



PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO CO-PRODUTOS DA INDÚSTRIA DE REFINO DE ÓLEOS

MURUCI, L. N. M.^{1,2}, CONCEIÇÃO, M. A. O.³ SANTOS, R. R.¹, PENHA, E. M.⁴, SILVA, J. P. L.⁴, COURI, S.⁵ e DAMASO, M. C. T.⁶

¹DTA/IT/Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

²Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - CTUR

³Colégio de Aplicação Emmanuel Leontsinis

⁴Embrapa Agroindústria de Alimentos

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ

⁶Embrapa Agroenergia

E-mail para contato: linolasco@yahoo.com.br

RESUMO – A técnica de fermentação em estado sólido (FES) é bastante promissora para produção de lipases, principalmente por possibilitar o uso de co-produtos agroindustriais. A borra é um subproduto oriundo do refino de óleos vegetais. O objetivo deste trabalho foi produzir lipase de *Aspergillus niger* por FES e comparar os resultados de atividade enzimática com o uso de três distintos indutores: borras de milho, de girassol e de canola, separadamente. Um delineamento fatorial completo foi realizado e as variáveis aeração em vvm (0; 0,5; 1) e concentração de borra de milho em % p/p (0; 0,5; 1) foram avaliadas. A fermentação foi conduzida em colunas aeradas, com farelo de trigo triturado, umidificado com 60 mL de solução de sulfato de amônio, inoculado com 10⁶ esporos/g_{meio}, acrescidos ou não com a fonte lipídica, e incubadas a 32°C/48horas. Resultados obtidos no planejamento fatorial completo revelaram que a melhor condição para a produção de lipase foi observada com 1,0% de borra de milho e 1vvm de aeração, nessas condições obteve-se atividade em torno de 215 U/gms. Nesta condição melhorada, foi testada a produção da enzima com as borras de girassol e canola, além da borra de milho. Utilizando-se as borras de girassol e de canola foram obtidas as atividades de 238 U/gms e 218 U/gms respectivamente. Desta forma, as três distintas borras mostraram potencial para serem utilizadas como indutores para a produção de lipase.

1. INTRODUÇÃO

As lipases apresentam aplicações nos mais diversos setores industriais, como por exemplo, na indústria alimentícia, na formulação de detergentes em pó, na indústria óleo-química e nos setores farmacêutico e cosmético (Sharma *et al.*, 2001). As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas industrialmente, sendo o microrganismo *Aspergillus niger* um importante e potencial produtor desta enzima (Ellaiah *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, atenção especial vem sendo dada para o reaproveitamento de resíduos e/ou co-produtos da agroindústria. Dentre os co-produtos gerados pelas indústrias

alimentícias, encontram-se quantidades apreciáveis de farelos, tortas, cascas, caroços e borras. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, servem como fonte de proteínas, lipídeos e óleos essenciais, portanto, podem ser empregados para a produção de lipases (Coelho, 1993; Cunha, 1999).

A fermentação em estado sólido apresenta como vantagens o baixo custo das matérias-primas empregadas, como por exemplo, a borra e, além disso, o biocatalisador pode ser produzido de forma mais concentrada, o que pode facilitar a sua recuperação do meio de cultura (Mitchell *et al.*, 2006).

A borra é um subproduto gerado pelas indústrias de refino de óleos comestíveis durante a etapa de neutralização alcalina do óleo. Ela consiste de uma mistura de sabão, óleo arrastado, substâncias insaponificáveis, gomas, fosfatídeos, água e ácidos graxos (Moretto e Fett, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo produzir lipase de *Aspergillus niger* por FES e comparar a atividade enzimática da produção com o uso de três distintos indutores: borras de milho, de girassol e de canola.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

No presente trabalho utilizou-se uma linhagem de *Aspergillus niger* isolada de amostras de manteiga e selecionada em trabalhos anteriores como bom produtor de lipase (Moreira *et al.*, 2009). A linhagem pertence a Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia, da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

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

Meios contendo sabugo de milho e nutrientes esterilizados 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.

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

Durante a fermentação foram empregados co-produtos provenientes da agroindústria como o farelo de trigo, e borras de milho, girassol e canola utilizados separadamente em cada um dos processos de produção da lipase. O farelo de trigo foi comprado em comércio local e as borras geradas durante o refino dos óleos foram gentilmente cedidas pela Indústria Granfino S/A, Nova Iguaçu, RJ, Brasil.

