

Área: Engenharia de Alimentos

ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA LIPASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

**Marceli Fernandes Silva, Mara Cristina Zenevicz, Lenir Rigoli Ferraz,
Daniela Santos de Oliveira, Débora de Oliveira, Helen Treichel, Marco Di Luccio,
Sheila Maria Predabon***

*Laboratório de Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos,
Departamento de Ciências Agrárias, URI - Campus de Erechim*

**E-mail: spredabon@yahoo.com.br*

RESUMO

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono. A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo que envolve sólidos, em ausência ou quase ausência de água livre. A especificidade pelo substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade. A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado como a torta de soja, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo. O objetivo do trabalho foi o estudo da especificidade da lipase obtida de *Penicillium brevicompactum* por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. O Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FA+CA: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia longa, e ácidos graxos de cadeia longas e médias. O Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CA: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longas, e ácido graxo de cadeia longa. Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CS: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longa, e ácidos graxos de cadeia longa.

Palavras-chave: Lipase, Fermentação em estado sólido, Biorreator de leito fixo, Especificidade.

1 INTRODUÇÃO

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono (Castro-Ochoa et al., 2005; Bornscheuer et al., 2002; Nini et al., 2001; Sharma et al., 2001; Jaeger et al., 1999). Atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise (Foresti e Ferreira 2006; Krishna e Karanth, 2001).

Alguns fungos produtores de lipases mais importantes comercialmente são reconhecidos como pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. A produção de lipases por fungos filamentosos varia de acordo com a composição do meio, condições de cultivo, pH, temperatura, e do tipo de fonte de carbono e nitrogênio empregados. Além disso, as respostas aos fatores ambientais são também diferentes entre as cepas fúngicas, sendo que, para uma determinada cepa o mesmo fator pode estimular a produção, mas para outra pode não afetar, ou até mesmo inibir a produção de lipase (Colen, 2006).

Inúmeras são as aplicações potenciais de lipases, muitas delas já desenvolvidas em escala industrial. As lipases têm sido frequentemente utilizadas na resolução de misturas racêmicas, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes; no tratamento de efluentes, na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (Camarota e Freire, 2006; Hassan et al., 2006; Salis et al., 2005; Silva et al., 2005).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como o processo que envolve sólidos, em ausência ou quase ausência de água livre (Germano, 2000; Pandey, 2003). O micro-organismo pode crescer entre os fragmentos do substrato (dentro da matriz do substrato) ou sobre a superfície do mesmo, consumindo o substrato e secretando metabólitos, dentre os quais as enzimas (Mitchell et al., 2006).

A especificidade pelo substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade (Peter e Preda, 2002). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun e Xu, 2009).

As lipases são capazes de catalisar reações com uma ampla faixa de substratos, mas as taxas de reação variam amplamente com a estrutura das moléculas do substrato. As diferentes afinidades de uma molécula de lipase por diferentes álcoois e ácidos graxos, pode ser entendida em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo das lipases (Abbas e Comeau, 2003). A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (hidratação estérica e interações hidrofóbicas) (Rigo, 2009).

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado como a torta de soja, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima, sendo que a aplicação da fermentação em estado sólido em muitos casos diminui consideravelmente os custos do processo (Castilho et al., 2000).

Os biorreatores de leito fixo também são bastante utilizados em escala laboratorial. Neste tipo de biorreator, o meio pré-inoculado é acondicionado em colunas pequenas que são incubadas em banho termostático. Ar úmido é forçado através do leito, buscando expandir o mesmo, aumentando a superfície de contato e assim propiciando uma melhor transferência de calor. O ar utilizado deve ser saturado em água para minimizar a evaporação. Este sistema facilita o acompanhamento do crescimento microbiano através de técnicas de respirometria (Sato e Sudo, 1999; Mitchell et al, 2003a). Este equipamento também apresenta outras vantagens como o baixo custo e uso relativamente fácil (Durand, 2003).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Micro-organismo e Substratos

O fungo *Penicillium brevicompactum* foi isolado previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural de amêndoas de babaçu. Os substratos utilizados foram uma mistura de farelo de arroz e casca de arroz, farelo de soja e casca de arroz, farelo de soja e casca de soja.

2.1.2 Biorreator de leito fixo

As fermentações foram realizadas em biorreator de leito fixo com capacidade útil de 4kg de casa de arroz seca. O biorreator consiste de um cilindro de 34cm de diâmetro e 50cm de altura.

A metodologia da produção da lipase em biorreator em leito fixo foi descrita conforme a dissertação de Predabon (2011).

