

Estudo da extração de lipase obtida por fermentação em estado sólido utilizando como substrato torta de canola

Bruno Venturin¹, Jéssica Mulinari¹, Marina Sbardelotto¹, Analise Dall Agnol¹, Gean Delise Leal Pasquali Vargas², Helen Treichel¹

¹Universidade Federal da Fronteira Sul – Departamento de Engenharia Ambiental
CEP: 99700-000 Erechim – Rio Grande do Sul

²Universidade Federal da Fronteira Sul – Departamento de Engenharia Ambiental
CEP 99700-000 Erechim – RS - E-mail: brunoventurin583@gmail.com

RESUMO

*O presente trabalho avaliou o processo de extração de lipase produzida pelo fungo *Aspergillus sp.*, identificado como um bom produtor da enzima. Para produção da lipase, foi utilizado o processo de fermentação em estado sólido tendo como substrato a torta de canola, subproduto agroindustrial resultante do processo de extração do óleo de canola. Buscou-se avaliar a influência da temperatura e do pH de extração da enzima, para isso utilizou-se um delineamento experimental a fim de avaliar o processo de extração. Os resultados obtidos mostraram que a temperatura mais adequada para a extração das lipases é de 50°C e o pH, segundo análise estatística não apresentou efeito significativo, na faixa estudada.*

Palavras-chave: extração, temperatura, pH, lipase, fermentação em estado sólido.

INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que tem capacidade catalítica na modificação de lipídios esterificados, via hidrólise, esterificação e interesterificação, bem como na obtenção de ácidos graxos específicos ou glicerídeos de óleos vegetais¹. O atual interesse na produção da enzima provém de sua vasta aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica, na produção de biocombustíveis e no tratamento de águas residuárias que contem óleos². Um dos limitantes ao uso das lipases pela indústria é o elevado custo das lipases comerciais, o que impulsiona o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à produção desta enzima a partir de microorganismos filamentosos, utilizando a fermentação em estado sólido (FES) e tendo como substrato subprodutos agroindustriais (torta de canola), que além de agregarem valor a materiais de baixo custo no mercado, podem reduzir os custos de produção da enzima³. O fungo *Aspergillus sp.*, tem sido citado como um bom produtor de lipase extracelular por ter capacidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas⁴. Uma das etapas da produção é a extração da enzima do meio sólido, sendo de fundamental importância a otimização das condições dessa etapa, pois através dela pode-se definir as condições que conduzem à máxima atividade enzimática, determinar as faixas de atuação das lipases e, conseqüentemente, definir as suas possíveis aplicações⁵. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a extração de lipase microbiana, utilizando o fungo *Aspergillus sp.*, por meio da fermentação em estado sólido e tendo como substrato a torta de canola. Tendo em vista que os principais fatores que influenciam o processo de extração sólido-líquido são o pH e a temperatura⁶, buscou-se determinar a influência desses fatores durante a extração, a fim de otimizar o processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Neste estudo utilizou-se o fungo *Aspergillus sp.* isolado por Rigo (2009) e identificado como bom produtor de lipases. O meio para a produção de inóculo continha: amido solúvel 2%, óleo de oliva 1%, extrato de levedura 0,1%, CaCO₃ 0,5%, MgSO₄ 0,025%, (NH₄)SO₄ 0,5%, KH₂PO₄ 0,05% e ágar 2%, sendo esta solução solubilizada e esterilizada a 1 atm por 30 minutos. Após a esterilização o meio foi então inoculado com 100µmL de suspensão de esporos do fungo *Aspergillus sp.*, sendo então incubados por sete dias a 30°C. Os esporos utilizados no preparo do inóculo foram coletados através de adição de 20mL de solução Tween 80 0,1% (v/v). Desta solução diluiu-se 1mL em um erlenmeyer contendo 100ml de solução Tween 80 0,1% (v/v) para realização da contagem de esporos contidos no meio de cultura.

Fermentação em Estado Sólido

Como substrato, foi escolhido resíduo da indústria de processamento de óleo de canola (torta de canola). O meio de fermentação foi preparado usando-se 10g de torta de canola (base seca) em béqueres de polipropileno (600mL). A torta foi suplementada com 2% de nitrogênio dissolvido em solução preparada com água deionizada, cuja concentração, de água na torta, foi ajustada de acordo com a umidade final desejada, sendo ela de 60%. A temperatura de fermentação foi fixada em 27°C. Após a adição do suplemento, os béqueres foram fechados e esterilizados a 1atm por 30 minutos. As condições acima foram definidas com base em resultados obtidos preliminares durante a pesquisa, sendo que a temperatura foi fixada através de resultados encontrados na literatura. Os béqueres contendo o meio estéril foram então inoculados com uma concentração de esporos de 10⁸ esporos/g torta seca, estes foram incubados em temperatura de 27°C. As amostras foram retiradas em 48h de fermentação, após a coleta fez-se a medição do pH, umidade da torta e atividade lipásica.

Avaliação das Condições de Extração

Para o estudo do processo de extração da enzima utilizou-se a técnica do planejamento experimental. As variáveis investigadas foram o pH do solvente (6, 7, 8) e a temperatura (30, 40, 50° C). A variável dependente utilizada foi a atividade hidrolítica da lipase no extrato bruto. A extração foi efetuada em frascos de erlenmeyer (250 mL) pela adição de um tampão de fosfato de sódio em condições experimentais estabelecidas no planejamento experimental. As amostras (10 g) foram agitadas num agitador orbital durante 30 minutos a 165 rpm, condição determinada em trabalhos anteriores⁷. A separação da fase líquida foi realizada através de filtração manual. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade de lipase para cada ensaio. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do software Statistica[®] (StatSoft Inc., Tulsa, EUA, versão 7.0).