2.4. Delineamento Experimental

Macedo *et al.*, (2009) realizaram um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman (Rodrigues e Iemma, 2005) para selecionar as variáveis que influenciavam de forma significativa a produção de lipases e concluíram ser a aeração e a concentração de borra de milho as duas variáveis independentes mais significativas. Baseado nesses resultados, foi elaborado um delineamento fatorial completo para essas duas variáveis com os diferentes níveis a serem avaliados (Tabela 1). Foram realizados quatro ensaios e três pontos centrais (5, 6 e 7), como pode ser observado na Tabela 2.

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

Tabela 2 – Matriz para o delineamento fatorial completo 2^2 com seus níveis codificados e reais

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra (%)
1	-1(0,0)	-1(0,0)
2	+1(1,0)	-1(0,0)
3	-1(0,0)	+1(1,0)
4	+1(1,0)	+1(1,0)
5*	0(0,5)	0(0,5)
6*	0(0,5)	0(0,5)
7*	0(0,5)	0(0,5)

*Pontos centrais

2.5. Produção de Lipases por Fermentação em Estado Sólido em Colunas Aeradas

Os meios preparados continham 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 acordo com planejamento experimental descrito no item 2.4 e após a seleção da melhor condição para a produção de lipase obtido no delineamento

fatorial completo com a borra de milho, foram realizadas quatro fermentações em triplicata, onde foi fixado 1% de borra e 1vvm de aeração. Foram testadas as borras de canola, de girassol e de milho (Figura 1).

Os meios foram homogeneizados e esterilizados a 1 atm por 15 minutos, sendo posteriormente inoculados com 10^6 esporos/g de meio e transferidos para colunas cilíndricas de vidro (21,0cm x 2,2cm), contendo aproximadamente 17g do meio de cultivo inoculado e imersas em banho termostático com circulação de ar a 32°C por 48 horas.



Figura 1 - Borra de girassol (A); Borra de canola (B);
Borra de milho (C).

2.6. Obtenção do Extrato Enzimático

Após a produção da enzima, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 por grama de meio fermentado. Os frascos foram incubados em banho-maria sob agitação, onde permaneceram por uma hora à 32°C a 100 rpm. Posteriormente, 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.

2.8. Determinação da Atividade Lipásica

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, segundo a metodologia descrita por Pereira *et al.* (2001), com modificações. Para a determinação da atividade lipásica foi preparado uma emulsão constituída por água e óleo de oliva extra-virgem Borges® na proporção de 1:1 e 7% de goma arábica. Desta emulsão, foram adicionados 5mL em frascos de vidro, juntamente com 4 mL de tampão citrato 0,05M pH 4,0

Uma unidade de atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima que produz 1 µmol de ácidos graxos por minuto, sob as condições de ensaio padrão. Toda a análise foi feita em triplicata e a atividade lipásica foi expressa em U/g de meio seco (U/gms).

2.9. Determinação da Umidade

A umidade das amostras foi realizada antes da fermentação e determinada por gravimetria, após secagem em estufa à 100°C até atingir peso constante.

2.10. Análise Estatística

Procedeu-se a Análise de Variância (ANOVA) mediante o programa Statistic 7.0. Em todas as análises, para o valor de $p < 0,10$ as variáveis foram consideradas como significativas. Foi aplicado o teste de Tukey para comparar os resultados obtidos com as três borras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de Lipase Utilizando Delineamento Fatorial Completo

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da produção de lipase utilizando planejamento fatorial completo e borra de milho como indutor. Os resultados obtidos revelaram que a maior atividade lipásica (215,9 U/g de massa seca) foi obtida no ensaio 4 (1,0% de borra, 1,0 vvm de aeração), enquanto que a menor atividade lipásica (81,0 U/g de massa seca), foi obtida no ensaio 3 (1,0% de borra e sem aeração).

Tabela 3 - Matriz para o delineamento fatorial completo 2^2 com seus níveis codificados e reais e com as respostas de atividade lipásica para o indutor borra de milho

Ensaio	Aeração (vvm)	Concentração de borra (%)	Ativ. Lipásica U/gms
1	-1(0,0)	-1(0,0)	175,9
2	+1(1,0)	-1(0,0)	189,2
3	-1(0,0)	+1(1,0)	81,0
4	+1(1,0)	+1(1,0)	215,9
5*	0(0,5)	0(0,5)	136,8
6*	0(0,5)	0(0,5)	169,7
7*	0(0,5)	0(0,5)	169,0

*Pontos centrais

Na Tabela 4 estão representados os coeficientes de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo (2^2), para a atividade lipásica. O coeficiente de correlação obtido para atividade lipásica foi de 0,92. De acordo com a análise estatística dos resultados

de atividade lipásica, a variável aeração e a sua interação com a concentração de indutor foram estatisticamente significativas de forma positiva ao nível de confiança de 90%.

