

Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso

Lívia Nolasco Macedo¹, Ana Carolina Pereira de Oliveira², Anna Danielle da Fonseca Ferreira¹, Mônica Caramez Triches Damaso³ e Sonia Couri³

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Tecnologia

BR 465, km, 7 - Seropédica - RJ, 23890-000. E-mail: linolasco@yahoo.com.br

²Universidade Estadual do Norte Fluminense, Ensino à Distância de Biologia, Campos dos Goytacazes, RJ

³Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 – Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP 23020-470. E-mail: scoury@ctaa.embrapa.br

RESUMO

Lipases são enzimas que têm como função catalisar a hidrólise de triglicerídeos gerando glicerol e ácidos graxos livres e, sob certas condições, catalisar a reação reversa de síntese de ésteres por processos tais como esterificação e transesterificação. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de diferentes variáveis de processo na produção de lipase por linhagem fúngica em fermentação semi-sólida. Os experimentos foram realizados segundo planejamento experimental Plackett & Burman. Os meios de cultivo continham farelo de trigo, sulfato de amônio e fontes lipídicas. A fermentação em colunas aeradas foi conduzida a 32°C por 48 horas e as variáveis estudadas foram concentração de inóculo e de fontes lipídicas (óleo de oliva ou borra), umidade e aeração. As variáveis aeração e concentração da fonte lipídica foram estatisticamente significativas ($p < 0.10$) para a produção de lipase em meio contendo borra, enquanto a umidade foi significativa em meio contendo óleo.

Palavras-chave: lipases; fermentação semi-sólida; fungo filamentoso, hidrolases, esterases.

INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3), as quais catalisam a hidrólise de gorduras a monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol (CASTRO, PAULA e BARBOZA, 2005). Além desta função, também são amplamente utilizadas como catalisadores de reações de acidólise, aminólise, interesterificação e principalmente de esterificação e transesterificação, quando presentes em meio orgânico (SAAD et al., 2009). As lipases apresentam aplicações promissoras na área de alimentos, em formulações de detergentes, na indústria óleo-química, na indústria de laticínios, na fabricação de papel, no tratamento de efluentes, e nos setores farmacêutico e cosmético (SHARMA et al., 2001).

Dentre as diversas fontes de obtenção de lipases, as de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, pois apresentam procedimentos mais simples de isolamento, são mais estáveis e com propriedades mais diversificadas que as lipases de outras fontes (CARVALHO et al., 2003). Os fungos filamentosos principalmente aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thermomyces*



são reconhecidos como os melhores agentes microbianos produtores de lipases (CARDENAS et al., 2001). Atualmente, muitas fontes de carbono têm sido estudadas, pois existe grande interesse em encontrar alternativas economicamente mais atrativas para produção de lipases por fermentação semi-sólida, uma vez que como substrato pode-se utilizar os resíduos da agroindústria visando a redução do custo do processo e a preservação ambiental.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência de diferentes variáveis de processo na produção de lipase(s) por uma linhagem fúngica, através de fermentação semi-sólida em colunas aeradas, segundo planejamento experimental do tipo Plackett & Burman.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismo

Fungo filamentososo isolado de amostras de manteiga e selecionado como produtor de lipases, não identificado até o momento.

2. Planejamento Experimental

Dois planejamentos foram realizados utilizando metodologia de Plackett & Burman, um com óleo de oliva e o outro com a borra do refino do óleo de milho. Para cada planejamento foram realizados 12 ensaios e três pontos centrais (13, 14 e 15), como pode ser observado na Tabela 1. Para o estudo das condições da produção de lipases por fermentação semi-sólida foram analisadas quatro variáveis: concentração de inóculo e de fontes lipídicas, umidade e aeração, em três níveis de valores conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1. Planejamento experimental de Plackett e Burman para a produção de lipases de origem fúngica.

