

# INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR TERMOESTÁVEL VISANDO A OBTENÇÃO DE BIODIESEL

Juelina Oliveira dos Santos (bolsista PIBIC/ UFPI), Tânia Maria da Silva Lima (Orientadora, Depto de Química – CCN/UFPI), Laís Jéssica de Oliveira Veloso (Iniciação científica), Anaídia Lopes Costa (Iniciação científica), Carla Verônica R. Moura (colaborador, Depto. de Química –CCN/UFPI), Edmilson M. Moura (colaborador, Depto. de Química – CCN/UFPI).

## INTRODUÇÃO

A tecnologia de obtenção de biodiesel mais promissora é a transesterificação catalisada por enzimas. As lipases, em particular, têm sido as enzimas com maior potencial de emprego tanto em pesquisas científicas quanto em processos tecnológicos. As lipases verdadeiras (E.C. 3.1.1.3) são definidas como enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis na interface óleo/água para produzir acilgliceróis parciais, ácidos livres e glicerol (BROCKMAN et al., 1988). As lipases são encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases microbianas são mais interessantes, pois apresentam ampla aplicação industrial devido a sua estabilidade, seletividade, larga especificidade por substratos e capacidade de síntese orgânica. A composição do meio e condições de fermentação geralmente têm papel central na produção de lipase, bem como a identificação de uma formulação de um meio que seja ativo e a condição da cultura utilizada é de grande importância para a otimização da produção (LIU et al., 2006). Um meio que permite a otimização de produção de lipase depende de diversos fatores como: fontes de carbono e nitrogênio, emulsificantes, pH, temperatura, quantidade de inóculo, dentre outros. Os tipos e as concentrações dos componentes do meio de cultivo interferem qualitativa e quantitativamente na produção de enzima microbiana. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio, açúcares aditivos e agentes emulsificantes, em diferentes concentrações, na produção de enzimas lipolíticas extracelulares a partir de fungos filamentosos, por fermentação submersa (FS).

## METODOLOGIA

### Preparo do Inóculo

Os fungos (F4, F06 e *Fusarium oxysporum* ATCC 48112) previamente selecionados como bons produtores de lipases, foram cultivados em ágar batata dextrosado (BDA) a 30 °C por sete dias para que houvesse a produção de esporos. Após o crescimento, os esporos foram coletados por raspagem utilizando uma espátula cuchara, adicionados à tubos de ensaios contendo 10 mL de água destilada estéril e, em seguida, homogeneizados por três minutos no agitador tipo Vortex. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, após diluição adequada ( $10^{-4}$ ) em uma solução contendo 0,75 mL de Triton X-100 (0,1% v v<sup>-1</sup>) e 0,25 mL da suspensão de esporos. A inoculação nos meios foi realizada adicionando-se a suspensão de esporos previamente diluída até a concentração de esporos ( $2 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>) para cada 100 mL de meio de cultura.

### **Meio de Cultura e Condições de Cultivo**

O meio de cultura utilizado nas fermentações foi o meio mineral Czapeck Dox Modificado (CDM), cuja composição é (g L<sup>-1</sup>) (p v<sup>-1</sup>): NaNO<sub>3</sub> 6,0; KCl 0,52; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,52; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,52; Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,001; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001; glicose 2,0; óleo de oliva 1,5 (% v v<sup>-1</sup>); pH 6,0. Os experimentos foram realizados em duplicata, para cada cepa produtora de lipase, em erlenmeyers de 250 mL, hermeticamente fechados, com volume inicial do meio de 100 mL e mantidos em agitador orbital a 30°C por 05 dias em shaker orbital com agitação de 200 rpm. Amostras de 7,0 mL foram filtradas, a cada 24 horas, e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de atividade lipásica. A fração sólida retida no filtro foi usada para avaliar o crescimento celular por peso seco.

