	4	1	0	0	0	0	PUBLIC
AGROPECUÁRIO	0	0	0	164	226	323	334	347	347	365	AGRICULTURE AND LIVESTOCK
TRANSPORTES ⁴	1	69	404	876	1.228	1.864	2.098	2.222	2.364	2.398	TRANSPORTATION ⁴
RODOVIÁRIO	1	68	396	858	1.202	1.825	2.039	2.161	2.304	2.338	HIGHWAYS
FERROVIÁRIO	0	1	8	18	26	39	59	61	60	59	RAILROADS
INDUSTRIAL	0	0	0	22	29	36	59	62	68	71	INDUSTRIAL
CIMENTO	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	CEMENT
FERRO-GUSA E AÇO	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2	PIG-IRON AND STEEL
MINERAÇÃO E PELOTIZAÇÃO	0	0	0	7	9	15	22	23	23	25	MINING/PELLETIZATION
QUÍMICA	0	0	0	4	6	2	1	1	1	1	CHEMICAL
ALIMENTOS E BEBIDAS	0	0	0	2	3	8	11	12	15	15	FOODS AND BEVERAGES
TÊXTIL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TEXTILES
PAPEL E CELULOSE	0	0	0	2	3	0	7	7	8	10	PAPER AND PULP
CERÂMICA	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	CERAMICS
OUTROS	0	0	0	4	5	8	11	11	12	13	OTHERS

¹ Geração de eletricidade. / ¹ Input for electricity generation.

² A partir de 2008 a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória. Entre janeiro e junho de 2008 a mistura foi de 2%, entre julho de 2008 e junho de 2009 foi de 3% e entre julho e dezembro de 2009 foi de 4%. / ² Since 2008 the blend of pure biodiesel (B100) in diesel oil has become mandatory. Between January and June 2008 the mix was 2%, between July 2008 and June 2009 it was 3% and between July and December 2009 it was 4%.

³ Admitiu-se a hipótese de que antes de 2008 todo o consumo de biodiesel foi no setor transportes. / ³ It was admitted that before 2008 all the biodiesel consumption was in the transportation sector.

⁴ O óleo diesel para transporte hidroviário não contém biodiesel. / ⁴ The diesel oil for waterways transportation does not contain biodiesel.

Muitas políticas de incentivo a esses combustíveis, em diversos países, têm sido criadas para aumentar o uso e a consolidação dos mesmos nos setores energéticos. No Brasil, por exemplo, a lei do DOFC 13263 (2016), estabelece que a porcentagem de biodiesel adicionado ao diesel suba gradativamente dos atuais 7% até atingir 10% .

O biodiesel, dentre os demais biocombustíveis, merece destaque devido às suas propriedades físico-químicas próximas ao do diesel comum. Além disso possui uma série de propriedades não presentes no combustível fóssil, como a presença de oxigênio molecular, atrelado à função química éster, o que permite um maior rendimento de combustão e um ponto de fulgor elevado facilitando seu transporte e tornando-o mais seguro (ANP 2016). Tal produto é obtido através de reações de esterificação e/ou transesterificação de óleos e gorduras, de origem animal, vegetal ou de microrganismos, com álcoois de cadeia curta. Alguns exemplos são o metanol, muito utilizado industrialmente, ou o etanol, como alternativa sustentável e ambientalmente correta. A

catálise pode ocorrer via agentes químicos, sendo esses, ácidos ou bases fortes, como o NaOH, ou o H₂SO₄, ou biológicos, como as enzimas da classe hidrolase (lipases), gerando a mistura de ésteres de cadeia curta, conhecida como biodiesel (Pereira *et al.*, 2013).

Além das políticas de incentivo ao uso do biodiesel já citadas, o mesmo já alimenta em uma grande parte o setor energético brasileiro, como podemos ver pela tabela 1.

Dada a grande importância do biodiesel como fonte combustível energética, muitas rotas e metodologias têm sido pesquisadas a fim de melhorar o rendimento da catálise e criar, no processo como um todo, um método com alto desempenho, baixo custo associado e de forma ambientalmente correta e sustentável (Pereira *et al.*, 2013).

1.3. Catálise de Biodiesel

A catálise aplicada atualmente na produção industrial de biodiesel é do tipo química. Tal método é utilizado uma vez que possui um alto rendimento em um custo-benefício razoável para o setor, além de estar consolidado e determinado há muitos anos, com todos os possíveis parâmetros ajustados, bem como com todas as condições de contorno para a reação já determinadas e elucidadas (Hama e Kondo, 2013). No entanto, existem alguns aspectos de tal catálise que caracterizam desvantagens industriais e também apresentam dificuldades para o tratamento de resíduos, para um processo “verde”, ambientalmente sustentável e de baixo impacto (Nasaruddin *et al.*, , 2014).

Dada a utilização do processo via catalisador químico, as desvantagens encontradas no mesmo são características da reação e da natureza dos reagentes empregados na mesma. Primeiramente, a reação de síntese de biodiesel consiste em uma mistura heterogênea de componentes. O óleo e o álcool utilizados no processo possuem polaridades tão opostas que não se misturam, gerando um ambiente não-favorável para a reação, porque tal fato impede os choques entre as moléculas, essenciais para a realização de qualquer processo químico (De Regil e Sandoval, 2013). Para contornar tal impecílio, existe um grande gasto energético associado ao setor, uma vez que a medida mais eficiente encontrada para superar o mesmo, foi a utilização de altas agitações, bem como de altas temperaturas dentro do reator, a fim de permitir um fluxo constante dos reagentes e o contato entre as moléculas do mesmo (Narwal *et al.*, , 2015).

Além desse impedimento, outro ponto negativo reside na natureza do catalisador. Três dos reagentes mais utilizados consistem em ácidos e bases fortes, sendo eles KOH, NaOH

e H₂SO₄. Tais catalisadores químicos, além de realizarem a catálise necessária às reações de síntese orgânica (Fig. 3), também são consumidos na reação conhecida como saponificação. Tal fato impede que sejam utilizados como reagente do processo, óleos e gorduras que possuam um alto índice de ácidos graxos livres (*Free Fat Acids* – FFA), uma vez que esses reagem com os íons que constituem os catalisadores, gerando sais de ácido carboxílico (sabão) (Pereira *et al.*, 2013). Esse ponto faz com que tal mecanismo de catálise necessite de lipídeos altamente purificados, que também são destinados a outros fins, como o óleo de soja, utilizado também em propósitos alimentícios. Adicionado a tal barreira, também existe o fato de que, mesmo que altamente purificado, o óleo ou gordura utilizado, ainda consome parte do reagente na reação de saponificação e a espuma resultante do processo, bem como as moléculas anfifílicas da mesma, interferem na reação via parâmetros reológicos, sempre diminuindo a capacidade catalítica máxima possível para tal via (Nasaruddin *et al.*, 2014). Os sais utilizados na via química ainda não podem ser recuperados e reutilizados, uma vez que o processo seria altamente custoso e necessitaria de várias etapas, perdendo o produto principal (biodiesel) nas mesmas, e a reação produz subprodutos tóxicos, como resíduos do solvente utilizado no processo, compostos de pH extremo, devido aos catalisadores, e grandes quantidades de glicerol, que através de tal via, não pode ser reutilizado ou implementado no processo (Hama e Kondo, 2013).

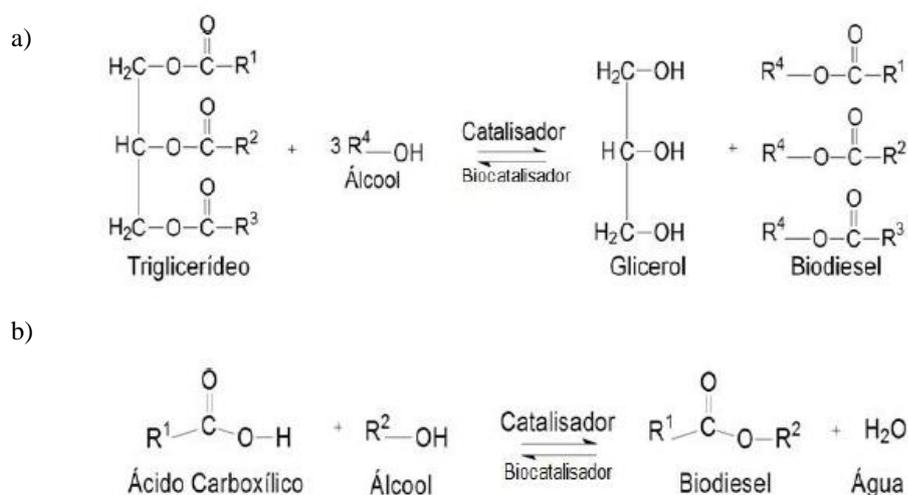


Figura 3 - Reações necessárias à síntese de biodiesel. a) Transesterificação; b) Esterificação. Fonte: adaptado de Pereira *et al.*, 2013.

Deste modo, a via de catálise enzimática surge como uma alternativa para superar os desafios do processo químico, bem como uma forma mais ambientalmente correta de síntese, sem os grandes impactos atrelados ao processo químico (De Regil e Sandoval, 2013).

Diferentemente da rota química, a natureza dos reagentes não afeta da mesma forma, o andamento do processo. As enzimas utilizadas nesta via são obtidas de seres vivos e por isso, estão adaptadas as condições necessárias à catálise, bem como, atuam de forma eficiente, mas em condições compatíveis com a vida (Narwal *et al.*, , 2015). Os biocatalisadores não necessitam das altas agitações e temperaturas da via química, isso porque, os mesmos estão adaptados à atuação em ambientes heterogêneos, realizando a catálise na superfície de contato das fases de diferentes polaridades, além de possuírem um espectro de ação em temperaturas baixas se comparadas ao processo de outra rota, uma vez que a temperatura ótima de atuação das enzimas se encontra em uma faixa que existe nas condições ambiente, onde estão adaptadas à realização da catálise (Hama e Kondo, 2013).

