

Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase

Fermentation of cocoa meal by *Aspergillus niger* to obtain lipase

Graziella Marques Amorim¹

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil
amorim_gal@yahoo.com.br

Tamires Carvalho dos Santos¹

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil
tamic_santos@hotmail.com

Clissiane Soares Viana Pacheco¹

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil
clissianesoares@hotmail.com

Isadora Monteiro Andrade Barreto¹

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil
isa_mab@hotmail.com

Denise Maria Guimarães Freire²

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil
freire@peq.coppe.ufrj.br

Marcelo Franco¹

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil
marcelofranco@pq.cnpq.com

Resumo. O objetivo deste trabalho foi utilizar o farelo de cacau para obtenção de lipase fúngica produzida por intermédio da fermentação em estado sólido, por *Aspergillus niger*. A concentração de esporos utilizada foi de 10^7 esporos/g de substrato. As fermentações foram conduzidas em estufa bacteriológica a 35°C, com teor de água inicial de 60% e variando o tempo de fermentação até 96 horas. A determinação da atividade enzimática, pH, atividade de água e umidade foram efetuadas no intervalo de 24 horas. O ponto máximo da atividade enzimática foi de 11,67 U/g, em 48 horas de fermentação. Após esse período foi observado a redução na produção enzimática. Os valores de umidade e atividade de água decresceram durante o processo fermentativo enquanto que o pH se manteve constante.

Palavras-chave: atividade de água, tempo de fermentação, fermentação em estado sólido.

Abstract. The aim of this study was to use cocoa meal as substrate for obtaining fungal lipase produced by solid state fermentation by *Aspergillus niger*. The spore concentration used was 10^7 spores/g substrate. Fermentations were conducted in a bacteriological incubator at 35°C with an initial moisture content of 60% and the fermentation time was 96 hours. The determination of enzyme activity, pH, water activity and moisture were taken every 24 hours. The higher enzyme activity was quantified 11.67 U/g after 48 hours of fermentation. After this time there was reduction in enzyme production. The moisture content and water activity decreased during the fermentation process and the pH remained constant.

Key words: water activity, fermentation time, solid-state fermentation.

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Pç. Primavera, 40, Campus de Itapetinga, 45700-000, Itapetinga BA, Brasil.

² Universidade Federal do Rio de Janeiro. Av. Pedro Calmon, 500, Prédio da Reitoria, 2º andar, 21941-901, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Introdução

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que promovem a hidrólise de triglicerídeos. Esse tipo de reação química encontra aplicação em diversos produtos industriais como detergentes, alimentos, aromas, flavorus. Essas aplicações industriais impulsionam diversos estudos sobre as lipases. No entanto, sua utilização é reduzida devido aos altos custos de produção (Contesini e Carvalho, 2006; Hasan *et al.*, 2006; Snellman *et al.*, 2002).

A produção da lipase por métodos biotecnológicos se destaca, e entre esses a fermentação em estado sólido (FES), tem sido amplamente utilizada devido à simplicidade do processo, sendo sugerida como um fator de redução destes custos (Nandini e Rastogi, 2009).

Uma das principais características da Fermentação em Estado Sólido (FES) é a utilização de substratos com baixa atividade de água, na qual as condições de crescimento aproximam-se do *habitat* natural de fungos, o que facilita o crescimento desses no substrato sólido e a produção de grandes quantidades de enzimas. Os resíduos gerados nos processos agroindustriais podem ser utilizados como substrato para o crescimento celular. A matéria orgânica presente neste material é usada como fonte de energia para o crescimento e o carbono para a síntese de biomassa celular e dos produtos do metabolismo microbiano (Menoncin *et al.*, 2009; Rigo *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi utilizar o farelo de cacau como matéria-prima para produção de lipase fúngica por fermentação em estado sólido com o fungo *Aspergillus niger*.

Materiais e métodos

O farelo de cacau foi adquirido em agroindústrias, localizadas no sul da Bahia. O resíduo foi triturado em um moinho de facas tipo WILLY (ACB Labor), com peneira de 1,25cm de diâmetro.

