



## X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Universidade Severino Sombra  
Vassouras – RJ – Brasil

### PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Penicillium sp*

LIMA, R. C.\*<sup>1</sup>; SILVA, H. N. L.\*<sup>1</sup>; PINOTTI, L. M.<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Aluno do DETEC/CEUNES/UFES    <sup>2</sup>Professor do DETEC/CEUNES/UFES  
Departamento de Engenharias e Tecnologia – Centro Universitário Norte do Espírito Santo - UFES,  
BR101 Km 60 – São Mateus, ES – CEP 29932-540  
e-mail: [laurapinotti@ceunes.ufes.br](mailto:laurapinotti@ceunes.ufes.br)

**RESUMO** - O interesse na produção de lipases está relacionado ao seu grande potencial tecnológico devido a sua ação catalítica em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Estas enzimas são extraídas de tecido animal e de plantas ou ainda produzidas por microrganismos. As lipases microbianas, em especial, são amplamente aplicadas industrialmente devido à sua estabilidade, seletividade e especificidade. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi pesquisar o efeito da concentração de peptona bacteriológica ( 1, 2 e 3% m/v) e do óleo de oliva ( 1, 2 e 3% m/v) na produção de lipases pela cepa fúngica *Penicillium sp.*, utilizando um planejamento fatorial 3<sup>2</sup>. Foi constatado atividade extracelular/intracelular para todos os meios de produção realizados, sendo obtido a melhor atividade extracelular no ensaio contendo a maior concentração de peptona bacteriológica e de azeite de oliva (0,6 UI/mL). Quanto a atividade intracelular, verificamos que baixas concentrações de peptona favorece a produção intracelular de lipases, sendo obtido 11,2 UI/g células no ensaio contendo 1% de peptona bacteriológica e 3% de azeite de oliva.

**Palavras chave:** catálise, enzimas, transesterificação

### INTRODUÇÃO

Muitos processos tecnológicos utilizam catalisadores biológicos nas seqüências de conversão química. Esses catalisadores elevam consideravelmente a velocidade das reações, requerem condições brandas, em alguns casos, catalisam reações de síntese e degradação (Warner *et al.*, 2004). O uso de enzimas nas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (Hasan *et al.*, 2006) e sem causar riscos ambientais.

Dentre os catalisadores enzimáticos, as lipases se destacam devido as suas múltiplas aplicações, sendo utilizados nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (Jaeger e Reetz, 1998; Houde *et al.*, 2004). As lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. No entanto, mesmo com uma vasta

\*Bolsista FAPES

variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, pelos elevados custos de produção (Paques & Macedo, 2006 apud Messias et al., 2011). São biocatalisadores de grande valor, devido, principalmente a características como estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua quimio-regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004).

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases e que atuam sobre ligações éster. As lipases (E.C.3.1.1.3), pela definição clássica, são glicerol éster hidrolases e, de acordo com Jaeger et al., 1994, atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. No entanto, em ambientes aquo-restritos essas enzimas catalisam reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, entre outras, o que confere às lipases um grande potencial biotecnológico (Salum et al., 2007).

Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, a deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve et al., 2000). Embora a lipase mais estudada até hoje seja a lipase pancreática, do ponto de vista industrial as lipases microbianas são bem mais interessantes por permitirem produção em maior escala e poderem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar et al., 2000). Ainda, dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana (Fernandez, 2007), sendo o *Aspergillus niger* um dos mais conhecidos produtores de lipases com muitas aplicações industriais (Mahadik et al, 2002).

A quantidade de lipases produzidas depende de diversos fatores, tais como fontes

de carbono e nitrogênio, presença de lipídios, de indutores ou inibidores, concentrações de sais inorgânicos, disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH e inóculo. A produção requer altas concentrações de fontes de nitrogênio, quando comparada à produção de outras enzimas. Dentre as principais fontes citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada. Essa fonte é usualmente adicionada na faixa de 1 a 7%(p/v) ao meio de fermentação. O extrato de levedura também vem sendo empregado como fonte única de nitrogênio, ou complementando um meio contendo peptona, em níveis de adição que variam de 0,1 a 1%(p/v) (Castilho et al., 2000).

