



Estudo da produção de lipase em cultivo submerso pelo *Aspergillus sp.* usando óleo de oliva comercial como indutor

Maria Fernanda Silveira Santos, Amanda Souto Machado, Eloá Mangabeira Santos, Jéssica Simões Pereira, Luiz Felipe da Silva Xavier, Janete Maria da Silva Alves, Henrique Maia Valério

Introdução

No segmento industrial, a utilização de catalisadores químicos está relacionada à limitações na obtenção dos produtos e intermediários de interesse comercial, por apresentarem pouca versatilidade e exigirem altas temperaturas durante o processo. Além disso, apresentam baixa especificidade e geralmente formam subprodutos, normalmente não biodegradáveis durante a reação, que após o fim do processo precisam ser removidos por purificação [1, 2].

As enzimas, ao contrário dos catalisadores químicos, são muito ativas e versáteis, possuem a habilidade de realizarem várias reações de forma rápida, seletiva e sob condições brandas de reação [3]. Outra vantagem na utilização desses biocatalisadores é a facilidade em se regular a atividade enzimática por modificações do meio de reação tais como, pH, temperatura, substratos, dentre outros [4].

Neste contexto, as lipases microbianas (EC 3.1.1.3) vêm se destacando como catalisadores de hidrólise, síntese e transesterificações de triacilgliceróis [5]. Apesar de sua importância, estudos sobre o papel de substâncias lipídicas utilizadas como indutores no crescimento e na produção de lipases são escassos [6].

O fungo filamentososo *Aspergillus sp.* é considerado um bom produtor de lipase, e o óleo de oliva tem a capacidade de induzir a síntese da enzima em vários gêneros de fungos filamentosos [7]. Assim, este trabalho avalia o efeito do óleo de oliva comercial no crescimento e na produção de lipase extracelular pelo *Aspergillus sp.* quando cultivado em fermentação submersa.

Material e métodos

A. Isolamento do fungo

O fungo utilizado neste estudo foi coletado de resíduos de bagaço e palha de cana-de-açúcar, bem como porções do solo (até 15 cm de profundidade) na região Norte de Minas, e isolado a partir do processamento das amostras em meio de cultura BDA (2% Ágar, 20% Batata, 2% Dextrose), estrategicamente preparado com pH acidificado para 5,0 acrescido de antibiótico tetraciclina 100 µg/mL.

B. Identificação morfológica

O fungo isolado teve o seu gênero identificado pela técnica de microcultivo, em que o fungo foi inoculado em uma fatia fina de ágar BDA empobrecido e colocada em uma lâmina de vidro coberta por uma lamínula estéril. A lâmina foi então colocada numa placa de petri, e a sistema foi, em seguida, incubado durante 3 dias a 30 °C. Após este período a lâmina com as hifas aderidas foi retirada e corada com corante azul de algodão, a identificação do gênero de fungo foi baseada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo de estruturas de frutificação da cepa.

C. Fermentação submersa

Uma suspensão de 5 mL de esporos (10^8 esporos/mL), preparada por lavagem de sete a dez dias de amostras contidas no BDA com água destilada estéril, foi usada como inóculo para cada frasco de 250 mL contendo 50 mL do meio líquido de crescimento (por litro): 20,0 g de peptona bacteriológica, 8,0 mL de óleo de oliva, 0,6 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de NH_4NO_3 com pH inicial ajustado para 7,0. A amostra foi incubada em agitador rotatório a 30 °C operando a 160 rpm/min durante sete dias. Em intervalos de 24 horas a biomassa foi separada por centrifugação a 10.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante da cultura foi usado para determinar a atividade enzimática. Os resultados foram expressos como a média de pelo menos três medições independentes [8].

D. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação ou avaliação da atividade de hidrólise dos extratos enzimáticos foi utilizado o método espectrofotométrico. A atividade foi avaliada pela reação de hidrólise catalisada pela lipase de ésteres de *p*-nitrofenil laurato, com a formação do produto comóforo *p*-nitrofenol. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de solução enzimática a 0,25 mL do substrato *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM com acetonitrila: DMSO (1:1), e 2,2 mL de tampão de fosfato de sódio 50 mM pH 7, a 30 °C. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm no modo cinética. Uma unidade de atividade será definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio [9].

Resultado

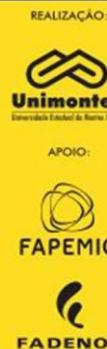


FÓRUM ENSINO • PESQUISA EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

O fungo selecionado para este estudo foi identificado pela técnica de microcultivo como pertencendo ao gênero *Aspergillus sp.* (Fig. 1). Após 120 horas de cultivo em fermentação submersa contendo óleo de oliva comercial como indutor na síntese de lipase, o *Aspergillus sp.* atingiu o seu pico de produção da enzima, a atividade enzimática máxima foi de 95,76 U/L (Figura 2).

Discussão

Iodita *et al.* [10] também analisaram a capacidade lipolítica de alguns fungos quando cultivados em meio líquido contendo óleo de oliva como substrato indutor, duas espécies de *Aspergillus* se destacaram como bons produtores de lipase, o *Aspergillus oryzae* CPhI-20-9 que produziu 9,5 U/L e o *Aspergillus niger* CPhI-8-N-9 que produziu 7,6 U/L.

Conclusão

A espécie de *Aspergillus sp.* selecionada para este estudo foi capaz de produzir lipase em concentração além do esperado quando cultivado em meio contendo óleo de oliva comercial. Assim, podemos concluir que o fungo isolado é um bom produtor da enzima, e o óleo de oliva um bom indutor na síntese de lipase.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Petrobras, e a *Biom Technology* pela doação da cepa utilizada neste estudo.

