

PRODUÇÃO DA ENZIMA LIPASE PROVENIENTE DA ESPÉCIE *ASPERGILLUS ACULEATUS* CTT 3084 UTILIZANDO A FERMENTAÇÃO SUBMERSA.

CNPq¹, Beatriz de Carvalho Farias Lima da Silva², Ana Laura Santos Sirino³, Janaina Silva De Freitas⁴.

RESUMO

As enzimas são proteínas catalisadoras que permitem ampliar a agilidade de uma reação química e são extremamente eficientes pois possuem uma capacidade de não se degradar durante a reação catalisada, além disso, podem atingir velocidades superiores às outras reações não-catalisadas. São conhecidas cerca de 4.000 mil enzimas, como a lipase, protease, pectinase, amilase. A lipase pode ser produzida por fungos, leveduras, bactérias, além de plantas e animais. Os gêneros que são mais estudados para produção de lipases são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida*. Para a criação da enzima lipase microbiana é necessário a utilização das técnicas de fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). O fungo utilizado é do gênero *Aspergillus*. O *A. aculeatus*, CCT 3084 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (CCT- FAT), que fica localizado em Campinas – São Paulo. Esse microrganismo é mantido no laboratório pelo método de sílica-gel. Na produção da enzima através do método da fermentação submersa foi utilizado o meio de cultura líquido composto por: óleo de soja refinado 3%(m/v), extrato de levedura 7% (m/v), MgSO₄ .7H₂O 0,05% (m/v), KNO₂ 0,1% (m/v), KH₂PO₄ 0,1% (m/v) em 1 litro de solução, completando com água. Eles serão mantidos por até 120 horas incubados em shaker. Para o monitoramento de produção enzimática foi feito nos períodos de: 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Com esse estudo é possível observar que o fungo *Aspergillus Aculeatus* é um produtor da enzima lipase, os fungos do gênero *Aspergillus*, são reportados como bons produtores de lipases e é possível observar que o melhor tempo de produção da lipase na fermentação submersa foi no tempo de 96h (8,25U/ml) seguido por 72 h (1,75 U/mL). Contudo, foi possível observar que o fungo *Aspergillus aculeatus* produz a enzima lipase. O indutor para o crescimento da enzima foi o óleo de soja (óleo de cozinha), a maior produção dessa enzima em fermentação submersa em relação ao tempo foi em 96h com cerca de 8,25 de atividade lipolítica seguido por 72h com cerca de 1,75 de produção lipolítica.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação Submersa, Enzima, *Aspergillus aculeatus*, Lipase.

PRODUCTION OF LIPASE ENZYME FROM THE ASPERGILLUS ACULEATUS CTT 3084 SPECIES USING SUBMERGED FERMENTATION.

ABSTRACT

Enzymes are catalyzing proteins that allow the agility of a chemical reaction to be increased and are extremely efficient as they have the ability to not degrade during the catalyzed reaction, in addition, they can reach speeds higher than other non-catalyzed reactions. Around 4,000 enzymes are known, such as lipase, protease, pectinase, amylase. Lipase can be produced by fungi, yeast, bacteria, as well as plants and animals. The genera that are most studied for lipase production are *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida*. To create the microbial lipase enzyme, it is necessary to use submerged fermentation (FS) and solid-state fermentation (FES) techniques. The fungus used is from the *Aspergillus* genus. *A. aculeatus*, CCT 3084 was acquired from the Tropical Cultures Collection – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (CCT-FAT), which is located in Campinas – São Paulo. This microorganism is maintained in the laboratory using the silica gel method. In the production of the enzyme through the submerged fermentation method, a liquid culture medium was used consisting of: refined soybean oil 3% (m/v), yeast extract 7% (m/v), MgSO₄ .7H₂O 0.05% (m/v), KNO₂ 0.1% (m/v), KH₂PO₄ 0.1% (m/v) in 1 liter of solution, topping up with water. They will be kept for up to 120 hours incubated in a shaker. Enzyme production was monitored for periods of: 24h, 48h, 72h, 96h and 120h. With this study it is possible to observe that the fungus *Aspergillus Aculeatus* is a producer of the lipase enzyme, fungi of the genus *Aspergillus* are reported to be good producers of lipases and it is possible to observe that the best time for lipase production in submerged fermentation was during the 96h (8.25U/ml) followed by 72h (1.75 U/mL). However, it was possible to observe that the fungus *Aspergillus aculeatus* produces the lipase enzyme. The inducer for the growth of the enzyme was soybean oil (cooking oil), the highest production of this enzyme in submerged fermentation in relation to time was 96h with around 8.25 of lipolytic activity followed by 72h with around 1.75 of lipolytic production.

