

Produção de Lipases por Fermentação no Estado Sólido

L. M. PINOTTI¹, J. X. LACERDA¹, M. M. OLIVEIRA e R. D. TEIXEIRA¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Engenharias e Tecnologia
E-mail para contato: pinotti2008@hotmail.com

RESUMO – O interesse na produção de lipases está relacionado ao seu potencial tecnológico em reações de esterificação e transesterificação. No entanto, os processos de produção e recuperação das enzimas possuem custos elevados, inviabilizando muitas vezes a sua utilização. Neste contexto a fermentação em estado sólido surge como alternativa para redução dos custos, uma vez que permite o uso de resíduos agroindustriais de baixo valor agregado e propicia a produção do biocatalisador mais concentrado. Dessa forma, neste trabalho, tem-se como objetivo estudar a produção de lipases utilizando o bagaço de cana como substrato. Os microrganismos utilizados foram o *Penicillium sp.* e o *Bacillus megaterium* e as condições operacionais estudadas foram temperatura (28, 33 e 38°C), teor de umidade (40, 50 e 60%) e concentração do indutor óleo de oliva (1, 3 e 5%), através de um planejamento fatorial (3³). O microrganismo melhor produtor de lipases foi o *Penicillium sp.* (0,3 UI/g_{substrato}), embora ainda muito baixo e com uma diferença muito pouco significativa quando comparada com a do *B. megaterium* (0,2 UI/g_{substrato}). O teor de umidade do meio de cultivo interferiu na produção enzimática para ambos os microrganismos.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como biocatalisadores em processos industriais tem sido amplamente estudada e vem apresentando panorama promissor para produção de compostos de alto valor agregado. Segundo Vargas (2004), são conhecidas atualmente cerca de 4.000 enzimas e destas, em torno de 200 são aplicadas em processos comerciais. Dentre as enzimas utilizadas como biocatalisadores destacam-se as lipases (E.C.3.1.1.3), que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, podendo também catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido de síntese. Essas enzimas apresentam uma ampla gama de substratos, possuem estabilidade à mudanças de temperatura e pH e à concentrações diferentes de solventes orgânicos e ainda catalisam reações apresentando alta quimio-regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004, Pastore *et al.*, 2003).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais (lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais e microbianas. Tanto microrganismos

eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência. As enzimas microbianas são mais frequentemente utilizadas devido à grande variedade de atividade catalítica, à facilidade de manipulação genética, rápido crescimento, são mais estáveis e a sua produção é mais conveniente e mais segura (Menoncin, 2007). Microrganismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas, e por esse motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores (Messias *et al.*, 2011).

Uma ferramenta de potencial interesse na obtenção de enzimas é a Fermentação em Estado Sólido (FES), pois permite o uso de rejeitos de outros processos industriais como substrato e suporte para o crescimento de microrganismos, reduzindo dessa forma o custo de produção das enzimas (Silva *et al.*, 2002, Menoncin *et al.*, 2009, Vargas, 2004). A FES tem como base o crescimento de microrganismos em substratos sólidos com baixa atividade de água e apresenta diversas vantagens quando comparada com a fermentação submersa tais como economia de espaço, simplicidade nos meios de fermentação, equipamentos simples e de fácil controle, altos rendimentos de produção, menor demanda energética, além de se obter o metabólito de interesse em uma concentração mais elevada. A absorção de água é essencial para o sucesso deste processo e, por este motivo são empregados substratos fibrosos, podendo estes fornecer os nutrientes necessários para o crescimento celular. Diversos resíduos agroindustriais podem ser empregados como suporte para a FES, como exemplos o bagaço de cana-de-açúcar e a casca de arroz (Oliveira *et al.*, 2012).

Embora a FES apresente as vantagens acima descritas, têm-se algumas limitações tais como a escolha dos microrganismos capazes de crescer sob condições de umidade reduzida, controle e monitoramento de parâmetros tais como pH, temperatura, umidade e fluxo de ar. Dentro deste cenário, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium sp.* e *B. megaterium*, e bagaço de cana-de-açúcar como suporte e fonte de nutrientes. Investigou-se o efeito da temperatura, umidade e concentração do indutor óleo de oliva através da técnica de planejamento fatorial de experimentos (3³).

