

Área: Engenharia de Alimentos

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DAS LIPASES PRODUZIDAS ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *Aspergillus niger*

Graciele Cossetin Pauletti, Tatiana Moresco Smaniotto, Luciane Maria Colla, Christian
Oliveira Reinehr*

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura,
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

**E-mail: reinehr@upf.br*

RESUMO – As lipases são enzimas utilizadas em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico e na indústria química. Estas enzimas catalisam reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação. Estratégias para uma maior utilização industrial dessas enzimas incluem a seleção de novos microrganismos produtores, bem como a utilização da fermentação em estado sólido. As técnicas de extração das enzimas podem ser utilizadas para a redução de custos na catálise de bioprocessos. Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito das condições de extração das lipases produzidas através de fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger*. Todos os fatores de estudo (pH, temperatura e razão de extração) influenciaram na atividade enzimática. A condição de extração que apresentou os melhores resultados de atividade enzimática foi pH 8, temperatura de 20°C e razão de extração de 1:20.

Palavras-chave: Fermentação em Estado Sólido, Extração, Lipases.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases e tem como função biológica catalisar a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis, obtendo com isso, ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. As lipases possuem facilidade de produção em grande escala, versatilidade na catálise de reações de síntese e hidrólise, podendo agir tanto em meio aquoso como em meio orgânico, o que lhes confere grande importância no mercado industrial (HOUDE et al., 2004; HASAN et al., 2006).

A fermentação em estado sólido oferece vantagens como maior concentração na recuperação do produto, menor geração de resíduos, redução do consumo de água e a possibilidade de utilização de subprodutos como substrato. A utilização de subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do microrganismo, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode vir a reduzir em muito o preço final da enzima (PANDEY et al., 1999; CASTILHO et al., 2000).

A busca por processos de produção de lipases que possam diminuir os custos finais das enzimas são de grande interesse, pois as enzimas disponíveis comercialmente apresentam ainda custo elevado. As técnicas de extração das enzimas podem ser utilizadas para a redução de custos na catálise de bioprocessos, assim como a eficiência catalítica do extrato obtido também pode ser aumentada pela técnica.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito das condições de extração das lipases produzidas através de fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger*, buscando-se determinar a influência do pH, da temperatura e da razão de extração no processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Aspergillus niger* (cepa O4), previamente isolado de solo contaminado com óleo diesel e selecionado como bom produtor de lipases através de fermentação em estado sólido (COLLA et al., 2009) foi utilizado para produção de lipases via fermentação em estado sólido e posterior purificação das mesmas. A cepa isolada foi mantida a 4°C em tubos de ensaio com ABD (ágar batata dextrose).

O meio de cultivo foi preparado com 85% de farelo de trigo, utilizado como suporte e fonte de macronutrientes, 15% de casca de arroz, utilizada para aumentar a porosidade do meio e facilitar a transferência de oxigênio. A quantidade de meio inicial foi de 300 g de meio de cultivo seco e quantidade final de 600 g de meio de cultivo úmido. O meio foi autoclavado a 120°C por vinte minutos. Após adicionou-se água destilada estéril até atingir a umidade de 60%, azeite de oliva como indutor (2%) e solução salina como fonte de micronutrientes.

Foram distribuídos 50 g desse meio em 12 béqueres de polipropileno de 600 mL tampados com manta acrílica hidrofóbica. Os experimentos foram incubados em estufa a 30°C por 8 dias (192 h). O procedimento de extração da enzima do meio fermentado foi realizado de acordo com o Planejamento Fatorial Completo 2³ (Tabela 1) em incubadora com rotação orbital e aquecimento, avaliando-se os seguintes fatores: pH, temperatura e razão volumétrica de extração.

A atividade lipolítica foi determinada, em duplicata, através do método proposto por Burkert et al. (2004). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido (1 U = 1 µmol.min⁻¹.g⁻¹), nas condições do ensaio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade lipolítica obtidos para os experimentos. Observa-se que a atividade enzimática variou de 0,66 U a 9,16 U, sendo que esta maior atividade foi obtida com pH mais alto (8), menor temperatura (20°C) e maior razão de extração (1:20). Entretanto, atividades enzimáticas próximas a 4 U também foram obtidas em condições diferentes de extração.

