

Área: Engenharia de Alimentos

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE LIPASE MULTIFUNCIONAL DE *Penicillium brevicompactum* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Mara Cristina Zenevicz, Graciele Kuhn, Sheila Maria Predabon, Daniela S. de Oliveira,
Lenir R. Ferraz, Marco Di Luccio, Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira,
Helen Treichel, Marceli Fernandes Silva*

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, URI - Campus de Erechim, Av. 7 de
Setembro, 1621, Erechim - RS, 99700-000

*E-mail: marceli_f@hotmail.com

RESUMO

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzima com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (EC 3.1.1.3) e as esterases (EC 3.1.1.1) fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos, amplamente distribuídos na natureza. As lipases atuam preferencialmente em TAGs de cadeia média e longa, enquanto as esterases em substratos de cadeia curta. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de lipase por *Penicillium brevicompactum* em fermentação em estado sólido utilizando como substrato torta de babaçu. Atividades máximas de hidrólise 48,6U/g foi produzidas pelo fungo *P. brevicompactum* em torta de babaçu. Esta condição também produziu as maiores atividades esterásica (244 U/g)

Palavras-chave: FES, resíduos agroindustriais, esterase, lipase, enzima.

1 INTRODUÇÃO

As lipases e as esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídios. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de micro-organismos (Gonçalves, 2007; Oliveira, 2000). As enzimas lipolíticas, juntamente com

as celulasas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (Jaeger & Eggert, 2002).

Enzimas extracelulares podem ser produzidas em meio sólido ou líquido, que se diferenciam pela quantidade de água livre (aw). A produção de lipase microbiana pode ser obtida no processo de Fermentação em Substrato Sólido (FES) ou no processo de Substrato Líquido (FS). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura que tenha um baixo custo (Lin et al., 2006).

As condições de crescimento da FES aproximam-se do habitat natural de fungos filamentosos, o que facilita o crescimento deste no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser usados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material 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).

Fundamentado nestas informações este trabalho teve por objetivo o estudo da produção de lipase com atividade hidrolítica e de esterificação por *P. brevicompactum* em FES com torta de babaçu.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e substrato

O fungo *Penicillium brevicompactum* foi isolado previamente por Freire (1996) a partir do flotado da fermentação natural das amêndoas de babaçu. O substrato-suporte utilizado no processo fermentativo para produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) foi em torta de babaçu. A torta de babaçu é o resíduo da extração de óleo de babaçu e foi obtida da Indústria Tobasa (Palmas, TO).

Fermentação em Estado Sólido

O farelo sem classificação foi utilizado nas fermentações conduzidas por 96h em béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica, contendo 10 g de farelo seco com umidade ajustada, conforme planejamento de experimentos, com água destilada. Após esterilização (121°C, 15 min) os béqueres foram inoculados e incubados em câmara climatizada (Tecnal TE-410). Para a inoculação de fungos utilizou-se 2,5 mL de inóculo com concentração de esporos ajustada para se obter $1,5 \times 10^7$ esporos/g de farelo seco, incubando-se a 30°C. A suplementação do meio foi realizada com óleo de soja, que é considerado uma fonte de carbono ao micro-organismo, ajustada conforme planejamento. Após a adição do inóculo os béqueres foram então fechados com manta acrílica e autoclavados a 121 °C por 15 min. Foi realizado 1 planejamento fatorial completo com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, somente para a cepa de *Penicillium brevicompactum* com torta de babaçu, adotou-se as mesmas variáveis e níveis para produção de enzimas com atividade de esterificação e hidrolítica.

Determinação da atividade hidrolítica

Para a dosagem da atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos lipolíticos, utilizou-se uma emulsão de óleo de oliva 5 % (m/v) e goma arábica 5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 18 mL desta emulsão são adicionados 2 mL da amostra do extrato bruto aquoso. Após incubação por 20 minutos a 35 °C com agitação de 200 rpm, a reação era interrompida através da adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação eram então titulados até pH 11 com solução 0,05 M de NaOH em titulador automático. Os brancos reacionais foram preparados adicionando-se 18 mL da emulsão óleo de oliva e goma arábica a solução de acetona-etanol e a amostra logo em seguida.

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).

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 paralisar a reação. A quantidade de ácido consumida foi determinada por titulação com NaOH 0,035 M.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados para o planejamento fatorial para *Penicillium brevicompactum* com torta de babaçu para as atividades de esterificação e hidrolítica.

Na Tabela 1 pode-se observar que a atividade hidrolítica máxima obtida nos tempos analisados, para a torta de babaçu ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 8 para 72 horas (U=70%/OS=3,4%) e pela condição experimental 4 em 96 horas (U=80%/OS=3%). O mínimo obtido nos dois tempos foi encontrado na condição experimental 6 (U=84%/OS=2%). Nota-se que o micro-organismo tende a secretar maiores quantidades de enzima nos níveis superiores de umidade e intermediários de carbono (óleo de soja).