Ensaios	Inóculo	Umidade (%)	Aeração (vvm)	Fonte Lipídica (%)
1	1	-1	1	-1
2	1	1	-1	1
3	-1	1	1	-1
4	1	-1	1	1
5	1	1	-1	1
6	1	1	1	-1
7	-1	1	1	1
8	-1	-1	1	1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	-1
11	-1	1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0



Tabela 2. Níveis dos valores das variáveis estudadas durante o processo fermentativo para a produção de lipases de origem fúngica.

Variáveis	-1	0	1
Inóculo	10^6	10^7	10^8
Umidade (%)	40	60	80
Aeração (vvm)	0,5	1	1,5
Fonte Lipídica (%)	0,5	1,5	2,5

3. Produção de Conídios e Preparo do Inóculo para a Fermentação

Meios contendo sabugos de milho foram preparados e inoculados com a cultura fúngica e incubados por 5 dias a 32 °C. Após este período, foram adicionados 20 ml de solução 0,1% de Tween 80 para o desprendimento dos conídios, formando assim uma suspensão (COURI e FARIAS, 1995). O número de conídios/ml da suspensão foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

4. Fontes Lipídicas Utilizadas para a Produção de Lipases

Foram utilizadas duas fontes lipídicas distintas para a produção de lipases: óleo de oliva extra virgem da marca Borges® e borra do refino do óleo de milho proveniente da Indústria Granfino S/A, Nova Iguaçu, RJ, Brasil.

5. Produção de Lipases por Fermentação Semi-Sólida em Colunas Aeradas

Os meios de fermentação foram preparados de acordo com os ensaios do desenho experimental. A matéria prima utilizada foi o farelo de trigo umidificado com solução de sulfato de amônio ajustada a pH 7,0, resultando em uma concentração final de 0,1% de nitrogênio, e adicionados com borra ou com óleo de oliva nas concentrações definidas no planejamento experimental. Os meios foram esterilizados por 15 minutos a 121 °C (COURI et al., 2000). Após a esterilização, os meios foram inoculados com a suspensão do inóculo.

A fermentação foi conduzida em colunas aeradas contendo cerca de 15 g de meio de cultivo inoculado, mantidas em banho termostatizado a 32 °C sob aeração por 48 horas.

6. Extração Enzimática

Após a fermentação, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por grama de meio fermentado, que permaneceu por uma hora em Shaker sob agitação a temperatura de 35 °C. O extrato enzimático obtido e filtrado em papel de filtro foi centrifugado por 10 min. a 6.000 rpm. e em seguida, filtrado em membrana de microfiltração para posterior determinação da atividade enzimática.



7. Determinação de Atividade Lipásica

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, utilizando-se como titulante NaOH 0,05 M (PEREIRA et al. 2001, com modificações.) no equipamento Metrohm Titrino 794®, até pH final de 11,0. A unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácidos graxos por minuto sob condições de ensaio padrão.

8. Determinação da Concentração de Proteína

O teor de proteína foi determinado segundo a metodologia descrita por Lowry et al., (1951).

9. Determinação da Umidade

A umidade foi determinada gravimetricamente através da desidratação da amostra, até atingir peso constante.

10. Análise Estatística

A partir dos resultados obtidos procedeu-se a Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa Statistic 7.0. Em todas as análises, para o valor de $p < 0,10$ as variáveis foram consideradas como significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra os dados de atividade lipásica expressos em U/g de massa seca obtidos nos ensaios contendo óleo de oliva ou borra como fontes lipídicas. A maior atividade lipásica (279,30 U/g) foi obtida no ensaio 11 (0,5% de borra, 0,5 vvm de aeração, 80% de umidade e 10^6 de inoculo), enquanto que a menor atividade (77,60 U/g) foi obtida no ensaio 1 (0,5% de borra, 1,5 vvm de aeração, 40% de umidade e 10^8 de inóculo).

A Figura 2 ilustra os dados de atividade específica expressos em U/g de proteína obtida nos ensaios contendo óleo de oliva ou borra como fontes lipídicas. A menor atividade específica (1372,88 U/g) também foi observada no ensaio 1, contendo óleo de oliva, enquanto que a maior atividade específica (7270,3178 U/g) foi observada no ensaio 11 contendo borra.