### **Maximização da Produção de Lipases Por Fermentação Submersa**

De acordo com a disponibilidade local e os dados na literatura, foram selecionadas as fontes de nitrogênio orgânico: peptona e extrato de levedura. Elas substituíram o nitrato de sódio do meio mineral (CDM) na concentração de 0,2 ou 0,4% (p v<sup>-1</sup>). Para avaliar o efeito de diferentes fontes adicionais de açúcares na produção de lipases, o meio de cultivo CDM foi suplementado com o a fonte de açúcar lactose, glicerol ou melaço, na concentração de 0,2% (p v<sup>-1</sup>). Para avaliar a influência de agentes emulsificantes na produção de enzimas lipolíticas pelos fungos selecionados, utilizou-se o meio sintético CDM suplementado com diferentes fontes de emulsificantes (Triton X-100 ou Tween 80) e suas concentrações (0,2 % e 0,02%, p v<sup>-1</sup>) sendo escolhidas com base na revisão bibliográfica. O crescimento microbiano por fermentação submersa (FS) foi quantificado pelo peso seco das amostras, segundo o protocolo proposto por GULATI et al. (1999) e a atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria utilizando *p*-nitrofenilaurato (*p*-NPL) como substrato, de acordo com a metodologia proposta por LIN et al. (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Quanto ao crescimento fúngico, as fontes de nitrogênio diferiram entre si apenas na concentração de 0,2%, para ambos os isolados. A atividade lipásica seguiu a mesma tendência dos dados de biomassa fúngica, sendo superiores para o isolado F04, especialmente quando na presença de peptona à 0,2 %. Em relação ao *F. oxysporum* ATCC 48112, as fontes de nitrogênio na concentração 0,2% proporcionaram igual ou menor crescimento do isolado, que na concentração de 0,4%.

O efeito da adição de açúcares ao meio de cultivo para a produção de lípases e biomassa pelos isolados fúngicos F04, F06 e *Fusarium oxysporum* ATCC 48112 foram significativamente melhoradas com a adição de açúcares ao meio de cultivo, para todos os isolados. Em comparação com as três fontes de açúcares, o melaço foi o melhor indutor para todos os isolados, na concentração testada, com valores de atividades lipolíticas superiores aos encontrados para lactose e glicerol.

Os surfactantes (Triton X-100 e Tween 80) como indutores de enzimas no meio de cultivo promovem aumentos significativos na produção de lipases (Tabelas 4-6) pelos isolados fúngicos em estudo. Porém, quando na presença do Triton X-100 a 0,02%, todos isolados apresentaram valores de

biomassa e de atividade lipolítica superiores aos obtidos quando cultivados no meio de cultura adicionado do Triton X-100 a 0,2%, ao final de 120 horas de incubação.

## CONCLUSÃO

As três cepas (F04, F06 e *Fusarium oxysporum*) são consideradas hiperprodutoras de lipases. A utilização da FS na produção de lipase por estes isolados fúngicos utilizando diferentes fontes de nitrogênio apresentou resultados satisfatórios. A produção de lipase e biomassa foram significativamente melhoradas com a adição de açúcares ao meio de cultivo, para todos os isolados em estudo, porém o melado foi à fonte de açúcar que melhor induziu aumento na produção de biomassa e na atividade lipolítica. Os surfactantes, Triton X-100 e Tween 80, como indutores de enzimas no meio de cultivo promoveram aumentos significativos na produção de biomassa e de lipases por todos os isolados.

## AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/UFPI pela bolsa de iniciação científica e ao CT-PETRO/CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROCKMAN, H.L., MOMSEN, W.E., TSUJITA, T. 1988. **The biology, biochemistry and technology of lipases**. Journal of the American Oil Chemists' Society, **65**: 891-896.

GULATI, R., SAXENA, R.X., GUPTA, R., YADAV, R.P., DAVIDSON, W.S. 1999. **Parametric optimisation of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis**. Process Biochemistry, **35**, 459-464.

LIN, S.F., CHIOU, C.M., TSAI, C.Y. 1995. **Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111**. Biotechnology Letters, **17**, 959-962.

LIU, C-H., LU, W-B., CHANG, J-S. Optimizing Lipase production of *Burkholderia sp.* by response surface methodology. Process Biochemistry, **41**, 1940-1944.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipases; fungos filamentosos; açúcares; emulsificantes.