O microrganismo estudado foi o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, proveniente do Laboratório de Reaproveitamento de Resíduos Agroindustriais (LABRA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* de Itapetinga. A cultura esporulada em ágar-ágar (VETEC), PDA (VETEC) e óleo de oliva (GALLO) foi suspensa em solução de em tampão fosfato de sódio – 50 mM, pH 7, sendo nesta efetuada a contagem do número

de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular BIOVAL L1000 (Gutarra *et al.*, 2009).

Nos *erlenmeyers* foram adicionados 15 g de farelo, acrescido de água esterilizada até o teor de 60% (p/p). A concentração de esporos utilizada foi de 10^7 esporos/g de sólido. As fermentações foram conduzidas em estufa bacteriológica modelo SL 101 SOLAB a 35°C, e o tempo máximo de fermentação foi de 96 horas. A determinação da atividade enzimática, pH, atividade de água e umidade foram efetuadas a cada 24 horas.

Quantificação da atividade lipásica

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico, utilizando como substrato para dosagem da atividade, óleo de oliva (5% m/v) emulsionado por três minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. A 19 ml desta emulsão contidos no erlenmeyers de 125 mL, foi adicionado 1 mL da amostra. Após a incubação em um agitador rotatório (QUIMIS) por 20 minutos a 35°C e 200 rpm, a reação foi interrompida e os ácidos graxos foram extraídos pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos foram, então, titulados com uma solução de NaOH (0,04 M) até pH 11.

Os brancos reacionais foram preparados colocando-se 1 mL da amostra após a incubação e a adição da solução acetona/etanol, realizando assim a titulação. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata e a média aritmética dos valores encontrados foi utilizada para o cálculo da atividade lipásica (Gutarra *et al.*, 2009).

Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima que produz 1 mmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, que pode ser determinada por meio da equação 1 (Menoncin *et al.*, 2009).

$$A = \frac{\left[\frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \right] \times V_d}{m \times \frac{A_s}{A_u}} \quad (1)$$

Onde:

A = atividade lipásica (U/g);

V_a = Volume da amostra titulada (mL);

V_b = Volume do branco titulado (mL);

Vc = Volume da amostra usada na reação (mL);

Vd = Volume do tampão usado para a extração (mL);

t = Tempo de reação (min);

M = Molaridade da solução de NaOH;

m = massa contida no erlenmeyer (g);

As = Massa da amostra seca (g);

Au = Massa da amostra úmida (g).

Os resultados obtidos em função do tempo, foram submetidos à análise de regressão realizada com auxílio do Programa SigmaPlot 10.0.

Resultados e discussão

A maior atividade lipásica (Figura 1) foi de 11,67 U/g, sendo a produtividade de 0,24 U/g.h no tempo de 48 horas. De acordo com os dados obtidos, observou-se que a maior atividade lipásica encontrada foi de 11,67 U/g, sendo a produtividade de 0,24 U/g.h no tempo de 48 horas. A redução da atividade lipásica ocorreu após 48 horas, sendo estas de 41,7% e 86,1%, para 72 e 96 horas, respectivamente.

Mala *et al.* (2007), utilizando o fungo *Aspergillus niger* e uma mistura dos resíduos de farelo de trigo e de torta de gergelim como

substrato, obtiveram máxima atividade lipásica de 384,3 U/g após 72 horas. A encontrada por Falony *et al.* (2006) foi de 9,14 U/g utilizando o mesmo fungo e somente farelo de trigo como substrato, no mesmo tempo de fermentação. Por sua vez, Kamini *et al.* (1998), utilizando o mesmo fungo e diferentes resíduos agroindustriais, constataram maiores atividades lipásicas em 72 horas (363 U/g) em torta de óleo de gengibre.

A umidade é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido. Como a quantidade de água é sempre limitada, o controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de água adequada para o substrato deve permitir a formação de um filme de água na superfície, para facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e oxigênio. Entretanto, os espaços entre as partículas devem permanecer livres para permitir a difusão de oxigênio e a dissipação de calor (Gervais e Molin, 2003; Sanchez, 2009).