2.1.3 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi quantificada através da reação de síntese do ácido oléico e etanol (razão molar 1:1) (Langone et al., 2002; Bernardes et al., 2007, modificado). A reação foi conduzida a 40°C, 150rpm por 40min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1g) ao meio reacional, em frascos de vidro tampados e mantidos em agitador orbital. Foram retiradas alíquotas (triplicata) de 0,5mL do meio reacional e a reação foi interrompida pela adição de 20mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,035M. Os brancos reacionais foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de 0,5mL e interrompendo-se a reação com 20mL da solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os brancos foram também titulados até pH 11,0 com solução de

NaOH 0,035M. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata para cada amostra liofilizada.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho realizou-se a avaliação do efeito de diferentes álcoois e ácidos graxos na atividade de esterificação da lipase produzida através da FES, em biorreator de leito fixo, extrato enzimático bruto.

Os valores apresentados na Figura 1 mostram a influência de diferentes álcoois (etanol, butanol, metanol, propanol) na atividade de esterificação com diferentes ácidos graxos. Pode-se observar maior afinidade das enzimas obtidas quando os substratos usados foram são ácidos graxos de cadeia longa (C18:1) e média (C12:0) em presença de álcoois de cadeia longa, no caso de ácido oleico e propanol, e ácido láurico com butanol e propanol.

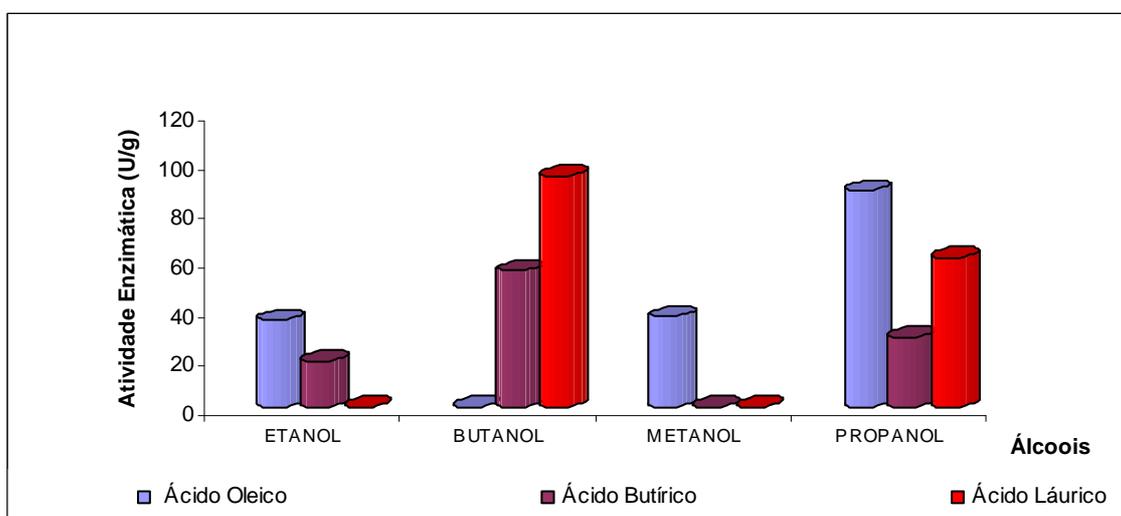


Figura 1 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 1 (FA+CA).

Observa-se na Figura 1 (amostra 1) que o emprego do ácido láurico e butanol como substratos resultou na maior atividade de esterificação, atingindo uma atividade de 94,03U/g na enzima produzida com FA+CA como substrato. Esta mesma enzima atingiu a segunda maior atividade (87,98U/g) quando ácido oléico foi empregado como doador acila e com

propanol como álcool. Nota-se a preferência da enzima por ácidos graxos de cadeias longas e álcoois de cadeias meias e longas.

Na Figura 2 nota-se que a enzima obtida a partir de FS+CA apresentou maior afinidade quando o ácido graxo utilizado como substrato foi de cadeia longa (C18:1), tanto na presença de álcoois de cadeia curta quanto de cadeia longa. O emprego de ácido oleico como doador acila resultou na maior atividade de esterificação atingindo 94,05U/g na enzima produzida utilizando farelo de soja e casca de arroz como substrato, reagindo com propanol como álcool. Essa mesma enzima obteve a segunda maior atividade (85,75U/g) reagindo com metanol como álcool.