A maioria dos microrganismos produtores de lipases necessita de um indutor para promover a síntese enzimática, podendo este ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo, que pode ser adicionado ao meio como única fonte de carbono ou em adição a carboidratos, em concentrações reduzidas. O meio de cultivo utilizado para produção de lipases fúngicas é em geral complexo, adicionado de indutores, muito frequentemente o óleo de oliva (Castilho et al., 2000).

Dentro deste contexto, este trabalho pretende pesquisar meios de produção que maximizem a produção de lipases, por fermentação submersa, a partir da cepa fúngica (*Penicillium sp.*).

## MATERIAIS E METODOS

### Obtenção do inóculo:

A cepa fúngica (*Penicillium sp.*) foi isolada pelo grupo de pesquisa LABSAN/DEA/UFES e foi propagada em meio ágar batata dextrose (3,9% m/v) por 7 dias na estufa a 28°C e armazenada em geladeira. Os esporos foram raspados com 10mL de tween 80 (0,1% m/v) e contados em câmara de Neubauer. Esses microrganismos foram inoculados no meio de fermentação até atingir uma concentração final de  $2 \times 10^6$  esporos/mL.

### Produção enzimática

Os meios de produção de lipases continham peptona bacteriológica, extrato de levedura (0,5% m/v), cloreto de sódio (0,5% m/v) e óleo de oliva. Os ensaios foram

realizados em câmara rotativa a 28 °C a 200rpm. O tempo de cultivo foi estudado para obter os melhores resultados. Para a realização dos experimentos foi utilizado um planejamento experimental do tipo fatorial ( $3^2$ ), com dois fatores em três níveis de variação e pontos centrais, totalizando 11 experimentos. As variáveis estudadas foram as concentrações de peptona bacteriológica (1, 2 e 3% m/v) e do óleo de oliva (1, 2 e 3% m/v). Amostras foram coletadas durante o período de fermentação e centrifugadas a 6000 rpm por 60 minutos a 0°C. O sobrenadante (extrato enzimático) foi utilizado para a dosagem da atividade lipásica.

### Determinação da atividade enzimática

A atividade lipásica foi determinada pelo método descrito por Silva (2007). A atividade pode ser quantificada pela hidrólise de p-nitrofenilbutirato (pNPB) em 2-propanol (15mM). Essa reação foi realizada em um reator encamisado mantido a 25°C, onde foi adicionado 29 mL de tampão fosfato 0,1M pH 8,0, 1 mL da pNPB em 2-propanol e os diferentes extratos enzimáticos (1mL ou 0,5mL). Em diferentes tempos foram retiradas amostras e acompanhadas a absorbância em comprimento de onda de 410nm no espectrofotômetro.

### Extração das Enzimas intracelular

Sedimentado: Com os microrganismos foram feitas rupturas celulares em disruptor de células com 90% de potência por 4 minutos. Para tal, foi necessário colocar as células em um volume de 25mL de tampão fosfato 10mM pH 8, para então realizar o processo de sonicação. Ao final da sonicação, os fragmentos celulares foram separados por centrifugação a 6000 rpm, 60 minutos e 0°C, sendo analisado a atividade enzimática no sobrenadante (Enzima Intracelular).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo do Tempo de Cultivo

Com o intuito de estabelecer o tempo de fermentação que maximizasse a produção enzimática, foram realizados ensaios com um meio padrão (composição dos pontos centrais do planejamento fatorial) e amostras foram retiradas de 24 em 24 horas para análise da concentração celular e atividade lipolítica. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Resultados obtidos na produção extracelular de lipase a partir do *Penicillium sp.* para diferentes tempos**

Tempo	Massa seca (g/L)	Atividade enzimática (U/mL)
t =0	0,30	-
t =24h	4,15	-
t =48h	13,0	0,060
t = 72h	14,1	0,111
t = 96 h	-	0,138
t = 120h	20,0	0,273

O melhor tempo foi de 120h, onde se obteve a maior atividade lipolítica.

### Produção enzimática

Os ensaios com a cepa fúngica foram realizados de acordo com o planejamento de experimentos e os resultados obtidos se encontram na Tabela 2.