Conforme observado neste trabalho, a redução da atividade enzimática, após 48 horas, pode ser atribuída à redução significativa da atividade de água que também ocorre após esse tempo de fermentação. Nesse caso, a re-

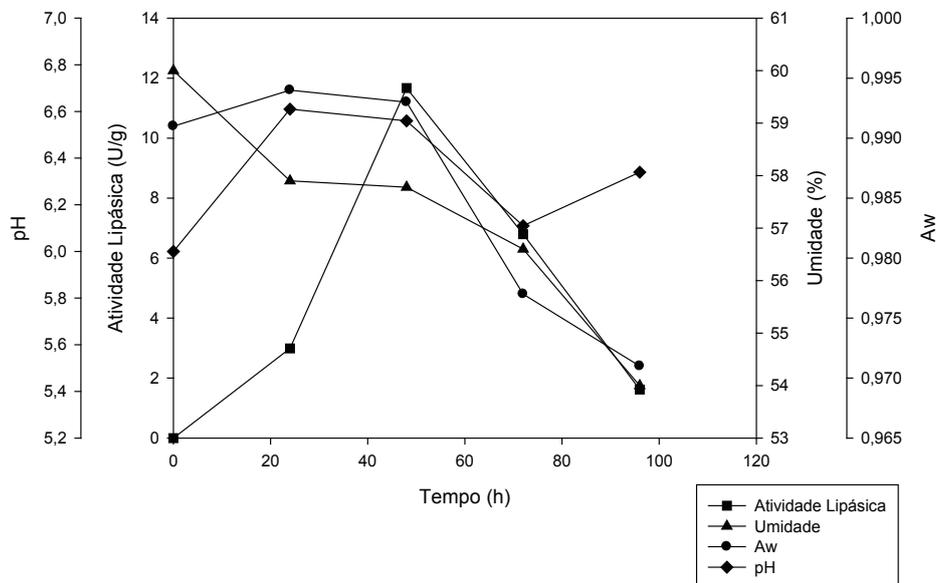


Figura 1. Cinética da fermentação do fungo *Aspergillus niger* em farelo de cacau a 35°C e 60% de umidade inicial.

Figure 1. *Aspergillus niger* kinetics fermentation in cocoa meal at 35°C and 60% of initial moisture.

Notas: ■ Atividade lipásica (U/g); ▲ Umidade (%m/m); ● Atividade de água; ◆ pH.

dução da atividade e água pode estar influenciando a dispersão de nutrientes, o que afeta o crescimento microbiano e consequente excreção de enzimas.

Conclusão

O fungo *Aspergillus niger* foi capaz de excretar cerca de 11,67 U/g de lipase durante a fermentação do farelo de cacau, após 48 horas. Os valores de umidade e atividade de água decresceram durante o processo de fermentação, enquanto que o pH se manteve estável. A enzima lipase pode ser obtida por fermentação em estado sólido, com o fungo *Aspergillus niger*, utilizando o farelo de cacau como matéria-prima, apresentando atividade de água como fator limitante.

Agradecimentos

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), CAPES, BNB e CNPq pelo apoio concedido.

Referências

- CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P.O. 2006. Esterificação de (RS)-ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**:2069-2073. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.07.020>
- FALONY, G.; ARMAS, J.C.; MENDOZA, J.C.D.; HERNÁNDEZ, J.L.M. 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, **44**(2):235-240.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**:85-101. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00122-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00122-5)
- GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. 2009. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, **100**:5249-5254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.050>
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**:235-251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. 1998. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, **33**:505-511. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00005-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00005-3)
- MALA, J.G.S.; EDWINOLIVER, N.G.; KAMINI, N.R.; PUVANAKRISHNAN, R. 2007. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **53**(4):247-253. <http://dx.doi.org/10.2323/jgam.53.247>
- MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.M.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. 2009. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **29**(2):440-443. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000200033>
- NANDINI, K.E.; RASTOGI, N.K. 2009. Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase:effect of various parameters on extraction. *Process Biochemistry*, **44**:1172-1178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.020>
- RIGO, E.; NINOW, J.L.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V.; POLLONI, A.E.; REMONATO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT – Food Science and Technology*, **43**:1132-1137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.002>
- SANCHEZ, C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**(2):185-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- SNELLMAN, E.A.; SULLIVAN, E.R.; COLWELL, R.R. 2002. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. *Biochemical Engineering Journal*, **11**:269-274.

Submissão: 23/07/2011

Aceito: 06/11/2011