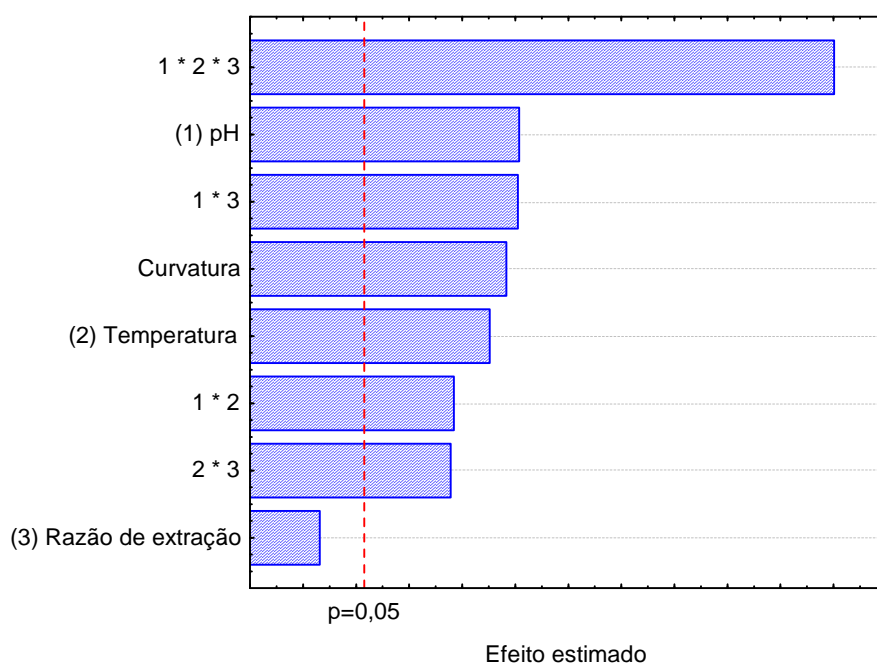
Tabela 1: Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2³ para estudo do pH, temperatura e razão de extração, com 3 pontos centrais e resultados de atividade enzimática

EXPERIMENTO	X ₁ (pH)	X ₂ (Temperatura, °C)	X ₃ (Razão de extração)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U)*
1	5	20	1:10	4,39 ± 0,62
2	8	20	1:10	1,96 ± 1,38
3	5	40	1:10	1,70 ± 0,38
4	8	40	1:10	4,15 ± 0,59
5	5	20	1:20	0,66 ± 0,93
6	8	20	1:20	9,16 ± 0,01
7	5	40	1:20	2,89 ± 2,31
8	8	40	1:20	1,28 ± 0,05
9	6,5	30	1:15	1,45 ± 0,69
10	6,5	30	1:15	1,93 ± 0,07
11	6,5	30	1:15	1,72 ± 1,07

*Resultados: média ± desvio padrão

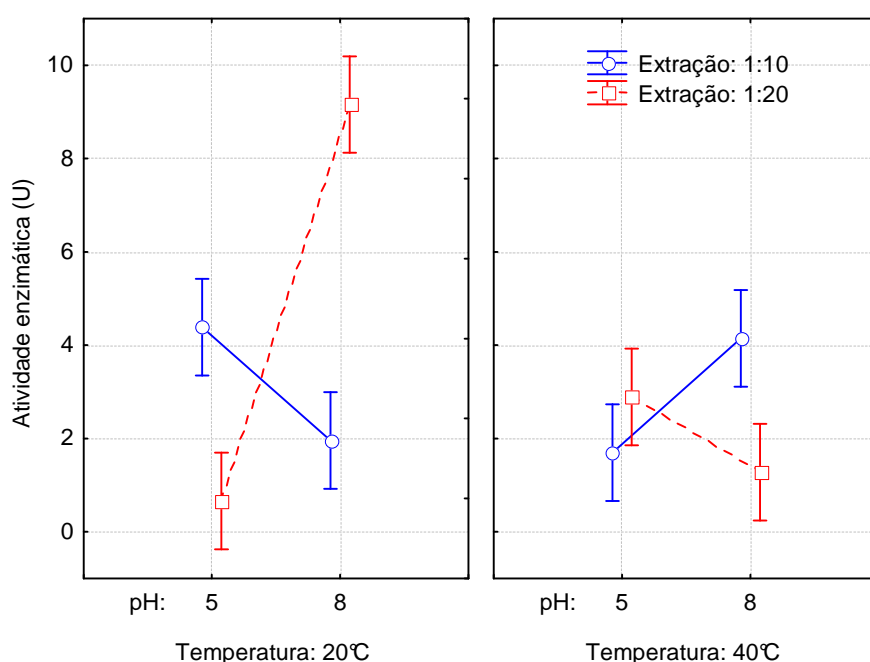
A Figura 1 apresenta o Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores estudados, evidenciando que todos os parâmetros mostraram influência sobre a atividade enzimática, sendo o efeito de interação entre os três fatores o mais significativo.

Figura 1: Gráfico de Pareto para os efeitos estimados dos fatores de estudo sobre a atividade enzimática



A Figura 2 apresenta o gráfico dessa interação entre os três fatores de estudo sobre a atividade enzimática, podendo ser observado que se a extração for realizada a 40°C, deve-se utilizar o pH 8 e menor volume para extração da enzima. Maiores volumes para extração são requeridos quando esta é efetuada a 20°C e pH 8, enquanto que se o pH utilizado for 5 deve-se diminuir o volume para extração, indicando que a enzima produzida pode ficar mais ou menos aderida à matriz da fermentação dependendo das condições de pH e temperatura.

Figura 2: Gráfico de interação entre os fatores de estudo sobre a atividade enzimática



4 CONCLUSÃO

Todos os fatores de estudo (pH, temperatura e razão de extração) influenciaram na atividade enzimática. A condição de extração que apresentou os melhores resultados de atividade enzimática (9,16 U) foi em pH mais alto (8) utilizando menor temperatura (20°C) e maior razão de extração (1:20).

5 REFERÊNCIAS

- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipases 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 JR., G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

COLLA, L. M.; REZZADORI, K.; CÂMARA, S. K.; DEBON, J.; TOBOLLA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, p. 131-137, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, p. 118-125, 2004.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.