

## Área: Engenharia de Alimentos

# MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO SEQUENCIAIS PARA SEPARAR E CONCENTRAR LIPASES FÚNGICAS

**Lais Carteli Cidade, Helen Treichel, Luciane Maria Colla, Marcus Vinicius Tres, Vandrê Barbosa Brião, Christian Oliveira Reinehr\***

*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS*

*Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS*

*\*E-mail: [reinehr@upf.br](mailto:reinehr@upf.br)*

**RESUMO** – Lipases são enzimas aplicáveis a diversos setores industriais, podendo ser obtidas de fontes microbianas a partir de fermentação em estado sólido utilizando matrizes oriundas de resíduos agroindustriais. A separação e a concentração da enzima podem ser feitas através de vários métodos, sendo que os processos de separação por membranas apresentam vantagens sobre outras técnicas, como economia de energia, simplicidade de operação e viabilidade de uso em escala industrial. Objetivou-se concentrar as lipases produzidas a partir de fermentação em estado sólido com fungos filamentosos e resíduos agroindustriais, através de processos de filtração tangencial com membranas de acetato de celulose e de polietersulfona. O uso de processos sucessivos de microfiltração e ultrafiltração possibilitaram a obtenção de concentrados com atividade de hidrólise 3 vezes superior à do extrato inicial. Os resultados evidenciaram a viabilidade do processo de concentração de lipases de *Aspergillus niger* utilizando membranas, sendo uma alternativa aos tradicionais métodos de separação e concentração de enzimas.

**Palavras-chave:** Lipases, *Aspergillus niger*, Membranas.

## 1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas muito utilizadas que podem catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, atuando também em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, quando em ambiente com restrição de água. Lipases são aplicáveis a diferentes setores, como indústrias de alimentos, detergentes, tecidos, polpa e papel, gorduras, óleos, tratamento de efluentes, polímeros biodegradáveis, fármacos, testes de diagnóstico, cosméticos, chás, aplicações médicas, biossensores, couro, biodiesel, como revisado por diversos autores (TREICHEL et al., 2010; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Enzimas microbianas são preferíveis para aplicações industriais em virtude dos menores tempos de geração para produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. As lipases industriais são produzidas principalmente por fungos filamentosos, em especial dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (NAGARAJAN, 2012). Após a produção das enzimas torna-se necessário efetuar a separação e purificação das mesmas. A separação e purificação de uma enzima é um dos maiores desafios da área de processos de separação, em virtude das características singulares das partículas que devem ser concentradas (VARDANEGA et al., 2013).

As tecnologias de separação por membranas podem ser uma alternativa para essa situação, pois trazem diversas vantagens: economia de energia, seletividade, separação de compostos termolábeis, simplicidade de operação e de aumento de escala (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006). Entre as principais aplicações dos processos de separação por membranas estão: esterilização, clarificação, concentração de células, fracionamento e concentração de proteínas, recuperação de solventes utilizados na extração de óleos, tratamento de efluentes, purificação de enzimas, dessalinização da água, entre outras diversas aplicações (STRATHMANN; GIORNO; DRIOLI, 2006).

O objetivo deste trabalho foi concentrar lipases produzidas a partir de fungos filamentosos utilizando processos sequenciais de separação por membranas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção de lipases através de fermentação em estado sólido

O processo de fermentação em estado sólido para a produção de lipases foi realizado em bandejas de polipropileno com quantidade inicial de meio seco de 250 g. O meio de cultivo utilizado foi composto de 85 % de farelo de trigo e 15 % de casca de arroz. A umidade foi ajustada a 65 %, sendo também adicionados 2 % de óleo de soja como indutor e solução salina com micronutrientes, de acordo com Colla (2009). Após o preparo do meio foi realizada a inoculação do fungo *Aspergillus niger* O-4 com a adição de  $10^7$  esporos/g de substrato. As bandejas foram tampadas com manta acrílica hidrofóbica e incubadas em estufa a 30 °C por 6 dias (144 h), sendo então efetuada a extração das enzimas (COLLA, 2009) para a realização dos processos de separação com membranas.

### 2.2 Separação e concentração das lipases com membranas

Os ensaios de concentração das enzimas foram realizados em um módulo de membranas com configuração plana, confeccionado em acrílico, apresentando uma área útil de filtração de 0,006 m<sup>2</sup> (60 cm<sup>2</sup>). Foram utilizadas cinco membranas planas distintas, sendo duas de microfiltração (de acetato de celulose, com 20 µm e 0,45 µm de diâmetro de poro) e três de ultrafiltração (de polietersulfona, com massas molares de corte de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa).