Referências

- [1] MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, U. V.; ERRAZU, A. F. **Possible methods for biodiesel production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 11, 1300-1311p, 2007.
- [2] RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MHUKUMAR, K. **An overview of enzymatic production o biodiesel.** Bioresource Technology, v. 99, 3975-3981p, 2008.
- [3] KRAJEWSKA, B. **Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review.** Enzyme and Microbial Technology, v. 35, 126-139p, 2004.
- [4] DZIEZAK, J. D. **Enzymes: catalysts for food processes.** Food Technology, v. 45, 78-85p, 1991.
- [5] MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.V. **Present and future applications of lipases.** Biotechnol genet eng rev, v. 3, 193- 217p, 1985.
- [6] SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. **Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long -chain fatty acids.** J Ferment Bioeng, v. 74, 77-80p, 1992.
- [7] RATLEDGE, C.; EVANS, CT. **Lipids and their metabolism. in: rose ah, harrison js (eds) the yeasts.** academic press, new yourk, v. 3., 434-438p, 1989.
- [8] COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G; MORAES-SANTOS, T. **Isolation and screening of alcaline lipase-producing fungi from brazilian savana soil.** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 22, p. 881-885, 2006.
- [9] GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E, MACIEL, F.M., FELIX, S.P., BEVILAQUA, J.B.; MACHADO, O.L.T., FREIRE, D.M.G. **Use of low-cost methodology for biot detoxification of castor bean waste and lipase production.** Enzyme and Microbial Technology, v. 44, 317-322p, 2009.
- [10] IONITA, A; MOSCOVICI, M; POPA, A.; VAMANU, O.; Dinu, P. L. **Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 3, 147-151p, 1997.

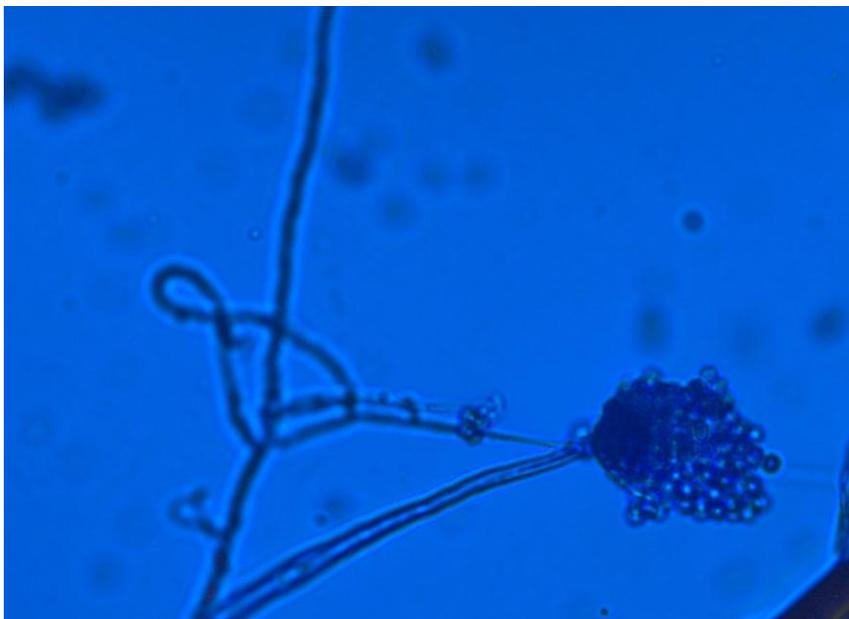


Figura 1. Foto do *Aspergillus sp.* em microcultivo (aumento de 1000X) escala 20mm.

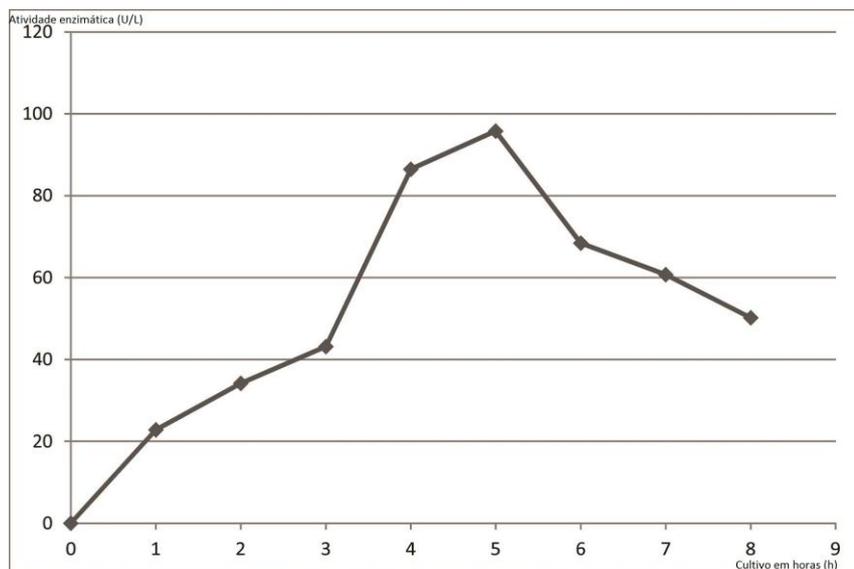


Figura 2. Atividade enzimática do *Aspergillus sp.* em 196 horas de cultivo submerso contendo óleo de oliva.