

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA UTILIZANDO *Aspergillus fumigatus* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE AERAÇÃO

Gabriel Luis Castiglioni, Michael Alves da Silva, Jorge Alberto Vieira Costa*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Curso de Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande

*Email: jorgealbertovc@aol.com

RESUMO

A aplicação de lípases vem crescendo nos últimos anos devido a recentes avanços biotecnológicos que permitiram a produção de enzimas economicamente viáveis. O presente trabalho teve por objetivo produzir e avaliar a produção de lipase de *Aspergillus fumigatus* em diferentes condições de aeração por fermentação semi-sólida. Os experimentos foram realizados em biorreatores de colunas com aerações de 0 a 200 mL_{ar.gmeio}⁻¹.h⁻¹. Os meios de fermentação foram mantidos a 30°C durante 144h, utilizando óleo de soja como fonte adicional de carbono. Foi verificada diferença significativa (p<0,05) nos resultados para as diferentes vazões de ar fornecidas ao meio. As maiores Atividades Enzimáticas encontradas foram nos experimentos sem o fornecimento de ar e com 60 mL_{ar.gmeio}⁻¹.h⁻¹, apresentando Atividades máximas de 112,29 U/g em 96h e 119,46 U/g em 120h, respectivamente. Estes resultados mostram que a ausência de aeração do meio de fermentação pode proporcionar a produção de enzima de maneira a conseguir maior produtividade com um menor custo.

Palavras-chave: enzima, fermentação sólida, fungo filamentososo.

1 INTRODUÇÃO

Devido aos baixos níveis de água no sistema de fermentação semi-sólida, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam capacidade de crescimento nessas condições. Como exemplos, podem ser citados, o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicilium* e *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas (BORZANI *et al.*, 2001). Na fermentação semi-sólida (SSF) os substratos sólidos são constituídos basicamente de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano, mesmo sem adição de nutrientes suplementares (SINGH *et al.*, 2001). Além disso, CASTILHO *et al.* (2000) menciona resultados com respeito a investimentos feitos para a produção de lipases, mostrando a grande vantagem da SSF devido a seu baixo custo envolvido em relação ao processo de fermentação submerso.

A fermentação semi-sólida tem sido muito empregada para processos de bioconversão e possui um grande potencial para produção de enzimas. A aplicação de recursos agroindustriais em bioprocessos, por um lado, fornece alternativa de substrato, por outro ajuda na resolução de problemas de poluição. Devido à rica natureza orgânica, os resíduos agroindustriais podem servir como um substrato ideal para processos microbianos na produção de produtos com alto valor agregado (PANDEY, 2000).

Além das possibilidades de aplicação na indústria, as lipases estão ligadas a deterioração de alguns produtos, principalmente de laticínios e de óleos comestíveis e a identificação e estudo de seu modo de ação podem auxiliar grandemente na solução destes problemas (HIOL *et al.*, 2000 citado por PASTORE *et al.*, 2003).

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são responsáveis pela catalise de reações que envolve hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas. Tais reações fazem com elas sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores. Seu potencial biotecnológico é devido a alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerer a presença de cofatores, possuem uma ampla especificidade pelo substrato e apresentam alta enantiosseletividade (CASTRO & ANDERSON, 1995).

Aproximadamente 20% das biotransformações são provenientes de reações com lipases (KAMIMURA et al, 1999). O uso de lipases microbiana na catalise de reações de interesterificação despertou interesse considerável por causa de suas vantagens em relação à catálise química.

Tendo em vista tais observações o presente trabalho teve por objetivo produzir, avaliar e otimizar a produção de lipase de *Aspergillus fumigatus* em processo de fermentação semi-sólida em diferentes condições de aeração.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

Para a realização dos experimentos foi utilizada a cepa do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, mantido a 4°C em tubos inclinados, com agar batata-dextrose (PDA). A partir de tubos de ensaio contendo o fungo, foi realizada a raspagem dos esporos com Tween80 0,2% e transferida esta suspensão para os frascos de Roux para posterior espalhamento. Os frascos de Roux foram incubados a 30°C durante 7 dias, visando o recobrimento completo da superfície e a esporulação dos microrganismos. Após este período fez-se nova raspagem dos esporos com Tween80 0,2%. A suspensão foi filtrada, visando a eliminação das hifas para posterior contagem dos esporos em Câmara de Neubauer.