O extrato enzimático foi inicialmente submetido a uma microfiltração com a membrana de 20  $\mu\text{m}$  para a retirada de material particulado em suspensão. Com o permeado dessa filtração procedeu-se uma segunda microfiltração, desta vez com a membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , a fim de separar partículas maiores que 0,1  $\mu\text{m}$  provenientes da fermentação. Após as duas microfiltrações foram efetuados mais três processos sequenciais de separação, utilizando três membranas de ultrafiltração (com massas molares de corte de 100 kDa, 50 kDa e 20 kDa), de forma a fracionar o extrato enzimático. O permeado de cada filtração foi utilizado como alimentação do processo subsequente.

### 2.3 Determinações analíticas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl e a atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos da alimentação, do permeado e do retido dos processos de filtração foi determinada, em triplicata, através do método proposto por Burkert, Maugeri e Rodrigues (2004), o qual se baseia na titulação com hidróxido de sódio dos ácidos graxos livres liberados pela ação da lipase presente no extrato enzimático sobre os triacilgliceróis do azeite de oliva emulsionados em goma arábica.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade de hidrólise das amostras em cada etapa do processo de filtração sequencial, assim como os teores de proteínas presentes. Pode-se observar que o teor de proteínas, assim como a atividade de hidrólise do extrato bruto inicial, do permeado e do retido da primeira microfiltração foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), o que pode ser explicado pela retenção de eventuais partículas maiores que 20  $\mu\text{m}$  presentes nesse processo, levando a uma concentração semelhante de partículas pequenas, como as proteínas, em ambas as correntes (retido e permeado). A partir do permeado da ultrafiltração com a membrana de 100 kDa o teor de proteínas foi significativamente menor, evidenciando que a maior retenção de proteínas ocorreu nesta etapa do processo.

Em relação à atividade de hidrólise observa-se que o extrato bruto inicial apresentou resultados iguais ( $p > 0,05$ ) às amostras da primeira e da segunda microfiltração. O retido da ultrafiltração de 100 kDa apresentou resultados mais elevados tanto para a atividade de hidrólise quanto para a atividade específica, indicando que as lipases produzidas na fermentação em estado sólido foram retidas nessa membrana, concentrando as enzimas. Algumas lipases ainda permearam essa membrana, mas foram completamente retidas na membrana de 50 kDa. A partir do permeado dessa membrana os resultados de atividade de hidrólise foram nulos, mostrando que as enzimas foram retidas pelas membranas nos últimos processos.

Na segunda microfiltração (0,45  $\mu\text{m}$ ) houve a retenção de lipases com atividade de hidrólise. Como o fator de concentração foi de 6 nesta etapa e não houve diferença significativa na atividade enzimática do retido e do permeado, pode-se dizer que houve a retenção de 17 % da enzima presente. Embora essas proteínas normalmente apresentem peso molecular entre 20 kDa e 80 kDa, o fenômeno de incrustação com o bloqueio dos poros pode ter levado a essa retenção das enzimas.

Tabela 1 – Resultados de atividade de hidrólise das amostras em cada etapa do processo de separação sequencial por membranas

Processo	Amostra	Proteína (mg/mL)*	AH (U/mL)*	AH <sub>esp</sub> (U/mg)*	R <sub>AH</sub> (%)
Extração	Inicial	15,36 <sup>b</sup> ± 0,68	20,24 <sup>b</sup> ± 0,65	1,318 <sup>cd</sup> ± 0,042	-
Microfiltração (20 µm)	Retido	14,26 <sup>b</sup> ± 1,36	19,78 <sup>b</sup> ± 1,95	1,387 <sup>bc</sup> ± 0,137	2,34
	Permeado	15,53 <sup>b</sup> ± 1,30	19,32 <sup>b</sup> ± 1,95	1,244 <sup>cd</sup> ± 0,126	
Microfiltração (0,45 µm)	Retido	26,25 <sup>a</sup> ± 1,86	18,86 <sup>b</sup> ± 0,65	0,718 <sup>d</sup> ± 0,025	21,96
	Permeado	10,06 <sup>c</sup> ± 1,86	14,72 <sup>b</sup> ± 0,65	1,423 <sup>bc</sup> ± 0,065	
Ultrafiltração (100 kDa)	Retido	17,19 <sup>b</sup> ± 0,06	60,72 <sup>a</sup> ± 3,90	3,532 <sup>a</sup> ± 0,227	92,44
	Permeado	2,49 <sup>d</sup> ± 0,19	4,60 <sup>c</sup> ± 0,65	1,845 <sup>bc</sup> ± 0,261	
Ultrafiltração (50 kDa)	Retido	3,94 <sup>d</sup> ± 0,00	7,82 <sup>c</sup> ± 1,30	1,986 <sup>b</sup> ± 0,330	100,00
	Permeado	2,54 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	
Ultrafiltração (20 kDa)	Retido	2,45 <sup>d</sup> ± 0,25	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	-
	Permeado	1,84 <sup>d</sup> ± 0,12	0,00 <sup>d</sup>	0,00 <sup>e</sup>	