### Metodologia estatística

Neste trabalho foram calculados parâmetros estatísticos, como o p-valor e os limites de confiança, associados aos efeitos principais e de interação entre os fatores estudados (concentração de peptona e de óleo de oliva) em relação à produção de lipase extracelular e intracelular.

A análise de variância do estudo da produção de enzima extracelular e intracelular do microrganismo *Penicillium* nas diferentes condições estudadas pode ser visualizada respectivamente na Tabela 3 e Tabela 4.

**Tabela 2: Resultados obtidos na produção de lipases intracelular e extracelular**

Ensaio	Peptona bacteriológica (%)	Óleo de oliva(%)	<i>Penicillium sp.</i>		
			Massa seca (g massa seca/L)	Atividade intracelular(UI/g)	Atividade extracelular (UI/ml)
1	1	1	10	10,28	0,11
2	1	2	18,4	9,27	0,17
3	1	3	20,6	11,15	0,08
4	2	1	30	7,36	0,14
5	2	2	21,6	7,24	0,51
6	2	3	37,8	6,46	0,18
7	3	1	17,6	4,78	0,11
8	3	2	33,2	4,54	0,26
9	3	3	43,8	6,10	0,60
10	2	2	32,4	5,56	0,57
11	2	2	31,4	6,47	0,56

Verificou-se que o melhor resultado de produção lipolítica extracelular foi obtido no ensaio 9, nesse ensaio o meio de cultivo contém a maior concentração de peptona testada (3%). Esse resultado está de acordo com a literatura, a qual descreve que ocorre uma maior produção de lipases com quantidades maiores de peptona (Castilho et al., 2000). Ainda, a concentração mais alta de óleo de oliva (3%) favoreceu a produção, embora esses valores de atividades sejam baixos em relação ao encontrado na literatura, como por exemplo, por WOLSKI (2008), que encontrou atividades máximas de 9,5UI/mL e PINHEIRO et al (2008) que encontrou atividade máxima de 3,15 U/mL.

Já para a atividade intracelular pode-se observar que os ensaios que apresentaram melhores resultados foram os 1 e 3 (10,28 e 11,15 UI/g, respectivamente). Podemos observar que a maior influência na produção enzimática intracelular foi a quantidade de peptona diluída no meio, sendo que as menores concentrações apresentaram os melhores resultados. As concentrações de óleo de oliva não mostraram variação significativa nos resultados esses valores também foram baixos em relação ao encontrado na literatura, por exemplo, Silva et al (2009) que encontrou atividade de 30,92 U/g.

**Tabela 3: Tabela ANOVA para a produção enzimática extracelular do fungo *Penicillium sp***

Fator	Soma quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Peptona(L)	0,062017	1	0,061017	1,951143	0,211945
Peptona(Q)	0,038261	1	0,038261	1,203759	0,314641
Óleo de oliva(L)	0,041667	1	0,041667	1,310899	0,295840
Óleo de oliva(Q)	0,080171	1	0,080171	2,522314	0,163345
Error	0,190709	6	0,031785		
Total SS	0,453691	10			

Na Tabela 3 é possível observar que os efeitos de concentração de peptona e de óleo de oliva não foram significativos para produção de lipase, nessas faixas de trabalho,

pois o p-valor para os fatores avaliados é maior que 0,05, ou seja, nenhuma das duas variáveis é estatisticamente significativa para um nível de 95% de confiança.

Tabela 4: Tabela ANOVA para a produção enzimática intracelular do fungo *Penicillium sp*

Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Peptona(L)	38,91	1	38,91	73,24	0,00014
Peptona(Q)	1,79	1	1,79	3,38	0,11
Óleo de oliva(L)	0,27	1	0,27	0,52	0,49
Óleo de oliva(Q)	1,82	1	1,82	3,42	0,11
Error	3,19	6	0,53		
Total SS	47,31	10			

Para esses ensaios pode ser observado que apenas para a peptona (L) o p-valor foi menor que 5%, o que significa que essa variável é estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%. Os novos parâmetros foram obtidos levando em consideração somente este efeito. A partir desses parâmetros é possível obter o modelo de regressão (equação 1) para a produção extracelular de lipase.

$$A = 12,29 + 0,25P \quad (1)$$

em que P é a variável de concentração de peptona.