Para a produção de lipases contendo óleo como fonte lipídica, verificou-se que a variável umidade do meio de produção foi significativa ($p < 0,10$) de forma positiva, tanto para atividade específica como para a atividade enzimática, enquanto que as variáveis aeração e concentração da fonte lipídica foram significativas ($p < 0,10$) de forma negativa para a atividade enzimática em meio contendo borra, ou seja, esses resultados indicam que a borra, provavelmente, é um indutor da síntese uma vez que a mais alta atividade foi obtida com a menor concentração deste resíduo, ou mesmo que altas concentrações de borra trazem mais inibidores/contaminantes para o meio de produção inibindo desta forma a síntese da enzima.

Quanto o uso do óleo de oliva, os resultados mostraram que a produção da enzima não foi influenciada pela sua presença. Este resultado é importante uma vez que a matéria prima é responsável por uma grande parcela do custo de produção de enzimas. Resultados similares foram obtidos por Kamini et al., (1998) que estudaram diferentes fontes lipídicas para a

produção de lipases por *Aspergillus niger*, e constataram que a adição de óleo de oliva não influenciou significativamente o processo de produção de lipases.

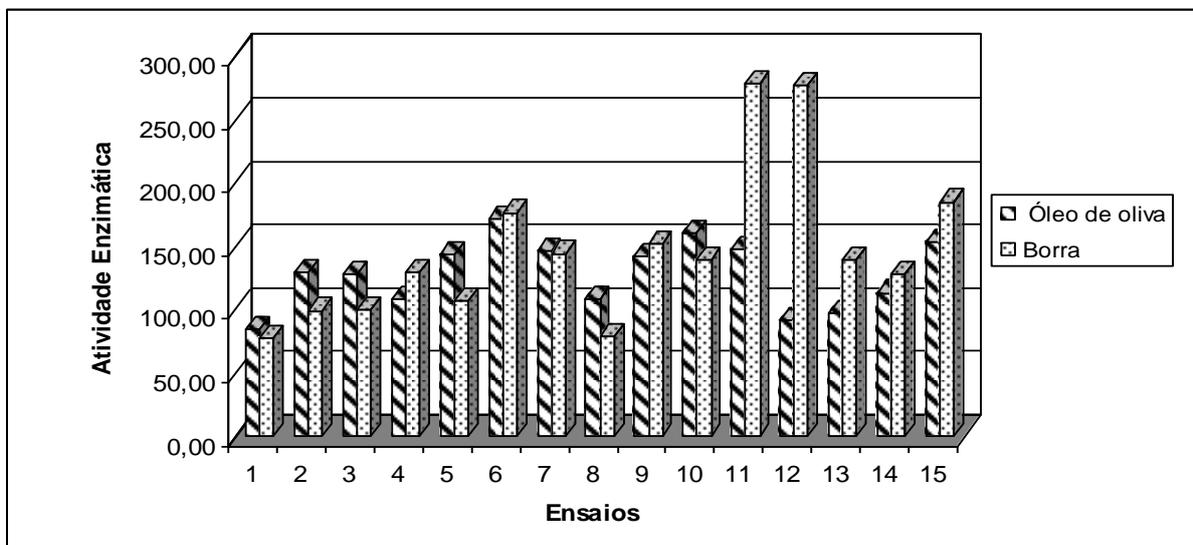


Figura 1: Valores de atividade lipásica U/g de massa seca, utilizando borra e óleo como fontes lipídicas.