AH: atividade de hidrólise, AH<sub>esp</sub>: atividade específica de hidrólise, R<sub>AH</sub>: Retenção da atividade de hidrólise.

\*Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na coluna não apresentam diferença significativa entre si com um nível de significância de 5%.

A ultrafiltração com a membrana de 100 kDa levou à obtenção de um retido com atividade de hidrólise 4,3 vezes superior à sua alimentação, mostrando que o processo de separação por membranas é uma alternativa viável à concentração das lipases produzidas por fungos a partir de fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais. A atividade específica de hidrólise também aumentou 2,5 vezes após a realização dessa etapa do processo.

O permeado da ultrafiltração de 100 kDa e o retido da ultrafiltração de 50 kDa apresentaram uma atividade enzimática menor que as frações anteriores, mostrando que a maior parte das lipases produzidas pelo fungo foi retida na membrana de 100 kDa. Após a etapa de ultrafiltração com a membrana de 50 kDa não houve o registro de atividade de hidrólise, embora algumas partículas proteicas tenham permeado essa membrana.

As enzimas, como proteínas, possuem uma estrutura química bastante complexa. No caso das lipases podem ser encontrados de 250 a até 550 resíduos de aminoácidos fazendo com que a sua estrutura apresente áreas com maior ou menor afinidade pela estrutura da membrana (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). No caso deste trabalho, que utilizou membranas de ultrafiltração hidrofílicas de polietersulfona, houve uma elevada retenção de moléculas menores que 100 kDa na membrana com essa massa molar de corte. Deve-se enfatizar

que o parâmetro conhecido como massa molar de corte das membranas de ultrafiltração considera a retenção de cerca de 90 % das partículas maiores que esse valor, sendo que os poros da membrana não são simétricos, havendo a presença de muitos poros menores e outros maiores que a média. Além disso, os parâmetros divulgados pelos fabricantes de membranas podem gerar resultados bastante diferentes em função da metodologia e das condições de teste utilizadas (CAUSSERAND et al., 2010).

Em relação à retenção da atividade de hidrólise, calculada levando em consideração a razão entre a atividade enzimática do permeado e do retido, verificou-se que não houve retenção significativa na primeira microfiltração e chegou a 22 % na segunda microfiltração. Na primeira ultrafiltração este índice foi de 92 %, atingindo 100 % de retenção da atividade de hidrólise na segunda ultrafiltração, tornando a última ultrafiltração desnecessária para o processo no que diz respeito à retenção de atividade enzimática.

## 4 CONCLUSÃO

A combinação de processos sequenciais de separação por membranas, utilizando um módulo de filtração tangencial com membranas de microfiltração (20 µm e 0,45 µm) e de ultrafiltração (100 kDa, 50 kDa e 20 kDa) levou à obtenção de concentrados enzimáticos com atividade de hidrólise 3 vezes superior ao extrato inicial, evidenciando a viabilidade de aplicação deste tipo de processo, como uma alternativa aos métodos tradicionais de separação e concentração.

## 5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UPF pela bolsa de iniciação científica disponibilizada (PIBIC/UPF).

## 6 REFERÊNCIAS

- 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.
- CAUSSERAND, C.; PIERRE, G.; RAPENNE, S.; SCHROTTER, J.; SAUVADE, P.; LORAIN, O. Characterization of ultrafiltration membranes by tracer's retention: comparison of methods sensitivity and reproducibility. **Desalination**, v. 250, p. 767-772, 2010.
- COLLA, L. M. **Otimização da produção biotecnológica de lipases e correlação com a produção de biossurfactantes**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS, 2009.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, p. 1-14, 2012.
- NAGARAJAN, S. New tools for exploring “old friends – microbial lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1163-1196, 2012.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486–520, 2012.

STRATHMANN, H.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. **An introduction to membrane science and technology**. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 2006, 394 p.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196, 2010.

VARDANEGA, R.; TRES, M. V.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Effect of magnetic field on the ultrafiltration of bovine serum albumin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1087-1093, 2013.