

Área: Engenharia de Alimentos

ANÁLISE DO POTENCIAL DA LEVEDURA *Sporobolomyces ruberrimus* COMO PRODUTORA DE LIPASES

Lenir Rigoli Ferraz*, Daniela Santos de Oliveira, Marcella Fernandes Silva, Sheila Maria Predabon, Helen Treichel, Débora de Oliveira

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, URI-Erechim

*E-mail: lenir.r.ferraz@ibest.com.br

RESUMO

A lipase produzida por uma nova cepa isolada de *Sporobolomyces ruberrimus* apresenta habilidade catalítica potencial para reações de esterificação. As mais altas atividades foram de 116,35; 128,88 e 269,39 U/g de substrato seco (gss) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente. Para os testes de fermentação, três substratos foram investigados: farelo de arroz, de soja e bagaço de cana.

Palavras-chave: lipase, microrganismo, fermentação e estado sólido (FES), resíduos agroindustriais.

1 INTRODUÇÃO

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal. A principal função biológica da lipase (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos. Ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases demonstram níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, o que facilita a catálise de muitas reações, tais como esterificação e transesterificação (Diaz, 2006).

As lipases de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas devido à versatilidade da estrutura molecular e propriedades catalíticas. Até a presente data as lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais

fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente (Treichel et al., 2010). Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas altamente ativas com propriedades apropriadas encoraja a pesquisa por novas fontes de enzimas (Kumar e Gupta, 2008)

Este trabalho tem como justificativa a pesquisa de novas linhagens de micro-organismos produtores de lipases em fermentação em estado sólido (FES) a partir de resíduos agroindustriais, viabilizando assim, a produção da enzima

O objetivo deste trabalho foi produzir lipases por FES utilizando como substratos resíduo agroindustriais avaliando a cepa *Sporobolomyces ruberrimus* como produtora da enzima Três resíduos indústrias foram utilizados para produção de lipase.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Materiais

Os resíduos agroindustriais (farelo de soja, de arroz, e o bagaço de cana) foram fornecidos por empresas da região sul. A levedura *Sporobolomyces ruberrimus* foi isolada no laboratório de Biotecnologia de Alimentos da URI-campus de Erechim e inoculada em meio PC. Após fermentação avaliou-se a atividade de esterificação no extrato bruto liofilizado.

2.1.2 Preparo do Inóculo da Levedura

O meio para o inóculo da levedura constituiu de meio PC (%m/v em água destilada 0,5% triptona; 0,1% de glicose; 0,25% extrato de levedura). O pré-inóculo foi preparado em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio estéril, inoculados com 1mL de suspensão da referida cepa e incubados por 24 horas a 25°C . Frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio estéril foram inoculados com o pré-inóculo e incubados por mais 24h em shaker a 30° C e 150 rpm .O caldo obtido foi utilizado como inóculo dos resíduos agroindustriais. A densidade ótica da suspensão celular foi determinada a 650 nm, após centrifugação (12100xg / 10 min) e lavagem com água destilada.

2.1.3 Fermentação em Estado Sólido

Os farelos foram conduzidos por 120h em béquer de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de cada farelo seco com umidade ajustada para 55% em forma de inóculo, após esterilização (121°C, 15 min). Os béqueres foram incubados a 27 °C, em câmara climatizada (Tecnal TE-410).

2.1.4 Teste Enzimático

O processo de extração foi realizado em erlenmeyeres de 250 mL, onde ao meio fermentado era adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 na razão 1:4 (10 g de farelo fermentado para 40 mL de tampão). Estes frascos foram incubados por 30 min a 35 °C e 160 rpm em Shaker. Após incubação, as amostras foram filtradas, utilizando-se tecido de nylon e pressão manual obtendo-se o extrato bruto enzimático. A determinação atividade de esterificação: A partir do extrato enzimático bruto liofilizado quantificou-se a reação de esterificação do ácido oléico e etanol, que foi conduzida a 40 °C, 160 rpm por 40 min onde 0,1 g de enzima foi dissolvida em etanol (1,381g) e logo após foi adicionado o ácido oléico (4,76 mL). Alíquotas de 300 mL foram retiradas em triplicata no início e no final da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para paralisar a reação e extração do ácido oléico. A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,02M. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido graxo/min, nas condições de ensaio (Cavalcanti et al.2005).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* as maiores atividades de esterificação por FES foram de 116,35 (em 72h); 128,88 (em 48h) e 269,39 (em 48h) U/g de substrato seco (gss) para bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de soja, respectivamente, conforme mostra a figura 1. Tan et al.(2003) na otimização do meio de cultura para a produção de lipase com

Candida sp. relataram a atividade ótima para produção de lipase de 6.230 e 9.600 U mL⁻¹ em frascos agitados e em biorreator de 5 L, respectivamente.

