

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE DE *PENICILLIUM* SP. PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Renata Vardanega, Elisandra Rigo, Daniela Remonato, Francieli Arbter, Jorge Ninow, Helen Treichel, Débora de Oliveira, Melania Sychoski e Marco Di Luccio*

*Laboratório de Biotecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-Campus Erechim *Email: diluccio@uricer.edu.br*

RESUMO

A grande versatilidade nas aplicações industriais de lipases leva à necessidade do estudo das suas características, pois enzimas produzidas por diferentes microrganismos podem apresentar características bastante distintas, como estabilidade térmica, constantes cinéticas, temperatura e pH de atuação ótimos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização parcial da lipase do extrato enzimático de *Penicillium* sp. quanto à estabilidade térmica e em relação ao pH. Os maiores tempos de meia-vida foram obtidos a 25°C e pH 7,0. A determinação da temperatura e do pH ótimos para a atividade da enzima também foi realizada, obtendo-se como condição maximizada, 23°C e pH 7,0 em tampão fosfato de sódio 100mM, que resultou na atividade hidrolítica de 19,57 U/mL.

Palavras-chave: *Penicillium* sp., lipase, fermentação, estabilidade.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (E.C.3.1.1.3) são esterases capazes de hidrolisar ésteres insolúveis em água, como triacilgliceróis de cadeia longa, atuando na interface óleo-água, onde ocorre um aumento da atividade da enzima através do mecanismo de ativação interfacial. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso (Pandey et al., 1999).

As lipases microbianas possuem um vasto potencial de aplicação industrial, que envolvem os setores de alimentos, química fina, tratamento de resíduos, couro, cosméticos, farmacêutico e médico (Pandey et al., 1999; Jaeger e Reetz, 1998).

A produção de lipase por fermentação em estado sólido com diferentes substratos sólidos combinados com uma grande variedade de fungos é bem reportada em trabalhos da literatura, bem como as vantagens desta frente à fermentação submersa sob alguns aspectos de processos biotecnológicos (CASTILHO et al., 2000). A produção de lipase de *Penicillium restrictum* utilizando FES e resíduo da indústria de óleo de babaçu é relatada em pesquisas recentes como uma técnica promissora para obtenção da enzima. A forma de obtenção de uma enzima pode alterar importantes características, como estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos de atuação, tornando a caracterização das enzimas extremamente importante. A caracterização de uma lipase de *C. rugosa* relata maior estabilidade térmica a 30 °C, durante

cinco dias (CASA et al., 2006) e, segundo Kumar (2005), a lipase de *B. coagulans* BTS-3 possui estabilidade a 55°C.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar parcialmente a lipase do extrato enzimático obtido de *Penicillium* sp. através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando farelo de soja como substrato.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Produção de lipase por FES utilizando *Penicillium* sp

Os ensaios de produção da lipase foram realizados utilizando o farelo de soja classificado (Tyler 1-115) e as fermentações foram conduzidas por 48 horas em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo de soja com umidade ajustada para 55% com água destilada. Após esterilização (121 °C, 15min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada a 27 °C com injeção de ar umidificado (Vargas, 2004). A extração foi realizada em *erlenmeyers* de 250 mL, pela adição de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 seguida da incubação por 30min a 35 °C e 160 rpm. A dosagem da atividade lipásica foi realizada através de método titulométrico conforme Freire et al. (1997).

2.1.2 Avaliação da estabilidade térmica e ao pH do extrato enzimático de *Penicillium* sp

A determinação da estabilidade em função da temperatura foi realizada incubando-se o extrato enzimático obtido em diferentes temperaturas (25 a 65 °C). Para a determinação da estabilidade em função do pH a extração da enzima do farelo de soja fermentado, foi realizada com diferentes valores de pH, variando de 4,9 a 9. As amostras foram coletadas em diferentes tempos de incubação, e a atividade enzimática determinada conforme Freire et al. (1997). Os resultados obtidos nesses experimentos foram utilizados para calcular a constante de desativação (K_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para cada temperatura e pH estudados.

2.1.3 Determinação da temperatura e pH ótimo para análise da atividade da lipase do extrato enzimático de *Penicillium* sp

A determinação do valor de temperatura e pH ótimo da reação enzimática foi definida através da realização de um planejamento experimental completo 2^2 , com variáveis independentes temperatura (27 a 51 °C) e pH (4,9 a 9,1). A emulsão reacional foi preparada com tampão fosfato em diferentes valores de pH, e a reação enzimática foi realizada a diferentes temperaturas de acordo com o planejamento. A atividade enzimática foi determinada conforme Freire et al (1997).

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Avaliação da estabilidade térmica e ao pH do extrato enzimático de *Penicillium* sp

A estabilidade de uma lipase está relacionada com sua estrutura e pode ser influenciada por fatores como pH e íons metálicos. Na Tabela 1, estão apresentados os valores obtidos para a estabilidade térmica e pH do extrato enzimático incubado sob diferentes temperaturas e pH, onde se verificou uma maior estabilidade em menores temperaturas, no caso, 25 °C e pH 7,0 com tempo de meia-vida de 76,17h (3,17 dias) e cinco horas,

respectivamente . Nas temperaturas de 37 °C e 45 °C a estabilidade da enzima do extrato caiu bruscamente para aproximadamente 1 hora, indicando que a enzima não apresenta uma ampla faixa de estabilidade térmica. Em alguns casos, a estabilidade térmica de muitas lipases pode ser aumentada de maneira expressiva pela imobilização (PANDEY, 1999).

Tabela 1 - Valores experimentais da constante de desativação (K_d) e do tempo de meia- vida ($t_{1/2}$) para o extrato extrato enzimático de *Penicillium* sp em função da temperatura e pH

Temperatura de Incubação (°C)	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	pH de Incubação	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
25	0,0091	76,17	4,9	0,271	2,55
37	0,4475	1,55	5,5	0,746	0,92
45	0,6249	1,11	7,0	0,137	5,07
55	0,8665	0,80	8,5	0,228	3,03
65	1,8739	0,37	9,0	1,324	0,52

2.2.2 Determinação da temperatura e pH ótimos para análise da atividade da lipase do extrato enzimático de *Penicillium* sp

Os resultados obtidos para a determinação da influência da temperatura e do pH na atividade lipolítica do extrato enzimático estão apresentados na Tabela 2. A máxima atividade lipolítica do extrato enzimático foi de 19,57 U/mL, obtida no ensaio 5 nas condições de 23 °C e pH 7.0 do tampão fosfato de sódio 100 mM. No caso da produção de lipase por FES, utilizando *Penicillium simplicissimum* em torta de babaçu, a temperatura ótima utilizada na determinação da atividade consiste em 37 °C, pH 7.0, tampão fosfato de sódio 100 mM (GUTARRA, et al., 2005).

Tabela 2 - Avaliação da influência do pH e temperatura na análise da atividade do extrato enzimático de *Penicillium* sp através da realização do planejamento experimental completo 2²

Ensaio	Condições Experimentais		Atividade lipásica U/mL
	pH	T (°C)	
1	-1 (5,5)	-1 (27)	13,80 ± 0,22
2	-1 (5,5)	1 (47)	15,04 ± 0,90
3	1 (8,5)	-1 (27)	9,30 ± 0,73
4	1 (8,5)	1 (47)	15,17 ± 0,42
5	0 (7,0)	-1,41 (23)	19,57 ± 0,10
6	0 (7,0)	1,41 (51)	16,10 ± 0,64
7	-1,41 (4,9)	0 (37)	14,66 ± 0,33
8	1,41 (9,0)	0 (37)	12,81 ± 1,14
9	0 (7,0)	0 (37)	14,448
10	0 (7,0)	0 (37)	13,517
11	0 (7,0)	0 (37)	13,047

A Figura 1 apresenta o gráfico de Pareto obtido através dos dados do planejamento experimental, apresentados na Tabela 2, onde a análise indica que o pH influencia negativamente na medida da atividade, descaracterizando a tendência de uma lipase alcalina. No entanto, as atividades não diferenciaram de forma abrupta entre si, proporcionando uma maior liberdade na escolha da condição da análise, considerando-se que a temperatura da faixa estudada, não influenciou significativamente na análise da atividade da enzima.

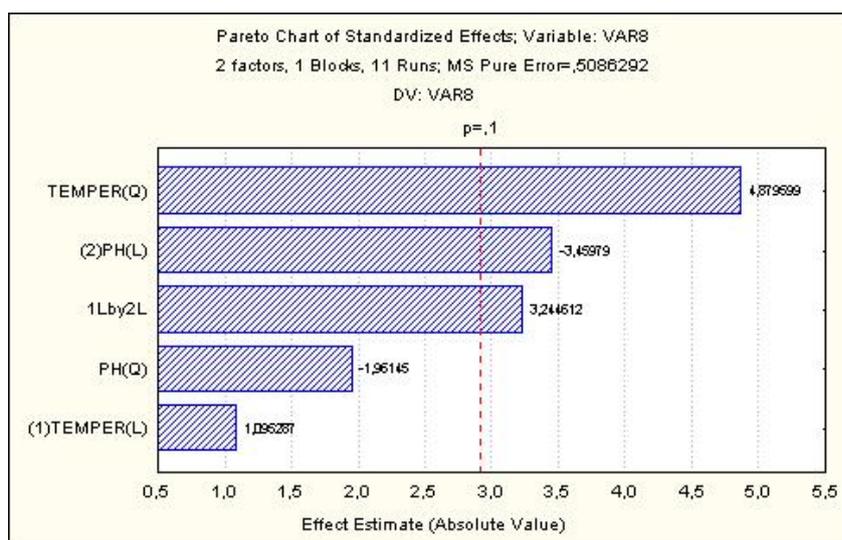


Figura 1 - Gráfico de Pareto para estimativa dos efeitos da temperatura e pH na determinação da atividade enzimática do extrato enzimático de *Penicillium sp*

3 CONCLUSÕES

Os extratos brutos da lipase produzida por fermentação em estado sólido apresentam maior estabilidade em pH 7,0 e 25 °C. A temperatura e pH ótimos para a atividade hidrolítica foram 23 °C e 7,0, respectivamente.

4 REFÊRENCIAS

- CASA, R. M.; SINISTERRA, J. M.; SÁNCHEZ-MONTERO. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. **Enzyme and Microbial Technol**, v. 38, p. 599-609, 2006.
- CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations. **Biochem. Eng. J.**, v. 4, p. 239-247, 2000.
- FREIRE, D. M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 409-421, 1997.
- GUTARRA, M. L. E. et al. Lipase production by solid-state fermentation. **Applied Biochim. and Biotechnol**, p. 121-124, 2005.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KUMAR, S. et al. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expr. Purif.**, v. 41, p. 38-44, 2005.
- PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Agrárias, Erechim - RS, 2004.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Intecnial, CAPES, CNPq, FAPERGS e URI-Campus de Erechim pelo apoio financeiro e bolsas.