Outro ponto favorável a essa metodologia, é a não necessidade de pureza dos reagentes. As enzimas são catalisadores enantioseletivos, capazes de atuar especificamente sobre o seu substrato, mesmo que tal composto se encontre dentro de uma mistura complexa (De Regil e Sandoval, 2013). Tal característica possibilita a utilização de óleos e gorduras diferenciados na síntese orgânica, podendo-se aproveitar resíduos como o óleo de fritura, por exemplo. Também, de forma diferente à metodologia química, o catalisador desse processo não é consumido durante a reação em uma reação secundária, como a saponificação. As enzimas não reagem com os componentes da mistura levando a geração de compostos secundários, não produzindo interferentes de reação, como a espuma, citada anteriormente, e possibilitando o uso de óleos com alto teor de FFA, que anteriormente, deveriam ser processados antes de entrar no reator (Pereira *et al.*, 2013).

Uma das principais características desse processo enzimático, criando uma possibilidade ainda mais vantajosa do que a via química, é que o catalisador pode ser facilmente recuperado do meio reacional e ser reutilizado em outro processo, quantas vezes forem possíveis de recuperação. Pelo fato de as enzimas não se dissociarem em íons para a realização da catálise, basta que as mesmas estejam simplesmente aderidas em alguma superfície ou carreador, para que possam ser agrupadas e retiradas da reação, possibilitando a reutilização das mesmas (Pereira *et al.*, 2013). Muitos trabalhos buscam a

imobilização enzimática como forma de diminuição dos custos associados ao processo. Ainda, os subprodutos tóxicos do processo químico não são gerados por esta via e o glicerol pode reentrar no processo, como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo produtor da enzima e também para organismos produtores de óleos (Narwal *et al.*, 2015).

Contudo, ainda existem barreiras a serem quebradas para a aplicação rentável e vantajosa da via enzimática. O grande problema existente em tal processo é o alto custo associado à produção das enzimas empregadas. As enzimas hoje disponíveis passam por variadas etapas de purificação para a obtenção de um composto com a mais alta pureza, sem a presença de interferentes (Hama e Kondo, 2013). Outro ponto que a torna onerosa e menos vantajosa ao setor industrial é o fato de muitas enzimas serem obtidas através de engenharia genética, com produção heteróloga da mesma em organismos modelo, o que por um lado facilita o manejo dos mesmos e também possibilita a produção mais controlada em etapas conhecidas e protocoladas há anos, por outro, adiciona todo o custo laboratorial e de pesquisa existente para a produção dos biocatalisadores, bem como, adiciona etapas de purificação mais rígidas, para a separação dos organismos recombinantes do produto associado (De Regil e Sandoval, 2013). Nenhuma enzima hoje disponível, possui a capacidade de ser utilizada de forma direta a partir da produção em organismo nativo, evitando as etapas de purificação, bem como ser produzida em grandes quantidades diretamente a partir do organismo de origem da mesma. Esse alto custo associado à produção desse tipo de catalisador, leva a uma grande desvantagem econômica se comparado ao processo químico e por isso, o uso de enzimas para a rota de síntese ainda se limita a escalas de pesquisa apenas.

1.3.1. Fatores que influenciam a catálise enzimática

O fato de a catálise enzimática se utilizar de produtos derivados de seres vivos leva ao fato de que alguns parâmetros não existentes na via química tornarem-se interferentes de reação, no que diz respeito à natureza do catalisador (De Regil e Sandoval, 2013). Enzimas são proteínas, o que faz com que necessitem se encontrar na conformação correta para a realização das reações a que são destinadas. Muitos parâmetros acabam então afetando o estado conformacional das mesmas, alterando sua

capacidade catalítica, existindo assim, um conjunto de parâmetros ótimos que levam ao estado conformacional ideal para a realização da catálise (Pereira *et al.*, 2013).

Primeiramente, a reação é afetada pela natureza dos reagentes. A escolha do álcool e de um solvente apropriado para a reação, afetam em muito, a capacidade catalítica da enzima. O álcool, por ser um reagente polar (uma vez que os álcoois utilizados são o metanol e o etanol) tem alta capacidade de desnaturação proteica, isso porque, é capaz de interagir com a água e sequestra-la da superfície da enzima, expondo os resíduos hidrofóbicos no ambiente heterogêneo de reação, mantendo a estrutura nesse estado incapaz de realizar catálise (Hama e Kondo, 2013). O uso de um solvente, e o estudo das razões molares do mesmo quanto ao álcool, pode servir para contornar essa condição. O solvente acaba preservando a água de hidratação da enzima, impedindo que a mesma saia, por interagir com a cadeia alifática do álcool, no lugar da mesma (Pereira *et al.*, 2013). No entanto, solventes fortemente apolares, em proporções não adequadas, podem interferir na polaridade do meio, expondo os resíduos hidrofóbicos da proteína, desnaturando-a. Existem enzimas capazes de atuar em um ambiente sem solvente, pelas suas características físico-químicas. Outro método de contorno de tais barreiras é a adição do álcool reagente em etapas separadas, dado o seu volume total (Narwal *et al.*, 2015). Tal método mantém o álcool no meio reacional, porém em concentrações que não afetam a enzima.

Outra característica importante, é o tipo de óleo utilizado, bem como as razões molares do mesmo, quanto ao álcool. Óleos de resíduos podem conter em sua composição alguns inibidores ou compostos nucleofílicos e eletrofílicos que podem atacar a enzima, prejudicando a catálise (Pereira *et al.*, 2013). Além disso, a razão entre as molaridades de álcool e óleo ou gordura devem ser cuidadosamente calculadas. Isso porque, o reagente limitante da reação devem ser o óleo, uma vez que busca-se que todo ele seja transformado em biodiesel, portanto, a adição do álcool deve-se ser feita em excesso, quantas vezes forem necessárias, para permitir a reação, mas evitar a desnaturação proteica (Nasaruddin *et al.*, 2014).

A água, como já citado anteriormente, é essencial para a manutenção da estrutura proteica, uma vez que a enzima está enovelada de forma correta e adaptada a um ambiente aquoso, onde é produzida (citosol) e modificada (Hama e Kondo, 2013). No entanto, como vemos na figura 3, a água também é um dos subprodutos de reação, capaz de deslocar o equilíbrio químico que compõe a esterificação, para a formação de

reagentes, no caso, os óleos e gorduras, indo em contrapartida ao objetivo da reação industrial (Pereira *et al.*, 2013). Por tal motivo, deve-se haver um balanço muito bem caracterizado, em que a água esteja presente no reator apenas em uma quantidade necessária para a manutenção da estrutura proteica, evitando que seja consumida na reação inversa da proposta para a síntese.

A temperatura, o pH e a agitação são fatores relacionados capazes de interferir fisicamente na estrutura proteica e portanto, também possuem um certo peso sobre a catálise (Hama e Kondo, 2013). Como sabemos, a temperatura é capaz de influenciar na vibração das moléculas, causando distorções na estrutura da mesma e pode levá-la a desnaturação. As enzimas em geral, justamente por serem obtidas de seres vivos, atuam em temperaturas usuais, próximas a temperatura ambiente. Inclusive, é de grande interesse industrial a busca de enzimas capazes de atuarem em altas temperaturas, uma vez que as mesmas facilitam o contato entre as moléculas e aumentam os choques efetivos dessas, favorecendo a reação. O pH influencia na ionização da molécula, podendo fazê-la precipitar se for próximo de seu ponto isoelétrico ou causar uma perda temporária/irreversível de função, através da ionização de hidrogênios protonáveis (De Regil e Sandoval, 2013). No caso da síntese de biodiesel, alterações no pH podem advir dos próprios óleos e gorduras utilizados como reagentes, uma vez que um alto teor de FFA pode levar a uma diminuição do mesmo, bem como a presença de compostos oxidados, no caso do uso de rejeitos de outras fontes. Por fim, a agitação é capaz de causar danos físicos aos biocatalisadores, podendo produzir uma desnaturação mecânica sobre os mesmos, se for utilizada de forma extrema. No entanto, a mesma é essencial para evitar a precipitação da enzima e manter um fluxo de massa contínuo no meio reacional, impedindo acúmulos e criação de gradientes estacionários (Pereira *et al.*, 2013).

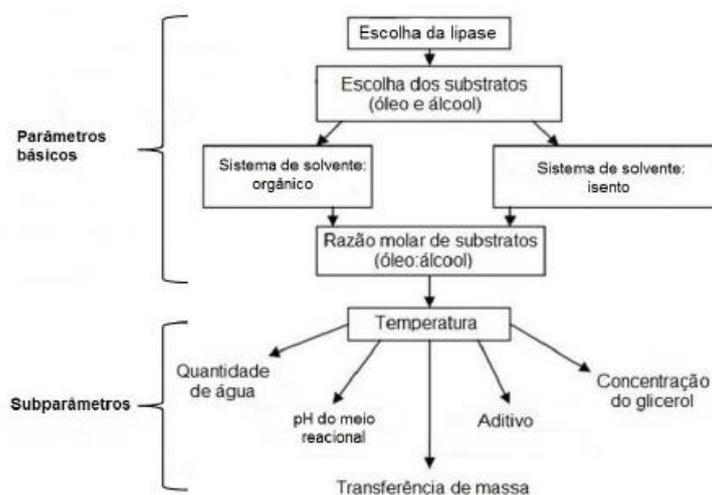


Figura 4 - Fluxograma representativo das etapas que compõem o processo e afetam a síntese de biodiesel. Fonte: adaptado de Pereira *et al.*, 2013.

