

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA NOVOZYMES Eversa® UTILIZADA NO PROCESSO ENZIMÁTICO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

ANA PAULA FAGUNDES^{1*}, LETÍCIA RENATA BOHN², GUILHERME MARTINEZ MIBIELLI³, JOÃO PAULO BENDER³

¹Acadêmica de Engenharia Ambiental da UFFS, *campus* Chapecó. Bolsista de Iniciação Científica e Tecnológica PRO-ICT/UFFS, Edital 281/UFFS/2015; ²Acadêmica de Engenharia Ambiental da UFFS, *campus* Chapecó. Estudante Voluntária de Iniciação Científica; ³Professor do curso de Engenharia Ambiental da UFFS, *campus* Chapecó.

*Autor para correspondência: Ana Paula Fagundes (anapaula.caea@gmail.com)

1 Introdução

A busca por fontes de energias alternativas e renováveis vem crescendo a cada ano, devido aos problemas causados pela alta demanda no consumo de combustíveis fósseis e pela questão econômica que estas energias envolvem. No processo atual de produção de biodiesel, a partir da rota catalítica homogênea, devem ser utilizadas matérias-primas com baixa acidez e livres de umidade, ou seja, com alto grau de refino e elevado custo. Neste contexto, o processo enzimático de produção de biodiesel se torna uma grande alternativa, pois possibilita a utilização de matérias-primas alternativas, mais baratas, como óleos e gorduras de descartes industriais. Neste sentido a Novozymes disponibilizou ao mercado no final de 2014, uma solução enzimática para a produção de biodiesel, a qual poderá utilizar qualquer tipo de gordura. No entanto, para a utilização desta solução em processos industriais é necessário o conhecimento das características bioquímicas das enzimas presentes, para que haja utilização em larga escala.

2 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é obter a caracterização bioquímica da solução enzimática comercial Novozymes Eversa® utilizada no processo de produção enzimática de biodiesel.

3 Metodologia

Após a determinação da atividade enzimática, foi realizada a caracterização bioquímica desta solução, através do efeito do pH e temperatura na atividade enzimática. A estabilidade da solução enzimática foi realizada a partir do efeito do pH, temperatura e presença de íons. Também estudou-se a estabilidade da solução enzimática em relação à estocagem. As metodologias utilizadas são de acordo com Pastore, Costa e Koblitz (2003) e Muruci et al (2012), com algumas modificações para a realidade da enzima utilizada.

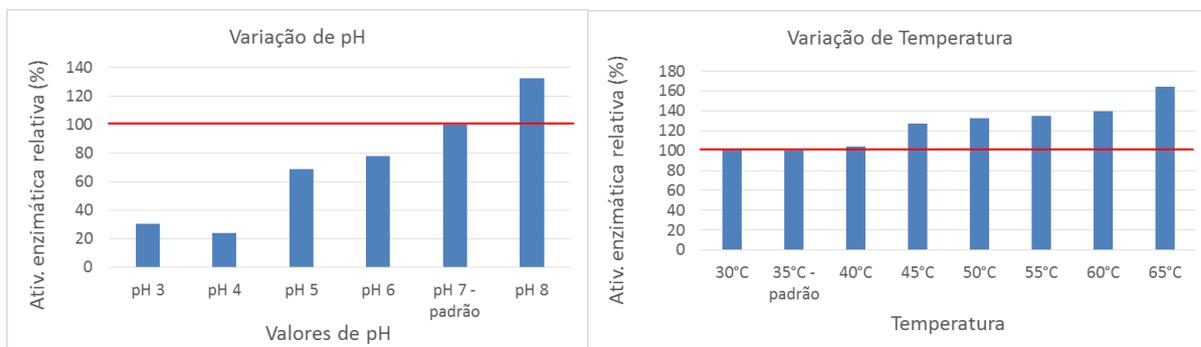
O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado alterando o pH do meio reacional para os seguintes valores: 3,0; 4,0 e 5,0 utilizando tampão acetato de sódio e 6,0; 7,0 e 8,0 utilizando tampão fosfato de sódio. O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado alterando a temperatura da reação para os seguintes valores: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 65°C. Para a avaliação do efeito do pH na estabilidade da solução enzimática, a mesma foi diluída 1:10 com diferentes tampões (tampão acetato de sódio e tampão fosfato de sódio), sendo posteriormente incubada à 35°C. Foram retiradas alíquotas em alguns horários para realizar a atividade enzimática.