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismos

O *B. megaterium* foi cedido gentilmente pelo grupo de pesquisa do DEQ da UFSCar e mantido em ágar-slant (meio Luria-Bertani) e congelado em solução de glicerol 20%. O *Penicillium sp.* foi isolado e cedido pelo grupo de pesquisa LABSAN/DEA/UFES e também mantido em ágar-slant (meio de ágar batata dextrose) e congelado em solução de glicerol 20% (-80°C).

2.2. Obtenção do Inóculo

B. megaterium: A bactéria foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) em câmara rotativa a 37°C. O tempo de obtenção do inóculo foi estudado e para isso foram retiradas amostras em intervalos de tempo e analisado a concentração celular por massa seca.

Penicillium sp.: O cultivo do fungo foi realizado em meio de PDA 3,9% à 28°C. O tempo de obtenção de inóculo foi estudado e para isso foram retiradas amostras a cada 24 horas e analisado a concentração de esporos. Para isso os esporos foram raspados com 10mL de twen80 (0,1% v/v) e contados em câmara de Neubauer.

2.3. Produção Enzimática

Para a produção da enzima foi utilizado bagaço de cana moído e peneirado até granulometria entre 0,6 e 1,18mm de diâmetro. Esse substrato foi seco em estufa a 55°C por 24 horas. O bagaço de cana foi então adicionado em erlenmeyers e umedecido com tampão fosfato 0,1mol/L pH 7,0 para obter a umidade desejada. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e, após resfriamento, inoculados com 1mL de inóculo líquido com concentração igual a 10^8 esporos/mL. Foram estudados a temperatura de cultivo (28, 33 e 38°C), o teor de umidade (40, 50 e 60%) e a concentração do indutor óleo de oliva (1, 3 e 5%) para o tempo de cultivo de 120 horas para o *Penicillium sp.* e 48 horas para o *B. megaterium*. Para a realização dos experimentos foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 3^3 (Tabela 1), com três pontos centrais, totalizando 29 experimentos para cada microrganismo.

Tabela 1 – Variáveis e níveis utilizados nos experimentos

	-1	0	+1
Temperatura de cultivo	28	33	38
Teor de umidade	40	50	60
Concentração do indutor	1	3	5

2.4. Extração da Enzima do Sólido Fermentado

A enzima foi extraída do material fermentado com 100mL de solução aquosa de NaCl 2% (m/v). A mistura de sólido fermentado (10g) e a solução extratora (100mL) foram colocados em agitador orbital durante 1 hora, a 200rpm e 29°C. A mistura foi filtrada em gaze e o sólido prensado manualmente para extração do líquido. O extrato resultante foi centrifugado por 30 minutos a 6.000g. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

2.5. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade das enzimas produzidas foi determinada de acordo com a metodologia descrita por

Silva (2007). Segundo o autor, a atividade lipásica pode ser quantificada pela hidrólise do paranitrofenolbutirato (pNPB) em 2-propanol a 25°C com adição de lipase. Para realizar a reação, um volume de 29mL de tampão fosfato 100mM pH 8,0 é adicionado a 1,0mL de solução de pNPB 15mM em 2-propanol em um reator encamisado, provido de agitação. A reação inicia-se com a adição da enzima. A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410nm foi monitorado por 9 minutos, retirando-se para isso cerca de 2 mL do sobrenadante a cada 1,5 minutos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Cinética de Crescimento do *Penicillium sp.*

A cinética de crescimento do *Penicillium sp.* foi estudada a 28°C, realizando-se contagem de esporos a cada 24h. Os resultados são apresentados na Figura 1:

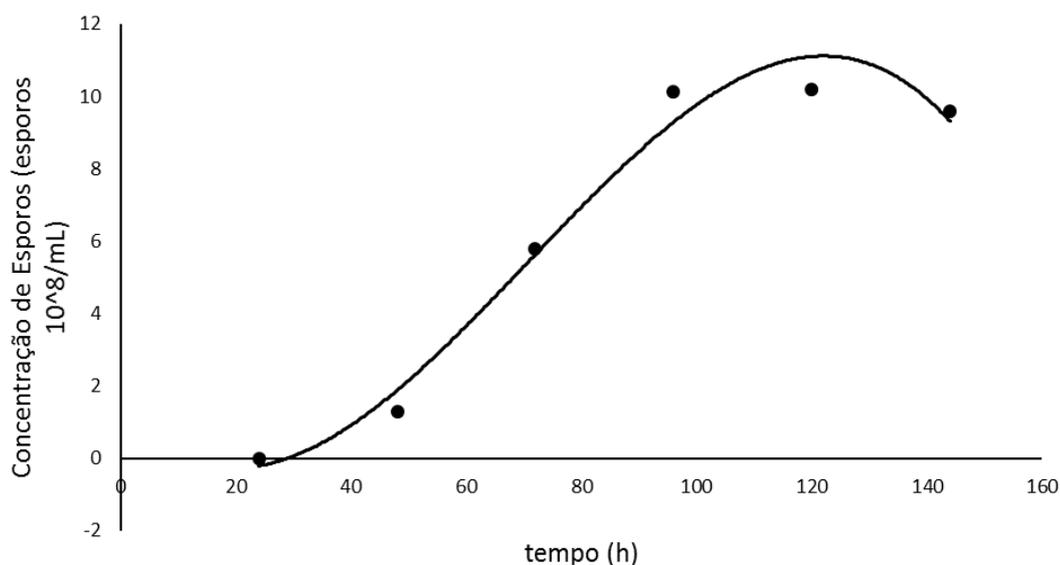


Figura 1: Resultados obtidos no estudo da cinética de crescimento do fungo *Penicillium sp.*

Pode-se observar que o fungo *Penicillium sp.* atingiu uma fase estacionária de crescimento entre o tempo de 96h e 144h. Dessa forma foi selecionado o tempo de 120h para a realização do inóculo com o fungo *Penicillium sp.*

3.2. Cinética de Crescimento do *B. megaterium*

Para a cinética de crescimento do *B. megaterium* foram retiradas amostras em intervalos de tempos e analisado a concentração celular por massa seca. Os resultados são apresentados na Figura 2.

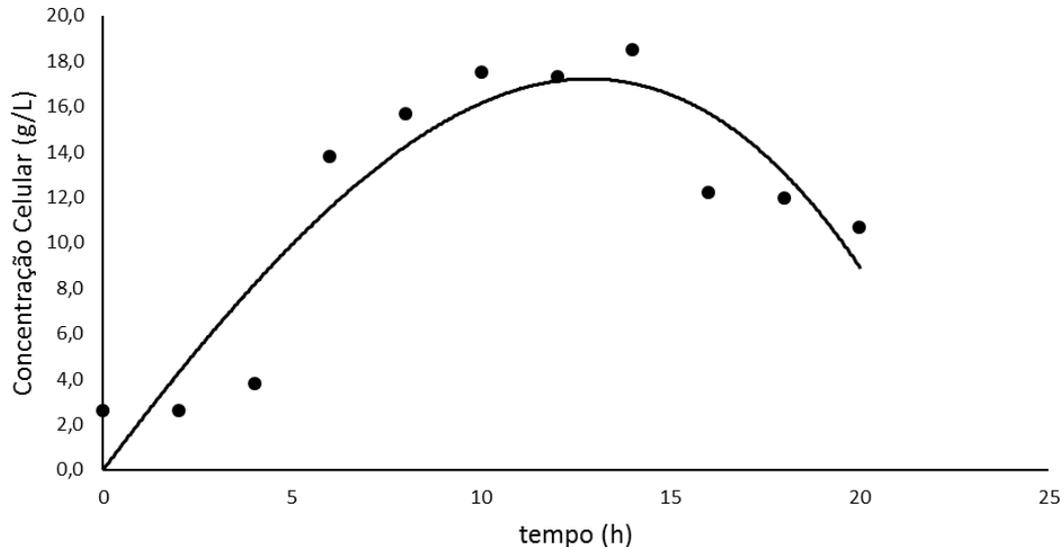


Figura 2. Resultados obtidos no estudo da cinética de crescimento da bactéria *B. megaterium*

O máximo de crescimento da bactéria *B. megaterium* ocorreu no intervalo entre 10 a 14 horas, com o pico em 14 horas, sendo, portanto, selecionado esse tempo para obtenção dos inóculos utilizados nas fermentações.