Determinação da atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica foi realizada utilizando uma emulsão de óleo de oliva 10 % (m/v) e goma arábica 5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. Adicionou-se a 18 mL de emulsão, 2 mL da amostra do extrato bruto. Após incubação por 15 min. a 37 °C com agitação, a reação foi interrompida através da adição de solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados até pH 11 com solução 0,05 M de

NaOH. Sendo que uma unidade de atividade hidrolítica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições de reação⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se trabalha com enzimas alguns parâmetros são determinantes na busca por elucidar a melhor condição para a obtenção destes biocatalisadores. Dentre os diversos fatores que influenciam no processo de extração das enzimas produzidas por fermentação em estado sólido, destacam-se pH e a temperatura. Além disso, a estabilidade térmica da enzima, que é uma função do tempo de exposição, devem igualmente ser consideradas⁶.

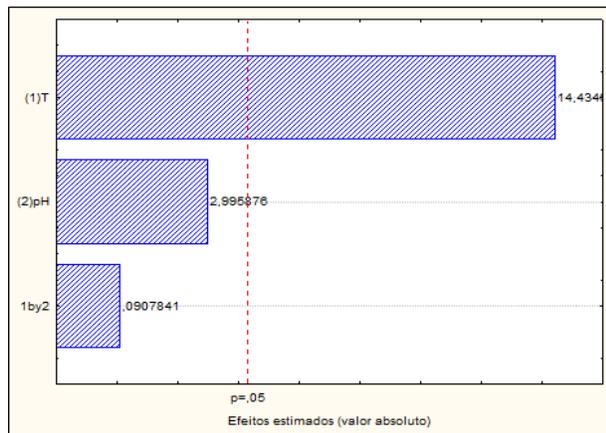
A Tabela 1 apresenta a matriz do planejamento experimental utilizada nos ensaios, bem como os resultados para a variável dependente atividade hidrolítica nas diferentes condições avaliadas. Através destes resultados juntamente com a análise estatística apresentada na Figura 1(a), é possível verificar que a temperatura apresenta um efeito positivo na atividade da enzima, sendo que a maior atividade (2,54 U/g) foi obtida quando se utilizou a temperatura de 50°C e tampão em pH 8.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados de atividade lipásica para os tempos de 48 horas de fermentação.

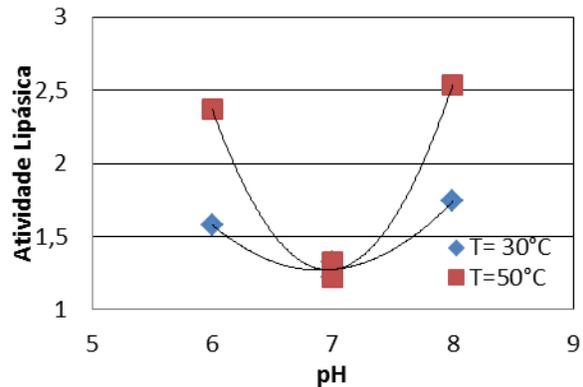
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade hidrolítica (U/g)
1	30 (-1)	6 (-1)	1,58
2	50 (+1)	6 (-1)	2,37
3	30 (-1)	8 (+1)	1,74
4	50 (+1)	8 (+1)	2,54
5	40 (0)	7 (0)	1,27
6	40 (0)	7 (0)	1,33
7	40 (0)	7 (0)	1,22

O gráfico de Pareto (Figura 1a), mostra uma correlação positiva para a temperatura e negativa para a variável pH. Porém, ao analisar a Figura 1b, nota-se que há aumento da atividade lipásica nos extremos de pH (6 e 8), e uma diminuição da atividade no pH 7.

Figura 1 – (a) Efeito das variáveis de estudo - Atividade hidrolítica (48 horas de fermentação) com 95% de certeza conforme as condições estabelecidas no planejamento experimental.
(b) Variação de atividade lipásica para os pHs testados em diferentes temperaturas.



(a)



(b)

CONCLUSÕES

Visando o máximo rendimento na produção de enzimas microbianas, o estudo da extração destas após o processo fermentativo mostra-se de extrema relevância. Desse modo, a metodologia utilizada mostrou-se útil na avaliação da extração de lipase hidrolítica produzida por *Aspergillus sp.* em fermentação em estado sólido. A condição que maximizou a extração foi utilizando tampão fosfato de sódio 100mM pH 8 e temperatura de 50°C, atingindo-se uma atividade média de 2,54 U/g.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro (Processo número 12/1028-0)

REFERÊNCIAS

- (1) KUMAR, S., KIKON, K., UPADHYAY, A., KANWAR, S.S, GUPTA, R. **Protein Expression Purificati**, v. 41, p. 38-44, 2005.
- (2) SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; ABDUKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. **Resources, Conservation and Recyclin**, v. 58, p. 36-44, 2012.
- (3) SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T.; BARRENA, R.; SANCHEZ, A. **Bioresource technol.**, 120, 2011.
- (4) MURUCI, L. N. M. **Produção e caracterização de lipase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação no estado sólido utilizando resíduos da agroindústria**. Tese, UFRRJ, 2012.
- (5) MENONCIN, S. **Concentração, imobilização e caracterização parcial de lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando fermentação em estado sólido**. Tese, URI, Brasil, 2007.
- (6) VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, J. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M. **Food Bioprocess Technol**, v. 3, p. 461-465, 2010.
- (7) DI LUCCIO M., CAPRA F., RIBEIRO N.P., VARGAS G.D.L.P., FREIRE D.M.G., OLIVEIRA D. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 113-116, 173- 180, 2004.
- (8) CAVALCANTI E.A.C., GUTARRA M.L.E., FREIRE D.M.G., CASTILHO L.R., SANT'ANNA G.L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p.79-84, 2005.