ESTUDO DE DIFERENTES INDUTORES PARA A PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus oryzae* ATCC 11488 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Maria Fabiana Sirino de Campos (BIC/Fundação Araucária), Tayna Cris Silva, Nelci Catarina Chiquetto, Mareci Mendes de Almeida (Orientador), e-mail: marecimal@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Engenharia de Alimentos

Ciência e Tecnologia de Alimentos e Ciência de Alimentos.

Palavras - chave: *Aspergillus oryzae*, p-nitrofenil-palmitato, palmeira juçara

Resumo

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de trigliacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. Esse trabalho tem por objetivo estudar diferentes indutores na produção de lipase por fermentação em estado sólido, utilizando como meio de cultivo o resíduo proveniente do processamento do fruto da palmeira Juçara. Foi usado como produtor de lipase o fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488. A detecção da atividade lipolítica foi por análise espectrofotométrica tendo como substrato ρ-nitrofenil-palmitato. Dos indutores testados os que apresentaram melhor resposta para o aumento da atividade enzimática foram o azeite de oliva, o ácido oléico e o óleo do extrato aquoso do fruto da palmeira juçara.

Introdução

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de triacilgliceróis e podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades organolépticas (MESSIAS; HEMKEMEIER; COLLA, 2011). As lipases podem ser obtidas de diversas fontes, as de origem microbiana possuem algumas vantagens como menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala por processos industriais, entre outras (ROVEDA et al., 2010).

A produção de lipase pode ser realizada por fermentação submersa, mas o processo por fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado promissor por utilizar como substrato resíduos de baixo custo (MESSIAS; HEMKEMEIER; COLLA, 2011), como o resíduo do processamento do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis*), utilizado nesse trabalho.

A proposta deste trabalho é produzir lipase de *Aspergillus oryzae* por FES e comparar a atividade lipolítica com diferentes indutores enzimáticos.

Materiais e Métodos

Produção de Aspergillus oryzae por fermentação no estado sólido.

O fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 11488 foi mantido em Agar Sabouraud e para a fermentação em estado sólido foi utilizado como meio de cultivo o resíduo do processamento dos frutos da palmeira juçara. Foram utilizados erlenmeyers com capacidade de 125 mL como fermentadores, contendo 25g de meio e esterilizados a 121ºC por 20 minutos. A suspensão de conídios foi padronizada através de

contagem em câmara de Neubauer, sendo inoculados 10^8 conídios mL^{-1}, os meios foram incubados a 28°C, por 120 horas. Após o tempo de crescimento foram adicionados 60 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7. Para a etapa de extração o material foi colocado em banho de gelo, sendo agitado de 5 em 5 min até completar 1 hora. Então foi filtrado em tecido, separando a biomassa do filtrado, que passou a ser denominado de extrato enzimático.

Adição de indutores

Para determinar a atividade lipolítica com diferentes indutores, foram utilizados azeite de oliva extra virgem (Gallo), ácido oléico (Synth), óleo do extrato aquoso do fruto de juçara (extraído no laboratório), óleo de milho (Suavit), óleo de girassol (Suavit) e Tween 80 (Biotec). Os indutores foram adicionados no meio de cultivo, antes da inoculação do fungo, na concentração de 1% (v/m) e incubados a 28°C por 120 horas. Para o estudo cinético foi utilizado o azeite de oliva e o ácido oléico, sendo retiradas amostras em 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas de crescimento. Após os tempos de cultivo foi preparado o extrato enzimático conforme já descrito.

Determinação da atividade enzimática e Análise estatística

Foram retiradas alíquotas de 4mL do extrato enzimático e centrifugadas durante 30 minutos a 12000 rpm a 4ºC. Em seguida o material foi passado em uma membrana filtrante (0,45µ) e diluído 5 vezes. A atividade da lipase foi determinada através do método modificado descrito por Lee et al. (1999). A atividade foi determinada na presença de p-nitrofenil-palmitato como substrato, medindo a absorvância do p-nitrofenol (pNP) em 405 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade ($U.mL^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de pNP por minuto.

Para a análise estatística foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e aplicado o Teste de Duncan utilizando o programa SASM-Agri.

Resultados e Discussão

Estudo cinético da atividade lipolítica

A cinética de produção de lipase foi realizada para determinar o melhor tempo de cultivo para a síntese da enzima e os valores obtidos se encontram na figura 1.

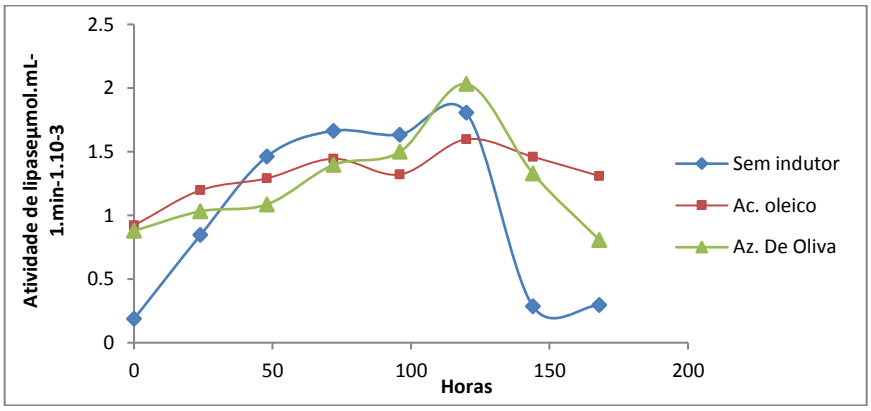


Figura 1 – Cinética de produção de lipase de *A. oryzae* cultivado em resíduo do processamento da palmeira juçara com e sem adição de indutores

