



Melhoramento da Produção de Lipase de *Aspergillus niger* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Subprodutos Agroindustriais

Lívia Nolasco Macedo Muruci¹, Lucielen Oliveira dos Santos¹, Sonia Couri², Edmar das Mercês Penha³ e Mônica Caraméz Triches Damaso⁴.

¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Tecnologia
BR 465, km, 7 – Seropédica/RJ, 23890-000. E-mail: linolasco@yahoo.com.br

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) - Rio de Janeiro/RJ.

³Embrapa Agroindústria de Alimentos, Av. das Américas, 29501 – Guaratiba, Rio de Janeiro/RJ, 23020 470.

⁴Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica S/N
Av. w3 Norte (final)-Brasília/DF, 70.770-901 E-mail: monica.damaso@embrapa.br

RESUMO

*As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras e em meio orgânico catalisam reações de esterificação e transesterificação. A produção de lipases por fermentação semi-sólida possibilita agregar valor a resíduos e subprodutos agroindustriais. O presente trabalho teve por objetivo melhorar o nível de produção de lipase de *Aspergillus niger* por fermentação semi-sólida em colunas aeradas utilizando borra de milho e farelo de trigo. Um delineamento fatorial completo foi realizado e as variáveis aeração em vvm (0; 0,5; 1) e concentração de fonte lipídica (borra) em %p/p (0; 0,5; 1) foram avaliadas, demonstrando serem significativas para a produção da enzima. A maior atividade lipásica (329,77 U/g de massa seca) e atividade específica (6362,68 U/g de proteína) foram obtidas no ensaio contendo 1,0% de borra e 1,0 vvm de aeração.*

Palavras-chave: borra de milho; lipase; fermentação semi-sólida; *Aspergillus niger*; fungo filamentosos.

INTRODUÇÃO

As lipases constituem um importante grupo de enzimas, principalmente por apresentarem inúmeras aplicações. Elas catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol e em meio orgânico são capazes de catalisar reações de esterificação (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). A busca por novas linhagens produtoras de lipases têm crescido nos últimos anos, uma vez que o microrganismo utilizado é de suma importância para alcançar o sucesso dos bioprocessos.

Dentre as espécies produtoras de lipases, tem merecido destaque o fungo *Aspergillus niger*. A técnica de fermentação semi-sólida (FES) é bastante promissora para produção de enzimas, pois além de usar substratos de baixo custo, como por exemplo, resíduos



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

agroindustriais, o biocatalisador pode ser produzido de forma mais concentrada, o que pode facilitar a sua recuperação do meio de cultura (MITCHELL et al., 2006).

Os principais indutores utilizados na produção de lipases através de FES são os óleos vegetais (babaçu, girassol, oliva, soja, palma, canola, milho), gorduras animais (SILVA et al., 2005) e borra (DAMASO et al., 2008). A borra é um subproduto gerado pelas indústrias de refino de óleos durante a etapa de neutralização alcalina.

O presente trabalho teve como objetivo melhorar a produção de lipase de *A. niger* através de fermentação semi-sólida em colunas aeradas, segundo delineamento fatorial completo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Microrganismo

Utilizou-se a espécie *Aspergillus niger* isolada de amostras de manteiga e selecionado como um potencial produtor de lipase (MOREIRA et al., 2009).

2. Planejamento Experimental

Em trabalhos anteriores (MACEDO et al., 2009) foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (RODRIGUES e IEMMA) para selecionar as variáveis que influenciavam de forma significativa a produção de lipases. Duas fontes lipídicas foram testadas: óleo de oliva e borra de milho, sendo que esta última induziu de forma mais significativa a produção da enzima. Com base nos resultados obtidos, foi realizado o delineamento fatorial completo para duas variáveis independentes a saber: aeração e concentração de borra de milho (Tabela 1). Foram realizados quatro ensaios e três pontos centrais * (5, 6 e 7), como pode ser observado na Tabela 2. O delineamento foi realizado em duplicata e em ambos foram obtidos resultados similares.

Tabela 1. Níveis e variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2^2 para o melhoramento das condições de produção de lipase.

Níveis	Variáveis	
	Aeração (vvm)	Concentração de borra de milho (%)
-1	0	0
0	0,5	0,5
+1	1	1

3. Produção de Conídios e Preparo do Inóculo para a Fermentação

Meios contendo sabugo de milho foram preparados e inoculados com a cultura fúngica e incubados por 5 dias a 32°C. Após este período, foram adicionados 20 mL de solução 0,1% de Tween 80 para o desprendimento dos conídios, formando assim uma suspensão (COURI e FARIAS, 1995). O número de conídios/mL da suspensão foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

4. Matérias-primas e Indutores Utilizados para a Produção de Lipases

Durante a fermentação foram empregados farelo de trigo e borra de óleo de milho, ambos os subprodutos provenientes da agroindústria. O farelo de trigo foi comprado em



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

comércio local e a borra foi gerada durante o refino do óleo de milho a qual foi gentilmente cedida pela Indústria Granfino S/A, Nova Iguaçu, RJ, Brasil.