1.4. Levedura *Pseudozyma hubeiensis* e lipase derivada

A levedura *Pseudozyma hubeiensis* é uma levedura não-modelo, muito pouco abordada na literatura (Fig. 5) . No entanto, os poucos trabalhos os quais se referem a mesma já demonstram o grande potencial biotecnológico que a mesma representa. Esses apresentam a grande capacidade de produção de enzimas e produtos de interesse industrial pelo fungo através de simples cultivos de indução, com exemplos na área de biossurfactantes, enzimas glicolíticas e degradadoras de polímeros de glicose e acumulação de lipídeos intracelulares (Tanimura *et al.*, 2016; Konishi *et al.*, 2010; Adsul; Bastawde; Gokhale, 2009).

A mesma chegou à coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica por um screening realizado por Bussamara *et al.* (2009) que estava em busca de microrganismos produtores de lipase com capacidade de aplicação em catálise orgânica. O isolamento da mesma ocorreu a partir de folhas de plantas do gênero *Hibiscus*. O relato do isolamento da mesma a partir da superfície foliácea de plantas também se deu no trabalho que identificou pela primeira vez, tal fungo (Wang; Jia e Bai, 2006). Tal ambiente, provavelmente propicia sua grande capacidade lipolítica, uma vez que habitando a superfície de folhas, entra em contato com os lipídeos que compõem a cutícula das mesmas.

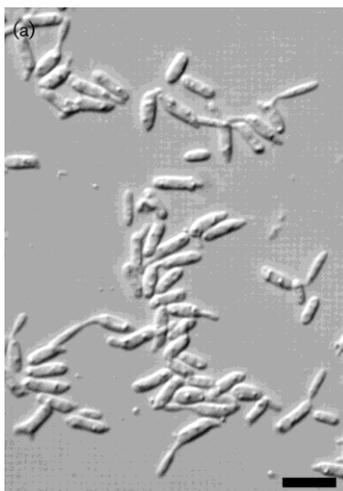


Figura 5 - Microscopia das células vegetativas de *P. hubeiensis*. Na imagem podemos ver as características das células da levedura. Fonte: Adaptado de Wang; Jia e Bai, 2006.

O trabalho de Bussamara *et al.* (2009) também revelou o grande potencial do catalisador obtido da levedura *P. hubeiensis* . Tal lipase demonstra poder atuar em

substratos consolidados no meio industrial, sem a necessidade de uma purificação. Essa enzima apresenta características favoráveis nos parâmetros de reação, e aparenta poder realizar uma catálise sem aprimoramento via engenharia proteica ou expressão heteróloga para obtenção de biomassa. Através de estudos mais aprofundados como os propostos neste trabalho, pode se revelar como uma alternativa de baixo custo e alta capacidade catalítica, sendo vantajosa se comparada tanto a catálise química, quanto aos biocatalisadores já disponíveis no mercado.

2. JUSTIFICATIVA

A indústria do biodiesel utiliza atualmente a catálise por via química como método clássico para a produção de biodiesel. Devido aos problemas ambientais, bem como às desvantagens energéticas de utilizar altas temperaturas e agitações, atrelados ao processo, é necessária a pesquisa de alternativas para aprimorar a síntese do biocombustível. A via alternativa se caracteriza pelo uso de catalisadores do tipo enzimático, que são ambientalmente mais corretos, não necessitam de condições extremas para a reação de síntese e podem ser reutilizados. No entanto, atualmente os biocatalisadores disponíveis comercialmente passam por processos de purificação, expressão heteróloga e engenharia proteica para o aumento no rendimento de reação, obtenção de grandes quantidades de enzima e aprimoramento catalítico, respectivamente. Tal abordagem torna a via enzimática onerosa e pouco utilizada. Contudo, dados do grupo de pesquisa do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (Bussamara *et al.*, 2009), apresentam um biocatalisador obtido a partir da levedura *P. hubeiensis* com potencial e capacidade de alterar tal cenário. Seu potencial provém do fato de o mesmo não necessitar de processos de purificação e expressão heteróloga, para obter rendimento de reação e biomassa suficiente para a síntese de biodiesel. Desta forma, através de estudos mais aprofundados, a atividade catalítica desta enzima pode ser aprimorada e utilizada como uma alternativa para a produção de biocombustíveis, tornando assim, o seu uso uma estratégia menos custosa e mais simples para a aplicação industrial.

3. OBJETIVO

Produzir e caracterizar a lipase obtida a partir da levedura *Pseudozyma hubeiensis* e determinar os parâmetros de reação necessários para obtenção de uma catálise com o mais alto rendimento e com menor custo associado.

3.1. Objetivos específicos

- a) Induzir a produção da lipase de *P. hubeiensis* em escala semi-industrial;
- b) Avaliar a atividade da enzima produzida;
- c) Caracterizar a enzima produzida através de SDS-PAGE, HPLC e espectrometria de massas;
- e) Avaliar a influência da concentração da enzima frente ao substrato em escala laboratorial e semi-industrial.
- f) Verificar a pureza do biodiesel produzido através da catálise enzimática por GC-FID.

4. METODOLOGIA

4.1. Lipase *P. hubeiensis* e lipase controle

A levedura *P. hubeiensis* linhagem HB85A utilizada no trabalho para a produção de lipase, pertence à coleção do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a liderança da Dra. Marilene Henning Vainstein.

A lipase comercial “*lipase from porcine pancreas L3126*” (Sigma – Aldrich) foi utilizada como controle positivo em todos os testes e como controle comparativo para reações de síntese de biodiesel, uma vez que sua capacidade catalítica já é caracterizada e descrita (Ebrahimi *et al.*, 2012).

4.2. Indução da produção de lipase

A levedura foi cultivada em meios de cultura GYMP e YPD e mantida em estoques com glicerol 20%. A indução da enzima foi realizada em meio mínimo de cultura com 20 g/L de óleo de soja de acordo com Bussamara *et al.*, (2010). Tal meio proporciona as condições de baixa concentração de fontes de carbono que levam a utilização de rotas do metabolismo alternativo, como o uso de lipídeos para síntese energética, e por isso induz o microrganismo à utilização do óleo de soja, como fonte de carbono e para tal fim, proporciona a produção de lipases para acesso a esse tipo de nutriente. A produção foi realizada tanto em plataforma rotatória por 48 horas, a 28°C, 200 RPM com 10% do volume em aeração, quanto em biorreator de 5 L (Minifors Bench-top – INFORS HT) , por 24 horas, 200 RPM, 1 vvm.

4.3. Tratamentos do produto cultivado

Ao final dos cultivos descritos no item 4.2., o sobrenadante de cultura foi recuperado por centrifugação a 12.000 RPM, por 10 minutos (Bussamara *et al.*, 2009).

Após a centrifugação, as amostras foram liofilizadas (0,042 bar e -50°C) (uma vez que a água é capaz de interferir na síntese do biodiesel como descrito no ítem 1). Três tratamentos obtidos através desse método foram utilizados: secagem completa, secagem incompleta (retirada das amostras do liofilizador antes do tempo total necessário à secagem completa) e secagem seguida de hidratação (adição de água destilada após a liofilização, até a amostra obter um aspecto semi-sólido), simulando diferentes conteúdos aquosos na amostra. O tratamento que obteve melhor resultado na conversão de biodiesel foi utilizado para os testes subsequentes.

4.4. Ensaio bioquímicos

Para determinação do conteúdo proteico total dos tratamentos descritos foi utilizado o kit “*Quick Start Bradford protein assay*” (Bio-Rad) (Bradford 1976).

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados pelo método de hidrólise do éster p-nitrofenil-palmitato (PNPP) à p-nitro-fenol (PNP) (Silva *et al.*, 2005). Os ensaios foram

realizados em placas de 96 poços com 10 μ L de amostra adicionados a 90 μ L de uma solução contendo 3 mg de PNPP, dissolvido em 1 mL de isopropanol, misturados a 9 mL de uma solução contendo tris-HCL 50 mM pH= 6, 7 ou 8 (pH ótimo da lipase *P. hubeiensis* = 6, pH ótimo da lipase controle = 7, pH de teste = 8), 40 mg de triton x-100 e 10 mg de goma arábica. Após a incubação por 30 min, à temperatura ótima da enzima (50 °C), a leitura foi feita em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida, como a quantidade necessária de enzima para converter 1 μ mol do substrato em seu produto de hidrólise, em 1 minuto. Tal teste, produz uma molécula colorimétrica (PNP), através da hidrólise do éster PNP, na presença de lipases, com absorção máxima de luz branca, em espectrofotômetro a 410 nm, em pH = 8 (ionização da molécula). O mesmo método foi utilizado para a obtenção dos parâmetros cinéticos proteicos através de curvas de concentração do substrato plotadas contra a velocidade inicial e aplicação das equações de Michaelis-Menten (Deutchser e Burgess, 1990).

As amostras também foram resolvidas eletroforeticamente, para um melhor conhecimento dos possíveis interferentes proteicos, bem como para uma caracterização inicial dos peptídeos que as compõem através de SDS-PAGE (Deutchser e Burgess, 1990). Inicialmente as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) 10%, overnight a 4°C de temperatura e posteriormente recuperadas via centrifugação a 13000 RPM, 10°C, por 10 minutos. O sedimento proteico foi lavado com acetona, para retirada de impurezas e resquícios de precipitação e resuspendido em tampão de amostra 1X (Deutchser e Burgess, 1990) e fervidos a 100°C para a desnaturação proteica. As amostras foram resolvidas em um gel de acrilamida 12%, com gel de entrada 4% de acordo com Deutchser e Burgess (1990). A coloração foi realizada com uma solução contendo comassie R, *overnight* e posteriormente lavada com água aquecida até a visualização das bandas.

