

SIAGRO

Ciência, Inovação e Mercado - 2014

Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP - Brasil



Editores:

Carlos Manoel Pedro Vaz

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Silvio Crestana

Embrapa

Instrumentação



SCREENING DE FUNGOS LIPOLÍTICOS E PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DO PROCESSAMENTO DO DENDÊ

E. de A. Silveira¹, P.W. Tardioli², C.S. Farinas¹

- (1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP,
erick.biotech@yahoo.com.br; cristiane.farinas@embrapa.br
(2) Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905,
São Carlos, SP, pwtardioli@ufscar.br

Resumo: As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem a uma classe de hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres. Além disso, as lipases também catalisam a hidrólise e a transesterificação de outros ésteres e exibem propriedades enantioseletivas, possuindo uma gama de aplicações biotecnológicas de grande interesse industrial. Neste contexto, o presente trabalho apresenta resultados parciais acerca da produção de lipases por Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando a fibra e borra de dendê (resíduos agroindustriais). Após triagem de potenciais fungos lipolíticos (plaqueamentos e confirmação através de FES usando farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor), o fungo filamentososo *Aspergillus niger* C foi selecionado para produção enzimática. Em 72h de cultivo, o fungo apresentou os maiores níveis de atividade (15,41 IU/mL e 58,27 IU/mg de proteínas totais) em fibra de dendê utilizando a borra como indutor. Esta linhagem mostrou-se promissora para produção de lipases utilizando tais resíduos agroindustriais e para estabelecer a Fermentação Combinada (FC) em etapas posteriores visando o desenvolvimento de um bioprocessos inovador para a produção de lipases, buscando também uma destinação adequada aos resíduos do processamento do dendê.

Palavras-chave: lipases, dendê, fermentação em estado sólido, fermentação combinada, resíduos agroindustriais.

SCREENING OF LIPOLYTIC FUNGI AND LIPASE PRODUCTION UNDER SOLID-STATE FERMENTATION USING AGROINDUSTRIAL WASTES FROM THE PALM OIL PRODUCTION PROCESSES

Abstract: Lipases (triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) belong to a class of hydrolases, which catalyzes the hydrolysis of triglycerides to glycerol and free fatty acids. Furthermore, lipases also catalyze the hydrolysis and transesterification of other esters, exhibit enantioselective properties and have several biotechnological applications of great industrial interest. In this context, this work presents results on the lipase production under Solid-state Fermentation (SSF) using fiber and palm oil residues (agro-industrial wastes). After the screening of potential lipolytic fungi (platings and confirmation by SSF using wheat bran as substrate and olive oil as inducer), the filamentous fungus *Aspergillus niger* C was selected for the enzyme production. At 72h of cultivation, the fungus presented the highest levels of activity (15.41 IU/mL and 58.27 IU/mg of total protein) in palm oil fiber using draff as inducer. This strain proved to be promising for lipase production using agro-industrial residues and to establish the Combined Fermentation (CF) in later steps for the development of a novel bioprocess for lipases production, also seeking a suitable destination for wastes from the palm oil production processes.

Keywords: lipases, palm oil, solid-state fermentation, combined fermentation, agro-industrial residues.

1. Introdução

A busca por tecnologias “verdes” tem incentivado a comunidade científica a desenvolver novos processos de interesse industrial que utilizem matéria-prima renovável, reduzam o consumo energético e tenham menor impacto ambiental. Neste contexto, destacam-se os processos biotecnológicos. A grande motivação pelo uso de enzimas deve-se principalmente à redução do consumo energético do processo, pois enzimas atuam em condições brandas de temperatura e pressão, e à redução dos custos na etapa de purificação do produto final, pois, devido à alta seletividade e especificidade das enzimas, a formação de subprodutos indesejáveis é reduzida (VESCOVI, 2012). As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C 3.1.1.3), enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, destacam-se dentre as enzimas mais investigadas e com vasto potencial de aplicação industrial. Reações catalisadas por lipases podem ser usadas industrialmente para vários propósitos, incluindo a hidrólise de óleos e gorduras, síntese de ésteres de ácidos graxos como ingredientes de cosméticos ou surfactantes, produção de intermediários para síntese orgânica, entre outros (PALOMO et al., 2002).

Ademais, como em qualquer aplicação que exige grandes quantidades de enzima, a produção de lipases depende da redução do custo para se tornar economicamente viável. A fermentação em estado sólido (FES) representa uma interessante alternativa para a produção de enzimas industriais com menores custos, com a vantagem de utilizar resíduos agroindustriais como meio de cultura. Porém, a maioria da produção industrial em larga escala de enzimas usa a tecnologia de fermentação submersa (FSm) devido à maior facilidade do monitoramento e controle do processo (SINGHANIA et al., 2010). Assim, é neste contexto que é de interesse validar a potencial produção de lipases pelo processo de fermentação combinada (FC), o qual busca reunir as principais vantagens de utilização tanto da FES quanto da FSm quando se trata de bioprocessos.