3.3. Produção Enzimática

Os resultados de produção enzimática a partir do fungo *Penicillium sp.* e da bactéria *B. megaterium* são apresentados na Tabela 2.

Pode-se observar que a produção de lipases foi baixa para ambos os microrganismos, embora o *Penicillium sp.* apresente uma produção um pouco maior (média de 0,3 UI/g substrato). Após análise estatística dos resultados verificamos que a umidade foi a única variável que interferiu na produção enzimática ($p < 0,05$) quando utilizado o *Penicillium sp.*, obtendo a equação 1. Valores maiores de umidade conduziram a melhores produções.

$$\text{UI/g}_{\text{substrato}} = 0,078931 + 0,004500U \quad (1)$$

Para as fermentações com o *B. megaterium* foi verificado que a Temperatura e a Umidade influenciaram nos resultados de produção de lipases, obtendo a equação 2.

$$\text{UI/g}_{\text{substrato}} = - 0,216885 + 0,009000T + 0,002667U \quad (2)$$

Tabela 2: Resultados obtidos nas fermentações utilizando os microrganismos *Penicillium sp.* e *B. megaterium*

Ensaio	T (°C)	Teor de umidade (%)	Concentração do indutor (%)	Atividade Enzimática	Atividade Enzimática
				(UI/ g substrato) <i>Penicillium sp.</i>	(UI/g substrato) <i>B. megaterium</i>
1	28	40	1	0,36	0,16
2	28	50	1	0,28	0,16
3	28	60	1	0,39	0,21
4	28	40	3	0,26	0,20
5	28	50	3	0,42	0,16
6	28	60	3	0,38	0,19
7	28	40	5	0,32	0,16
8	28	50	5	0,28	0,15
9	28	60	5	0,31	0,20
10	33	40	1	0,38	0,20
11	33	50	1	0,36	0,20
12	33	60	1	0,33	0,20
13	33	40	3	0,29	0,20
14	33	50	3	0,33	0,20
15	33	60	3	0,34	0,20
16	33	40	5	0,25	0,20
17	33	50	5	0,30	0,20
18	33	60	5	0,34	0,20
19	38	40	1	0,23	0,20
20	38	50	1	0,28	0,20
21	38	60	1	0,48	0,20
22	38	40	3	0,20	0,20
23	38	50	3	0,27	0,20
24	38	60	3	0,43	0,40
25	38	40	5	0,21	0,20
26	38	50	5	0,20	0,40
27	38	60	5	0,32	0,40
28	33	50	3	0,13	0,20
29	33	50	3	0,17	0,20

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que ambos os microrganismos produzem lipase por fermentação no estado sólido, embora ainda muito baixa. O teor de umidade foi uma variável que influenciou a produção de lipases quando utilizado o *B. megaterium* como o *Penicillium sp.*, sendo, portanto, uma variável que requer estudos posteriores.

5. REFERÊNCIAS

- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non- Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 42 (4), p. 279–286, 2004.
- MENONCIN, S. Concentração, Imobilização e Caracterização Parcial de Lipase Produzida por *Penicillium Verrucosum* utilizando Fermentação em Estado Sólido. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Agrárias, URI, Erechim-RS, 2007.
- MENONCIN, S., DOMINGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., OLIVEIRA, J.V., LUCCIO, M., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 29, n. 2, p. 440-443 – Campinas, 2009.
- MESSIAS, J.A.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. Lipases Microbianas: Produção, propriedade e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciênc. Exat. Tecnol.* v. 32, n.2. p. 213-234, 2011.
- OLIVEIRA, A.C.D, WATANABE, F.M.F., VARGAS, J.V.C., MARIANO, A.B., RODRIGUES, M.L.F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. *Rev. Bras. Tecnol. Agroind.*, v. 06, n. 02, p. 822-831, 2012.
- PASTORE, G.M., COSTA, V. dos S.R., KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, SP, 2003.
- SILVA, D., MARTINS, E.S., SILVA, R. da, GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, p. 318-324, 2002.
- 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.
- VARGAS, G.D.L.P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciências Agrárias – URI, Erechim, RS, 2004.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UFES e à FAPES pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.