As fermentações foram realizadas em colunas encamisadas para manter a temperatura em 30°C. As colunas, com capacidade para 250 g de meio, foram ligadas a rotâmetros, estes por sua vez conectados a filtros revestidos com lã de vidro para purificação do ar. Posteriormente, o ar foi umidificado e transferido para um eliminador de gotas, com o objetivo de manter a umidade do meio constante. O ar foi injetado por bombas de diafragma.

O meio de fermentação utilizado foi o mesmo com que MARTINS *et al.* (2004) obtiveram melhores resultados para atividade lipolítica. O meio é composto por casca e farelo de arroz com granulometria de 420 e 500 mm (Tyler 35 e 32, respectivamente). Além da casca e do farelo de arroz, também fazem parte do meio fermentativo uma solução de nutrientes composta por MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, KH₂PO₄, extrato de levedura e peptona.

A fonte adicional de carbono utilizada foi o óleo de soja, adicionados na proporção de 1% em massa. O fornecimento de 0, 40, 60, 80, 120 e 200 mL_{ar}.g_{meio}⁻¹.h⁻¹ foram avaliados durante a fermentação de 144 h.

As condições físico-químicas utilizadas nas fermentações foram: umidade de 50%; concentração inicial de esporos 4.10⁶ esporos.g_{meio}⁻¹ e pH 4,5.

Os resultados foram avaliados qualitativamente através da confecção do Gráfico de Andrews utilizando software R e em seguida foi feita análise de variância com software Statistica 5.0 for Windows.

2.2 Resultados e Discussão

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de Atividade Enzimática na produção de lipase para as diferentes condições de aeração utilizadas nos experimentos. As melhores

Atividades foram encontradas nos experimentos sem o fornecimento de ar e com $60 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Os valores máximos encontrados foram $112,29 \text{ U/g}$ em 96h e $119,46 \text{ U/g}$ em 120h de fermentação, respectivamente.

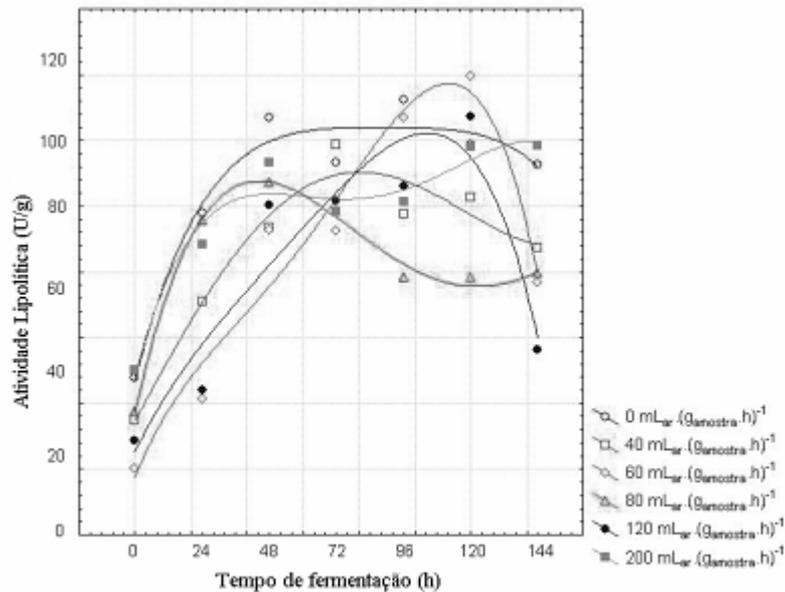


Figura 1 Curvas de Atividade Enzimática em função do tempo de fermentação para as diferentes vazões de ar fornecidas aos meios de fermentação.