Este trabalho objetiva a produção de lipases por fermentação em estado sólido utilizando o fungo filamentososo *Aspergillus niger* C selecionado após triagem de microrganismos potencialmente produtores. A principal contribuição deste trabalho foi identificar o melhor fungo produtor de lipase e estabelecer um processo de FES buscando utilizar resíduos agroindustriais do processamento do dendê para posterior complementação com o desenvolvimento da FC.

2. Materiais e Métodos

2.1. Screening de fungos produtores de lipases

Inicialmente, 18 fungos filamentosos da coleção da Embrapa foram submetidos a triagem em placas utilizando tributirina como substrato em que se verificou a formação de halo transparente ao redor da colônia e foi calculado o índice enzimático (relação entre tamanho do halo e o tamanho da colônia). Posteriormente, foram selecionados 8 destes fungos: 3 com maiores índices enzimáticos, 2 intermediários e 3 negativos para novo plaqueamento, mas desta vez utilizando o óleo de oliva como substrato e Rodamina B (BARROS et al., 2013). Por fim, os testes de plaqueamentos foram confirmados através de FES com farelo de trigo como substrato e óleo de oliva como indutor.

2.2. Fermentação em estado sólido (FES)

Os experimentos em FES foram conduzidos utilizando a fibra de dendê como substrato e ainda borra alcalina como indutor na produção de lipases – resíduos agroindustriais do processamento do óleo de dendê. A concentração do inóculo foi de 1.10^7 esporos por grama de fibra e os cultivos foram realizados em condições estáticas em estufa a 30 °C, com 80% de umidade e foram acompanhados durante 96h. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

2.3. Determinação da atividade enzimática e proteínas totais

A atividade hidrolítica das lipases foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999) e também foi utilizada a metodologia de hidrólise do pNPP (p-nitrofenil-palmitato) (KORDEL et al., 1991). A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976).

3. Resultados e Discussão

Para os testes em placas com tributirina, as melhores linhagens (que apresentaram maiores índices enzimáticos) foram P77C5, P50B2 e *Aspergillus niger* 12. Já para os plaqueamentos em meio contendo óleo de oliva e Rodamina B, testes qualitativos que apenas revelam a presença ou ausência de lipases, as linhagens P75P1 e P77C5 apresentaram-se negativas (ausência de lipase), enquanto que todas as outras linhagens apresentaram produção da enzima (Tabela 1). Assim como os plaqueamentos realizados por Gutarra, Castilho e Freire (2005) também sugerem, os resultados deste trabalho evidenciam certo perfil de secreção das enzimas lipases e esterases pelos diferentes fungos: a linhagem P77C5 somente apresentou halo de hidrólise para substrato de cadeia curta (tributirina, C4) indicando uma predominância na produção de esterases, enquanto que as linhagens P18E2 e *Trichoderma harzianum* apresentaram halo de hidrólise para substrato de cadeia longa (óleo de oliva, C18) indicando que produzem predominantemente lipases. Os demais fungos provavelmente sintetizam as duas referidas enzimas, com exceção do fungo P75P1 que não apresentou nenhum halo hidrolítico.

Com relação aos ensaios feitos em FES-Farelo de trigo utilizando óleo de oliva como indutor para confirmação dos plaqueamentos, os extratos brutos destas 8 linhagens foram testados segundo os métodos descritos no item 2.3. Após 72h de cultivo as linhagens apresentaram atividade lipolítica máxima (Tabela 2). Não foi possível realizar o método do pNPP para as linhagens de *A. niger* devido aos seus extratos terem coloração escura, prejudicando a leitura em espectrofotômetro. Os dados revelam que, quando aplicados em processos fermentativos, os fungos P77C5 e P75P1 são capazes de produzir lipases, resultados que conflitam com os dados de plaqueamentos mostrados anteriormente, inferindo que os testes de triagem em placa são um bom guia para selecionar linhagens promissoras, porém não são conclusivos, devendo-se realizar uma fermentação que comprove a produção enzimática. As linhagens de *A. niger* apresentaram as maiores atividades dentre todas as linhagens e, assim, foi selecionado o fungo *Aspergillus niger* C para produção de lipases em FES utilizando fibra e borra de dendê.

Tabela 1. Plaqueamentos dos fungos filamentosos utilizando substrato de cadeia curta (tributirina) e de cadeia longa (óleo de oliva) com Rodamina B - revelação sob luz UV.

