

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Silvia Benedetti, Raquel Aparecida Loss, Marieli de Lima, Andreiza Lazarotto Primaz, Telma Elita Bertolin, Luciane Maria Colla*

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

**Email: lmcolla@upf.br*

RESUMO

A fermentação submersa é um processo em que os nutrientes encontram-se dissolvidos em um meio líquido no qual o microrganismo é introduzido na forma de inóculo. As lipases são enzimas que hidrolisam triacilgliceróis, liberando mono e diacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres. Elas são utilizadas na indústria de alimentos em reações de interesterificação e transesterificação, para a modificação de gorduras, entre outros. Objetivou-se a seleção de microrganismos produtores de lipases via fermentação submersa. Foram testados 27 fungos, pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Para o preparo do meio de cultivo, 100 g de farelo de trigo foram submetidos à cocção em 500 mL de água destilada, filtrados, adicionados de 100 mL solução salina, 1% de nitrato de sódio e 1% de azeite de oliva como indutor para a produção de lipases. Completou-se o volume até 1 L. As fermentações foram realizadas em duplicata durante sete dias a 30 °C. A cada 24 horas, coletaram-se amostras para determinação da atividade lipolítica, quantificada através de titulação com NaOH 0,05 mol⁻¹ dos ácidos graxos liberados pela ação das lipases produzidas na fermentação em um sistema de reação com o extrato enzimático, tampão e emulsão contendo trioleína como substrato. Foram selecionados como bons produtores de lipases dois fungos, pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais apresentaram atividade lipolítica máxima de 2,808 U e 2,840 U, respectivamente.

Palavras-chave: fungos; atividade lipolítica; enzimas.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação submersa é um dos métodos de produção de substâncias e compostos de interesse, que surgiu em escala industrial na Segunda Guerra Mundial, devido a necessidade de produção de penicilina em grande escala. Por isso, este método de fermentação é o mais desenvolvido e é utilizado para a produção de inúmeros bioprodutos por oferecer várias vantagens, como melhor controle do processo, pH, temperatura, aeração e agitação para homogeneidade, entre outras (SCHIMIDELL et al., 2001).

As lipases são enzimas que hidrolisam ligações nos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres e glicerol. Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza em

animais, vegetais e microrganismos. As lipases microbianas demonstram um enorme potencial biotecnológico, por apresentarem fatores peculiares como estabilidade em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem especificidade de substrato e exibem alta enantioespecificidade e enantioespecificidade (ELIBOL; OZER, 2000).

As lipases encontram inúmeras aplicações na indústria de alimentos, como fabricação de óleos e gorduras, margarinas, gorduras dietéticas, melhoramento da qualidade da gordura utilizada na fabricação de chocolates, no melhoramento da textura das massas, aumento do aroma e da vida de prateleira de produtos de panificação, no desenvolvimento de aromas, remoção do excesso de gordura e redução do período de maturação na indústria de carnes, na hidrólise da gordura do leite e redução do tempo de maturação do queijo na indústria de laticínios, na aceleração da fermentação de lipídios na indústria cervejeira, na produção de essências, entre outros. Também apresentam aplicações no tratamento de efluentes ricos em ácidos graxos onde são utilizadas na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais como as indústrias beneficiadoras de óleo (SHARMA et al., 2001). A seleção de microrganismos produtores de lipases também se justifica pelo fato de que as lipases produzidas por diferentes microrganismos podem apresentar diferentes características de reação, podendo ser selecionadas lipases termoestáveis ou atuantes em pHs extremos, além de poderem apresentar diferentes especificidades por substratos ou reações.

Objetivou-se a seleção de fungos produtores de lipases via fermentação submersa.

Excluído: no

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Microrganismos

Utilizaram-se 27 fungos, pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*.

2.1.2 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo foi realizado através da inoculação dos fungos em placas de Petri contendo o meio ágar-batata-dextrose (ABD) solidificado e incubação a 30 °C por cinco dias. Após o crescimento, preparou-se uma suspensão de esporos com uma solução 0,1% de Tween 80 e filtrou-se em gaze estéril para retenção das hifas. A inoculação dos meios foi realizada adicionando-se 5 mL de suspensão de esporos para cada 100 mL de meio líquido.

2.1.3 Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados em duplicata, em *erlenmeyers* com 100 mL de meio inicial, sendo incubados durante sete dias a 30 °C, em agitador orbital com agitação de 160 rpm. A cada 24 horas, foram coletadas amostras para a determinação da atividade lipolítica. O meio de cultivo foi preparado pela cocção de 100 g de farelo de trigo em água destilada com posterior filtração, adição de 100 mL solução de nutrientes, 1% de nitrato de sódio e 1% de azeite de oliva, seguida da avolumação até 1 L. Autoclavou-se e ajustou-se o pH do meio para 6,0.

Na determinação da atividade lipolítica (AL) adotou-se 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

triacilglicerídios do azeite de oliva emulsionados em goma arábica. Em *erlenmeyers*, adicionaram-se 2 mL de tampão fosfato 10 mM com pH 7,0 e 5 mL de emulsão contendo goma arábica e azeite de oliva. A este sistema adicionou-se 1 mL de extrato enzimático da fermentação e incubou-se a 37 °C por 30min a 160 rpm. Após a incubação a reação foi inativada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água 1:1:1 v/v, e os ácidos graxos liberados foram 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 μ mol de ácido graxo por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições descritas.

2.2 Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta as atividades lipolíticas máximas dos fungos testados, com sua identificação e gênero. As fermentações foram realizadas em duplicata e o tempo indica o dia de obtenção de maior atividade lipolítica.

