

Avaliação da produção de lipase microbiana a partir de *Aspergillus sp.*, utilizando torta de canola como substrato

Marina Sbardelotto², Analise Dall Agno¹, Bruno Venturin¹, Jéssica Mulinari¹, Helen Treichel¹, Gean Delise Leal Pasquali Vargas¹

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: msbardelotto01@gmail.com

RESUMO

O presente trabalho avaliou a produção de lipase utilizando o fungo Aspergillus sp., que foi identificado como um bom produtor da enzima. Foi utilizado como substrato no processo de fermentação em estado sólido, o subproduto da indústria de processamento de canola, a torta de canola. Para este estudo foi elaborado um delineamento composto central 2² e então verificou-se que a melhor condição para a produção de lipase utilizando o fungo Aspergillus sp. tendo como substrato a torta de canola, foi de 60 % de umidade e, 2 % de ureia como fonte suplementar de nitrogênio.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, atividade lipásica, umidade, suplementação.

INTRODUÇÃO

O uso de tecnologias enzimáticas é uma ferramenta promissora para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as diversas enzimas utilizadas industrialmente, as lipases tem despertado interesse por apresentarem capacidade de catalisar reações em meios orgânicos e aquosos, ou seja, em meios que apresentam condições restritas de água¹. Assim, as lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas capazes de catalisar a hidrólise de triacilglicerol para diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres² e, além disso, apresentam elevado potencial de aplicação pela sua afinidade com uma ampla gama de substratos, pela sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos¹. O atual interesse na produção da enzima está associado a sua ampla aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, na produção de biocombustíveis e no tratamento de águas residuárias que contenham óleos³. Porém, o fator limitante do uso das enzimas é o elevado custo da lipase comercial, com isso, a produção de lipases a partir de micro-organismos filamentosos, utilizando a fermentação em estado sólido (FES) e tendo como substrato subprodutos agroindustriais (torta de canola), surge com alternativa para diminuir consideravelmente os custos do processo⁴. Dentre estes micro-organismos, pode-se citar o fungo *Aspergillus sp.* que apresenta-se como um bom produtor de lipase extracelular por ter capacidade de fermentar uma grande variedade de matérias primas⁵. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipase microbiana, utilizando o fungo *Aspergillus sp.*, por meio da fermentação em estado sólido e tendo como substrato a torta de canola. Buscou-se através da técnica de planejamento experimental determinar as variáveis que podem influenciar o processo de fermentação como: suplementação de nitrogênio e a umidade do meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e preparo do inóculo.

Definiu-se como o micro-organismo de estudo o fungo *Aspergillus sp.* que foi isolado por Rigo (2009) e identificado como um bom produtor de lipases microbianas. O meio de cultura utilizado para a produção de inóculo continha: amido solúvel 2%, óleo de oliva 1%, extrato de levedura 0,1%, CaCO_3 0,5%, MgSO_4 0,025%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, KH_2PO_4 0,05% e ágar 2%, sendo esta solução solubilizada e esterilizada a 1atm por 30 minutos. Após a autoclavagem, inoculou-se o meio com 100 μL de suspensão de esporos do fungo *Aspergillus sp.*, sendo então incubados por sete dias a 30°C. A coleta dos esporos para preparação do inóculo foi realizada adicionando-se 20mL de solução Tween 80 0,1% (v/v) e pérolas de vidro ao meio de cultura contendo esporos. 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.

Substrato e Suplementos

Como substrato, utilizou-se na fermentação em estado sólido (FES) o resíduo da indústria de processamento de óleo de canola (torta de canola) e, a partir disto determinou-se o teor de umidade da mesma (12,63%) segundo o Manual de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁶. Como fonte suplementar de nitrogênio utilizou-se a ureia

Fermentação em Estado Sólido

Para o preparo do meio de fermentação utilizou-se 10g de torta de canola (base seca) em béqueres de polipropileno (600mL). A suplementação foi adicionada através de solução preparada com água deionizada, cuja concentração foi ajustada de acordo com a umidade final desejada na torta, conforme teor de umidade previsto no planejamento experimental. O efeito da umidade e suplementação com nitrogênio foi avaliado na produção de lipase através de um delineamento composto central ²². Após a adição do suplemento, os béqueres foram fechados com manta acrílica e papel alumínio e esterilizados a 1atm por 30 minutos. Os béqueres contendo o meio estéril foram então inoculados com uma concentração de esporos de 10^8 esporos/g de torta seca, e incubados à temperatura de 27°C. As amostras foram retiradas seguindo o intervalo de estudo das variáveis proposto pela literatura para o monitoramento da umidade da torta e atividade lipásica (U).

Determinação de atividade hidrolítica

Após o período de fermentação, a extração da enzima foi realizada utilizando tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0 (45mL) em shaker com velocidade de 160 rpm a uma temperatura fixa de 35°C por 30 minutos. Após extração o meio foi filtrado por prensagem manual, obtendo-se o sobrenadante. Para a determinação da atividade hidrolítica utilizou-se 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 em 18 mL da emulsão 2 mL da amostra do sobrenadante. Após incubação por 15 minutos a 35 °C com agitação e amostras em duplicata, 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 11,00 com solução 0,05M de NaOH. Uma unidade de atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições de reação⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de resultados obtidos em um planejamento anterior (dados não mostrados) constatou-se que não há a necessidade de suplementação de carbono, visto que este não apresentou efeito significativo. Assim, a partir destes resultados propôs-se um novo delineamento composto central (Tabela 1) a fim de avaliar os efeitos da umidade e da fonte de nitrogênio (ureia), que foram as variáveis que se mostraram significativas no planejamento anterior, fixando a temperatura de fermentação em 27°C e finalizando o processo no tempo de 48 horas. A matriz do planejamento experimental e os resultados de atividade lipásica encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados de atividade lipásica produzida por *Aspergillus sp.* em torta de canola após 48 horas de fermentação a 27°C.

