

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Mirela Roveda¹, Luciane M. Colla², Marcelo Hemkemeier^{1,2*}

¹ Mestrado em Engenharia: Infra-estrutura e Meio Ambiente, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, *Email: marceloh@upf.br

² Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Email: lmcolla@upf.br

RESUMO

A produção enzimática é um dos campos mais promissores para a síntese de compostos de alto valor agregado, estando em constante crescimento pela grande capacidade dos microrganismos de realizarem transformações químicas. As enzimas produzidas por processos fermentativos tem sido utilizadas para o controle ambiental de vários ecossistemas, sendo que muitas podem ser produzidas a partir de resíduos industriais, diminuindo os custos de produção. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de longas cadeias de triglicerídeos transformando-os em glicerídeos e ácidos graxos. Para a produção de lipases utilizaram-se nove fungos, selecionados devido à habilidade de crescimento em meio ágar-batata-dextrose (ABD) adicionado de 5% de azeite de oliva, denominados E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₇, E₂₀ e E₂₁, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*. A produção de lipases foi realizada via fermentação submersa, utilizando-se como meios de cultivo os efluentes coletados na saída do equalizador e aerador do sistema de tratamento de efluentes, acrescido de nutrientes. A fermentação foi realizada a 30 °C em agitador orbital. Amostras foram coletadas diariamente para a determinação da atividade lipásica. Os fungos E₉ (*Aspergillus*), E₂₁ (*Aspergillus*) e E₂₀ (*Penicillium*) foram os que apresentaram as maiores atividades lipolíticas, de 1,250 a 2,250 μmolAG/mL.min.

Palavras-chave: produção de enzimas, efluente agroindustrial e lipídios.

1 INTRODUÇÃO

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, especialmente em áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesses estão as reações de hidrólise, as de síntese e as de interesterificação de lipídeos por meio das lipases. O elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua régio e enantiosseletividade. O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial. As lipases vêm conquistando uma faixa de mercado crescente das enzimas industriais.

As enzimas são produzidas na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da hidrólise do mesmo, que podem ser adicionados ao meio de várias maneiras.

A utilização de enzimas no tratamento de efluentes tem sido alternativa ao tratamento convencional de efluentes e tem despertado grande interesse para pesquisa em razão das vantagens apresentadas.

As enzimas apresentam uma importância particular pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura. A utilização das lipases reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e desobstrui filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos.

Objetivou-se a produção de lipases em fermentação submersa utilizando-se como meio de cultivo efluente de laticínios.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Produção de lipases via fermentação submersa

2.1.1.1 Microrganismos

Utilizaram-se os microrganismos E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₇, E₂₀ e E₂₁, pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, para a produção de lipases via fermentação submersa.

2.1.1.2 Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos foi realizado em placas de Petri contendo meio ABD. As placas foram incubadas por sete dias em estufa a 30 °C. A inoculação dos meios foi realizada adicionando-se 5 mL de suspensão de esporos para cada 200 mL de meio de cultivo.

2.1.1.3 Meio de cultivo e condições experimentais

O meio de cultivo utilizado nas fermentações foi o efluente de laticínios coletado na saída do equalizador e na saída do aerador de uma estação de tratamento de efluentes, adicionados dos nutrientes: nitrato de sódio (NaNO₃) 0,1%, fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 0,1%, sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) 0,05% e azeite de oliva como indutor. O pH foi ajustado a 6,5 com H₂SO₄ 1,5 M.

Os experimentos foram realizados em duplicata em erlenmeyers de 500 mL, com volume inicial de meio de 200 mL, em agitador orbital a 30 °C por quatro dias, com agitação de 130 rpm. Amostras de 10 mL foram coletadas no tempo inicial e a cada 24h, para avaliação da atividade lipolítica.

2.1.1.4 Atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica, 10 mL de meio fermentado foram filtrados para a retenção dos sólidos, e o filtrado utilizado como extrato enzimático.

A determinação da atividade lipolítica baseou-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. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade enzimática necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto por mL de meio fermentado, nas condições do ensaio (BURKERT et al., 2004). A produtividade enzimática máxima foi calculada através da

Equação 1.
$$Pe = \frac{Ae_{max} - A_{eti}}{t} \quad (1)$$

Pe = produtividade enzimática

A_{emax} = atividade enzimática máxima

A_{eti} = atividade enzimática tempo inicial

t = tempo em que foi observada a atividade enzimática máxima

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Atividade lipolítica

A Tabela 1 apresenta as máximas atividades lipolíticas (U) obtidas, o tempo de fermentação em que foi observada a máxima atividade e a produtividade máxima para os fungos e meios utilizados.