KEYWORDS: Submerged Fermentation, Enzyme, *Aspergillus aculeatus*, Lipase.

¹Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

²Graduação em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia;

³Graduação em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia;

⁴Doutora em Bioquímica Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia;

⁵Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas catalisadoras que permitem ampliar a agilidade de uma reação química são extremamente eficientes pois podem atingir velocidades superiores às outras reações não-catalisadas (Champer et al, 2019). Elas são encontradas em todos os organismos vivos e são importantes para o suporte da vida. Além dos seres vivos, as enzimas também são encontradas em alimentos in natura e processados (Olempska-Beer et al, 2006).

Historicamente não é possível constatar o período exato do início da utilização habitual das enzimas, contudo, a partir do surgimento da escrituração observou-se o queijo como o primeiro alimento produzido pelo homem, seguido da cerveja e do pão fazendo uso da fermentação, sem ao menos ter noção da sua principal finalidade (Zimmer et al, 2009). São conhecidas cerca de 4.000 mil enzimas, como a lipase, protease, pectinase, amilase (Colla, et al, 2012; Weiss, et al, 2020).

Na área da indústria grande parte das enzimas são provenientes de microrganismos, pois são conhecidos pelo seu custo reduzido referente à produção de metabólitos, a quantidade e o tempo, além de não causar impacto negativo ao ambiente (Messias et al, 2011). A lipase pode ser produzida por fungos, leveduras, bactérias, além de plantas e animais. Os gêneros que são mais estudados para produção de lipases são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Candida* (Sharma et al, 2001).

A lipase microbiana referida como enzima ideal, traz vantagens para a indústria quando se trata da sua mutabilidade, capacidade, economia, fácil produção e falta de dependência das estações do ano (Patel et al, 2020). Para a criação da enzima lipase microbiana é necessário a utilização das técnicas de fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (Ferraz et al, 2018).

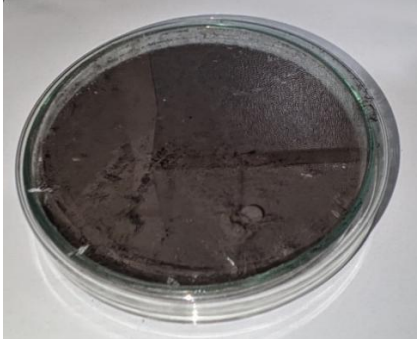

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo utilizado é do gênero *Aspergillus*. O *A. aculeatus*, CCT 3084 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (CCT- FAT), que fica localizado em Campinas – São Paulo. Esse microrganismo é mantido no laboratório pelo método de sílica-gel (Perkins,1962). O microrganismo foi cultivado em meio DBA por 7 dias à 30°C. Um círculo de 7mm foi cortado da placa com auxílio de um sistema de ponteiras desenvolvidos para realizar este procedimento. A partir da etapa anterior, o fungo ao apresentar atividade lipolítica em meio sólido suplementado com Tween® 80 (Sperb et al, 2015), foi utilizado para a produção de lipases via fermentação submersa. Na produção da enzima através do método da fermentação submersa foi utilizado o meio de cultura líquido composto por: óleo de soja refinado 3%(m/v), extrato de levedura 7% (m/v), MgSO₄ .7H₂O 0,05% (m/v), KNO₂ 0,1% (m/v), KH₂PO₄ 0,1% (m/v) em 1 litro de solução, completando com água, He, et al. (2016), com modificações. Eles serão mantidos por até 120 horas incubados em shaker. Para o monitoramento de produção enzimática foi realizado ensaios nos períodos de: 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Em cada um deles serão retiradas alíquotas de 6 mL. A dosagem da atividade enzimática será efetuada no extrato bruto enzimático (Winkler & Stuckmann, 1979). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata. Para determinação da Atividade lipolítica por Titulação foram coletadas 6 ml de cada amostra diariamente (24h) e feita a análise segundo a metodologia adaptada de (Leal, 2000). Foi preparada uma emulsão dissolvendo a 5% (m/v) goma arábica no tampão fosfato de sódio (0,1 mol/l e pH 7) e adicionou-se 10%(m/v) azeite de oliva virgem para emulsionar por 5 minutos em agitação constante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela I** apresenta o microrganismo *A. aculeatus*, CCT 3084 que foi identificado com a capacidade de produzir lipase. Confirmado com o teste qualitativo, com Tween 80, a hidrólise de éster. Mostrando, portanto, o desenvolvimento do halo opaco ao redor da colônia de acordo com o trabalho de Cassimi *et al.*, 2007.