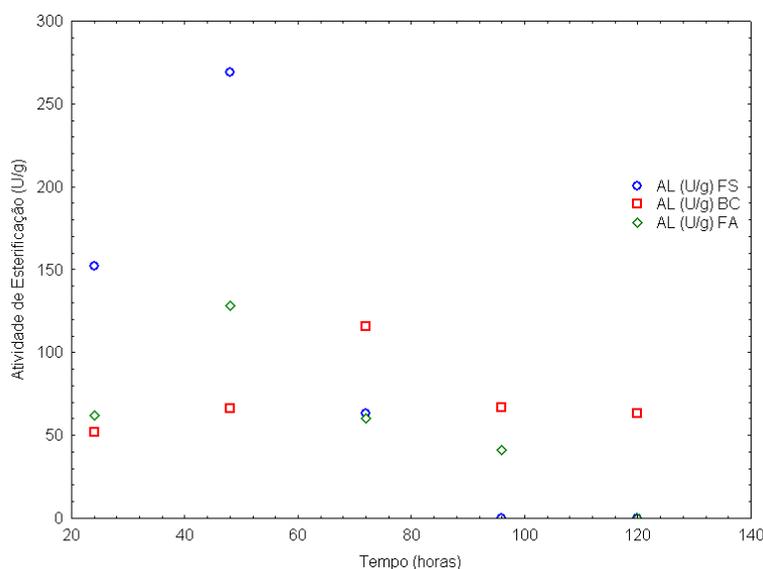


Figura 1. Cinética de produção de lipase pela levedura *Sporobolomyces ruberrimus* ao longo de 120 horas de fermentação, usando como substrato farelo de soja, bagaço de cana e farelo de arroz.

Em um biorreator 30 L, Tan et al. (2003) chegou a uma atividade de lipase máxima de 8.300 U mL⁻¹, mostrando que os valores de atividade de lipase são altamente influenciados pelo microrganismo, substrato, e as condições operacionais. Em contraste com as atividades altas alcançadas nos trabalhos acima mencionados, Rajendran et al. (2009) relataram a atividade ótima da lipase de 3,8 U mL⁻¹ por *C. rugosa*. Rodrigues, et al. (2008) estudou a atividade de esterificação por *Candida antarctica* em FS obtendo 226,8 U/mL em butil butirato.

3 CONCLUSÃO

Observou-se durante os experimentos que a levedura *Sporobolomyces ruberrimus* apresentou alto potencial como produtora de lipases utilizando resíduos agroindustriais como substratos, pois estes são encontrados em abundância em países como o Brasil, o que torna o processo de fermentação economicamente viável, pois são matérias-primas baratas.

REFERÊNCIAS

- CAVALCANTI, E.A.C., GUTARRA, M.L. E., FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.R., SANT'ANNA, G.L.. Lipase production by solid-state fermentation in Fixed-Bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 79-84, 2005.
- DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; *Enzyme Microb. Technol.* 39, 1042, 2006.
- KUMAR S AND GUPTA R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry.*; 43:1054-1060, 2008.
- RAJENDRAN, A., THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Science and Technology.*; 42:985–992, 2009.
- RODRIGUES, D. S., CAVALCANTE, G. P., SILVA, G. F., FERREIRA, A. L. O., GONÇALVES, L. R. B. Effect of additives on the esterification activity of immobilized *Candida antarctica* lipase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*; 24:833–839, 2008.
- TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry.*; 39:459-465, 2003.
- TREICHEL, H., OLIVEIRA, D, MAZUTTI, M., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, V. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol* (2010).