

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE PRODUZIDA POR *ASPERGILLUS* SP. VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Aline Milan, Anne Perin, Mônica Bertochi, Telma Elita Bertolin, Christian Oliveira Reinehr, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo
**Email: lmcolla@upf.br*

RESUMO

A utilização de lipase de origem microbiológica vem se expandindo em diversos setores industriais nos últimos anos, devido à principal característica desse tipo de enzima, que é catalisar a reação de hidrólise de lipídios transformando-os em subprodutos como ácidos graxos livres. Objetivou-se estudar o efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase produzida por *Aspergillus* sp em fermentação em estado sólido (FES). A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 1 L, utilizando farelo de soja, em pH 5,0, 60% de umidade, e com adição de 2% de fonte de nitrogênio e indutor (azeite de oliva) a 30 °C durante seis dias. As enzimas foram extraídas com tampão pH preestabelecido e os testes de atividade enzimática conduzidos para a determinação do pH e temperatura ótimos para a obtenção da maior atividade enzimática. Foram testadas as combinações dos pHs 5, 6, 7, 8 e 9 e temperaturas de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. A atividade enzimática foi determinada pelo método de titulometria com NaOH 0,05 N, segundo Burket et al., (2004). A enzima apresentou melhor atividade enzimática em pH 6,0 e temperatura de 35 °C, com atividades lipolíticas em torno de 42,8 $\mu\text{molAG}/\text{min.g}$. A atividade mínima apresentada em pH 6 foi de 32,16 $\mu\text{molAG}/\text{min.g}$ à temperatura de 50 °C. Na temperatura de 30 °C a enzima apresentou dois picos de atividade enzimática, em pH 6,0 (40,62 $\mu\text{molAG}/\text{min.g}$) e pH 8,0 (40,73 $\mu\text{molAG}/\text{min.g}$).

Palavras-chave: temperatura, pH ótimo, lipase.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Lehninger (2002), as enzimas são proteínas altamente especializadas, com função catalítica nos sistemas biológicos. As enzimas têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, ainda, funcionam em soluções aquosas e

em condições muito suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos mostram todas estas propriedades. As lipases são definidas como enzimas que hidrolisam as ligações éster de glicerídeos emulsionados, atuando na interface óleo-água. Estas são encontradas em tecidos vegetais e animais, em líquidos biológicos, sementes, outros órgãos e microrganismos. As lipases são classificadas em relação à especificidade quanto ao tipo de glicerídeo a ser hidrolisado, quanto à posição preferida para hidrolisar, quanto ao ácido graxo presente na posição a ser hidrolisada e quanto à estereoespecificidade (FURLONG, 2000). O objetivo geral do trabalho foi estudar o efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase produzida por *Aspergillus* sp. via fermentação em estado sólido.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Produção das lipases via fermentação em estado sólido (FES)

As lipases foram produzidas através de fermentação em estado sólido utilizando-se o fungo *Aspergillus* sp. O meio padrão utilizado para a fermentação semi-sólida foi composto de 16 g de casca de arroz, 91 g de farelo de trigo e 75 mL de solução salina. Ao meio adicionaram-se 2% das fontes de nitrogênio (nitrato de sódio) e indutor (azeite de oliva). Autoclavou-se a mistura e posteriormente ajustou-se o pH do meio para 5,0. Para o preparo do inóculo, inocularam-se os fungos em erlenmeyers contendo 30 mL de meio ágar-batata-dextrose solidificado. O inóculo foi incubado durante cinco dias a 30 °C. Adicionaram-se aos fungos 20 mL de uma solução de ágar 0,02%, realizando-se a raspagem dos esporos com auxílio de uma alça de Drigalsky. Para a inoculação dos meios utilizaram-se $2 \cdot 10^6$ esporos/g meio.

2.1.2 Extração das lipases do meio fermentado

A extração da lipase produzida realizou-se a partir de 1 g de meio fermentado em 10 mL de solução tampão com pH preestabelecido pelo delineamento experimental, seguido de agitação por 30min a 30 °C. Filtrou-se o extrato obtido e este foi utilizado como extrato enzimático nas reações posteriores.

2.1.3 Influência do pH e temperatura na atividade lipolítica

A influência do pH e temperatura na atividade lipolítica foi avaliada através da realização da reação enzimática nas seguintes combinações de pH e temperatura: pHs 5, 6, 7, 8 e 9 e temperaturas de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C, totalizando 25 condições experimentais. Na determinação da AL foi adotado o método descrito por Burkert et al (2004), o qual baseia-se na titulação com NaOH 0,05 mol.L⁻¹ dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase presente no extrato enzimático da fermentação, sobre os triacilglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica. Em frascos de 125 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 10 mM com pH 7,0 e 5 mL de emulsão de azeite de oliva (75% de solução de goma arábica 7% e 25% de azeite de oliva). A este sistema foi adicionado 1 mL de extrato enzimático da fermentação e incubado a 37 °C por 30min a 160 rpm. Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 20 mL de solução acetona:etanol:água 1:1:1 v/v e os ácidos graxos liberados titulados com uma solução de NaOH 0,05 mol.L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de

lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera $1\mu_{\text{mol}}$ de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado nas condições descritas.