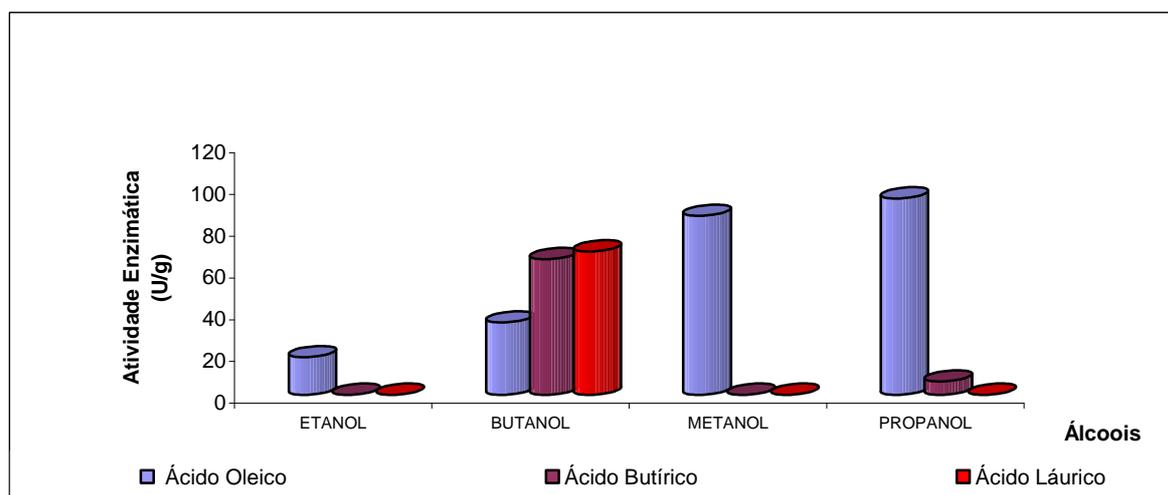


Figura 2 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 2 (FS+CA).

É possível observar na Figura 3, referente ao emprego do extrato enzimático obtido a partir de FS+CS, que o uso de ácido oleico como doador acila conduziu às maiores atividades de esterificação, com um pico de atividade de 90,24 U/g, quando metanol foi utilizado como álcool. Essa mesma enzima atingiu a segunda maior atividade de esterificação (62,72U/g) reagindo com propanol.

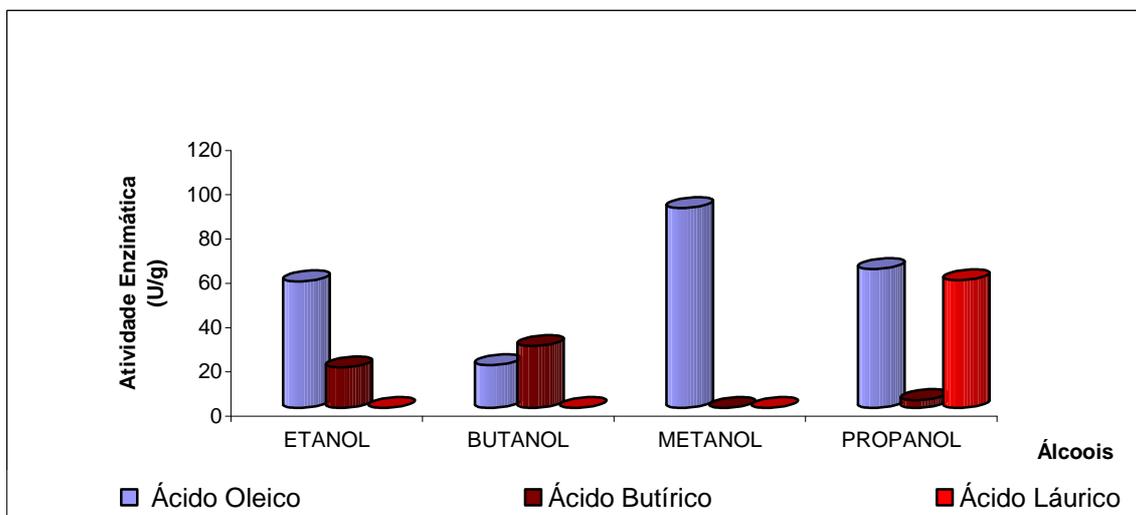


Figura 3 - Especificidade do extrato enzimático da reação com diferentes álcoois e diferentes ácidos graxos. Amostra 3 (FS+CS).

Os dados apresentados mostram que, de uma forma geral, as enzimas apresentaram maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia longa (ácido oleico), aos álcoois de cadeia carbônica curta (metanol e etanol) e intermediária (propanol), porém quando butanol foi utilizado, a atividade de esterificação diminuiu.