4.5. Purificação proteica e espectrometria de massas

Para análise em espectrometria de massas e para uma futura determinação dos parâmetros cinéticos da lipase (K_m , K_{cat} e eficiência catalítica) foi necessária a realização de uma purificação da mesma, uma vez que tal processo facilita e enriquece a análise em espectrômetro de massas e os parâmetros devem ser determinados sem a presença de interferentes de reação e possíveis ativadores ou inibidores. Para isso, uma

separação via HPLC (ÄKTA – *purifier* – GE *life sciences*) foi realizada utilizando diferentes tipos de fase estacionária, para obtenção de uma amostra o mais pura possível em água ultrapura (MilliQ). As colunas utilizadas foram obtidas do kit “*Hiprep Ion Exchange*” (GE *life sciences*) sendo elas, colunas Q sepharose FF e SP sepharose FF, de 1 mL. Todas as colunas foram preparadas e corridas de acordo com as determinações do fabricante.

Para a determinação da faixa proteica responsável pela catálise, o ensaio de atividade enzimática descrito no item 4.4 foi realizado para as frações que produziram sinal de detecção no equipamento, e as faixas positivas para atividade foram isoladas e utilizadas em experimentos posteriores. A análise de tais faixas também se deu por SDS-PAGE, para a visualização das faixas proteicas restantes após a purificação, como também descrito no item 4.4.

A análise via espectrometria de massas ocorreu na Uniprote – MS, localizada no Centro de Biotecnologia da UFRGS. O equipamento disponível para as análises na unidade é um Q-TOF microTM que realiza as análises via procedimento de LC-MS-MS. Inicialmente as amostras positivas para a atividade enzimática e que foram resolvidas via SDS-PAGE, tiveram as bandas retiradas do gel e tratadas para o procedimento de espectrometria via alquilação, redução e digestão *in gel* como descrito por Schevchenko, Wilm, Vorm e Mann, 1996. Tal método consiste na aplicação de um solvente para descoloração da banda do gel dividida em pequenos fragmentos (50% metanol / 5% ácido acético em água) overnight, seguido por uma repetição de 2 horas. Posteriormente o gel é desidratado em acetonitrila e reidratado em uma solução 10 mM (em 100 mM de NH_4HCO_3) de ditioneitol para a redução por 30 minutos. Após a remoção o gel é alquilado em uma solução de iodoacetamida 50 mM (em 100 mM de NH_4HCO_3) também por 30 minutos e segue um procedimento de desidratação com acetonitrila e lavagem com NH_4HCO_3 100mM por 3 vezes. Posteriormente, o gel é reidratado com uma solução de tripsina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (em 50 mM de NH_4HCO_3) e segue para a digestão overnight a 37° C. Após esse período, os peptídeos são extraídos com 100 mM de NH_4HCO_3 , via vórtex e incubação por 10 minutos e 5% ácido fórmico em 50% acetonitrila, seguindo os mesmos passos. O último passo foi repetido uma segunda vez. Os peptídeos agora em solução foram concentrados até a secagem completa em speedvac e seguiram para a análise na Uniprote – MS. O equipamento de MS disponível é acoplado à um UPLC, que em uma fase anterior a análise realiza a separação dos peptídeos via coluna de fase reversa e uma

vez dentro do equipamento Q-tof, os peptídeos são ionizados via electrospray, separados pelo analisador de quadropolo e analisados quanto a razão massa/carga via tof (time of flight). Esses peptídeos seguem para mais um round de análise via segunda ionização, onde são degradados aos seus aminoácidos constituintes e detectados no espectro. Tal espectro então é comparado à bancos de dados em um software específico do aparelho. O banco de dados utilizados nesse trabalho foi o proteoma da levedura *Pseudozyma hubeiensis* linhagem SY62 disponível para acesso no NCBI (Uniprote – MS, 2016).

4.6. Aprimoramento dos parâmetros reacionais da síntese de biodiesel

Buscou-se avaliar o parâmetro concentração da enzima frente ao substrato, primeiramente, de forma isolada, em experimentos únicos, para que posteriormente os resultados sejam avaliados em conjunto com análises ortogonais, via planejamento experimental por metodologia de superfície de resposta, determinando assim os parâmetros ótimos para a catálise de forma isolada, caracterizando-a e de forma conjunta, para futuras aplicações industriais (Su *et al.*, 2016). Tais experimentos são necessários uma vez que existem interações indiretas entre os parâmetros reacionais testados, tornando a análise por forma isolada e por forma conjunta uma ferramenta poderosa e estatisticamente mais confiável para a determinação dos mesmos. Além disso, a interferência do conteúdo aquoso do biocatalisador foi avaliada nos diferentes tratamentos de liofilização pelos quais a enzima passou.

Tais reações ocorreram em duas escalas de trabalho: uma escala laboratorial, em microtubos, simulando condições de teste e em escala semi-industrial (Ebrahimi *et al.*, 2012) em reatores de vidro com agitação mecânica, simulando um escalonamento industrial para futuras aplicações do trabalho. Tal escalonamento se faz necessário, uma vez que, a diferença de tamanho da reação e de sistemas de troca de calor e agitação, afetam os parâmetros reológicos do processo e inserem variáveis experimentais não controladas. Os testes foram feitos fixando as variáveis e alterando o parâmetro de interesse. Para a síntese, os parâmetros utilizados foram: 19 horas de reação, adição de álcool etílico em única etapa na razão molar 3:1 frente ao óleo, 300 RPM para a reação em microtubos e 200 RPM na escala semi-industrial, 50°C para as enzimas *P. hubeiensis* e 37° C para a enzima controle (temperatura ótima), sem solvência. A razão entre a enzima e o substrato variou de 5% a 25%, sendo o substrato, óleo de soja comercial.

Após as reações, os produtos foram separados via decantação, *overnight*, à temperatura ambiente no caso dos produtos da reação semi-industrial e a 4°C no caso das reações em escala laboratorial. Apenas a fase superior foi recuperada, sendo que, no caso das reações laboratoriais, uma etapa de centrifugação a 13000 RPM, 4°C por 10 min foi adicionada para completa retirada de partículas suspensas. A massa então passou por rotaevaporador com aquecimento a 60°C, no caso semi-industrial ou por aquecimento em termomixer, no caso laboratorial, a 70°C, para retirada de álcool e solventes. A amostra ainda foi submetida a mais uma etapa de enriquecimento no caso da escala aumentada, com reação com magnésol 0,1% a 70°C por 5 min, e posterior filtração.

4.7. Avaliação do biodiesel produzido através da catálise enzimática

As análises dos produtos convertidos durante a reação de síntese foram realizadas de forma qualitativa, para visualização da existência de ésteres etílicos de biodiesel nos mesmos, através de cromatografia em camada delgada via comparação com padrões de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos e condições de corrida descritas por Soham e colaboradores. (2011).

A análise quantitativa para a confirmação da existência de tais ésteres na mistura, bem como para a quantificação dos mesmos e determinação da conversão obtida nas reações foi realizada por cromatografia gasosa (GC-FID) através de métodos descritos na norma europeia EN 14103 (2011), pela mesma servir de padrão de qualidade internacional e ser mais rigorosa quanto a qualidade do que a norma brasileira, com os resultados se adequando, portanto, a ambos conjuntos de parâmetros .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e caracterização bioquímica da enzima

Após a inoculação do microrganismo em meio indutor, tanto em plataforma rotatória, como em biorreator, como descrito no item 4 deste trabalho, os sobrenadantes da cultura

foram recuperados e testados para lipases extracelulares. Como descrito por Bussamara *et al.* (2009) a levedura *P. hubeiensis* produz uma lipase secretada das células para o meio de cultura, com alta capacidade catalítica, a qual é o objetivo das análises descritas neste trabalho. Dado tal potencial, aliado a secreção da lipase em ambiente extracelular, bem como a alta produção de biomassa proteica, buscou-se então analisar as características da reação catalisada por essa lipase, bem como a possibilidade de aplicação da mesma em reações de síntese de biocombustível, a fim de torná-la uma possível alteradora de cenário no que se diz respeito a produção de biodiesel, uma vez que tais qualidades diminuem muito o custo do processo, assim como da operação, uma das principais desvantagens ainda encontradas no setor (Hama e Kondo, 2013). Os resultados das características bioquímicas estão listados na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização bioquímica dos diferentes tratamentos utilizados no estudo, via atividade enzimática. Os diferentes tratamentos simulando conteúdos aquosos variáveis foram testados para atividade enzimática como descrito no item 4.4, para uma caracterização inicial da cinética dos mesmos.

Tratamento	Conversão (μmol/mL)	Atividade (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
Liofilização e hidratação	400	13,33	1,26	10,57
Liofilização completa	320	11,00	1,67	6,58
Hidratação residual	590	19,50	3,80	5,13
Biorreator (Liofilização)	205,45	6,85	0,60	11,41

Como podemos ver, o tratamento que atingiu um máximo de atividade específica, ou seja, se caracteriza como o tratamento em que a maior parte da proteína produzida é do tipo lipase e é capaz de realizar catálise, foi o tratamento de secagem completa obtido via biorreator. Tal tratamento se caracteriza por possuir as menores concentrações proteicas, bem como por possuir o menor número de unidades de atividade por volume de amostra. No entanto, como demonstrado, o mesmo é o tratamento mais específico, pois, é aquele produzido em um equipamento de condições altamente controladas, especificadas para o microrganismo e proteína de interesse (Bussamara *et al.*, 2009). A indução em biorreator ocorre por um tempo maior do que àquela realizada em plataforma rotatória, fato que pode influenciar em

tal resultado. Com um maior tempo de indução, as leveduras acabam esgotando possíveis fontes de energia alternativas, podendo essas serem providas de resquícios de fontes de carbono do pré-cultivo ou de estoques celulares, produzidos em meio rico. Dada a inexistência dessas fontes, o metabolismo das leveduras parece ser direcionado à produção de lipases, para o consumo da fonte disponível no meio de indução e redução de outras proteínas que poderiam atuar em outras rotas metabólicas. Assim, a maior atividade específica pode estar atrelada ao fato da levedura estar produzindo muito mais lipases se comparada ao método de indução via plataforma rotatória, comprovando a maior capacidade desse sistema em induzir produtos específicos (De Regil e Sandoval, 2013).