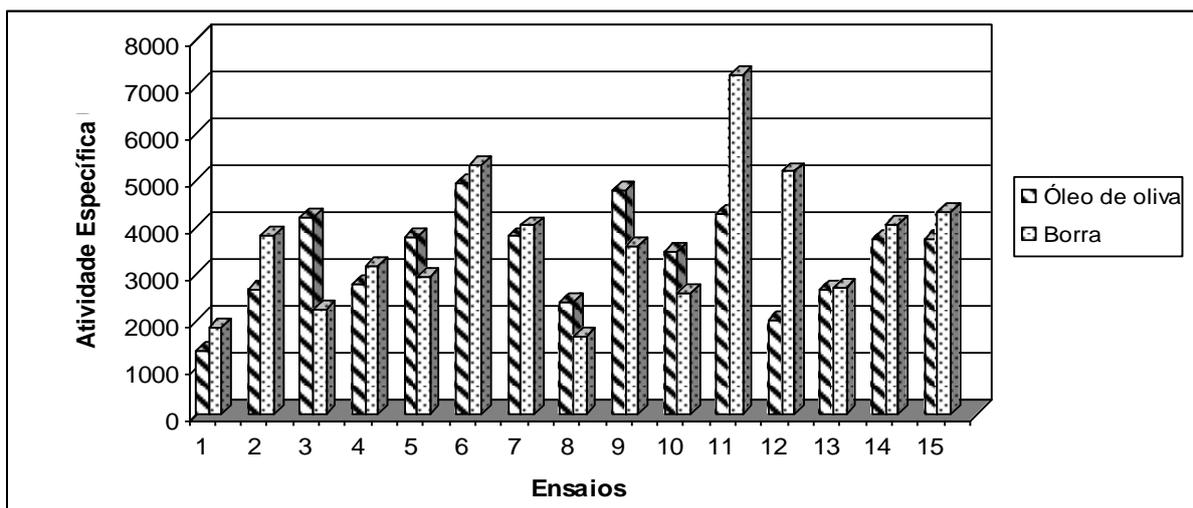


Figura 2: Valores de atividade específica U/g de proteína utilizando borra e óleo como fontes lipídicas.

CONCLUSÕES

Como resultados preliminares, este planejamento experimental indicou quais são as principais variáveis que influenciaram o processo de produção da enzima lipase por um fungo filamentosso isolado do ambiente. O aumento da umidade em meio contendo óleo foi positivo para a produção da enzima enquanto que a concentração da fonte lipídica e a aeração, em meio



contendo borra, influenciaram de forma negativa a produção da enzima significando que o mesmo influencia em baixas concentrações. Os níveis mais altos de atividade lipásica U/g foram obtidos com a adição de 0,5% borra, dessa forma os rejeitos da indústria de refino do óleo de milho podem ser empregados em concentrações baixas para produção de lipases. Pretende-se elaborar outro planejamento experimental alterando os valores da aeração, umidade e concentração da fonte lipídica, visando principalmente a redução dos custos e a otimização da produção da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cardenas, F.; Castro, M.S.; Sanchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Valmaseda, M.; Elson, S.W.; Alvarez, E. (2001), Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzymes and Microbial Technology*, v.28, p. 145-154.
- Carvalho, P.O., Campos, P.R.B., Noffs, M.D., Oliveira, J.G., Shimizu, M.T., Silva, D.M. (2003), Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, n.1, p. 75-80.
- Castro, H.F., Paula, A.V., Barboza, J.C.S. (2005), Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, v. 28, n.5, p.792-796.
- Charney, J. & Tomarelli, R.M. (1947) "A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice". *Journal Biol. Chemistry*, 171, p. 501-505.
- Couri, S.; Farias, A. X. (1995), Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, v.26, n.4, p.314-317.
- Couri, S.; Terzi, S. Da C.; Pinto, G. A S.; Freitas, S. P.; Costa, A. C. A. (2000), Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry, Inglaterra*, v. 36, p. 255-261.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R. E Freire, D.M.G. (1999), Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate, *Process Biochem.* v 35, p 85-90.
- Kamini, N.R.; Mala, J.G.S.; Puvanakrishnan, D. (1998), Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, v.33, p. 505-511.
- Lowry, O.H.; Rosebrough N. J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265.
- Pereira, E. B.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G.M. (2001), Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 91-93, p. 739-752.
- Saad, E. B.; Fernandes, M. L.; Krieger, N.; Mitchell, D. A.; Ramos, L. P. (2009), Etanolise de Óleo de Milho Empregando Lipases de *Burkholderia cepacia*. Biodiesel Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/producao/Eta16.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2009.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Wu, X.; Banerjee, U. C. (2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. v. 19, p. 627- 662.