

Área: Engenharia de Alimentos

PRODUÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE LIPASES PRODUZIDAS POR *Penicillium brevicompactum* E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE ARROZ COMO SUBSTRATO

Marceli Fernandes Silva, Mara Cristina Zenevicz, Daniela Santos Oliveira, Lenir Rigoli Ferraz, 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: spreadabon@yahoo.com.br*

RESUMO

Lipases são biocatalisadores de importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito, a fermentação em estado sólido tem se mostrado uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo. O processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de purificação. O objetivo deste trabalho foi a produção e a concentração de lipases produzidas por *Penicillium brevicompactum* utilizando farelo de arroz como substrato. Para a concentração do extrato enzimático para o planejamento 1, a máxima atividade foi de 101,31U/g após a concentração, meio sem suplementação de ureia e melão. Para a concentração do extrato enzimático para o planejamento 2, a máxima atividade foi de 150,12U/g após a concentração, meio suplementado com 2% de melão e 1% de ureia, 3% de óleo de soja.

Palavras-chave: Lipase, micro-organismo, fermentação em estado sólido, farelo de arroz, extrato concentrado.

1 INTRODUÇÃO

A Fermentação em Estado Sólido tem se mostrado uma alternativa na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da

agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do micro-organismo (Castilho et al., 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003; Pandey, 2003).

A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de purificação. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total da obtenção de uma enzima. Apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que, por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas em função do processo de purificação (Maldonado, 2006).

A utilização de subprodutos agroindustriais como substrato na produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, 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, quando comparada à fermentação submersa (Castilho et al., 2000).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Dois planejamentos fatoriais foram conduzidos e as amostras foram analisadas por 72 horas. Nos planejamentos experimentais 1 e 2, farelo de arroz foi utilizado como substrato. A temperatura foi fixada em 30°C e a concentração de esporos em $1,5 \times 10^7$ esporos/(g farelo seco). Cabe resaltar que a diferença entre os dois planejamentos é suplementação com óleo de soja no planejamento 2.

Tabela 1 – Variáveis e níveis estudados nos planejamentos 1 e 2.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Melaço (%)	0	2	4
Ureia (%)	0	1	2

Substrato e Micro-organismo

O substrato-suporte utilizado no processo fermentativo para produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi o farelo de arroz, que é o resíduo de empresas do sul do país. O fungo *Penicillium brevicompactum* foi isolado previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural das amêndoas de babaçu.

Preparo do Inóculo do Fungo

Foi realizado em frascos erlenmeyer (500 mL), contendo 100 mL de PDA esterilizado e 0,5 mL de suspensão de esporos obtida a partir de estoques, incubadas por 7 dias a 30°C. Para a coleta dos esporos adicionou-se 10 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro estéreis ao frasco para remoção dos esporos. Para a contagem dos esporos na câmara de Neubauer (Prolab), 1 mL da suspensão foi retirado assepticamente e diluído de 10 a 1000 vezes em solução aquosa estéril de Tween 80. A concentração da suspensão foi de 10^7 esporos/g de substrato seco.

Fermentação em Estado Sólido

Os farelos foram fermentados por 72 h em béquer de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada conforme planejamento experimental com água destilada para o fungo e após esterilização (121°C, 15 min.). A suplementação foi feita com óleo de soja, melaço e ureia, levando-se em consideração o planejamento experimental. Para a inoculação do fungo utilizou-se 2,5 mL de

inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter $1,5 \times 10^7$ esporos/g de substrato. Os béqueres foram incubados a 30 °C, em câmara climatizada (Tecnal TE-410).

Concentração da lipase

De acordo com a metodologia desenvolvida por Menoncin et al. (2008), para saturação de sulfato de amônio 60 %, o processo de precipitação foi realizado com a adição de 150mL do extrato enzimático bruto em um béquer de 500mL, ao qual foi acrescentado sulfato de amônio (Vetec) até a concentração de 60% de condição de saturação. O béquer com a mistura foi mantido em banho de gelo a 4°C, com agitação constante, controlando-se o pH em 7,0 com a adição de NaOH 20%. O extrato enzimático contendo o sal foi transferido para tubos de centrifuga e mantido a (-10°C) durante 5 horas. Transcorrido o tempo, o mesmo foi centrifugado a 4°C por 5400xg durante 30min, separando a fração protéica. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com uma pequena quantidade de tampão fosfato de sódio 100mM (pH 7,0) (Shu et al., 2006; Menoncin et al., 2008).

As amostras foram então congeladas a -80°C e liofilizadas por 48 horas. As determinações de atividade de esterificação foram realizadas conforme descrito posteriormente.