Umidade (%)	Fonte de N Ureia (%)	Atividade Lipásica (U/g) *
60 (-1)	2(-1)	0,84
80 (1)	2(-1)	0,65
60 (-1)	6(+1)	0,00
80 (1)	6(+1)	0,00
70(0)	4(0)	0,34
70(0)	4(0)	0,30
70 (0)	4 (0)	0,32

*Unidade de Atividade lipásica por grama de torta seca.

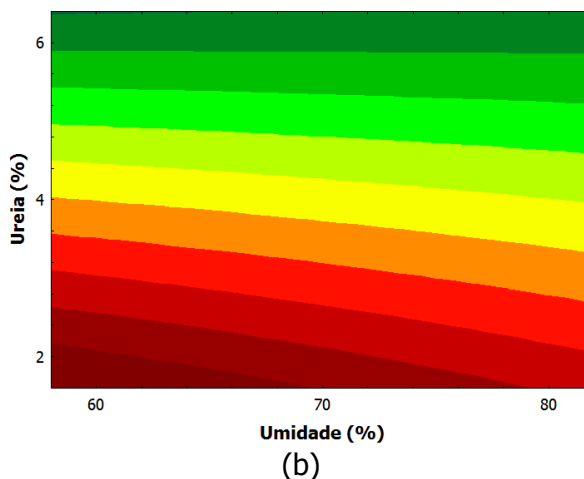
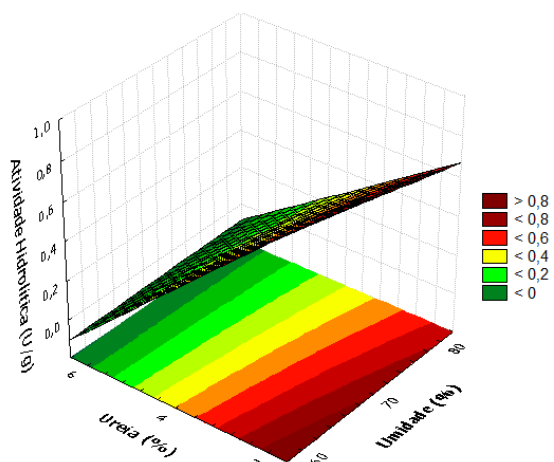
A análise estatística dos dados permitiu verificar que a variável de maior influência na atividade lipásica é a umidade do meio, porém a interação entre umidade e fonte de nitrogênio também mostra uma influência positiva na produção da lipase. Assim foi possível obter um modelo matemático empírico que expressa o comportamento da atividade enzimática em função da umidade e da concentração de ureia. O modelo matemático, apresentado na Equação 1, foi validado através da análise de variância, sendo que o F calculado foi maior que o F tabelado e o valor do R² foi de 0,99. A partir do modelo matemático obtido, os valores preditos foram calculados e observou-se desvios relativos inferiores a 10%.

$$\text{Atividade Enzimática} = 0,35 - 0,05. \text{Umidade} - 0,37. \text{Ureia} + 0,048. \text{Umidade.Ureia}$$

Equação 1

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) obtidas a partir da validação do modelo matemático. Sendo assim, verificou-se que a melhor condição para a produção de lipase utilizando o fungo *Aspergillus sp.* tendo como substrato a torta de canola, foi de 60 % de umidade e, 2 % de ureia como fonte suplementar de nitrogênio.

Figura 1—(a) Superfície de resposta e (b) Curva de contorno da atividade lipásica em função da umidade da torta e da suplementação do meio com ureia.



(a)

(b)

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos determinam que a umidade do meio de fermentação tem influencia positiva resultando na máxima produção de lipases. Porém pode-se concluir que para a máxima produção de lipases deve-se utilizar além de altos teores de umidade uma fonte de nitrogênio, pois a interação entre estas duas variáveis foi positiva. Na literatura há poucos relatos sobre a produção de lipase por *Aspergillus sp.* utilizando a torta de canola como substrato. Assim, há a necessidade de mais estudos sobre as variáveis que influenciam esta produção.

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) FERANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** Dissertação de Mestrado, UFPr, 2007.
- (2) CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D., OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.
- (3) SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; ABDUKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. **Resources, Conservation and Recyclin.** v. 58, p. 36-44, 2012.
- (4) SANTIS-NAVARRO, A.;GEA, T.; BARRENA, R.; SANCHEZ, A. **BioresourceTechnol.**, 120, 2011.
- (5) MURUCI, L. N. M. **Produção e Caracterização de Lipase de AspergillusNiger obtida por Fermentação no Estado Sólido Utilizando Resíduos da Agroindústria.** Tese, UFRRJ, 2012.
- (6) Adolfo Lutz: vol.1. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3ª edição, Instituto Adolfo Lutz, SP.
- (7) 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