PRODUÇÃO DE LIPASE DE *ASPERGILLUS ORIZAE* ATCC 11488 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Maria Fabiana Sirino de Campos (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Nelci Catarina Chiquetto, Mareci Mendes de Almeida (Orientadora), e-mail: mareci@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos
Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia

Ciência e Tecnologia de Alimentos e Ciência de Alimentos

Palavras-chave: indutor, resíduo do processamento do fruto da palmeira juçara, ρ-nitrofenil-palmitato.

Resumo

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O resíduo do despolpamento do fruto da palmeira juçara pode ser utilizado para a produção de lipases. Foi usado como produtor de lipase o fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488 que foi mantido em Agar Sabouraud. Para a produção de lípase o fungo foi cultivado no resíduo do despolpamento do fruto da palmeira juçara sem suplementação e suplementado com azeite de oliva. A atividade lipolítica foi determinada por análise espectrofotométrica tendo como substrato ρ-nitrofenil-palmitato. Foi feito também a curva padrão do p-nitrofenol e para a caracterização bioquímica parcial da lipase foi feito um planejamento experimental tendo como variáveis de entrada o pH e a temperatura. O efeito do fator pH foi mais significativo sobre a atividade lipolítica que o efeito da temperatura e os valores da atividade enzimática com uso de indutor foram maiores que os valores da atividade sem indutor.

Introdução

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. Elas podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Lipases de origem microbiana apresentam ampla diversificação e também possuem vantagens como menor custo de produção, amplo espectro de características físico-químicas, alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto entre outras (ROVEDA et al., 2010).

A produção de lipases pode ser desenvolvida por fermentação submersa (FSM) e por fermentação no estado sólido (FES) (MESSIAS et al., 2011). Com a produção de enzimas o uso de fermentação no estado sólido tem se destacado, devido ao baixo custo para sua realização (SCHRODER, 2015).

As lipases são enzimas de caráter indutivo, e a escolha do indutor ideal é o que determina a produtividade do biocatalizador. O processo de indução é aquele que ocorre quando na presença de algum substrato, os genes que induzem a formação de algum bioproduto (enzimas) são desreprimidos liberando a síntese enzimática (SCHRODER, 2015).

As lipases podem ser produzidas utilizando como meio de cultivo e de suporte os resíduos do processamento do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*). Os frutos

da palmeira juçara, no Paraná, são obtidos do extrativismo em pequena escala por agricultores e grande parte dos frutos é encaminhada a indústrias de polpa (SCHRODER, 2015).

Materiais e Métodos

O micro-organismo utilizado foi o *Aspergillus oryzae* (ATCC 11488). Para o crescimento e manutenção celular da cepa do fungo, foi utilizado o meio de cultura Agar Sabouraud.

Para a fermentação no estado sólido foi utilizado o método descrito por Schroder (2015). Como fermentadores foram utilizados frascos de Erlenmeyer, com capacidade de 125 mL. O meio foi esterilizado a 121 º C por 20 minutos.

Foi utilizado o resíduo do processamento do fruto da palmeira juçara e inoculada uma suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488, o meio de cultivo foi preparado sem e com enriquecimento, sendo adicionado 10% de azeite de oliva extra virgem (Gallo).

Depois de inoculados os frascos de Erlenmeyers foram levados a estufa e incubados a 28 ± 2 °C, por 120 horas. Após o tempo de cultivo em cada frasco foi adicionado 62,5 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7), em banho de gelo, sendo agitado a cada 5 minutos, durante 1 hora. Em seguida o material foi filtrado em tecido cirúrgico em funil de haste longa, separando a biomassa do filtrado, que passou a ser denominado de extrato enzimático.

Foram retiradas alíquotas de 4mL do extrato enzimático, adicionado 0,4g de carvão ativado para serem centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm à 4 ºC. Após a centrifugação o sobrenadante foi filtrado em papel filtro.

A atividade da lipase foi determinada através do método modificado descrito por Lee et al. (1999), sendo usado o p-nitrofenilpalmitato (ρ-NPP) como substrato. O sistema reacional foi incubado por 15 minutos a 40° C em banho-maria, em seguida foi adicionado 100 µL de carbonato de sódio 10%. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de p-nitrofenol formada por mL de extrato enzimático, nas condições de ensaio. Para calcular a atividade lipolítica foi feita a curva de calibração do p-nitrofenol lida em espectrofotômetro a 405nm.

Foi realizado um planejamento experimental fatorial completo 2^2, onde os fatores escolhidos como variáveis independentes foram o pH e temperatura e a resposta (fator dependente) foi a atividade enzimática, variando as combinações dos fatores.