Tabela 4 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do planejamento fatorial completo (2^2), para a atividade lipásica

Atividade Lipásica				
	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t(3)	p
Média/Inter.*	162,5	6,14	26,48	0,000118
(1)Aeração*	37,05	8,12	4,56	0,019719
(2)Concentração	-17,05	8,12	-2,10	0,126494
1 x 2*	30,4	8,12	3,75	0,033222

O modelo codificado para a atividade lipásica foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 5. O valor de F calculado foi maior que o F tabelado, portanto validou-se estatisticamente o modelo ($p < 0,1$) e permitiu a construção da curva de contorno apresentada na Figura 2.

Tabela 5 - Análise de variância do primeiro 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	9187,45	2	4593,725	9,41
Resíduos	1953,39	4	488,3475	
Total	11140,84	6		

F tabelado = 4,32; $R^2 = 0,929$.

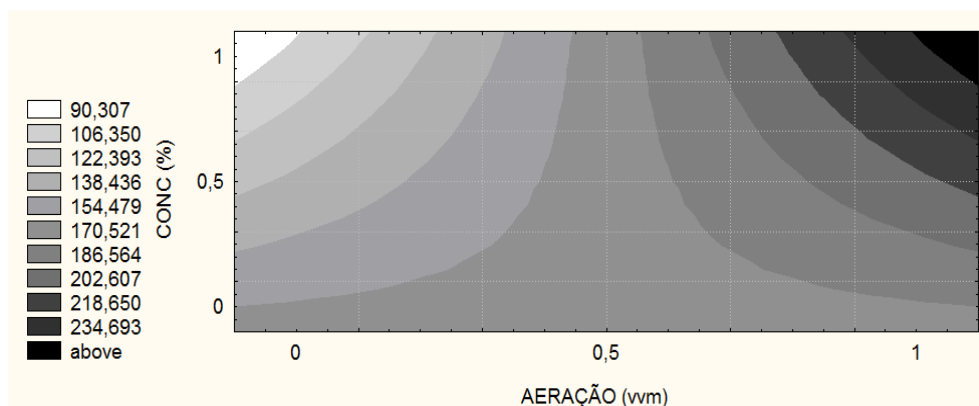


Figura 2 – Curva de contorno para atividade lipásica U/gms.

Analisando-se a curva de contorno do planejamento fatorial completo (Figura 2), pode-se verificar que as maiores atividades lipásicas foram obtidas em níveis superiores de aeração e concentração de borra. Portanto, dentre as condições estudadas, a melhor condição para a produção de lipase de *A. niger* em FES foi observada no ensaio 4 (10^6 de inóculo; 1 vvm de aeração; 1% de borra e 60 mL de sol. de sulfato de sódio) com atividade lipásica de 215,9 U/gms. Entretanto, o ensaio 2 (10^6 de inóculo; 1 vvm de aeração; 60 mL de sol. de sulfato de sódio e sem adição de borra), também apresentou uma atividade lipásica elevada (189,2 U/gms), sugerindo que a aeração é um parâmetro muito importante para produção da lipase. Além disso, o farelo de trigo, substrato utilizado para a produção de lipase, contém concentrações de óleo (Generoso *et al.*, 2008), dessa forma, pode ter ocorrido a indução da produção de lipase mesmo na ausência de borra.

Colla e colaboradores (2010), estudaram a produção de lipases de *Aspergillus* sp. em FES e em FS com o objetivo de comparar os resultados de processo. Resultados obtidos pelos autores revelaram que a atividade lipolítica máxima obtida na FS foi de 4,52 U, enquanto que na FSS foi de 25,07 U. Atividades maiores foram encontradas no presente trabalho.