Trabalhos encontrados na literatura, avaliando a especificidade de lipases em relação a ácidos graxos com diferentes cadeias carbônicas, em geral, relatam maior especificidade dessas enzimas em relação a ácidos graxos de cadeia média a longa (C8 a C16) (Sun e Xu, 2009; Wang et al., 2008). Dörmo et al. (2004) estudaram a influência do tamanho da cadeia do álcool em reações de esterificação com ácido oleico empregando a lipase comercial Novozym 435. Os álcoois investigados foram etanol, n-propanol, i-butanol e i-pentanol. Os autores verificaram que os maiores rendimentos foram obtidos com álcoois de maior cadeia. Os álcoois de maiores cadeias estudados foram n-butanol e n-propanol, tendo os mesmos apresentado as maiores conversões.

Cabe ressaltar que a amostra mostrou ter boa afinidade com ácidos graxos de cadeia longa em presença de metanol, propanol e etanol, contudo quando houve a troca de álcool por butanol na reação, os valores de atividade decresceram.

3 CONCLUSÃO

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FA+CA: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia longa, e ácidos graxos de cadeia longas e médias.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CA: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longas, e ácido graxo de cadeia longa.

Extrato enzimático bruto obtido da fermentação com FS+CS: Para a atividade de esterificação possui maior especificidade por álcoois de cadeia curta e longa, e ácidos graxos de cadeia longa.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. E COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.589-595, 2003.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Review.*, v. 733, p. 1-9, 2002.

BERNARDES O.L., BEVILAQUA J.V., LEAL M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., LAGNONE, M.A.P.(2007) Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.136-140, p. 105-114.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technol.*, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT`ANNA, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.*, v. 4, p. 239-247, 2000.

CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microbial Technol.*, v. 37, p. 648-654, 2005.

COLEN G., JUNQUEIRA R.G., MORAES-SANTOS T.; Isolation and screening alkaline lipase-production fungi from Brasil soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 881-885, 2006.

DÖRMO N., BÉLAFI-BAKÓ K., BARTHA L., EHRENSTEIN U., GUBICZA L.;
Manufacture of and environmental safe biolubrificant from fusel oil by enzymatic
esterification in solvent-free system. *Biochemical Engineering Journal*, v.21, n.3, p. 229-234,
2004.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 113-
125, 2003.

FORESTI M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty
acid esterification. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2006.

FREIRE, D.M.G. Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por
Penicillium restrictum. Rio de Janeiro: 1996. Tese de Doutorado. Departamento de
Bioquímica, IQ/UFRJ.

GERMANO, S. Desenvolvimento de bioprocessos para a produção, caracterização e
purificação de proteases de *Penicillium* sp, por fermentação no estado sólido. Curitiba: 2000.
Tese de Doutorado. Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme
Microbiol. Technol.*, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K.E.; DIJSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology,
three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Rev.
Microbiol.*, v. 53, p. 315-351, 1999.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A
Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1547, p. 262-267, 2001.

LANGONE M.A., DE ABREU M.E., REZENDE M.J., SANT'ANNA JR. G.L., Enzymatic
synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Appl. Biochem.
Biotechnol.*, v.100 p. 987-996, 2002.

MITCHELL, D. A.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N., Recent developments in modeling of
solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochemical Engineering
Journal*, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M., Solid-state fermentation bioreactors.
Springer-Verlag, Berlin, 2006.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.;
CHAHINIAN, H. Lipasecatalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in
emulsion: a Kinetic study. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1534, p. 34-44, 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*. v..13, 81-84,
2003.

PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology.*, v. 31, p. 804-826, 2002.

PREDABON, S. M. Produção e caracterização parcial de lipases produzidas por *Penicillium brevicompactum* em biorreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como substratos. 2011. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil

RIGO, E.; NINOWA, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.M.; POLLONI, A.E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Journal Food Science and Technology*, p. 1132-1137, 2010.

SALIS, A.; PINA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *J. Biotechnol.*, v. 119, p. 291-299, 2005.

SATO, K., SUDO, S. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology - Small-scale solid-state fermentations. 2^a edition, Washington, p. 61-79, 1999.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, Purification, Characterization and Applications of lipases. Research review paper. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R. da; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry.*, v. 40, p.2885-2889, 2005.

SILVA, M.F.; FREIRE, D.M.G.; CASTRO, A.M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, J.V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010: 34:145-152 DOI 10.1007/s00449-010-0455-1 .

SUN, S. Y., XU, Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Bioresource Technology.*, v. 100, p.1336-1342, 2009.

WANG D., XU Y., TIANYU S.; Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41, p. 30-37, 2008.