Podemos ver que os resultados são promissores se compararmos a atividade obtida no teste para a lipase de *P. hubeiensis* com outras enzimas da literatura: a lipase utilizada como controle, obtida de pâncreas suíno (*lipase from porcine pancreas* – Sigma-Aldrich) possui sua atividade descrita por Ebrahimi *et al.*, (2012) como sendo 31 U/mg de proteína, por um ensaio semelhante ao utilizado no trabalho. Tal atividade é maior que a máxima obtida nos tratamentos utilizados, porém, a lipase obtida de pâncreas suíno, possui uma série de desvantagens características de seu processo de produção. A mesma possui um alto custo associado ao processo de criação dos suínos, abate, extração do pâncreas e purificação da enzima a partir do mesmo. Além disso, é necessária uma grande quantidade de animais para a produção industrial dessa lipase, uma vez que a partir de cada pâncreas não se produz quantidades muito elevadas de enzima purificada. Todas essas desvantagens justificam o uso de uma maior quantidade da enzima de teste para obtenção da mesma quantificação de unidades enzimáticas, uma vez que o custo atrelado à esse processo se restringe ao meio de indução e a atividade dos equipamentos utilizados. Muitas outras enzimas são descritas por processo de produção via engenharia proteica como de fungos do gênero *Rhizopus* (Yu; Xu e Xiao, 2016) e para bactérias via produção heteróloga em organismos modelo, como por exemplo *Bacillus stratosphericus* (Gricajeva; Bendikienė e Kalėdienė, 2016). Essas, normalmente se apresentam com alta eficiência catalítica e alto poder de conversão de acilgliceróis em biodiesel, porém, novamente, existe um alto custo atrelado, tanto ao processo de produção de proteínas engenheiradas, como ao processo de purificação das mesmas, em colunas de cromatografia e através do uso de enzimas. Novamente, por se caracterizar com um

alto potencial catalítico em estados não purificados e sem expressão heteróloga em organismos modelo, a lipase de *P. hubeiensis* se torna uma alternativa realmente viável e capaz de alterar as dificuldades enfrentadas pelo setor.

5.1.1. SDS-PAGE

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, via desnaturação com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), SDS-PAGE, nos permite analisar o conteúdo proteico de amostras analisando a diferença de massa molar entre elas. Dadas as condições de análise, as proteínas do *pool* da amostra migram através do gel apenas devido a sua diferença de massa (Deutchser e Burgess, 1990). Assim podemos realizar uma identificação inicial dos peptídeos da amostra baseando-se no padrão de massas adicionado à reação, bem como a intensidade das bandas, uma vez que, se respeitada a aplicação de uma mesma massa de amostra para todos os poços, as proteínas com maior intensidade são mais presentes em determinado analito (Fig. 6).

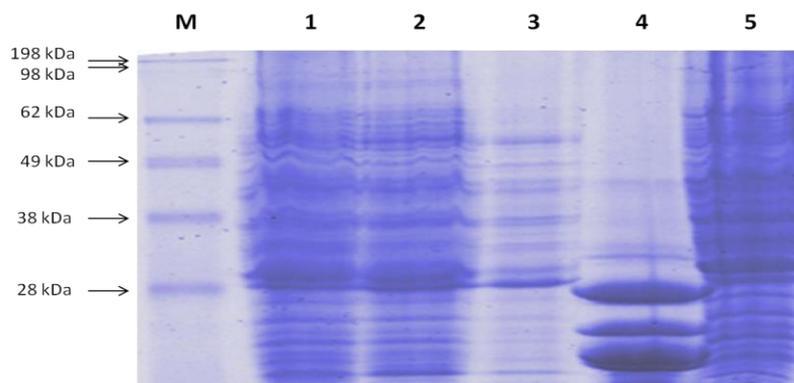


Figura 6 - Resolução eletroforética das amostras com diferentes constituições aquosas. M – Marcador de peso molecular, 1 – Tratamento secagem e hidratação, 2 – Tratamento secagem completa, 3 – Tratamento secagem incompleta, 4 – Lipase from porcine pancreas e 5 – Tratamento secagem completa obtido de biorreator. As amostras foram quantificadas via reagente de Bradford e 200µg das mesmas foram aplicados em gel para a resolução.

Como vemos na figura 6, o padrão característico das amostras dos diferentes tratamentos da lipase de *P. hubeiensis*, é de uma grande quantidade de proteínas, o que se espera de um sobrenadante de cultura, uma vez que muitas proteínas são secretadas através do metabolismo do microrganismo. Esse resultado também revela um dado

interessante. A enzima obtida de pâncreas suíno (Ebrahimi *et al.*, 2012), possui uma série de bandas proteicas em sua constituição, o que é incomum para uma enzima disponível comercialmente, que passou por várias etapas de purificação. Tal constituição poderia ser explicada pelo fato de o SDS-PAGE desnaturar as proteínas nele analisadas, desconectando subunidades de polipeptídeos que não estão unidas via ligação covalente. Porém, a estrutura obtida através de difração de raios-x para a lipase de pâncreas suíno já depositada no *Protein Data Bank* (PDB) (Hermoso *et al.*, 1996), prevê que a mesma é constituída de apenas 2 subunidades, que poderiam então, se separar durante a resolução eletroforética. Tal análise demonstra que até mesmo uma enzima vendida comercialmente e com capacidade já descrita pode possuir resquícios de produção e não estar totalmente purificada e que, mesmo depois de vários processos de tratamento, a mesma ainda não possui 100% de pureza e possui um alto custo associado. A lipase de teste novamente se demonstra então, como uma alternativa e possível substituta comercial.

A partir do resultado podemos inferir que, possivelmente, a proteína com intensidade aumentada, que aparece próxima ao marcador de 28 kDa, em todos os diferentes tratamentos, pode representar a lipase secretada de *P. hubeiensis*, uma vez que, por possuir uma intensidade aumentada se comparada as demais, está mais preponderante na amostra e como a mesma foi obtida através de um meio indutor, já descrito e consolidado (Bussamara *et al.*, 2009), espera-se então que seja a proteína mais representativa da amostra, ou esteja entre o grupo que apresenta uma intensidade elevada. Tal hipótese deve ser confirmada via espectrometria de massas.

5.2. Síntese de biodiesel e avaliação dos parâmetros reacionais

Muitos parâmetros são capazes de afetar reações enzimáticas, uma vez que, as enzimas necessitam estar em condições ótimas de estrutura para agirem corretamente sobre seus substratos. No caso específico da síntese de biodiesel, muitos métodos foram criados para superar as barreiras encontradas na realização da catálise (Pereira *et al.*, 2013).

No caso deste trabalho, a interferência do parâmetro conteúdo aquoso foi avaliado qualitativamente através dos diferentes tratamentos obtidos via liofilização e utilizados em todos os testes únicos realizados (Tabela 3). A quantificação deste conteúdo aquoso constitui uma etapa lenta e outro parâmetro a ser avaliado

futuramente. A partir destes tratamentos, as reações foram então conduzidas fixando as variáveis e alterando apenas o parâmetro de interesse. O escalonamento para um nível semi-industrial (Tabela 4) é uma importante etapa da análise, uma vez que os parâmetros se modificam conforme a escala, já que a reologia, a transferência de massa e a superfície de contato se modificam e inserem variáveis que alteram os resultados (Hama e Kondo, 2013).

Tabela 3 - Porcentagem de conversões obtidas através do teste do parâmetro concentração enzimática frente ao substrato para reações laboratoriais. Teste do parâmetro realizado com % de enzima em relação a massa de substrato (parte superior, em vermelho). Reação em microtubos com agitação de 300 RPM, 50°C para as enzimas de *P. hubeiensis*, 37 °C para a enzima comercial (porcine). Condições: ausência de solvência, álcool 3:1 (razão molar álcool/óleo) e 19 horas de execução. – representa produtos não analisados.

Tratamento	5%	15%	25%
Liofilização e hidratação	0,07	0,07	0,4
Comercial (Porcine)	3,1	8,2	4,6
Biorreator (Liofilização)	0,06	-	0,08

Tabela 4 - Porcentagem de conversões obtidas através do teste do parâmetro concentração enzimática frente ao substrato para reações semi-industriais. Teste do parâmetro realizado com % de enzima em relação a massa de substrato (parte superior, em vermelho). Reação em reatores de vidro com agitação mecânica de 200 RPM, 50°C para as enzimas de *P. hubeiensis*, 37 °C para a enzima comercial (porcine). Condições: ausência de solvência, álcool 3:1 (razão molar álcool/óleo) e 19 horas de execução. – representa produtos não analisados.

