

# USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

**Christian O. Reinehr<sup>1</sup>**

Professor/Pesquisador do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo.

E-mail para contato: reinehr@upf.br

**Tatiana M. Smaniotto<sup>1</sup>, Valquíria Q. Morais<sup>2</sup>, Luisa Bortoluzzi<sup>2</sup>**

Acadêmico do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo.

E-mail para contato: 78527@upf.br

**Luciane M. Colla.<sup>2</sup>**

Professor/Pesquisador do curso Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo.

**Resumo.** As lipases são enzimas utilizadas em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico e na indústria química. Estas enzimas catalisam reações de hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação. A produção de enzimas por microrganismos é afetada por diversos fatores, como o pH e a temperatura. Objetivou-se neste trabalho produzir lipases com fungos do gênero *Aspergillus*, avaliando o efeito dos indutores e da umidade utilizando processo em estado sólido. Foram utilizados 2 planejamentos fatoriais completos ( $3^2$  e  $2^2$ ), inicialmente selecionando-se o microrganismo e o indutor, e posteriormente avaliou-se a influência da concentração de indutor e da umidade. Na primeira etapa as maiores atividades lipolíticas, de 24,171 U, foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* em 6 dias de fermentação. As maiores atividades lipolíticas foram encontradas utilizando-se óleo de soja como indutor. Na segunda etapa as maiores atividades lipolíticas foram encontradas nos pontos centrais para 4 e 6 dias, com 65% de umidade e 2% de óleo de soja.

**Palavras - chave:** Lipases. *Aspergillus*.

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases que têm como função biológica catalisar a hidrólise de triacilgliceróis insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Além desta função, as lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não-aquoso (Houde *et al.*, 2004). As lipases possuem versatilidade nas aplicações, facilidade de produção em grande escala, tornando-as atrativas para aplicações industriais, tais como nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e de produção de biodiesel (Burkert *et al.*, 2004).

Segundo Rivaldi *et al.* (2010), o glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, tornando necessária a busca de alternativas para o uso do glicerol bruto gerado. A conversão microbiana de glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado é uma alternativa relevante para a maior valorização da produção de biodiesel. Embora o glicerol seja assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, existem poucos estudos utilizando glicerol para produção de lipases com obtenção de atividades lipolíticas significativas.

Desta forma, objetivou-se produzir lipases com fungos do gênero *Aspergillus*, avaliando o efeito dos indutores (óleo de soja e glicerol não residuais) e da umidade utilizando processo fermentativo em estado sólido.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos

Os fungos utilizados foram do gênero *Aspergillus*, sendo: *A. niger* cepa O-4, previamente isolada por Colla *et al.* (2009), cepas *A. niger* e *A. fumigatus*, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Fermentações da Universidade de Passo Fundo.

### 2.2. Condições experimentais

O meio de cultivo foi preparado a partir da mistura de 85% de farelo de soja e 15% de casca de soja. 25 g da mistura foram adicionadas em béqueres de polipropileno tampados com manta acrílica hidrofóbica. O meio de cultivo foi autoclavado a 121°C por 20 min. A umidade foi acertada pela adição de água destilada estéril, com posterior adição de indutores. Estas variáveis foram controladas segundo os níveis planejados. A inoculação foi realizada com a adição de 1mL da solução de esporos para cada béquer, correspondendo a uma concentração final de  $10^7$  esporos/g de substrato. Os experimentos foram incubados em estufa a 30°C, sendo realizada a coleta das amostras (1g) para a determinação da atividade de hidrólise.

Foram realizados 2 planejamentos fatoriais completos, um  $3^2$  e um  $2^2$ , respectivamente. No planejamento  $3^2$  objetivou-se a seleção de microrganismos (3 cepas citadas) e indutores (óleo de soja, glicerol e mistura de ambos) para a produção de enzimas com atividade de hidrólise em condições fixas de umidade (65%), segundo a Tabela 1. No planejamento  $2^2$ , estudou-se a

influência da concentração de indutor (melhor indutor do planejamento anterior) e da umidade (entre 60 e 70%), segundo a Tabela 2. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 1: Planejamento Fatorial Completo  $3^2$  para a seleção de fungos e indutores.