Baseado nos resultados obtidos nos planejamentos de seleção de variáveis e no fatorial completo, poderia ser sugerido um novo experimento que avaliasse melhor a produção de lipases na faixa de 1,0 a 1,5 vvm de aeração e 1 a 2% de borra, no entanto, em virtude do rotâmetro que estabelece a aeração no sistema de colunas não possuir sensibilidade dentro desta faixa, a condição de ensaio 4 do planejamento fatorial completo será utilizada nos próximos experimentos de produção a serem conduzidos futuramente.

3.2. Produção de Lipase com Distintas Borrás

Com o intuito de avaliar a capacidade de outras borrás induzirem a produção de lipase, foram realizados ensaios utilizando-se as borrás de girassol e canola, além da de milho, nas condições de processo selecionadas como mais produtivas nos experimentos realizados no item 3.1 (10^6 de inóculo; 1 vvm de aeração; 1% de borra e 60 mL de sol. de sulfato de sódio).

Os resultados das médias da produção da lipase estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Médias da produção de lipase utilizando as diferentes borrás de refino de óleo e os resultados do Teste de Tukey

Indutores	Ativ. Lipásica U/gms*
Borra de Milho	196,14a
Borra de Girassol	238,49b
Borra de Canola	218,02ab

Diferença Média Significativa (DMS) = 30,9325. *Valores médios de 4 repetições em triplicata. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,1$).

De posse das médias das atividades lipásicas foi possível aplicar o Teste de Tukey e comparar estatisticamente os resultados obtidos. Segundo os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se observar que não houve diferenças significativas ($p < 0,1$) entre a adição de

borras de girassol e de canola, Mesmo assim, cabe ressaltar que todas as borras podem ser usadas como indutoras, uma vez que apresentaram resultados iguais (ou superiores) àqueles obtidos no experimento sem indutor (189,2 U/gms, Tabela 3). Em comparação com outros trabalhos que utilizaram co-produtos da agroindústria para a produção de lipase de *A. niger*, verificou-se que Dantas e Aquino (2010) obtiveram máxima atividade enzimática de 25 U/g empregando torta de babaçu e 20 U/g empregando borra de café, resultados estes, menores que os obtidos no presente trabalho. Palma et al. (2000) estudaram a produção de lipases de *Penicillium restrictum* por (FES) e constataram que a maior atividade lipásica (27,8 U/g) foi obtida com torta de babaçu enriquecido com peptona. Resultados superiores foram obtidos no presente trabalho com a utilização de borras oriundas do refino de óleos.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial completo, a melhor condição para a produção de lipase de *Aspergillus niger* em colunas aeradas por FES foi observada com 1,0% de borra de milho, 1vvm de aeração, 10^6 esporos/g de meio e 60 mL de solução de sulfato de amônio, nessas condições obteve-se atividade lipásica em torno de 215,9U/gms. Entretanto, após a avaliação com outras duas borras (girassol e canola), verificou-se que resultados superiores foram encontrados empregando-se borra de girassol (238 U/gms). Portanto, os co-produtos testados neste trabalho demonstraram potencial para a produção de lipase de *A. niger*.

5. REFERÊNCIAS

- COLLA, M.L., RIZZARDI, J., PINTO, M.H., REINEHR, C.O., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bior. Technol.*, v. 101, p.8308–8314, 2010.
- COURI, S.; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Rev. de Micro.*, v.26, n.4, p.314-317, 1995.
- DANTAS, E.M.; AQUINO, L.C.L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Rev. Bras. Prod. Agro.*, v.12, n.1, p.81-87, 2010.
- ELLIAIAH, P., PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A.T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Proc. Biochem.*, v. 39, p. 525-528, 2004.
- GENEROSO, R.A.R.; GOMES, P.C., ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; BARRETO, S.L.T.; BRUMANO, G. Composição química e energética de alguns alimentos para frangos de corte em duas idades *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, n.7, p.1251-1256, 2008

MACEDO, L.N.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; FERREIRA, A.D.F.; DAMASO, M.C.T.; COURI, S. Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Natal, 6p, 2009.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. *The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena*. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Editora Springer, Heidelberg, 2006.

MOREIRA, C.G.; DAMASO, M.C.T.; VALADÃO, R.C.; COURI, S. 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, 2009.

MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 1998.

PALMA, M.; PINTO, A.L.; GOMBERT, A.K.; SEITZ, K.H.; KIVATINITZ, S.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicilium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.1137-1145, 2000.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G.M. 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, 2001.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 1.ed. Campinas: Casa do pão, 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; WU, X.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotech. Ad.*, v. 19, p. 627- 662, 2001.