Tabela 1 - Máximas atividades lipolíticas, tempo de fermentação e produtividade máxima obtidos durante a fermentação submersa

Fungo	Ponto de coleta do efluente	Atividade lipolítica máxima (U)	Tempo de fermentação (d)	Produtividade máxima* ³ (U/d)
E6		0,496	1	0,068
E7		0,579	1	0,151
E8		0,744	1	0,316
E9	Saída	1,250	2	0,411
E10	equalizador	0,750	4	0,081
E12	(P3)* ¹	-	-	-
E17		0,667	1	0,239
E20		2,042	2	0,807
E21		2,250	4	0,456
E6		0,597	1	0,321
E7		-	-	-
E8		-	-	-
E9	Saída aerador	-	-	-
E10	(P6)* ²	0,500	2	0,121
E12		0,417	1	0,159
E17		0,333	2	0,038
E20		0,333	1	0,075
E21		-	-	-

*¹ AE inicial = 0,428(U); *² AE inicial = 0,258(U); *³ $Pe = Ae \max - Aeti/t$

Verifica-se na Tabela 1 que as maiores atividades lipolíticas foram obtidas utilizando-se o efluente coletado na saída do equalizador (P3) como meio de cultivo para a produção de lipases, a partir dos fungos E9, E20 e E21, de 1,250, 2,042 e 2,250 $\mu\text{molAG/mL}\cdot\text{min}$, respectivamente. Entretanto, verifica-se que para os fungos E9 e E20 a atividade máxima foi obtida em dois dias de fermentação, ao passo que para o fungo E21 a atividade máxima foi obtida no tempo de quatro dias. Desta forma, a produtividade máxima em lipases, de 0,807 U/dia, foi obtida com o fungo E20, em 2 d de fermentação.

O fungo E20 foi classificado como do gênero *Penicillium*, ao passo que os fungos E9 e E21 como do gênero *Aspergillus*, sendo ambos reportados como bons produtores de lipases por Carvalho et al., (2005); Hasan et al., (2005); Mendes e Castro, (2003).

Vários autores, como Mahadik et al. (2002), Baron et al. (2005), utilizaram o azeite de oliva como indutor da produção de lipases por fungos, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. Segundo Carvalho et al. (2005), os valores da atividade enzimática na hidrólise do azeite de oliva têm sido amplamente utilizados para efeito de comparação e seleção de cepas produtoras de lipase. Esses valores podem variar significativamente dependendo do tipo de fermentação, da composição do meio de cultivo e também de outras variáveis do processo fermentativo, tais como pH, temperatura de incubação e presença de indutores da síntese de lipase como os óleos vegetais. Entretanto, o custo da adição de azeite de oliva como indutor é elevado se for considerada a produção de enzimas em larga escala. Desta forma, pode-se estudar a utilização de outros indutores, tais como o óleo de soja proveniente de frituras, o qual seria facilmente obtido, visto ser um resíduo de restaurantes e indústrias alimentícias.

Baron et al. (2005) estudaram a produção de lipases por *Penicillium corylophilum* IOC 4211 em dois meios de cultivo. O primeiro continha 0,2% KNO_3 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,043% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,11% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,015% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,25%

(NH₄)₂SO₄; 0,5% de extrato de levedura; 2% de peptona de carne e 1% de óleo de oliva. Já o segundo meio de cultivo continha 0,14% de NH₄NO₃; 0,073% MgSO₄.7H₂O; 0,067% KH₂PO₄; 0,01% ZnSO₄.7H₂O; 0,0007% FeSO₄.7H₂O; 0,067% de glicose e 2% de óleo de oliva. As atividades enzimáticas obtidas com o segundo meio de cultivo foram superiores, de 7,1 U.mL⁻¹ após seis dias de fermentação a 29°C e 120 rpm. Já com o primeiro meio de cultivo, o qual era mais simples, obteve-se atividade máxima de 3,25 U/mL após três dias de fermentação. Os meios de cultivo utilizados pelos autores são meios com maior quantidade de nutrientes que o meio de cultivo utilizado para a produção de lipases nesta pesquisa, onde se utilizou o efluente de laticínios adicionado de nutrientes (nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio e azeite de oliva), o que justifica as menores atividades enzimáticas obtidas. O meio de cultivo utilizado neste trabalho consiste em um meio barato, visto ser um efluente. Novas pesquisas podem ser realizadas a fim de otimizar a produção de lipases pelos fungos selecionados, estudando-se a adição de outros nutrientes ao efluente, temperaturas de produção, pH, concentração de oxigênio dissolvido, entre outros.

O melhor meio de cultivo para a de produção de lipases foi o efluente da saída do equalizador (P3), o que pode ser justificado pelas maiores quantidades de matéria orgânica, DQO, de 835,97 ± 17,26 mg/L, e fósforo (0,26 ± 0,04 mg/L) encontradas neste efluente, em comparação com o efluente coletado na saída do aerador, o qual apresentou DQO de 115,90 ± 61,37 mg/L e concentração de fósforo de 0,06 ± 0,01 mg/L. O nitrogênio é um nutriente essencial para a formação estrutural dos fungos, bem como para a produção de enzimas, visto estas serem constituídas de aminoácidos, os quais apresentam nitrogênio na sua estrutura.

3 CONCLUSÃO

A maior produção de lipases ocorreu com a utilização do efluente da saída do equalizador. O uso do próprio efluente na produção de lipases constitui uma alternativa para a diminuição dos custos de produção desta enzima, aliado ao fato do aproveitamento do efluente. A produção de lipases utilizando o efluente é viável, uma vez que esta apresenta elevada carga de nutrientes ainda disponíveis para o crescimento fúngico e produção de enzimas. A presença de lipídios no efluente possibilita a produção das lipases, uma vez que estes são utilizados como fonte de carbono para o crescimento fúngico. Além disso, o meio de cultivo é de baixo custo, e as lipases produzidas podem ser utilizadas posteriormente no tratamento de efluentes.

4 REFERÊNCIAS

- BARON, A. M. et al. **Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, XV, Recife, 2005.
- BURKERT et al. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, issue 1, p. 77-84, jan. 2004.
- CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lípases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing Gum Arabic emulifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.