Resultados e Discussão

A partir da curva padrão do p-nitrophenol foi possível fazer o cálculo da atividade lipolítica. Com a relação gráfica dos valores de absorbância e concentração, foi possível a verificação da linearidade do mesmo, obtendo a seguinte equação linear para o p-nitrophenol y = 0,184x + 0,010.

Os resultados das análises correspondentes ao planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 1. As respostas foram a atividade de lipase obtida do meio de cultivo enriquecido com azeite de oliva e sem enriquecimento.

Tabela 1 – Matriz dos experimentos para planejamento experimental fatorial de 2 níveis e atividade de lipase de *Aspergillus oryrae* ATCC 11488 em meio enriquecido com azeite e meio sem enriquecimento

Ensaios	Valores codificados: pH	T ºC	Valores reais pH	Valores reais T ºC	Atividade de lipase (U) com azeite	Atividade de lipase (U) sem azeite
1	-1	-1	5	35	0,057	0,057
2	+1	-1	7	35	0,174	0,120
3	-1	+1	5	45	0,135	0,102
4	+1	+1	7	45	0,138	0,091
5	-1,41	0	4,59	40	0,105	0,088
6	+1,41	0	7,41	40	0,185	0,121
7	0	-1,41	6	33	0,074	0,015
8	0	+1,41	6	52	0,111	0,085
9	0	0	6	40	0,069	0,071
10	0	0	6	40	0,060	0,110
11	0	0	6	40	0,078	0,129
12	0	0	6	40	0,072	0,122
13	0	0	6	40	0,080	0,113

Foi possível observar que o efeito do fator pH foi maior sobre a atividade lipolítica que o efeito da temperatura, pois nos ensaios 1 e 7, utilizando os menores valores de pH e temperatura foi observado que a atividade da enzima foi a mais baixa. Os ensaios 2 e 6 mostram que ao se utilizar valores de pH e temperatura mais altos a atividade da enzima aumenta, sendo que no ensaio 6 foi observada a maior atividade enzimática. No ensaio 5 foi observado que a atividade enzimática não foi muito alta em pH baixo, mesmo em temperatura mais alta. Os ensaios de 9 a 11 foram os pontos centrais dos experimentos, mantendo se os valores de pH e temperatura.

Também foi possível comparar na tabela 1, as atividades lipolíticas com e sem indutor (azeite de oliva). Foi observado que os valores da atividade enzimática, com exceção dos pontos centrais, com azeite são maiores que os sem azeite, mostrando então que a utilização do indutor auxilia no aumento da atividade lipolítica.

O efeito do pH foi maior que o efeito da temperatura na atividade enzimática. Quando o efeito de uma variável depende de outra, como nesse caso, as duas variáveis interagem e pode-se calcular o valor do efeito de interação entre elas (NETO et al., 1995).

Após a Análise de variância (dados não mostrados) foi observado que a atividade lipolítica obtida no planejamento com a utilização do indutor foi maior que sem o indutor, ambas foram estatisticamente significativas, mas só a atividade com indutor pode ser preditiva.

Conclusões

O micro-organismo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488 cresceu no meio de cultivo e produziu a lipase com e sem enriquecimento do meio. A atividade de lipase em meio enriquecido com o indutor (azeite de oliva) foi maior que em meio não suplementado.

Foi importante ter feito o planejamento porque ele mostra a direção para as melhores condições de pH e temperatura para otimizar as melhores condições de atividade da enzima para as variáveis estudadas.

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela bolsa concedida. A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Departamento de Engenharia de Alimentos pela disponibilidade de uso dos laboratórios, equipamentos e materiais de consumo e a professora dra. Mareci Mendes de Almeida pela orientação.

Referências

LEE, D., KOK, Y., KIM, K., KIM, B., CHOI, H., KIM, D., SUHARTONO, M. T., e PYUN, Y.: Isolation and characterization of a thermophilic lipase from Bacillusthermoleovorans. ID-1, **FEMS MicrobiologyLetter**, v. 179, p. 393 e 400, 1999.

MESSIAS, J.M; COSTA, B.Z; LIMA, V.M.G; GIESE, E.C; DEKKER, R.F.H; BARBOSA, A.M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213 - 234, 2011.

ROVEDA, M; HEMKEMEIER, M; COLLA, L.M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.126 - 131, 2010.

SCHRODER, A. S. **Produção de lipase a partir dos resíduos de processamento dos frutos de palmeira juçara por fermentação no estão sólido**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

NETO, B.B; SCARMINIO, I.S; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1995.