5. Produção de Lipases por Fermentação Semi-Sólida em Colunas Aeradas

No meio de produção da enzima foram utilizados 60 mL de solução de sulfato de amônio e 10^6 esporos/g de meio em todos os ensaios. Estes valores foram fixados, pois foram variáveis que não influenciaram de forma significativa o processo de produção da enzima (MACEDO et al, 2009). Os meios foram preparados em frascos cônicos contendo 100g de farelo de trigo triturado (tamanho do grão ≤ 5 mm), adicionados de 60mL de sulfato de amônio a 1,2% (p/v) pH 7,0 e acrescidos com diferentes concentrações de borra de milho de acordo com planejamento experimental descrito no item 2. Os meios foram homogeneizados e esterilizados a 1 atm por 15 minutos, sendo posteriormente inoculados com suspensão de conídios conforme descrito no item 3. A fermentação foi conduzida em colunas cilíndricas) aeradas (21,0cm x 2,2cm, contendo aproximadamente 17g do meio de cultivo e imersas em banho termostático com circulação de ar a 32°C por 48 horas

6. Obtenção do Extrato Enzimático

Após a produção da enzima por fermentação semi sólida, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por grama de meio fermentado. Os frascos foram encaminhados para o banho-maria sob agitação, onde permaneceram por uma hora à 32°C a 100rpm. Posteriormente, os meios fermentados foram homogeneizados e filtrados em papel de filtro quantitativo. Em seguida, procedeu-se a microfiltração através de membranas de celulose milipore® com porosidade de 0,45µm.

7. Determinação da Atividade Lipásica

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, segundo a metodologia descrita por Pereira et al. (2001), com modificações.

8. Determinação da Concentração de Proteína

O teor de proteína foi determinado segundo a metodologia descrita por Lowry et al., (1951).

9. Determinação da Umidade

A umidade das amostras foi realizada antes da fermentação e determinada por gravimetria, através da perda de água sofrida até atingir peso constante.

10. Análise Estatística

Procedeu-se a Análise de Variância (ANOVA) utilizando o programa Statistic 7.0. Em todas as análises, para o valor de $p < 0,10$ as variáveis foram consideradas como significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos revelaram que a maior atividade lipásica e específica (329,8 U/g de massa seca e 6363 U/g de proteína, respectivamente) foram obtidas no ensaio 4 (1,0% de borra, 1,0 vvm de aeração), enquanto que as menores atividades lipásica e específica (4,7 U/g de massa seca e 687 U/g de proteína, respectivamente) foram obtidas no ensaio 1 (sem adição de borra e sem aeração), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz para o delineamento fatorial completo 2^2 com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica e específica para o indutor borra de milho.

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra (%)	Ativ. Lipásica U/g massa seca	Ativ. Específica U/g de proteína
1	-1(0,0)	-1(0,0)	4,7	687
2	+1(1,0)	-1(0,0)	190,4	4952
3	-1(0,0)	+1(1,0)	171,5	3028
4	+1(1,0)	+1(1,0)	329,8	6363
5*	0(0,5)	0(0,5)	132,8	2582
6*	0(0,5)	0(0,5)	141,3	2808
7*	0(0,5)	0(0,5)	195,8	3364

*Pontos centrais

Na Tabela 3 estão representados os coeficientes de regressão e desvios padrão do planejamento fatorial completo (2^2), para a atividade lipásica e específica. Os coeficientes de correlação obtidos foram 0,9489 e 0,9223, respectivamente. A aeração e concentração de borra apresentaram efeito significativo positivo ($p < 0,1$) para a atividade lipásica e específica (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo (2^2), para a atividade lipásica e específica.

Atividade Lipásica				
	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(3)	p
Média/Inter.*	166,6	11,67	14,27	0,000746
(1)Aeração*	85,98	15,44	5,56	0,011438
(2)Concentração*	76,54	15,44	4,95	0,015772
1 x 2	-6,86	15,44	-0,44	0,687029
Atividade Específica				
	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(3)	p
Média/Inter.*	3397,7	269,99	12,58	0,001082
(1) Aeração*	1899,9	357,16	5,31	0,012978
(2) Concentração*	937,85	357,16	2,62	0,078606
1 x 2	-232,508	357,16	-0,65	0,561475

* variáveis estatisticamente significativas (90% confiança).

Os modelos codificados para a atividade lipásica e específica foram validados pelas análises de variância apresentadas na Tabela 4 e 5, respectivamente. O valor de F (F calculado maior que o F tabelado) validou estatisticamente os modelos ($p < 0,1$) e permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 1A e 1B.