Tratamento	5%	15%	25%
Liofilização e hidratação	0	0	0
Comercial (Porcine)	2,2	0	0
Biorreator (Liofilização)	10,7	-	-

Como podemos ver na tabela 3, as reações em escala laboratorial não atingiram valores desejáveis de conversão de óleo em ésteres de alquila. Tais valores seriam considerados ótimos em conversões superiores a 90% (ANP 2016). No entanto,

podemos notar que mesmo a enzima comercial, utilizada em suas condições ótimas determinadas pelo fabricante (Ebrahimi *et al.*, 2012) não obteve uma catálise com valores desejáveis de conversão. Tal fato pode em muito ser explicado pelo sistema aplicado para a catálise. A reação ocorrida em microtubos com agitações tão baixas (300 RPM) não criou o ambiente de troca de massa necessário para a criação de uma interação entre os componentes de polaridades distintas que compõem a reação de síntese de biodiesel (Hama e Kondo, 2013). Uma vez que as duas enzimas apresentaram resultados negativos nesse sistema, o mesmo deve ser modificado, para que algum de seus componentes facilite a interação dos constituintes da amostra, como por exemplo, a adição de um solvente orgânico que crie um sistema homogêneo, ou a utilização de agitações mais elevadas, que não cheguem ao extremo utilizado pela catálise do tipo química, mas que permitam maior interação entre o sistema álcool – enzima – óleo (Pereira *et al.*, , 2013). Como podemos ver em trabalhos recentes (Hu *et al.*, 2015), muitos esforços são feitos para a produção de um ambiente ótimo de reação, com estudos na área de líquidos iônicos e fluídos supercríticos, no entanto, apenas modificações dos sistemas de reação já utilizados podem oferecer avanços, como vemos na tabela

Na tabela 4, estão listados os resultados de conversão obtidos para os mesmos parâmetros testados em escala laboratorial, com a ampliação da escala. O tratamento liofilização e hidratação não obteve resultados, podendo indicar que, na troca de escala, as condições de hidratação da enzima deste tratamento são desfavoráveis à catálise, podendo estar induzindo a enzima a realizar as reações opostas do esperado, produzindo os subprodutos ou alterando o equilíbrio para os reagentes do processo. A simples troca de sistema elevou a conversão máxima obtida pela enzima do tratamento de secagem completa (liofilização) produzida em biorreator de um pico de 0,08% a 10,7%. Essa melhora, pode ser devido ao simples fato de que a reação em escala semi-industrial possui um reator desenhado especialmente para facilitar o fluxo de massa, energia e permite uma melhor homogeneização do meio reacional, garantindo que essas variáveis não interfiram na reação em si (Hama e Kondo, 2013). Nota-se que novamente, a enzima comercial de controle, não atingiu os valores esperados para a sua catálise (Ebrahimi *et al.*, 2012). Esse resultado demonstra que a enzima obtida da levedura *P. hubeiensis*, realmente possui uma alta capacidade catalítica e é capaz de ser empregada sem nenhum tratamento de purificação, reduzindo os custos do

processo e podendo alterar o cenário de alto custo embutido à catálise enzimática. Todavia, são necessários mais testes com os demais parâmetros reacionais para que a mesma atinja os valores esperados de uma catálise eficiente e vantajosa industrialmente (ANP 2016). Alguns trabalhos servem como base para demonstrar que existe a possibilidade de tornar a catálise mais eficiente apenas pela troca das condições do sistema, como descrito por Bernardes *et al.*, (2007).

O parâmetro inicialmente avaliado foi o de concentração da enzima frente ao substrato, uma vez que o mesmo é crítico para a catálise. Uma grande quantidade de enzima não demonstra uma grande conversão, em correlação linear. Na verdade, grandes quantidades de enzima, no caso da síntese de biodiesel, podem favorecer interações proteína – proteína em um ambiente apolar e deixar o sítio ativo inacessível ao substrato (Pereira *et al.*, 2013). Por isso, esse parâmetro foi utilizado nos testes piloto, uma vez que poderia, posteriormente, mascarar demais resultados. No entanto, é importante ressaltar que existem interações entre as variáveis de teste que fogem do controle experimental. Assim, é importante que tal parâmetro seja testado novamente de forma planejada ortogonal, em um método de superfície de resposta, avaliando todo o conjunto de variáveis ao mesmo tempo (Su *et al.*, 2016). Combinando as duas abordagens experimentais, pode-se obter um melhor entendimento da catálise, bem como do comportamento enzimático e seu mecanismo em uma reação de síntese orgânica.

5.3. Purificação proteica

Para um melhor entendimento da catálise realizada pela lipase de *P. hubeiensis*, bem como para a realização da caracterização da mesma, uma vez que o proteoma da levedura não está completamente e corretamente anotado, é necessária uma análise via espectrometria de massas, para a correta caracterização da sequência proteica. Além disso, para a análise de parâmetros cinéticos importantes para o entendimento do mecanismo da reação, bem como para controle da dinâmica da mesma é necessária a realização de uma purificação proteica (Deutchser e Burgess, 1990). As duas análises requerem então, que a proteína esteja corretamente purificada, com garantia de que a mesma seja a única constituinte da amostra. Tal etapa requer uma série de testes e padronizações, uma vez que a proteína pode formar aglomerados

e interagir com outros componentes do pool de proteínas (Hasan; Shah e Hameed, 2009).

Visando a purificação proteica para etapas de experimentos posteriores então, uma abordagem via HPLC (ÄKTA – purifier – GE life sciences) foi utilizada: combinando duas colunas de troca iônica, Hiprep Q sepharose e SP sepharose, de fases iônicas opostas, para aprimorar a purificação e pelo fato de não existirem dados sobre a carga proteica parcial.

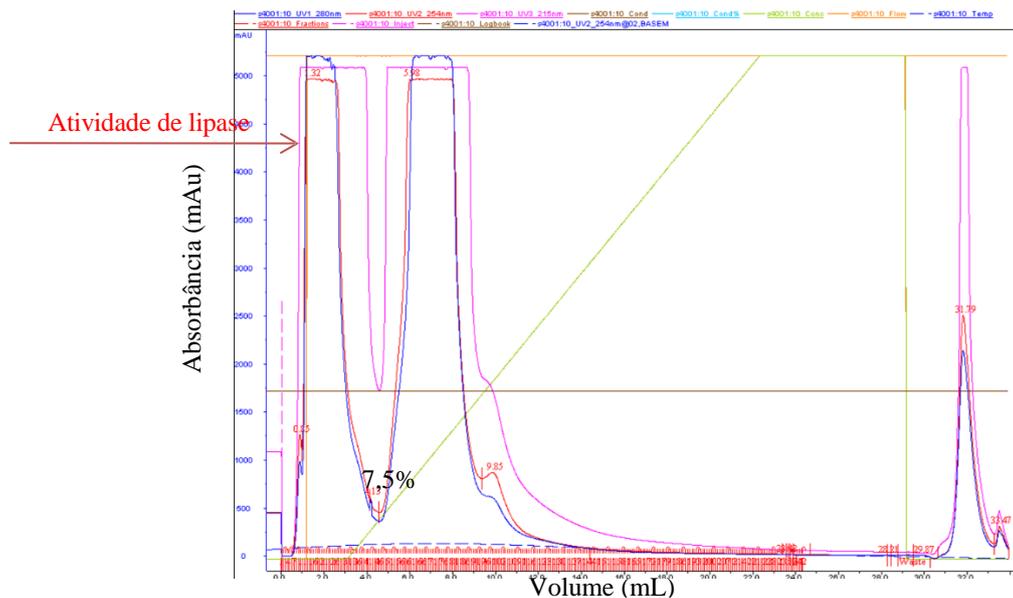


Figura 7 – Cromatograma representativo da purificação proteica na coluna Q sepharose. A amostra do tratamento obtido via biorreator e secagem completa foi ressuspensa em água e aplicada diretamente no equipamento de acordo com orientações do fabricante. Um gradiente de NaCl 1 M foi aplicado para eluir as proteínas da coluna. No gráfico estão indicados o pico representativo de atividade enzimática e a concentração de sal de na qual o mesmo foi obtido. Foram aplicados 200µg de proteína

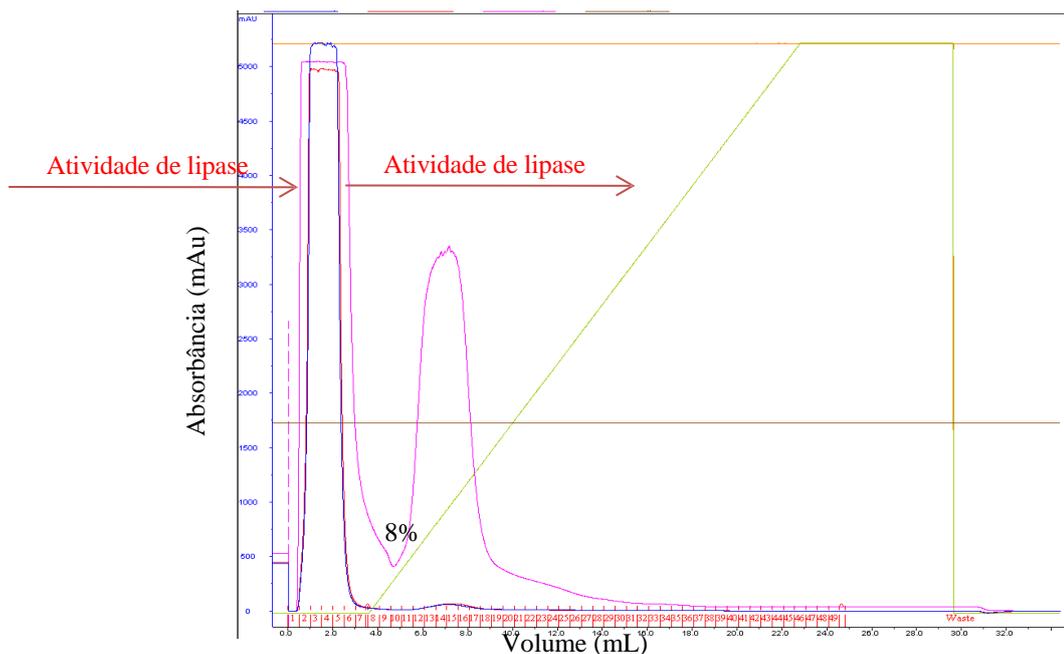


Figura 8 – Cromatograma representativo da purificação proteica na coluna SP sepharose. A amostra do tratamento obtido via biorreator e secagem completa anteriormente purificada na coluna Q sefarose e testada para atividade enzimática foi aplicada neste experimento. Um gradiente de NaCl 1 M foi aplicado para eluir as proteínas da coluna. No gráfico estão indicados o pico representativo de atividade enzimática e a concentração de sal de na qual o mesmo foi obtido. Foi aplicado todo o conteúdo recuperado na primeira coluna.

Inicialmente, após a ressuspensão da amostra obtida do tratamento secagem completa produzido via biorreator foi realizada a quantificação de proteínas via protocolo de Bradford. A amostra aplicada foi concentrada o máximo possível em água ultrapura até o momento em que a mesma formou uma solução supersaturada e iniciou a precipitação. Porém, a solução produzida não obteve uma quantificação elevada de proteínas, uma vez que atingiu um máximo de 200 $\mu\text{g/mL}$ de concentração. Todo o conteúdo foi aplicado na coluna e produziu o resultado obtido na figura 7. Os volumes correspondentes aos picos proteicos foram recuperados e testados para atividade enzimática. O pico que obteve resultado foi aquele que saiu antes mesmo da passagem do gradiente salino, indicando não interação com a coluna, ou repulsão de cargas (Deutchser e Burgess, 1990). Essa mesma amostra que representava o pico de atividade foi então aplicada na segunda coluna, SP sepharose, de fase oposta. A quantificação proteica foi muito baixa, fugindo dos limites de detecção do método de Bradford. A corrida nesta coluna está representada na figura 8. Novamente, os picos proteicos foram coletados e as amostras foram testadas para atividade enzimática. Interessantemente, o pico representativo de atividade foi novamente aquele que foi obtido antes mesmo da passagem de gradiente salino, indicando não interação, ou

repulsão pela fase estacionária da coluna. O fato de a amostra não interagir com ambas as colunas pode ser explicado por alguns motivos. Primeiro, a utilização de água como solvente para amostra pode ter induzido um estado não carregado à proteínas da amostra, sem mesmo, cargas induzidas. Assim, a mesma não possui capacidade de interação com colunas trocadoras de íons (Hasan; Shah e Hameed, 2009). Ou, em um evento mais complexo, as proteínas da amostra podem estar interagindo, gerando aglomerados que podem não estar interagindo com a coluna por tempo suficiente para a separação, devido ao grande tamanho da estrutura por eles formada (Deutchser e Burgess, 1990). Além disso, observou-se atividade enzimática numa fração do gráfico onde não existia pico algum. Tal fato pode ser explicado pelo baixa quantidade de proteínas aplicada no teste, fazendo com que as mesmas fujam do limite de detecção do aparelho, bem como, reforça a ideia de que as proteínas podem estar aglomerando, uma vez que, pode ser possível que uma parte delas tenha “escapado” da interação com as demais proteínas da amostra e sido detectada posteriormente, sendo eficientemente separadas. As amostras que apresentaram atividade após essa purificação foram resolvidos via eletroforese SDS-PAGE, tratadas e enviadas para a análise via espectrometria de massas, com métodos e análise sendo realizados na Uniprote - UFRGS. Contudo, devido a formação dos aglomerados e não completa purificação proteica, observa-se que este não é o melhor método de purificação para esse tipo de amostra.

5.4. Espectrometria de massas e caracterização proteica

A purificação realizada no item 5.3 gerou frações proteicas que primeiramente foram analisadas e resolvidas em gel SDS-PAGE para a seleção das frações que seguiriam para a espectrometria de massas, como representado na figura 9.

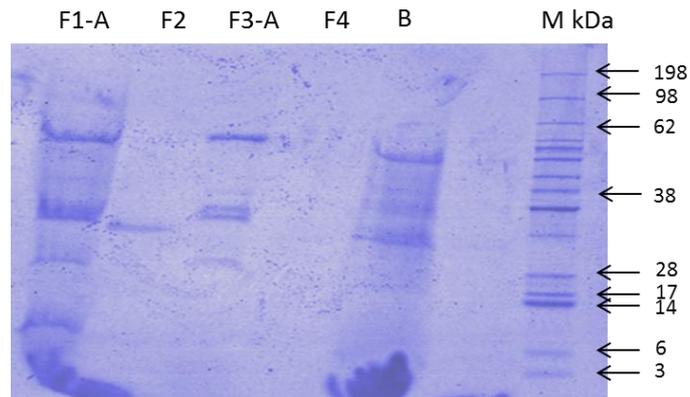


Figura 9 – SDS-PAGE dos produtos de purificação (item 5.3). M – Marcador de peso molecular, F1-A – Fração 1 do cromatograma que apresenta atividade enzimática, F2 – Fração 1 do cromatograma, F3-A – Fração 3 do cromatograma que apresenta atividade enzimática, F4 – Fração 4 do cromatograma e B – Suspensão da enzima biorreator secagem completa, sem nenhum tratamento. Todo conteúdo obtido da coluna foi seco e aplicado nas respectivas bandas. A coluna B possui 200µg de proteína.

Na figura 9, podemos ver que os dois picos do cromatograma que apresentaram atividade enzimática possuem bandas proteicas em comum. Como discutido anteriormente, isto se pode dever ao fato de que a proteína de interesse esteja aglomerando com as demais contidas na amostra e saindo em dois pontos da purificação, um no início, com as demais proteínas e outro no meio, onde sai devido ao tempo de retenção em que fica na coluna. Em ambas as frações, podemos ver uma banda próxima dos 28 kDa. No gel apresentado na figura 6, na mesma posição, existe uma banda com uma intensidade elevada se comparada as outras da amostra, para todos os tratamentos. Dada a utilização de um meio indutor de lipase, é muito provável que a proteína com uma intensidade relativa maior na amostra, seja a proteína secretada em resposta à indução, no caso a lipase de interesse. Seguindo tal raciocínio, a primeira banda a ser analisada via espectrometria de massas foi a próxima dos 28 kDa, da fração F1-A.

Após a análise via LC-MS-MS, na Uniprote – MS, para tal banda foram identificadas duas proteínas, utilizando o banco de dados de proteoma da levedura *Pseudozyma hubeiensis* linhagem SY62 disponível no NCBI, sendo a única levedura da espécie já sequenciada, com proteoma anotado. O software detectou peptídeos para duas proteínas, que correspondem aos acessos XP_012190244.1 e XP_012189017.1 de tal plataforma.

A proteína com código de acesso XP_012190244.1, representa uma uracil phosphoribosyltransferase anotada para o genoma da levedura *P. hubeiensis* SY62

(Konishi; Hatada e Horiuchi, 2013). Tal enzima é descrita como uma enzima altamente conservada entre procariotos e eucariotos e está relacionada com a síntese *de novo* de pirimidinas a partir de CO₂ e produtos metabólicos como aminoácidos, entre outros (Soysa *et al.*, 2013). Portanto, a mesma está relacionada com o metabolismo da levedura e não possui relação direta com a lipase de estudo.

No entanto, a proteína com código XP_012189017.1 no NCBI, representa uma cutinase (Konishi; Hatada e Horiuchi, 2013). Este resultado tem altas implicações no neste trabalho, uma vez que as cutinases são enzimas descritas como pertencentes à família das α/β hidrolases que catalisam a quebra do polímero cutina, via hidrólise, presente nas camadas de cutícula e suberina que revestem o tecido do epitélio foliar de plantas. Tais enzimas atuam então sobre polímeros de ésteres produzindo ácidos graxos capazes de serem utilizados como fonte de energia pelos organismos (Aoyagi; Katakura e Iwasaki, 2016). São descritas como enzimas intermediárias entre lipases e esterases, por não só atuarem em ésteres solúveis, como também em ésteres insolúveis em água. Possuem um sítio ativo altamente conservado entre suas representantes, com a tríade de aminoácidos clássica, responsável pelas reações de transesterificação/esterificação/hidrólise, Ser-His-Asp. Além disso, possuem uma capacidade catalítica descrita como “esterase promíscua” uma vez que são capazes de atuar sobre uma grande gama de substratos que vão de ceras, a ácidos graxos de cadeia curta. Esse tipo de enzima possui uma alta capacidade industrial sendo empregada em indústrias têxteis, de alimentos e de biocombustíveis (Nyyssölä, 2015).

A identificação de tal enzima é muito apropriada, uma vez que os trabalhos que descrevem o isolamento de leveduras da espécie *P. hubeiensis* partiram de screenings realizados sobre a superfície foliar de plantas (Wang; Jia e Bai, 2006; Bussamara *et al.*, 2010) o que faz com que, a levedura necessite de um maquinário metabólico apropriado para habitar tal ambiente, com uma enzima responsável pela retirada de fontes de carbono do tecido vegetal onde se encontram. Além disso, implica no fato de que o trabalho em questão trata das características de uma cutinase, não de uma lipase como anteriormente se havia pensado. Porém, como dito anteriormente, pela grande gama de substratos atrelados a catálise das cutinases (Nyyssölä, 2015), bem como pelo fato de as mesmas atuarem sobre substratos solúveis e insolúveis, o potencial existente de aplicações para a enzima extracelular de *P. hubeiensis* HB85A é ainda maior e mais promissor do que anteriormente se acreditava.