Para a avaliação do efeito da temperatura, a solução enzimática foi incubada a 45°C, 50°C, 55°C e 60°C, sendo retiradas alíquotas em alguns horários para ser determinada a atividade residual. Para a avaliação do efeito da interferência de íons na atividade enzimática, adicionou-se no meio reacional CaCl_2 e MgSO_4 em concentrações de 10 e 100 mM, e então mediu-se a atividade enzimática. Para os testes de estabilidade na estocagem, a solução enzimática ficou armazenada em geladeira e em temperatura ambiente, em intervalos de 3, 6, 15, 30, 60 e 90 dias, realizou-se as análises de atividade enzimática residual.

4 Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que conforme se aumenta a temperatura e o pH do meio, há melhora na atividade enzimática. Dessa forma, o pH e a temperatura ótimas são respectivamente 8 e 65°C, conforme pode-se verificar na Figura 1. No entanto, é necessário analisar se a enzima possui resistência nessa faixa de temperatura e pH por um longo tempo, porque o processo de produção de biodiesel necessita de aproximadamente 24 - 48 horas para ocorrer as reações.

Figura 1: Atividade enzimática relativa (%) a partir da variação de pH e temperatura.



Tanto no estudo da estabilidade do pH, como na estabilidade da temperatura não foi possível perceber o comportamento da solução enzimática frente as alterações a qual foi exposta, pois a alta variabilidade dos resultados não permitiu descrever o comportamento da solução enzimática.

Em relação à adição de sais, os resultados foram indistintos. Com a adição do íon $MgSO_4$ a atividade da enzima mostrou melhor rendimento. Porém, no comportamento da solução com o íon $CaCl_2$ na concentração de 10mM a variabilidade novamente deixa dúvida, pois nesse caso a atividade diminuiu com o tempo, mas nesse mesmo sal e com uma concentração maior (100mM) a atividade teve aumento.

Pelos resultados, houve a necessidade de melhorar a metodologia. Então, foram realizadas várias cinéticas de acidez com este objetivo. Através delas, concluiu-se que a emulsão com tampão fosfato prejudicava a atividade da enzima. Assim, para o prosseguimento dos estudos, obteve-se uma nova metodologia:

Deve ser utilizada uma emulsão de óleo de soja (50 g) em água destilada (50 g), a qual deve ser aquecida por 5 minutos na temperatura de 45°C, após adiciona-se 0,05 mL da solução enzimática bruta. A amostra fica em incubação por 10 minutos a 45°C e com agitação de 200 rpm. Posteriormente, aproximadamente 10 g da amostra são centrifugadas por 10 minutos a 4500 rpm. Em seguida, 3 g dessa amostra serão transferidas para um frasco de Erlenmeyer onde será adicionado 50 mL de álcool etílico e 4 gotas do indicador fenolftaleína, para posterior titulação com solução de hidróxido de potássio 0,2 M, até a viragem do indicador.

A atividade enzimática deve ser expressa pela Equação 1:

$$AE \text{ (U/mL)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M_{(KOH)} \cdot 1000}{t \cdot V_c} \quad (1)$$

Onde:

V_a = volume de KOH gasto na titulação após a reação (mL);

V_b = volume de KOH gasto na titulação do óleo de soja puro (mL);

M = molaridade KOH (mmol/mL); t = tempo (min); V_c = volume de enzima (mL).

5 Conclusão

Os resultados demonstram que a solução enzimática Novozymes Eversa® é mais eficiente em temperaturas altas, em torno de 65°C, em pHs também altos, por volta de 8. Porém, quanto a estabilidade da solução enzimática frente à temperatura e pH, e a estabilidade de estocagem, não foram possíveis de serem especificadas devido a alta variabilidade dos resultados. Referente à adição de cofatores, a solução enzimática apresentou melhores resultados de atividade com adição de MgSO₄. Pelo fato da bibliografia encontrada não ser satisfatória, houve a adequação dos métodos utilizados, que mesmo assim apresentaram grande variabilidade de resultados, evidenciando que mais estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Biocombustível; Caracterização enzimática; Biomassa; Energia.

Fonte de Financiamento: PRO-ICT/UFFS – Bolsista Edital 281/UFFS/2015.

Referências:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 11115:** Insumos - Substâncias Graxas - Determinação do índice de acidez. Brasil: Abnt, 2014. 6 p.

MURUCI, L. N. M.; SANTOS, R. R. S.; VIANA, L. A. N.; DAMASO, M. C. T; COURI, S.; PENHA, E. M. Estudo da estabilização a temperatura, pH e a estocagem, de lipase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. **Anais eletrônicos do X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC.** Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77996/1/Resumo-Monica-Damaso-Enzitec-1.pdf>>. Acessado em 18/08/2015.

NOVOZYMES. NEWS. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/news/news-archive/Pages/New-enzyme-technology-converts-waste-oil-into-biodiesel.aspx>>. Acessado em 18/08/2015.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de Lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 23, nº 2, p. 135-140, 2003.