

Área: Engenharia de Alimentos

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Penicillium brevicompactum* EM BIORREATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

**Marceli Fernandes Silva, Mara Cristina Zenevicz, Lenir Rigoli Ferraz,
Daniela De Oliveira, Débora Santos 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 são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, microbiana e vegetais. Atualmente, as lipases são produzidas a partir de microorganismos, constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, facilitando a produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial. 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. O objetivo deste trabalho foi a produção de lipases em biorreator de leito fixo utilizando resíduos agroindustriais como substrato. A metodologia da produção da lipase em biorreator em leito fixo foi descrita conforme a dissertação de Predabon (2011). Para a fermentação com FA+CA, a maior atividade de esterificação foi de 147,07U/g. Para a fermentação com FS+CA, a maior atividade de esterificação foi de 71,52U/g. Para a fermentação com FS+CS, a maior atividade de esterificação foi de 112,90U/g.

Palavras-chave: Lipase, Bioreator de Leito Fixo, Resíduos Agroindustriais.

1 INTRODUÇÃO

As Lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, microbiana e vegetais. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (Frost e

Moss, 1987). Atualmente, as lipases são produzidas a partir de microorganismos, constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, facilitando a produção em escala, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan et al., 2006).

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. (Colen, 2006)..

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens se comparadas as de origem animal e vegetal, uma vez que são enzimas extracelulares em sua grande maioria, são facilmente separadas do micélio por filtração ou centrifugação (Essamri et al., 1998; Jesus et al., 1999), possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substrato em produto (Leal, 2000).

O potencial de aplicações industriais que as lipases possuem abrange a indústria de alimentos, como aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas), couro (remoção de lipídios das peles dos animais), farmacêutica e a área médica (remédios, digestivos e enzimas para diagnósticos) (Burkert, 2002; Burkert et al., 2004).

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). A matéria orgânica presente nestes materiais é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (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). Contudo, o substrato deve possuir umidade

suficiente para dar suporte ao crescimento e sustentabilidade ao metabolismo do micro-organismo (Germano, 2000; Pandey, 2003)

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 0,035N. 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

Para o estudo da produção de lipase em biorreator de leito fixo, o biorreator foi dividido em zonas de coleta do meio fermentado: topo (40cm de altura), região intermediária (20 e 30cm de altura), e fundo (10cm de altura). Tal procedimento teve por objetivo permitir uma melhor análise da atividade enzimática em todo o biorreator. A umidade foi fixada em 55%, pois teores maiores de umidade como 80% tornavam difícil o preparo do meio, conduzindo a vazamentos no biorreator devido ao excesso de umidade.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 é possível observar que a produção de lipases em termos de atividade de esterificação aumentou conforme aumentou a altura do biorreator, nas fermentações que utilizaram FA+CA e FS+CS como substratos. De acordo com os resultados obtidos na tabela 3, a fermentação realizada com FS+CS apresentou comportamento inverso, ou seja, a produção de enzima diminuiu conforme aumentou a altura do biorreator. Esta queda na produção pode ser consequência da desnaturação causada pelo aumento do calor metabólico gerado pelo micro-organismo no topo do biorreator. Esse comportamento também foi observado por Astolfi (2010), na produção de inulinase por batelada alimentada em biorreator de leito fixo.

Tabela 1 – Atividade de esterificação do extrato bruto da fermentação com FA+CA em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	147,07
Meio	4	2	142,79
Fundo	4	2	34,51

Tabela 2 – Atividade de esterificação do extrato bruto da fermentação com FS+CA em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	47,17
Meio	4	2	71,52
Meio	4	2	30,92
Fundo	4	2	23,54

Tabela 3 – Atividade de esterificação do extrato bruto da fermentação com FS+CS em biorreator de leito fixo.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
Topo	4	2	40,64
Meio	4	2	84,76
Meio	4	2	112,90
Fundo	4	2	66,62

Os resultados da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto para a fermentação com (FA+CA), em biorreator de leito fixo foram apresentados na Tabela 1.

Observa-se que a maior atividade de esterificação (147,07U/g) foi obtida no ensaio correspondente à retirada de amostra no topo do biorreator; a segunda maior atividade

(142,79U/g) foi obtida na amostra retirada na região intermediária do fermentador (20 cm de altura).

Os resultados da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto para a fermentação com (FS+CA), em biorreator de leito fixo foram apresentados na Tabela 2.

Nesse estudo utilizou-se como substratos uma mistura de 2kg de farelo de soja (FS) e 2kg casca de arroz (CA), fixando a suplementação em 3% de óleo de soja, 4% de melaço e 2% de ureia e a umidade em 55%. Devido ao forte odor exalado pelo meio de fermentação, optou-se por diminuir o tempo de fermentação para 48 horas. Os resultados obtidos para a atividade de esterificação do extrato enzimático bruto foram apresentados anteriormente na Tabela 2. De acordo com esta tabela, observa-se que a maior atividade de esterificação (71,52U/g) foi obtida da amostra retirada na região intermediária do reator, seguida da amostra retirada no topo do fermentador, referente à atividade de esterificação de 47,17U/g.

Os resultados da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto para a fermentação com (FS+CA), em biorreator de leito fixo foram apresentados na Tabela 3.

A maior atividade de esterificação (112,90U/g) foi obtida a partir da amostra retirada na região intermediária do reator. A menor atividade (40,64U/g) foi obtida na amostra retirada do topo do fermentador.

3 CONCLUSÃO

Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FA+CA, atividade de esterificação:

A maior atividade de esterificação 147,07U/g foi obtida no Topo (40cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 68 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.

Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FS+CA, atividade de esterificação:

A maior atividade de esterificação 71,52U/g foi obtida no Meio (20cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 48 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.

Para a produção de lipase em biorreator de leito fixo, fermentação com FS+CS, atividade de esterificação:

A maior atividade de esterificação 112,90U/g foi obtida no Meio (20cm de altura) do biorreator, nas condições de 55% de umidade, 48 horas de fermentação, meio suplementado com 4% de melaço, 2% ureia, 3% de óleo de soja.

REFERÊNCIAS

ASTOLFI V.; Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leito fixo. 2010. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional do Alto Uruguai das Missões Campus de Erechim, RS, Brasil.

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.

BURKERT, J.F. DE M. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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.

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.

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.

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

ESSAMRI M., DEYRIS V., COMEAU L. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. of Biotechnol.*,v.60, p. 97-103, 1998.

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.

FROST, G. M. e MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: J. F. Kennedy (ed), *Biotechnology Enzyme Technology*, v. 7, VCH Publishers, 1987.

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., HAMEE A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 39, p.235-251, 2006.

JESUS M.F.C.P., BRANCO R.N., SANT'ANNA JR. G.L., FREIRE D.M.G., SILVA JR. J.G. *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.2:113-118, 1999.

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.

LEAL M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. Rio de Janeiro: 2000. Tese de mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ

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.

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

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

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

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.