Exp.	X1 (Fungo)	X2 (Indutor)
1A	-1( <i>Aspergillus Fumigatus</i> )	-1(2 % OS)
2A	-1( <i>Aspergillus Fumigatus</i> )	0(1 % Glicerol)
3A	-1( <i>Aspergillus Fumigatus</i> )	1(2 % OS, 0,5 % OS)
4A	0( <i>Aspergillus niger</i> )	-1(2 % OS)
5A	0( <i>Aspergillus niger</i> )	0(1 % Glicerol)
6A	0( <i>Aspergillus niger</i> )	1(2 % OS, 0,5 % OS)
7A	1( <i>Aspergillus niger cepa O4</i> )	-1(2 % OS)
8A	1( <i>Aspergillus niger cepa O4</i> )	0(1 % Glicerol)
9A	1( <i>Aspergillus niger cepa O4</i> )	1(2 % OS, 0,5 % OS)

Tabela 2: Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  para estudo da umidade e [ ] de indutor com 3 pontos centrais.

Exp	X1(Umidade)	X2 ([ ] Indutor)
1A	-1(60 %)	-1(0 %)
2A	1(70 %)	-1(0 %)
3A	-1(60 %)	1(4 %)
4A	1(70 %)	1(4 %)
5A	0(65 %)	0(2 %)
6A	0(65 %)	0(2 %)
7A	0(65 %)	0(2 %)

### 2.3. Determinação da atividade de hidrólise

A atividade lipolítica foi determinada, em duplicata, através do método proposto por Burkert *et al.* (2004). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 $\mu$ mol de ácido graxo por minuto por grama de farelo fermentado úmido (1 U=1  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>), nas condições do ensaio.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa as maiores atividades lipolíticas foram obtidas utilizando-se o fungo *Aspergillus niger* O-4, de 24,171 $\pm$ 6,232 U em 6 dias de fermentação. Em relação ao indutor, observou-se que as maiores atividades lipolíticas foram encontradas utilizando-se 2% de óleo de soja, com valores de atividade lipolítica de 7,692 $\pm$ 0,119 U, 1,030 $\pm$ 0,266 U e 24,171 $\pm$ 6,232 U, para os fungos *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. niger* O-4, respectivamente. Os lipídios são indutores essenciais para alta produção de lipases e o óleo de soja, bem como de outros óleos vegetais como oliva e milho fontes de carbono comumente utilizadas para a produção de lipase. Porém, devido ao alto custo desses óleos, e sua importância como alimento, torna-se importante o estudo de fontes alternativas como o glicerol. Os resultados do planejamento experimental mostraram que o fungo *A. niger* O-4 com adição de 2% óleo de soja foi a melhor condição testada. Estes resultados obtidos estão de acordo com os obtidos em Rigo (2009), que na produção de lipases por FES com fungo *Penicillium* 58F, com suplementação do meio com uréia e óleo de soja obteve a maior atividade hidrolítica de 147U/g em 72 h.

A análise de variância dos resultados de produtividade lipolítica indicou que as variáveis estudadas foram significativas ( $p < 0,05$ ) sobre a resposta, sendo o gráfico de

interação de médias apresentado na Figura 1, onde OS representa o óleo de soja e OS+G representa óleo de soja mais o glicerol. A variável fungo apresentou efeito linear positivo e efeito quadrático negativo, ambos significativos ( $p < 0,05$ ), corroborando as conclusões anteriores de que os melhores resultados foram obtidos nos níveis superiores desta variável, ou seja, utilizando o fungo *Aspergillus niger* O-4. Em relação à variável indutor, o efeito linear foi significativo e negativo, indicando que maiores produtividades foram obtidas no nível inferior desta variável, ou seja, com a utilização de óleo de soja.