Fato semelhante foi observado por Liu et al., (2006), que ao utilizar óleo de oliva como indutor para produção de lipase por *Burkholderia* sp. C20 este forneceu fonte de carbono extra para as células. Segundo Jaeger et al., (1994), a presença de óleos durante a reação de hidrólise pode promover de uma capa proteção para lipase quanto a oscilações de temperatura e a possíveis reações de proteólise.

Como observado também por Rodriguez et al., (2006), que pesquisaram diferentes óleos como fonte de carbono para o crescimento do *Rhizopus homothallicus*, quando o óleo é adicionado ao meio o crescimento do micro-organismo é acelerado. Segundo Marek e Bednarski (1996), a presença de triglicerídeos ou ácidos graxos de cadeia curta no meio pode aumentar a secreção de enzimas lipolíticas pelo micro-organismo.

Para a FES com torta de babaçu pode-se observar (Tabela 1) que a atividade de esterificação máxima obtida nos dois tempos analisados ocorreu no ponto central (U=70%/OS=2%), seguido pela condição experimental 5 para 72 horas (U=56%/OS=2%) e pela condição experimental 1 em 96 horas (U=60%/OS=1%). O mínimo obtido nos dois

tempos foi encontrado na condição experimental 2 ($U=80\%/OS=1\%$) para 72 horas e na condição experimental 7 para 96 horas ($U=70\%/OS=0,6\%$). Nota-se que a produção de lipase com capacidade de esterificação é influenciada diretamente pela quantidade de carbono no meio, fato evidente nos ensaios 4 e 5 onde tem-se extremos de umidade e pequenas variações de óleo de soja.

Tabela 1- Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) da atividade hidrolítica e de esterificação para FES com *P. brevicompactum* utilizando como meio torta de babaçu.

Ensaio	Umidade (%)	Óleo de soja (%)	Ativ. Hidrolítica (U/g)		Ativ.de Esterificação (U/g)	
			72h	96h	72h	96h
1	60 (-1)	1 (-1)	13,85	26,90	47,78	47,23
2	80 (1)	1 (-1)	25,83	30,24	0,00	45,58
3	60 (-1)	3 (1)	13,28	0,00	139,93	30,82
4	80 (1)	3 (1)	28,30	33,44	170,92	35,48
5	56 (-1,41)	2 (0)	0,00	0,72	174,91	37,18
6	84 (1,41)	2 (0)	0,00	0,00	67,63	35,43
7	70 (0)	0,6 (-1,41)	31,82	27,72	13,48	0,00
8	70 (0)	3,4 (1,41)	35,14	26,99	59,93	26,43
9	70 (0)	2 (0)	42,17	45,23	232,68	83,80
10	70 (0)	2 (0)	48,05	48,37	259,34	87,60
11	70 (0)	2 (0)	45,01	48,60	240,50	91,40

Conforme Tweddell et al., (1997), quando a interface de atuação da lipase possui água e solvente orgânico (sistema bifásico), sua conformação ativa é favorecida permitindo assim esterificação do meio reacional.

A diminuição da atividade esterásica em 96h pode se explicada pelo fenômeno de efeito da inibição enzimática, ou seja, este fenômeno pode conduzir à formação de complexos binários ou terciários entre o complexo que esta sendo formado pela lipase que age como

catalisador. A concentração desses novos complexos está em equilíbrio com os que estão sendo formados pela lipase, atrapalhando assim as reações de esterificação (Garcia et al., 2000).

A catálise de reações inversas como esterificação acontece, pois o meio reacional aquoso é modificado por um meio bifásico, essa síntese de ésteres pode ser catalisada por ácidos ou bases, mas o uso de tecnologia de enzimas oferece vantagens ambientais e uma redução nos custos de energia. Além disso, a seletividade das lipases pode acarretar em um maior grau de pureza nos produtos obtidos e trocas termodinâmicas para equilibrar reações desejadas (Oliveira et al., 2001).

Com a análise estatística dos dados foi possível a construção das superfícies de resposta (Figura 1) para a atividade hidrolítica (96h) e de esterificação (72h) em função da quantidade de óleo de soja e umidade.

A apresentação de uma região ótima de produção (Figura 1) é de extrema importância sob a ótica industrial, pois permite que a produção da enzima seja realizada em uma faixa de concentração dos componentes do meio, permitindo oscilações destas no processo, dentro da área estudada. Tais resultados são interessantes economicamente, também pelo fato de que concentrações intermediárias (ponto central) proporcionar maior atividade de hidrólise e de esterificação.