Tabela 4. Análise de variância do segundo delineamento fatorial completo 2^2 para atividade lipásica de *Aspergillus niger*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	53010,23	2	26505,11	34,75
Resíduos	3051,11	4	762,7774	
Total	56061,34	6		

*F tabelado = 4,32; $R^2 = 0,9489$.

Tabela 5. Análise de variância do delineamento fatorial completo 2^2 para atividade específica de *Aspergillus niger*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	17956977	2	8978488	20,56
Resíduos	1747049	4	436762,4	
Total	19704026	6		

*F tabelado = 4,32; $R^2 = 0,9223$

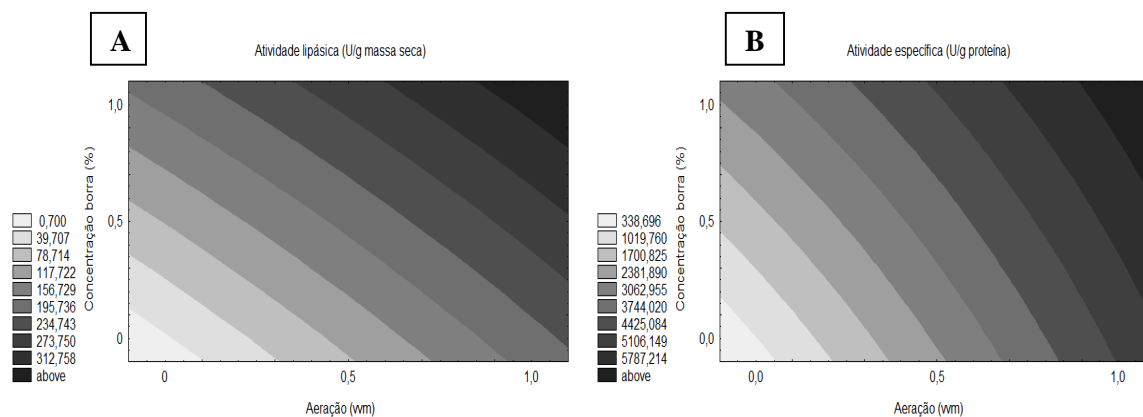


Figura 1: Superfície de resposta para atividade lipásica (A) e específica (B) de *Aspergillus niger*

Analisando as superfícies de resposta do planejamento fatorial completo (Figuras 1 A e 1 B), pode-se verificar que as maiores atividades lipásica e específica foram obtidas em níveis superiores de aeração e concentração de borra. Portanto, dentre as condições estudadas,



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

a melhor condição para a produção de lipase de *A. niger* em FES foi observada no ensaio 4 (10^6 de inóculo; 1vvm de aeração; 1% de borra e 60mL de sol. de sulfato de sódio).

Trabalhos estão sendo realizados visando testar também as borras de canola e girassol para produção da enzima. Serão realizadas análises físico-químicas das distintas borras com o intuito de correlacionar os resultados de produção de lipase obtidos com a composição das mesmas.

CONCLUSÕES

A borra de milho pode ser empregada com sucesso para a produção de lipases, conseqüentemente agregando valor a esse subproduto. De acordo com os dados obtidos e considerando-se as condições de processo testadas para a produção de lipase de *Aspergillus niger* em escala de bancada por FES, a melhor condição foi observada com 1,0% borra, 1vvm de aeração, 10^6 esporos/g de meio e 60 mL de solução de sulfato de amônio (ensaio 4). Nessas condições foram obtidos 329,7U/g de massa seca e 6363U/g de proteína de atividade lipásica e específica respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Couri, S.; Farias, A. X. (1995), Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, v.26, n.4, p.314-317.
- Damaso, M. C. T., Passianoto, M.A., Freitas, S.C., Freire, D.M.G., Lago, R.C.A.Couri, S. (2008), Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentativos. *Brazilian Journal of Microbiology*, n.39, p. 676- 681.
- Lowry, O.H.; Rosebrough N. J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 265.
- Macedo, L. N. M.; Oliveira, A.C.P.; Ferreira, A. D. F.; Damaso, M.C.T.; Couri, S. (2009), Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Natal, 6p.
- Mitchell, D.A.; Berovic, M.; Nopharatana, M.; Krieger, N. (2006), *The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena*. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Editora Springer, Heidelberg.
- Moreira, C.G.; Damaso, M.C.T.; Valadão, R.C.; Couri, S. (2009), Screening of lipolytic filamentous fungi and study of lipase production using three different reactors. *Anais do 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management*, Potsdam, p. 892-895.
- Pereira, E. B.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G.M. (2001), Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 91-93, p. 739-752.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. (2005), *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 1.ed. Campinas: Casa do pão, 325p.,
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Wu, X.; Banerjee, U. C. (2001), Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. v. 19, p. 627- 662.
- Silva.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Vainstein, M.H.(2005), Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 321- 326.