2.2 Resultados e discussão

A lipase produzida demonstrou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura de 35 °C, apresentando ainda elevadas atividades entre temperaturas de 30 °C e 35 °C (Figura 1) com valores de atividade lipolítica em torno de $42,819\mu_{\text{molAG}}/\text{min.g}$. A atividade lipolítica mínima em pH 6,0 foi de $32,16\mu_{\text{molAG}}/\text{min.g}$ à temperatura de 50 °C.

A Figura 1 mostra que a atividade lipolítica da enzima é crescente em pH 5,0-6,0; diminuindo em pHs superiores ao ótimo encontrado para a mesma, para qualquer temperatura avaliada, exceto em pH 9,0 e temperatura de 40 °C e pH 8,0 e temperatura de 30 °C. Em relação às atividades obtidas em pH 9,0, foram baixas em todas as temperaturas, com exceção da temperatura de 40 °C; em relação à temperatura de 30 °C, observaram-se dois picos de atividade em pH 6,0 e pH 8,0. Há relatos que em pH alcalino a atividade lipolítica pode sofrer alterações, como foi observado por Camargo et al. (2003), que, estudando a atividade lipolítica de lipases microbianas, observou que estas apresentaram elevadas atividades lipolíticas em pHs entre 9,0 e 9,5. Fato comprovado por Schuepp et al. (1998), citado por Maldonado et al (2005), que obtiveram e caracterizaram lipases intra e extracelulares de *Pseudomonas fragi* CRDA 037, encontrando uma faixa de pH ótimo para ambas as lipases entre 8,7 e 9,0. E ainda, Maldonado et al. (2005), citando Saxena et al. (2003), constataram que, a partir da lipase de *Aspergillus carneus* purificada por cromatografia de interação hidrofóbica, pode-se obter pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37 °C, respectivamente.

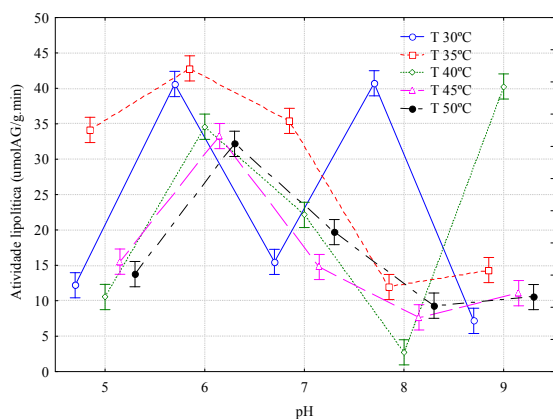


Figura 1 - Atividade lipolítica versus pH em diferentes temperaturas para as lipases produzidas por *Aspergillus* sp em fermentação em estado sólido

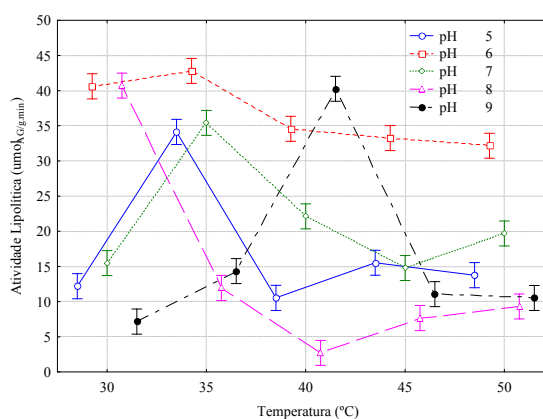


Figura 2 - Atividade lipolítica versus temperatura em diferentes pHs para as lipases produzidas por *Aspergillus* sp em fermentação em estado sólido

Analisando a Figura 2, pode-se observar que em pH 5 a atividade aumenta a temperatura entre 30 °C e 35 °C. Já em pH 6, a enzima é termicamente estável, pois sua atividade não é influenciada pelo aumento de temperatura. Com pH 7 a enzima apresentou um pico de atividade à temperatura de 35 °C, decaindo em temperaturas superiores, apresentando uma pequena elevação de atividade a 50 °C. A atividade lipolítica em pH 8,0 foi considerável apenas a 30 °C, sendo baixa em relação aos demais pHs estudados em temperaturas superiores a esta. Observa-se também que em pH 9 a enzima apresenta atividades enzimáticas mínimas entre 30 °C e 35 °C e 45 a 50 °C, apresentando atividade máxima na temperatura de 40 °C.

3 CONCLUSÃO

A lipase produzida pelo fungo *Aspergillus* sp via fermentação em estado sólido apresentou máxima atividade enzimática em temperatura de 35 °C e pH 6,0

4 REFERÊNCIAS

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

CAMARGO de MORAIS, M. M. et al. Oil/mineral-salts médium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 17-20, 2003.

FURLONG, E. B. **Bioquímica: um enfoque para alimentos**. Rio Grande: Edgraf, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Tradução da 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MALDONADO, R. R. et al. Determinação da temperatura e pHs ótimos das lipases bruta e purificada de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, XV. **Anais...** Recife, p. 76-80, 2005.