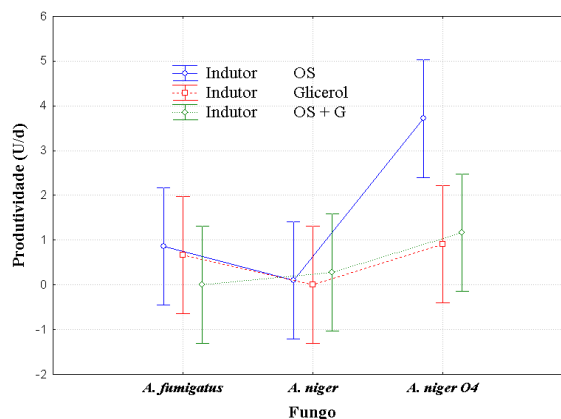


Figura 1 – Produtividade de atividade lipolítica em função dos microrganismos e indutores estudados no planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup>

Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases. As espécies melhores produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. O fungo selecionado nesta fermentação pertence ao gênero *Aspergillus*, sendo um promissor fungo para obtenção de lipases.

Na segunda etapa do estudo as maiores atividades lipolíticas, 11 U a 13 U, foram obtidas nos pontos centrais do planejamento (2% de óleo de soja e 65% de umidade), em 6 dias de fermentação. A diminuição da atividade lipolítica sugere a possibilidade da produção de proteases reduzindo os níveis de

lipases extracelulares contidas no meio da fermentação, comportamento este observado em pesquisas anteriores sobre produção de lipases microbianas (Di Luccio *et al.*, 2004). Isto também pode ter sido ocasionado pela perda parcial da capacidade do fungo de produção lipases ou ainda pela possível presença de inibidores no meio de cultivo. Alguns autores demonstraram que a suplementação muitas vezes não leva ao aumento da produção de lipases, devido ao efeito de inibição por excesso de substrato (Di Luccio *et al.*, 2004). Esse fato foi comprovado visto que nos ensaios adicionados de 2% de óleo de soja, as atividades lipolíticas foram superiores àquelas obtidas com 0% e 4% do indutor.

A análise dos efeitos estimados indicou que a umidade não foi significativa sobre as atividades lipolíticas no tempo de 4 dias de fermentação, enquanto em 6 dias esta variável apresentou efeito negativo, com maiores atividades em 60% de umidade. O aumento da umidade pode ocasionar a compactação e saturação do meio, diminuindo a oxigenação e, portanto, o crescimento fúngico e a produção de lipases. A quantidade de água é considerada ótima no ponto de saturação do substrato e pode variar entre 30% e 85%, assim as quantidades escolhidas de umidade estão na faixa prevista pela literatura. A concentração do indutor apresentou efeito negativo na análise dos efeitos em ambos os tempos de fermentação, indicando que as maiores atividades foram obtidas sem adição do indutor ou na condição de adição de 2% do indutor, corroborando os resultados anteriormente apresentados. A manutenção da fermentação por 6 dias foi vantajosa somente na condição de 60% de umidade sem adição do indutor. Desta forma, é apropriada a finalização do processo fermentativo em 4 dias, diminuindo custos de produção com aumento da produtividade.

## Agradecimentos

A Pibic UPF, aos Professores Christian Oliveira Reinehr e Luciane Maria Colla.

## 4. REFERÊNCIAS

- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipases production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91, p. 77-84, 2004.
- COLLA, L. M.; REZZADORI, K.; CÂMARA, S. K.; DEBON, J.; TIBOLLA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. A solid-state bioprocess for selecting lipase producing filamentous fungi. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 64, p. 131-137, 2009.
- DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 173-180, 2004.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 3, p. 118-125, 2004.
- RIGO, E. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 37, p. 44-51, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na seleção de fungos filamentosos produtores de lipases, o fungo *Aspergillus niger* foi o mais promissor, apresentando as maiores atividade lipolíticas, adicionando-se óleo de soja como indutor. Para o estudo das variáveis concentração de umidade e concentração de fonte de carbono, as maiores atividades lipolíticas foram encontradas nos pontos centrais para 4 e 6 dias, com 65% de umidade e 2% de óleo de soja.