

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *RHIZOMUCOR SP.*

M. M. OLIVEIRA¹ e L. M. PINOTTI¹

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

RESUMO – As lipases são muito utilizadas na biocatálise devido ao seu potencial tecnológico em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Entretanto, na maioria dos casos os processos enzimáticos possuem altos custos de produção e recuperação do biocatalisador do meio de fermentação. Assim, como uma tecnologia promissora para a produção de enzimas, temos a fermentação em estado sólido (FES), onde são utilizados substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, e o biocatalisador pode ser produzido em sua forma mais concentrada, podendo facilitar a sua recuperação do meio de fermentação. Dessa forma, tem-se como objetivo estudar a produção de lipases por *Rhizomucor sp.*, utilizando o bagaço de cana como substrato. As condições operacionais estudadas foram temperatura (28, 33 e 38°C) e teor de umidade (40, 50 e 60%), para bagaço de cana *in natura* e bagaço de cana tratado com ácido e base. Para os diferentes bagaços utilizados verificou-se que a temperatura interferiu na produção enzimática. A atividade enzimática variou nos ensaios entre 0,16 UI/g_{substrato} e 0,42 UI/g_{substrato}, sendo o melhor resultado obtido nos ensaios de 33°C e 60% de umidade.

1. INTRODUÇÃO

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., 2008).

Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluentes (Fernandez, 2007).

As lipases diferem grandemente com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal e animal) e propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de microorganismos, obtidas por meio de fermentação, são preferíveis às de fontes animais e plantas por sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de

synthetizá-las. Dentre as fontes produtoras destas enzimas, as fontes bacterianas possuem um rápido crescimento celular, em relação aos fungos (Jaeger et al., 1999).

Uma tecnologia promissora para a produção dessas enzimas é a fermentação em estado sólido (FES). Neste tipo de fermentação o microrganismo cresce em sólidos úmidos sem a presença de água livre. Essa técnica apresenta vantagens tais como economia de espaço; simplicidade nos meios de fermentação, equipamentos simples e de fácil controle, altos rendimentos de produção, menor demanda de energia, além de obter o metabólito de interesse na forma mais concentrada. O material sólido, onde o microrganismo cresce, age como suporte físico e como fonte de nutrientes. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia e para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Santana, 2012). O substrato a ser utilizado pode ser um resíduo da agricultura, sendo, portanto, uma matéria prima barata e que evitará o seu descarte como poluente. Podem-se utilizar diversos resíduos para a obtenção das lipases tais como tortas derivadas dos processos de extração do óleo (torta de milho, de girassol, soja, babaçu), bagaço de mandioca e bagaço de cana.

Ainda, 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 em concentrações reduzidas, sendo muito frequentemente usado o óleo de oliva (Castilho et al., 2000). 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. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é pesquisar meios de produção e condições físicas que maximizem a produção de lipases a partir de uma cepa fúngica (*Rhizomucor sp.*), utilizando a fermentação no estado sólido.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção e Propagação do Microrganismo

O *Rhizomucor sp.* foi cedido gentilmente pelo grupo de pesquisa da DEA/UFES. O microrganismo foi mantido em ágar-slant e congelado em solução de glicerol 20% (-80°C). A propagação do microrganismo foi feita por um período de 5 dias a 28°C no meio de ágar dextrose batata.

2.2. Obtenção do Inóculo

A cepa fúngica foi cultivada em meio de ágar dextrose batata (3,9%), de acordo com a metodologia descrita por Wolski 2008, em câmara rotativa à 28°C por 5 dias.

2.3. Produção Enzimática

Para a produção da enzima foi utilizado bagaço de cana moído e peneirado até granulometria entre 0,8 e 2,0mm de diâmetro. Esse substrato foi adicionado em erlenmeyers e umedecido com tampão fostato 0,1 mol/L pH 7,0 ou solução salina para obter umidade desejada. Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos e, após resfriamento,

inoculados com 1 mL de inóculo líquido (10^8 esporos /mL) e colocados em Shaker com aeração. Foi estudado a temperatura de cultivo (28, 33 e 38°C) e o teor de umidade (40, 50 e 60%) para os tempos de cultivo de 120 horas, com 5% de indutor óleo de óliva. Esse estudo também foi realizado com o bagaço de cana tratado com solução de ácido/ alcalino para deslignificação do material. Para a realização desses experimentos foi utilizado um planejamento fatorial do tipo 3^2 , com pontos centrais, totalizando 11 experimentos para cada um dos bagaços (tratado e não tratado). Os resultados obtidos foram tratados no *software* Statistica® 7 com nível de significância de 95%.