O gráfico tridimensional de superfície de resposta da produção lipolítica intracelular em função da concentração de peptona e de óleo de oliva está apresentado na Figura 1.

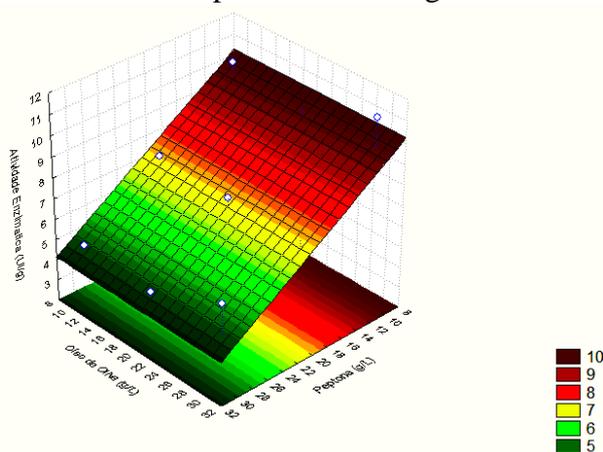


Figura 1 - Superfície de resposta tridimensional para produção de lipase intracelular em função das concentrações de peptona e óleo de oliva.

## CONCLUSÃO

Após a realização desse estudo pode-se concluir que a melhor produção lipolítica extracelular foi (0,6UI/mL), quando se utilizou

um meio composto de 3 % (m/v) de peptona, 3% (m/v) de óleo de oliva a 28°C por 120 horas. Já a atividade intracelular encontrou (11,2 UI/g) no ensaio contendo 1% de peptona bacteriológica e 3% de azeite de oliva. Esse resultado é bastante promissor uma vez que a atividade enzimática obtida foi de um enzimático cru e sem tratamento.

Os dados estáticos mostram que as variáveis estudadas não influenciaram na produção de lipases extracelular. Já para a produção intracelular apenas a concentração de peptona interfere nos resultados das atividades, obtendo melhores resultados para concentrações menores da peptona.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- FERNANDEZ, M.L.M. "Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise". Tese de Doutorado, Setor de Ciências Exatas, UFPR, Curitiba-PR, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. "Industrial applications of microbial lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. "Lipases and Their Industrial Applications": An Overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 118, p. 155-170, 2004.

- JAEGER, K.-E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. AND MISSET, O.; Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, 151, 29-63. 1994
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KRIEGER, N. "Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum*". Curitiba, 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências–Bioquímica)– Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. "Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state Fermentation". *Process Biochemistry*, V. 38, p. 715- 721, 2002.
- MESSIAS, J.M.; Costa, B.Z; Lima, V.M.G.; Giese, E.C.; Dekker, R.F.H.; Barbosa, A.M. Microbial lipases: "Production, properties and biotechnological applications". *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011
- PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. "Purification of Lipase": a Review. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, nº 3, p. 177-2000, 2000.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. "Plant lipases from latex": properties and industrial applications. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIM, S.; DOMINGUES, N. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LICCIO, M.; FREIRE, D. M. G.; production and partial characterization of lipase from *penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas*, 28(2):444-450, 2008.
- SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO E. C.; TURRA, V. ; BARATTI, J. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. "An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain". *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 26, p. 197-203, 2008.
- SILVA, G. S.; Bruno, L. M.; Castro, H. F. "Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase Intracelular". XVII simpósio nacional de bioprocessos. Natal RN, 2009
- SILVA, J.A. "Preparação de Biocatalisadores Utilizando Lipase de *Cândida antractica* Tipo B Imobilizada para Síntese de Ésteres de Vitamina A". Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, UFC, Ceará, 2007
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, v. 9, p. 113–148, 2000
- WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. "Green Chemistry". *Environmental Impact Assessment Review*, New York, v. 24, p. 775-799, 2004
- WOLSKI, E.; "Estudo Comparativo Da Produção De Lipase Por Fermentação Submersa Utilizando *Penicillium sp.* Livre e Imobilizado". Dissertação de Mestrado, URI-Erechim, 2008.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPES, o auxílio financeiro para realização deste trabalho.