Tabela I: Teste Qualitativo para Lipase

Fungo	Meio DBA ⁽¹⁾	Teste Qualitativo Hidrólise Éster (Tween 80) ⁽²⁾	Resultado
<i>A. aculeatus</i>			Positivo

Os resultados da Atividade lipolítica (U/mL) são mostradas na **Tabela II**. Com esse estudo é possível observar que o fungo *Aspergillus Aculeatus* é um produtor da enzima lipase, segundo os trabalhos realizados por Carvalho *et al.* (2005), Hasan, Shah e Hammed (2006), Mendes e Castro (2005) fungos do gênero *Aspergillus*, são reportados como bons produtores de lipases. A tabela 2 mostra os resultados referente ao melhor tempo de produção da lipase na fermentação submersa foi no tempo de 96h (8,25U/ml) seguido por 72 h (1,75 U/mL).

Pode-se observar que a produção no período de 24h foi de 1,25 U/mL, obtendo uma queda para 0,82 U/mL, no período de 48h, já no tempo de 72h houve novamente um aumento na produção, atingindo 1,75 U/mL. Chegando ao pico no tempo de 96h, porém no período de 120h ocorreu uma queda significativa na produção da lipase, na qual atingiu 1,5 U/mL.

Essa queda na produção pode ter sido motivada por diferentes agentes, uma vez que, o processo fermentativo, principalmente em frascos agitados, sofre a influência de vários fatores, como por exemplo o pH do meio. Diversos estudos têm mostrado que a produção de lipases pode ser afetada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio, agitação, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido no caso do bioprocessamento submerso (Sharma, 2001; Colla *et al.*, 2012; Collen, 2006).

TABELA II: Valores da Atividade lipolítica (U/mL) do *Aspergillus Aculeatus* em relação ao tempo através do método titulação.

Tempo	Atividade Lipolítica (U/mL) <i>Aspergillus Aculeatus</i>
24 h	1,25
48 h	0,82
72 h	1,75
96h	8,25
120h	1,5

CONCLUSÃO

Contudo, foi possível observar que o fungo *Aspergillus aculeatus* produz a enzima lipase. O indutor para o crescimento da enzima foi o óleo de soja (óleo de cozinha), a maior produção dessa enzima em fermentação submersa em relação ao tempo foi em 96h com cerca de 8,25 de atividade lipolítica seguido por 72h com cerca de 1,75 de produção lipolítica. Com isso essa enzima é de extrema importância para a biotecnologia, a mesma é utilizada na indústria alimentícia, saúde, limpeza, farmacêutica entre outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, P. O. et al. **Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas**. Química Nova, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química Nova, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- COLEN, Gecernir et al. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 2006.
- CHAMPER, P, et al. Bioquímica Ilustrada, cap. 5, ed. 3. Porto Alegre, 2019.
- COLLA, L. et al. **Aplicações e produção de lipases microbianas**. Revista CIATEC-UPF, vol. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.
- FERRAZ, J. **Obtenção de lipase microbiana: uma breve revisão**. Rev. Ciências Exatas e Naturais, vol.20, n. 1, Jan/Jun, 2018.
- HASAN, F, et al. Industrial application of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- LEAL, M. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. Leal, M. C. M. R. (2000). (Tese de mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 2000, 2000.

- MESSIAS, J, et al. **Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, vol. 32, n. 2, p. 213-234, Londrina, 2011.
- OLEMPSKA-BEER, Z. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review, Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 45, 2006.
- PERKIS, D. **Preservation of Neurospora stock cultures with anhydrous silica gel**. Canadian Journal of Microbiology, v. 8, n. 4, p. 591-594, 1962.
- SPERB, J et al. **Avaliação qualitativa da produção de lipase e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos**. Engevista, vol. 17, n. 3, p. 385-397, setembro, 2015.
- SHARMA, R, et al. **Production, purification, characterization, and applications of lipases**, Biotechnology Advances, vol. 19, 2001.
- WEISS, R, et al. **Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by Trichoderma reesei**, Journal of Cleaner Production, vol. 275, 2020.
- WINKLER, U, et al. **Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by Serratia marcescens**. JournalofBacteriology, vol. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.