Pré-tratamento com uso de ácido e base: O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado de acordo com metodologia descrita por Carli et al. (2011). O bagaço foi inicialmente submetido a uma solução 1% (m/v) de ácido sulfúrico, na proporção de 1,0L para cada 50g de bagaço por 30min a 120°C. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada (a quente) até pH neutro. Em seguida realizou-se o tratamento alcalino, sendo empregado solução de NaOH 7% (m/v) por 30min a 120°C, na mesma proporção do ácido. Em seguida foi realizada filtração e lavagem do material a quente até pH neutro. A amostra foi levada a estufa por 48h a 45°C.

2.4. Extração da enzima do sólido fermentado

A enzima foi extraída do material fermentado com 100 mL de solução aquosa de NaCl 2 % (m/v). A mistura de sólido fermentado (10 g) e a solução extratora (100mL) foram colocadas em agitador orbital durante 1 h, a 200 rpm e 29°C. A mistura foi filtrada em gaze e o sólido prensado manualmente para extração do líquido, que contém a lipase. O extrato resultante foi centrifugado por 10 min. a 10.000g. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática.

2.5. Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Silva (2007): Para esta reação, um volume de 29mL de tampão fosfato 100mM pH 8,0, foi adicionado a 1,0mL de solução de pNPB 15mM em 2-propanol num reator encamisado, mantido a 25°C e provido de agitação, sendo a reação iniciada pela adição da enzima. A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410nm foi monitorado por 9 minutos, retirando, para isso, aproximadamente 2 mL do sobrenadante, a cada 1,5 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção Enzimática

Na Tabela 1 encontram-se os resultados de produção enzimática obtidos nos experimentos com diferentes condições de umidade, temperatura e substratos estudados. Os substratos utilizados foram: Bagaço de cana *in natura* umedecido com tampão pH 7 (I.N. T.), Bagaço de cana *in natura* umedecido com solução salina (I.N. S.) e Bagaço de cana tratado umedecido com solução salina (Tr. S.).

Tabela 1: Produção de lipases utilizando o *Rhizomucor sp.* em diferentes condições de meio.

Ensaio	Umidade	T (°C)	Atividade enzimática		Atividade enzimática	
			UI/g _{substrato} I.N. T.	UI/g _{substrato} I.N. S.	UI/g _{substrato} Tr. S.	Tr. S.
1	40 %	28	0,18	0,36	0,37	
2	40 %	33	0,18	0,37	0,37	
3	40 %	38	0,16	0,20	0,20	
4	50 %	28	0,17	0,38	0,38	
5	50 %	33	0,18	0,38	0,39	
6	50 %	38	0,13	0,19	0,20	
7	60 %	28	0,18	0,41	0,41	
8	60 %	33	0,18	0,42	0,42	
9	60 %	38	0,16	0,20	0,20	
10	50 %	33	0,18	0,38	0,39	
11	50 %	33	0,18	0,38	0,38	

Os resultados experimentais foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados de Análise de Variância (ANOVA) para a produção enzimática

Bagaço de cana <i>in natura</i> umedecido com tampão pH 7 (I.N. T.)					
Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Umidade(L)	0,000000	1	0,000000	0,00000	1,000000
Umidade(Q)	0,000281	1	0,000281	4,36364	0,081719
T (°C)(L)	0,001067	1	0,001067	16,58182	0,006560
T (°C)(Q)	0,000961	1	0,000961	14,93455	0,008319
Error	0,000386	6	0,000064		
Total SS	0,002491	10			

Bagaço de cana <i>in natura</i> umedecido com solução salina (I.N. S.)					
Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Umidade(L)	0,001667	1	0,001667	11,4000	0,014924
Umidade(Q)	0,000309	1	0,000309	2,1168	0,195930
T (°C)(L)	0,052267	1	0,052267	357,5040	0,000001
T (°C)(Q)	0,024803	1	0,024803	169,6512	0,000013
Error	0,000877	6	0,000146		
Total SS	0,080255	10			

Bagaço de cana tratado umedecido com solução salina (Tr. S.)					
Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Umidade(L)	0,001350	1	0,001350	10,0370	0,019365
Umidade(Q)	0,000110	1	0,000110	0,8152	0,401375
T (°C)(L)	0,052267	1	0,052267	388,5913	0,000001
T (°C)(Q)	0,024540	1	0,024540	182,4470	0,000010
Error	0,000807	6	0,000135		
Total SS	0,080018	10			

A análise estatística dos experimentos nos mostra que a temperatura (L e Q) foi a única variável que interferiu nos resultados para o bagaço *in natura* umedecido com tampão. Para os demais bagaços tanto a variável temperatura (L e Q) como a umidade (L) influenciaram na produção enzimática. Na figura 1 são apresentados os gráficos de superfície de resposta.