Tabela 1 - Atividade lipolítica máxima obtida por fungos em fermentação submersa

Fungo		Atividade Lipolítica máxima (U)*			
Identificação	Gênero	Fermentação 1 A		Fermentação 1 B	
		Máxima atividade (U)	Tempo (d)	Máxima atividade (U)	Tempo (d)
O1	<i>Aspergillus</i>	1,188 ± 0,054	5	1,073 ± 0,000	5
O2	<i>Levedura</i>	1,186 ± 0,000	1	1,271 ± 0,120	1
O3	<i>Penicillium</i>	1,150 ± 0,000	5	1,227 ± 0,000	5
O4	<i>Aspergillus</i>	1,457 ± 0,108	5	1,303 ± 0,108	7
O5	<i>Aspergillus</i>	0,537 ± 0,108	4	0,537± 0,108	4
O6	<i>Penicillium</i>	1,144 ± 0,120	5	1,144 ± 0,120	5
O8	<i>Aspergillus</i>	2,181 ± 0,063	5	1,603 ± 0,125	5
E1	<i>Fusarium</i>	1,186 ± 0,120	7	0,508± 0,000	4
E2	NI	0,763 ± 0,120	4	0,678 ± 0,000	1
E3	<i>Penicillium</i>	2,203 ± 0,000	3	1,907 ± 0,060	3
E4	NI	0,593 ± 0,000	3	0,763 ± 0,120	5
E5	<i>Fusarium</i>	2,796 ± 0,000	3	0,424 ± 0,120	1
E6	<i>Aspergillus</i>	1,229 ± 0,000	5	1,229 ± 0,000	5
E7	NI	0,537 ± 0,054	2	0,623± 0,126	5
E8	<i>Aspergillus</i>	1,229 ± 0,000	5	1,144± 0,120	5
E9	<i>Aspergillus</i>	0,508 ± 0,000	5	0,763± 0,000	3
E10	<i>Aspergillus</i>	1,102 ± 0,120	3	0,763 ± 0,120	3
E11	NI	0,975 ± 0,120	7	0,890 ± 0,000	7
E12	<i>Penicillium</i>	0,508 ± 0,000	1	0,297 ± 0,060	3
E13	<i>Trichoderma</i>	0,623 ± 0,125	7	0,997 ± 0,108	1
E14	<i>Fusarium</i>	0,508 ± 0,000	2	0,254± 0,120	2
E16	NI	1,695 ± 0,000	7	1,525 ± 0,120	4
E17	<i>Aspergillus</i>	0,690 ± 0,108	1	0,534 ± 0,125	5
E18	NI	1,059 ± 0,000	5	1,271± 0,120	7
E19	<i>Aspergillus</i>	0,932 ± 0,100	7	1,652 ± 0,120	5
E20	NI	2,671± 0,125	5	0,890 ± 0,125	5
E21	<i>Aspergillus</i>	0,801± 0,251	5	0,345 ± 0,108	2

Resultados de média ± desvio-padrão.

NI: não identificado.

Os fungos que apresentaram as maiores atividades lipolíticas (quais? Tabela 1) foram utilizados em uma segunda fermentação realizada nas mesmas condições apresentadas nos materiais e métodos. As Figuras 1 e 2 apresentam as atividades lipolíticas *versus* tempo para os fungos utilizados na segunda fermentação.

Excluído:

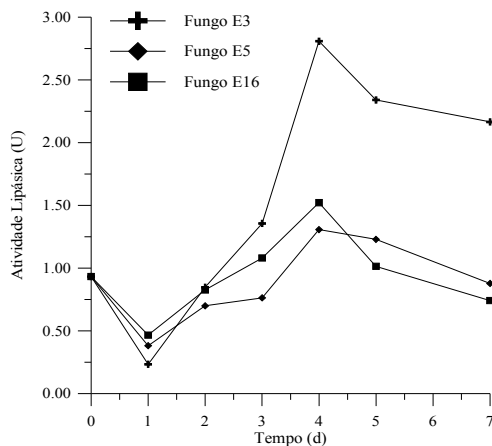


Figura 1 - Atividades lipolíticas máximas para os fungos E3, E5 e E16

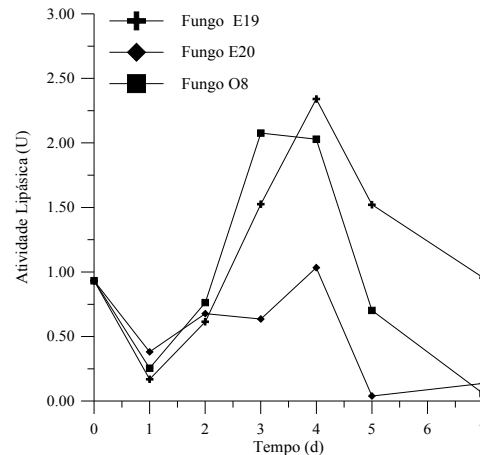


Figura 2 - Atividades lipolíticas máximas para os fungos E19, E20 e O8

De acordo com as Figuras 1 e 2, os fungos que apresentaram atividades lipolíticas máximas foram os fungos E3 (2,808 U) e E19 (2,340 U), pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo selecionados como bons produtores de lipases. Estes resultados estão de acordo com os obtidos Maldonado (2006) e Gulati et al. (2000) que relataram atividades de 2,63 U e 7 U em fermentações submersas utilizando os fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus terreus*, respectivamente.

3 CONCLUSÃO

Foram selecionados dois fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como bons produtores de lipase via fermentação submersa.

4 REFERÊNCIAS

- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.
- GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 149-155, 2000
- MALDONADO, R. R. Produção, purificação e caracterização da Lipase de *geotrichum candidum* obtida a partir de Meios industriais: 2006. Disponível em: <<http://www.fea.unicamp.br>>. Acesso em: 3 abr. 2007.
- SHARMA, R. et al. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 2.