Medida da Atividade de Esterificação

A determinação da atividade de esterificação do extrato enzimático bruto liofilizado foi realizada 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, 160 rpm por 40 min. Esta foi iniciada pela adição do extrato liofilizado (0,1 g) ao meio reacional, em frascos de vidro com tampa, mantidos em agitador orbital. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio reacional em triplicata no início e ao final da reação. A cada amostra foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) para cessar a reação.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com resultados obtidos previamente (Menoncin et al., 2008), no estudo da precipitação da lipase de *Penicillium verrucosum*, a saturação de 60% com sulfato de amônio e 5 horas de precipitação foram definidos como a condição que conduziu aos melhores resultados e, desta forma, esta condição foi utilizada no presente estudo.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, observa-se que o maior valor de atividade de esterificação (101,31U/g) foi obtido no ensaio 1, após a concentração, em meio sem suplementação de ureia e melação. E o menor valor de atividade foi (17,36U/g), foi observado no ensaio 4, após a concentração, em meio suplementado com 4% de melação e 2% de ureia. Com base nesses dados pode-se concluir que altas concentrações de nitrogênio no meio tendem a diminuir a atividade de esterificação.

Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental (1) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático concentrado com sulfato de amônio 60% de saturação.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
1	-1(0)	-1(0)	101,31
2	1(4)	-1(0)	34,57
3	-1(0)	1(2)	18,92
4	1(4)	1(2)	17,36
5	0(2)	0(1)	43,25
6	0(2)	0(1)	59,97
7	0(2)	0(1)	48,20

De acordo com os valores apresentados na Tabela 3 é possível observar que a concentração do extrato enzimático conduziu a um aumento da atividade enzimática em alguns ensaios, No ensaio 14, meio suplementado com 2% de melação e 1% de ureia, obteve-se a máxima atividade (150,12U/g), seguida da condição 9 (128,39U/g), correspondente ao meio foi suplementado com 4% de melação, sem adição de ureia. Resultado semelhante encontrados por Silva et al., (2010), em seu estudo de produção e caracterização parcial de

lipase de *Penicillium brevicompactum* utilizando como substrato farelo de babaçu, apresentou uma atividade de esterificação de 207,40U/g em 72 horas e 120,45U/g em 96 horas, com 60% de saturação. Porém Shu et al., (2006), encontraram 12,7 U/mg de atividade específica precipitando lipase de *Antrodita cinnamomea* com 70% de saturação. Menoncin et al., (2008) encontraram (0,91 U/mg) de atividade específica após a precipitação com 60% de saturação em 5 horas.

Tabela 3 - Matriz do planejamento experimental (2) (valores reais e codificados) com a atividade de esterificação do extrato enzimático precipitado com sulfato de amônio.

Ensaio	Melaço (%)	Ureia (%)	Atividade de esterificação (U/g)
8	-1(0)	-1(0)	76,42
9	1(4)	-1(0)	128,39
10	-1(0)	1(2)	87,77
11	1(4)	1(2)	97,67
12	0(2)	0(1)	113,61
13	0(2)	0(1)	48,95
14	0(2)	0(1)	150,12

Apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação (Maldonado, 2006).

3 CONCLUSÃO

Para a concentração do extrato enzimático com 60% de sulfato de amônio, planejamento 1: A máxima atividade foi de 101,31U/g após a concentração com sulfato de amônio, em meio sem suplementação de ureia e melaço. Para a concentração do extrato enzimático com 60% de sulfato de amônio, planejamento 2: A máxima atividade foi de 150,12U/g após a concentração com sulfato de amônio, meio suplementado com 2% de

melaço e 1% de ureia, 3% de óleo de soja. Esses dados estão de acordo com os da literatura onde corroboram a saturação com sulfato de amônio.

REFERÊNCIAS

- BERNARDES O.L., BEVILAQUA J.V., LEAL M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., LAGNONE, M.A.P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.136-140, p. 105-114, 2007.
- CASTILHO L.R., POLATO C.M.S., BUARQUE E.A., SANT'ANNA JR. G.L., FREIRE D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.* v. 4 p. 239-247, 2000.
- FREIRE D.M.G. Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ. Rio de Janeiro, 1996, Brasil.
- KRIEGER N., TAIPA M.A., MELO E.H.M., LIMA J.L., AIRES-BARROS M.R., CABRAL J.M.S. Purification of *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioproc. Eng.* v. 20 p. 59-65, 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.
- MALDONADO R.R. Produção, Purificação e Caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais. São Paulo. Dissertação de Mestrado. UNICAMP, 2006.
- MENONCIN, S., DOMÍNGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., TONIAZZO, G., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran, *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*, 2008. DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.
- PANDEY A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* v.13 p. 81-84, 2003.
- PANDEY A., SELVAKUMAR P., SOCCOL C.R., NIGAM P. Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. *Cur. Sci.* v.77 p. 149-162, 1999
- SAXENA R.K., GHOSH P.K., GUPTA R., DAVIDSON W.S., BRADDOO S., GULATI R. Microbial Lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Curr. Sci.* v.77 p.101-115, 1999.

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*, v. 34 p.145 -152, 2010.

SOCCOL C.R., VANDENBERGHE L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.* v.13 p. 205-218, 2003.