O melhor tempo de produção de lipase foi em 120 horas para os diferentes testes, sendo que o azeite de oliva foi o que apresentou maior atividade enzimática. Após estabelecer o melhor tempo de crescimento lipolítico foram realizados testes com mais indutores. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

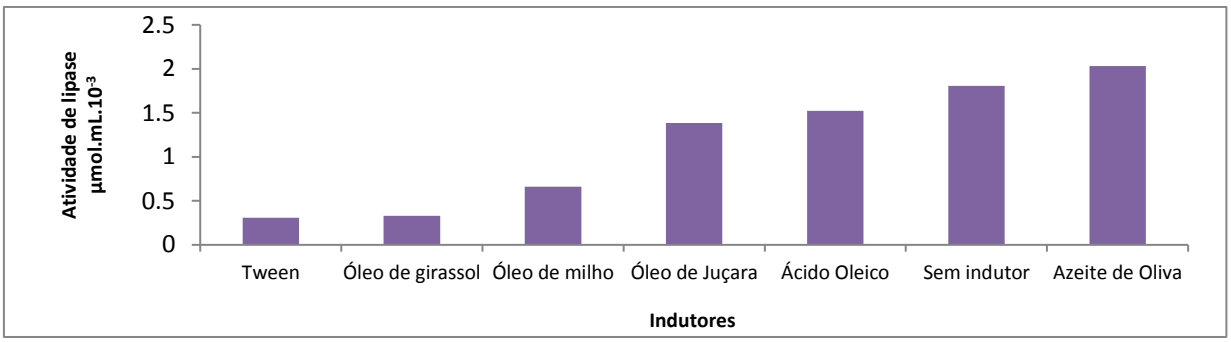


Figura 2 – Atividade lipolítica de *A. oryzae* cultivado em resíduo do processamento da palmeira juçara com e sem adição de indutores

Foi feita a Análise de Variância (ANOVA), para valor de p <0,05 obtendo F > $F_{crítico}$, sendo comprovada diferença significativa entre os ensaios. Foi aplicado o Teste de Duncan para verificar em quais amostras existia diferença significativa (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias da atividade enzimática utilizando diferentes indutores e os resultados do Teste de Duncan

Indutores	**Atividade de lipase µmol.mL.10^{-3} Desvio padrão (±)**
Azeite de oliva	2,0319 ± 0,318[a]
Sem indutor	1,8051 ± 0,009[a]
Ácido oléico	1,5220 ± 0,139[b]
Óleo de juçara	1,3845 ± 0,072[b]
Óleo de milho	0,6608 ± 0,036[c]
Óleo de girassol	0,3313 ± 0,007[d]
Tween 80	0,3075 ± 0,042[d]

O indutor que apresentou maior atividade enzimática foi o azeite de oliva e o ensaio sem indutor apresentou atividade lipolítica apenas 11% menor em relação a este, pelo Teste de Duncan foi comprovado que não existe diferença significativa entre os cultivos sem indutor e com azeite de oliva. Foi observado que com ácido oléico como indutor obteve-se maior atividade enzimática do que com os demais óleos e Tween 80. Segundo Roveda et al. (2010) o indutor de enzimas microbianas pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo a fim de estimular a produção da enzima.

Na composição de ácidos graxos dos indutores utilizados há a predominância do ácido oléico, acima de 50%, no azeite de oliva e no óleo de juçara (SCHRODER, 2015), o Tween 80 apesar de apresentar o ácido graxo mono-oleato na sua cadeia (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2010) expressou a menor atividade enzimática, demonstrando não ser um bom indutor de lipase, sendo os óleos e gorduras contendo triacilgliceróis os substratos naturais para as lipases (ROVEDA, 2010). O óleo de girassol e o óleo de milho quando utilizados como indutores expressaram as

menores atividades lipolíticas e apresentam na composição de ácidos graxos em torno de 20% de ácido oléico, predominando o ácido linoléico (SCHRODER, 2015). Assim pode-se inferir que o ácido oléico foi um importante indutor da lipase de *A. oryzae.*

O resíduo do processamento do fruto da palmeira juçara apresenta composição química semelhante ao extrato aquoso de juçara com concentração de ácido oléico de 56%, seguido do ácido linoléico (20%) (SCHRODER, 2015). Portanto, o resíduo usado como substrato não precisa ser adicionado de mais indutores para a síntese da lipase, nas condições estudadas.

Conclusões

Dos indutores testados os que apresentaram melhor resposta para o aumento da atividade enzimática foram o azeite de oliva, o ácido oléico e o óleo de juçara, porém como na composição do meio de cultivo já havia indutores para a síntese da lipase não haveria a necessidade da adição de outros indutores.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar saúde e determinação para ir em frente. Agradeço a professora Dra. Mareci Mendes de Almeida, aos meus pais, a Fundação Araucária pelo auxílio financeiro concedido. A professora Dra. Nelci Catarina Chiquetto, as professoras Tânia Bomfim e Débora Brand pela doação do fungo utilizado nesse trabalho e as minhas amigas e colegas da graduação.

Referências

ADITIVOS E INGREDIENTES, **Síntese e composição dos emulsificantes alimentícios**. Insumos: São Paulo, n. 70, 2010.

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.