6. CONCLUSÕES

- a) Até o momento, a lipase obtida da levedura *P. hubeiensis* continua demonstrando um alto potencial catalítico e uma capacidade de produzir uma catálise eficiente com baixo custo associado ao processo de produção da mesma. No entanto, são necessários os testes dos demais parâmetros reacionais para comprovar que a mesma pode produzir uma catálise dentro dos parâmetros aceitáveis e que seja passível de aplicação;
- b) A existência de um pool de peptídeos na amostra não impede que a mesma seja aplicada em uma reação catalítica. Como demonstrado, até mesmo uma lipase vendida comercialmente e já consolidada, possui alguns produtos inespecíficos em sua constituição. É claro que a presença de inibidores e proteases deve ser evitada, no entanto, de acordo com os resultados apresentados, parece que os mesmos não constituem a amostra ou estão inativados ou em condições não favoráveis;
- c) A purificação da enzima diretamente obtida da cultura da levedura *P. hubeiensis* constitui um processo complexo e que pode estar sendo afetado pelos constituintes amostrais. Dado o resultado aqui apresentado, deve-se buscar diferentes métodos de purificação, ou considerar a expressão em organismos modelo para a caracterização da enzima, uma vez que, tais processos já estão consolidados e facilitados;
- d) A caracterização da proteína realizada neste trabalho resultou na identificação de uma cutinase pertencente ao proteoma da levedura *Pseudozyma hubeiensis* HB85A. Existe a necessidade da caracterização das demais faixas proteicas do extrato purificado para a confirmação de tal hipótese, no entanto, muito provavelmente a enzima responsável pela catálise e o alto potencial apresentado neste estudo consiste em uma cutinase com uma ampla gama de aplicações a nível industrial. Tal identificação proporciona um novo escopo de estudos e experimentos que devem ser realizados sobre tal enzima e abre diversas portas para o seguimento deste trabalho.

7. PERSPECTIVAS

- a) Realizar os demais testes de parâmetros necessários à catálise restantes, buscando otimizar os resultados e obter uma conversão considerada ótima, com o menor custo associado visando tornar essa lipase uma alternativa ao setor combustível;
- b) Testar os parâmetros também de forma controlada em planejamento experimental ortogonal, via análise de metodologia de resposta de superfície. Tal dado, além de determinar o conjunto de parâmetros mais apropriado à uma aplicação da catálise da enzima, pode em conjunto com os dados de experimentos únicos, dar ideias do mecanismo de ação da enzima, bem como caracterizar a dinâmica da mesma, produzindo dados valiosos no âmbito da proteômica de leveduras não – modelo;
- c) Buscar meios de realizar uma purificação eficiente a fim de poder-se realizar a caracterização da enzima via mecanismos cinéticos;
- d) Realizar a análise via espectrometria de massas identificando a enzima e assim, depositando a sequência da mesma em bancos de dados, auxiliando na criação de conhecimento acerca da proteômica da levedura, bem como podendo utilizar tais dados para realizar uma análise via homologia e possivelmente via softwares de bioinformática, o que pode levar a um entendimento melhor das características da mesma, auxiliando na catálise e sua aplicação, bem como, tornando ainda mais completo o conhecimento sobre o metabolismo dessa levedura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. *Bioresour Technol*, v. 100, n. 24, p. 6488-95, Dec 2009. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19692229> > .

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS
– ANP. Rio de Janeiro, Brasil, 2016. Disponível em :
<<http://www.anp.gov.br/wwwanp/>> . Acesso em: 05 Nov, 2016.

AOYAGI, H.; KATAKURA, Y.; IWASAKI, A. Production of secretory cutinase by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. Springerplus, v. 5, p. 160, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27026857> >.

BRASIL, lei nº 13263, de 24 de Março de 2016. Altera a lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da União – DOFC**. Brasília, DF, v. único, 24 mar. 2016.

BRASIL. Ministério de Ciências e Tecnologia - MCT. Estimativas Anuais das Emissões de Gases do Efeito Estufa no Brasil 2014. Brasília: Ministério de Ciências e Tecnologia, 2014.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia - MME. Balanço energético nacional 2015. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2015.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia - MME. Plano Nacional de Energia 2030. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2016.

BERNARDES, O. L. et al. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 137-140, n. 1-12, p. 105-14, Apr 2007. ISSN 1559-0291. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478380> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BUSSAMARA, R. et al., Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 1, p. 268-75, Jan 2010. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700311> >.

CHEON, S. et al. Recent trends in metabolic engineering of microorganisms for the production of advanced biofuels. *Curr Opin Chem Biol*, v. 35, p. 10-21, Aug 2016. ISSN 1879-0402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27552559> >.

DE REGIL, R.; SANDOVAL, G. Biocatalysis for biobased chemicals. *Biomolecules*, v. 3, n. 4, p. 812-47, Oct 2013. Disponível em: < >.

DEUTSCHER, Murray; BURGESS, Richard. **Methods in enzymology: guide to protein purification**. San Diego: Academic Press Inc. 1990. V: 182.

EBRAHIMI, S.; AMINI, G.; YOUNESI, H.; NAJAFPOUR, G. D. Production of biodiesel using soybean oil catalyzed by porcine pancreas lipase in a solvent free system. *Middle East Journal of Scientific Research*, 2012.

EN 14103 – Fat and oil derivatives – Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. European Committee for Standardization, 2011.

GRICAJEVA, A.; BENDIKIENĖ, V.; KALĖDIENĖ, L. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. *Int J Biol Macromol*, v. 92, p. 96-104, Nov 2016. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27392776> >.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. *Bioresour Technol*, v. 135, p. 386-95, May 2013. ISSN 1873-2976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985827> >.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv*, v. 27, n. 6, p. 782-98, 2009 Nov-Dec

2009. ISSN 1873-1899. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19539743> >.

HERMOSO, J. et al. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol monoethyl ether complex. *J Biol Chem*, v. 271, n. 30, p. 18007-16, Jul 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663362> >.

HU, L. et al. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil and phytosterol in supercritical CO₂. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 38, n. 12, p. 2343-7, Dec 2015. ISSN 1615-7605. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26386863> >.

KONISHI, M. et al. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoe* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. *J Biosci Bioeng*, v. 110, n. 2, p. 169-75, Aug 2010. ISSN 1347-4421. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547357> >.

KONISHI, M.; HATADA, Y.; HORIUCHI, J. Draft Genome Sequence of the Basidiomycetous Yeast-Like Fungus *Pseudozyma hubeiensis* SY62, Which Produces an Abundant Amount of the Biosurfactant Mannosylerythritol Lipids. *Genome Announc*, v. 1, n. 4, Jun 2013. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23814110> >.

KOPPOLU, V.; VASIGALA, V. K. Role of *Escherichia coli* in Biofuel Production. *Microbiol Insights*, v. 9, p. 29-35, 2016. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27441002> > .

NARDINI, M. et al., Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J Biol Chem*, v. 275, n. 40, p. 31219-25, Oct 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893416> >.

NARWAL, S. K. et al., Production and characterization of biodiesel using nonedible castor oil by immobilized lipase from *Bacillus aerius*. *Biomed Res Int*, v. 2015, p.

281934, 2015. ISSN 2314-6141. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874205> >.

NASARUDDIN, R. R.; ALAM, M. Z.; JAMI, M. S. Evaluation of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol-based biodiesel from sludge palm oil (SPO). *Bioresour Technol*, v. 154, p. 155-61, Feb 2014. ISSN 1873-2976. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384322> >.

NYSSÖLÄ, A. Which properties of cutinases are important for applications? *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 99, n. 12, p. 4931-42, Jun 2015. ISSN 1432-0614. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25981992> >.

PEREIRA, Evandro. **Síntese de biodiesel a partir do farelo de arroz via catálise enzimática**. 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de engenharia, Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

POGGI-VARALDO, H. M. et al. Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. *Waste Manag Res*, v. 32, n. 5, p. 353-65, May 2014. ISSN 1096-3669. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24742981> >.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, v. 68, n. 5, p. 850-8, Mar 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779443> >.

SILVA, W.O.B., MITIDIARI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem*, 2005.

SOHAM & SEN, RAMKRISHNA. "Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process," *Applied Energy*, Elsevier, Elsevier, 2013.

SOYSA, R. et al. Substrate inhibition of uracil phosphoribosyltransferase by uracil can account for the uracil growth sensitivity of *Leishmania donovani* pyrimidine auxotrophs. *J Biol Chem*, v. 288, n. 41, p. 29954-64, Oct 2013. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986453>>.

SU, Y. et al. Development and application of a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Sporisorium scitamineum* in sugarcane. *Sci Rep*, v. 6, p. 23994, Apr 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035751>>.

TANIMURA, A. et al. Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and L-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study. *AMB Express*, v. 6, n. 1, p. 58, Dec 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566647>>.

UNIDADE DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS E ESPECTROMETRIA DE MASSAS – UNIPROTE – MS. Porto Alegre, Brasil, 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/uniprote-ms/index.html>>. Acesso em: 15 Dez, 2016.

VON DER HAAR, D. et al., Enzymatic esterification of free fatty acids in vegetable oils utilizing different immobilized lipases. *Biotechnol Lett*, v. 37, n. 1, p. 169-74, Jan 2015. ISSN 1573-6776. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214229>>.

WANG, Q. M.; JIA, J. H.; BAI, F. Y. *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 56, n. Pt 1, p. 289-93, Jan 2006. ISSN 1466-5026. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403900>>.

YU, X. W.; XU, Y.; XIAO, R. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. *Prog Lipid Res*, v. 64, p. 57-68, Aug

2016. ISSN 1873-2194. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497512> >.