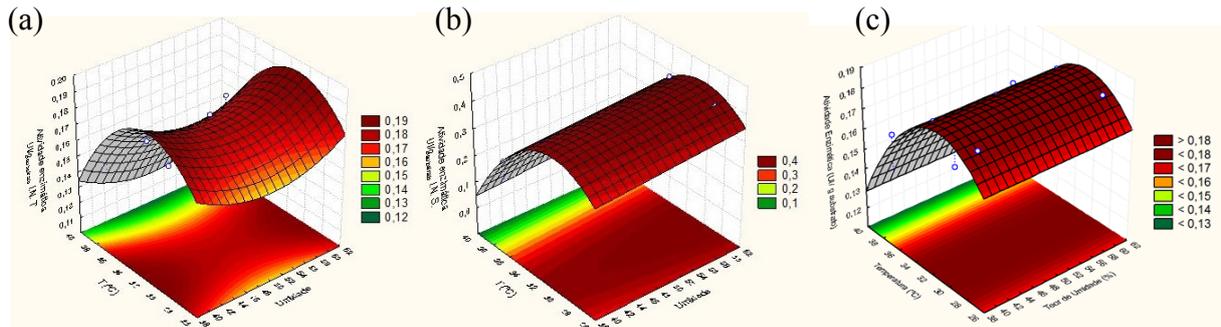


Figura 1 – Gráfico de superfície para análise da atividade enzimática em função da temperatura e da umidade, utilizando bagaço de cana-de-açúcar (a) I.N. T (b) I.N. S (c) Tr. S.

Pode-se observar que os experimentos realizados à 38°C conduziram a uma menor atividade enzimática. Nessa temperatura o microrganismo apresentou um baixo crescimento, como pode ser observado na figura 2a. Já nas demais temperaturas, podemos notar um desenvolvimento maior do microrganismo sobre o substrato (figuras 2b e 2c) e conseqüentemente uma maior produção enzimática.

Também vale ressaltar que a adição de solução salina para umedecer o meio, ao invés de tampão pH 7, ajudou no desenvolvimento do *Rhizomucor sp.*, independente do substrato utilizado (bagaço tratado ou *in natura*), obtendo uma maior produção enzimática.

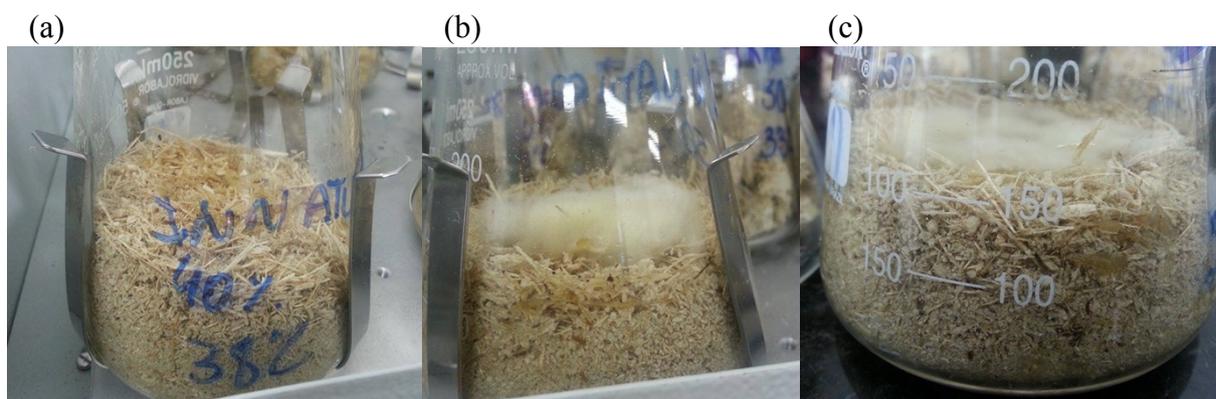


Figura 2. Fotos dos experimentos de fermentação a) T 38°C e 40% umidade (experimento 3); b), T 33°C e 50% umidade (experimento 5); c) T 28°C e 40% umidade (experimento 1).

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que na fermentação em estado sólido, utilizando o bagaço de cana como substrato, a temperatura influenciou de forma significativa na produção enzimática do

fungo *Rhizomucor sp.*, obtendo melhores produção à 28°C e 33°C. Outro fator importante que influenciou a produção enzimática foi o tipo de solução utilizado para umedecer o substrato. Quando utilizado solução salina ao invés do tampão pH 7, obtivemos uma melhora significativa na produção enzimática.

5. REFERÊNCIAS

CARLI, C.M., CRUZ, A.J.C., SILVA, R.G., Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos para produção de bioetanol. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, RS, 2011.

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.

JAEGER, K.E.; DIJSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. Annual Rev. Microbiol., v. 53, p.315-351, 1999.

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.

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.

SANTANA, R. S. M. *Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido*. 2012. 73f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do sudoeste da Bahia, Bahia. 2012.

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.

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