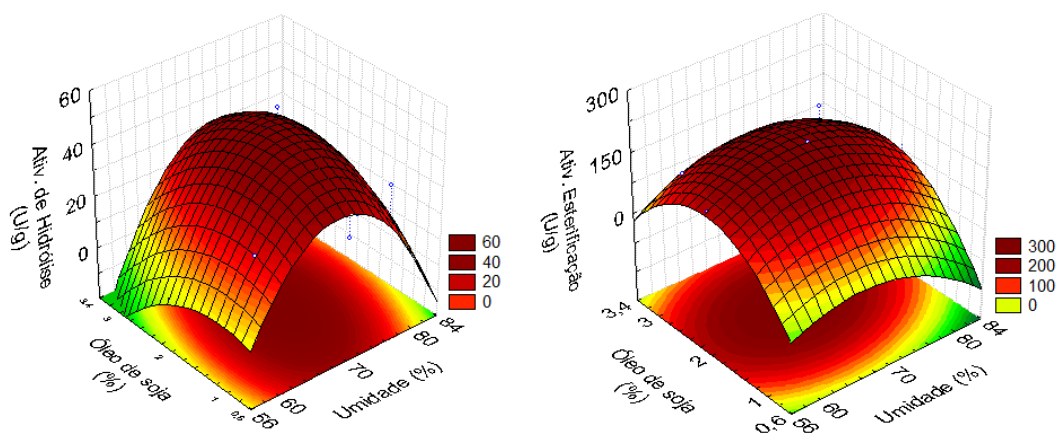


Figura1- Superfície de resposta da fermentação de *P. brevicompactum* em torta de babaçu (a) atividade de hidrólise 96h; (b) atividade de esterificação 72h.

3 CONCLUSÃO

Após a realização deste estudo pode-se concluir que a fermentação em estado sólido é eficiente para produção de lipase com atividade de esterificação e hidrolítica usando torta de babaçu. O estudo da suplementação realizado com o micro-organismo *Penicillium brevicompactum*, se mostra promissor na produção de lipase sendo a suplementação com óleo de soja resultou em boas atividades. A técnica de planejamento de experimento mostrou-se eficiente para maximização de processo fermentativo com extrato bruto obtido da FES de *P. brevicompactum* em torta de babaçu a atividade hidrolítica foi maximizada em 96 horas (48,60 U/g de farelo seco) nas condições 30°C, 70% m/m de umidade e 2% m/m de óleo de soja, para a atividade esterásica a condição maximizada foi em 72 horas de fermentação (244, 17 U/g), 30°C, 70% m/m de umidade e suplementação de 2% m/m de óleo de soja.

REFERÊNCIAS

- FREIRE, D. M. G., Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Dep. de Bioquímica, IQ/UFRJ, (1996).
- GARCIA, T., COTERON, A.; MARTINEZ, M., ARACIL, J., Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. *Chemical Engineering Science*, v.55, n, 8, p. 1411-1423, (2000).
- GONÇALVES, F. A. G., Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado. Depto. de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, (2007).
- JAEGER, K. E., RANSAK, S., KOCK, H. B., FERRATO, F., DIJKSTRA, B. W., Bacterial lipase. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.15, n.1, p.29-63, (1994).
- JAEGER, K. E., EGGERT, T, Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.13, n.4 , p.390 – 397, (2002).
- LANGONE, M. A., DE ABREU, M. E., REZENDE, M. J., SANAT'ANNA, Jr. G. L., Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.100, n.1-9 , p.987-996, (2002).

LIN, E. S., WANG, C. C., SUNG, S. C., Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, n. , p.98-102, (2006).

LIU, C-H., LU; W-B., CHANG, J-S., Optimizing lipase of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochemistry*, v.41, n.9, p.1940-1944, (2006).

MAREK, A., BEDNARSKI, W., Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, v.18, n.10, p.1155-1160, (1996).

OLIVEIRA, D. T. M., Lipase extracelular de fungo filamentosos: isolamento e caracterização parciais. Belo Horizonte : Faculdade de Farmácia da UFMG, (Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos), (2000).

OLIVEIRA, A. C., ROSA, M. F., AIRES-BARROS, M. R., CABRAL, J. M. S., Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, v.11, n. 4-6, p.999-1005, (2001).

SILVA, W. O. B., MIDITIRRI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M. H., Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v.40, n.1, p.321-326, (2005).

TWEDDELL, R., KERMASHA, S., COMBES, D., MARTY, A., Esterification and interesterification activities of lipase from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in three different types of organic media: a comparative study. *Enzyme and Microbial Technology*, v.22, n.6, p.439-445, (1997).