Avaliando os resultados qualitativamente, observar-se através do gráfico de Andrews, representado na Figura 2, que há diferença entre os resultados de Atividade Enzimática no decorrer da fermentação para as diferentes vazões de ar fornecidas. Porém ao analisar separadamente os resultados experimentais em que foram utilizadas as aerações de 0 e $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, se percebe uma grande semelhança entre os resultados. Esta semelhança também foi observada entre os experimentos com 60 e $120 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

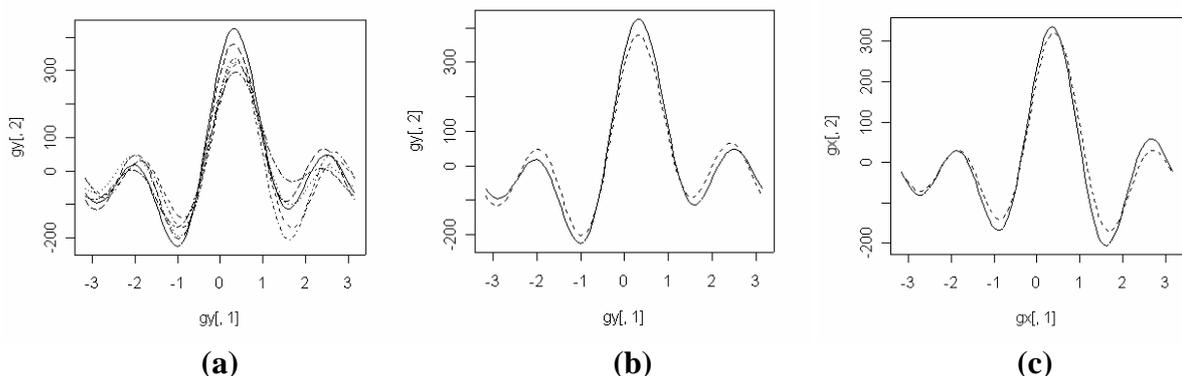


Figura 2 Gráfico de Andrews para os experimentos utilizando 0, 40, 60, 80, 120 e $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (a) e separadamente para os experimentos utilizando as aerações de 0 (linha contínua) e $200 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (linha pontilhada) (b) e 60 (linha contínua) e $120 \text{ mL}_{\text{ar}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (linha pontilhada) (c)

A análise de variância dos resultados mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as aerações utilizadas. Quando se analisou em separado os experimentos os resultados referentes

as aerações 0 e 200 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹, bem como 60 e 120 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹ estes se mostraram estatisticamente iguais p = 0,11 e p = 0,51, respectivamente.

Os resultados de Atividade Lipolítica encontrados nos experimento, mostraram que a ausência do fornecimento de ar e a utilização de 60 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹ favoreceu a produção de lipase pelo fungo *Aspergillus fumigatus*. Apesar da maior Atividade Enzimática encontrada para o experimento com o fornecimento de 60 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹, a diferença de 6% a menos em relação ao que experimento sem aeração só foi alcançado 24h após, o que pode ser vantajoso no que diz respeito a minimização de custos na produção da enzima.

3 CONCLUSÃO

A produção de enzima apresentou diferença estatisticamente significativa quanto as diferentes vazões de ar fornecidas ao meio de fermentação, sendo que as aerações de 0 e 200 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹ e 60 e 120 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹ se apresentaram iguais quando analisadas separadamente. As maiores Atividade Enzimáticas encontradas foram 112,29 U/g em 96h, sem fornecimento de ar e 119,46 U/g em 120h de fermentação, com 60 mL_{ar}·g_{meio}⁻¹·h⁻¹, respectivamente. Desta forma, a utilização do processo de fermentação sem aeração mostra ser promissora como uma alternativa de minimizar custos de produção da lipase produzida por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus fumigatus*.

4 REFERÊNCIAS

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2, Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A., SANT'ANNA, G. L.; FREIRE D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v. 4, p. 239 – 247, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

KAMIMURA, E. S.; MENDIETA, O.; SATO, H. H.; PASTORE, G.; MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum* sp and adsorption studies on affinity resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 103-112, 1999.

SINGH, H.; SONI, S. K. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 37, n. 5, p. 453-459, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153 - 1169, 2000.

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*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. , p. 135 – 140, 2003.