Fungos	Tributirina			Rodamina B	
	Média Øc	Média Øh	i.e.	Desvio Padrão	Revelação sob UV
P77C5	6,67	11,67	1,75	0,10	-
P50B2	11,67	19,33	1,66	0,02	+
<i>A. niger</i> I2	21,67	29,00	1,34	0,02	+
<i>A. niger</i> C	26,33	29,67	1,13	0,04	+
<i>A. niger</i> IIT53A14	21,67	24,00	1,11	0,03	+
P75P1	27,00	0,00	0,00	0,00	-
P18E2	19,33	0,00	0,00	0,00	+
<i>T. harzianum</i>	48,67	0,00	0,00	0,00	+

Øc= diâmetro da colônia (mm); Øh= diâmetro do halo (mm); i.e.= índice enzimático (Øh / Øc); (+) = presença de halo lipolítico fluorescente; (-) = ausência de halo lipolítico fluorescente

Tabela 2. Atividade Lipolítica (U/mL) em 72h de cultivo FES-Farelo de trigo e óleo de oliva.

	p-NPP	Óleo de oliva
<i>A. niger</i> C	-	85,33 ± 3,33
<i>A. niger</i> IIT53A14	-	51,73 ± 7,79
<i>A. niger</i> I2	-	27,73 ± 1,85
P77C5	0,072 ± 0,004	25,6 ± 2,88
P75P1	0,119 ± 0,000	19,2 ± 2,88
P18E2	0,548 ± 0,072	19,2 ± 4,45
<i>T. harzianum</i>	0,311 ± 0,005	8,27 ± 3,70
P50B2	0,070 ± 0,001	6,67 ± 3,23

Os perfis de produção de lipase em meio contendo os resíduos do processamento do dendê estão representados na figura 1 abaixo. Após 72h de cultivo, a linhagem utilizada apresentou os maiores níveis de atividade lipásica: 15,41 IU/mL e 58,27 IU/mg de proteínas totais. Em trabalhos anteriores(Penha *et al.*, 2014), a adição de borras alcalinastambém conduziu à produção de maiores quantidades de lipase, revelando-se ser um eficiente método indutor na FES com a torta (fibra) de dendê. Dessa maneira, em etapas futuras, será estabelecido o procedimento de fermentação submersa para produção de lipase por *A. niger* C para então se iniciar os testes de produção da enzima através da fermentação combinada.

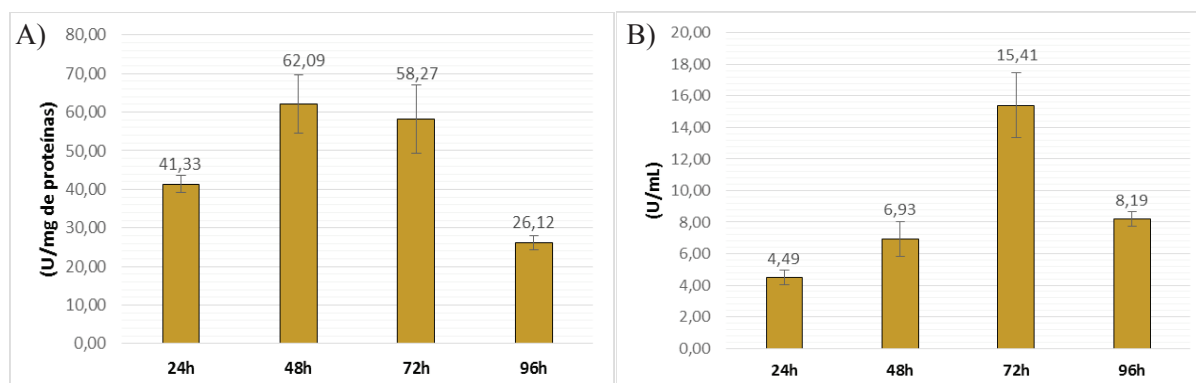


Figura 1 - (A) Atividade lipolítica (U/mL) do fungo *A.niger* C cultivado em FES utilizando resíduos agroindustriais do processamento do dendê. (B) Atividade lipolítica específica (U/mg de proteínas totais) do fungo *A.niger* C cultivado em FES utilizando resíduos agroindustriais do processamento do dendê.

4. Conclusões

Os testes de plaqueamentos representam um guia para triagem de fungos lipolíticos, porém não são ensaios conclusivos devendo-se realizar um processo fermentativo posterior para comprovação dos resultados. A linhagem *Aspergillus niger* C apresentou os maiores níveis de atividade dentre todos os fungos filamentosos testados em FES-Farelo de trigo sendo, assim, utilizada em FES-torta de dendê, mostrando-se bastante promissora para dar continuidade à pesquisa no intuito de estabelecer e validar o inovador processo de fermentação combinada para a produção de lipases.

Agradecimentos

À FAPESP e à Embrapa pelo apoio financeiro e à Embrapa Instrumentação, Laboratório de Agroenergia pela infraestrutura cedida.

Referências

- BARROS, F. F. C. et al. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Research International*: 9 p. 2013.
- BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- GUTARRA, M. L. E.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Seleção de Fungos Produtores de Lipase por Fermentação no Estado Sólido. XV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM). Recife, PE. 2005.
- KORDEL, M. et al. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp strain atcc-21808 - purification, characterization, crystallization, and preliminary-x-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 15, p. 4836-4841, 1991.
- PALOMO, J. M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 19, p. 279-286, 2002.
- PENHA, E. M. et al. Avaliação da estabilidade de lipases produzidas por *Aspergillus niger* 11T53A14 para aplicação na síntese de biodiesel em meio etanólico. SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Rio de Janeiro, RJ 2014.
- SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.
- SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 77-79, n. Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1998, p. 745-757, 1999.
- VESCOVI, V. Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. 2012. 79 (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar