

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPASE LIGADA AO MICÉLIO POR CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Aspergillus oryzae*

P. M. SATO¹, F. H. M. SOUZA¹, G. E. SANTOS¹ e G. S. S. ANDRADE¹

¹ Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciência e Tecnologia
E-mail para contato: grazielle.andrade@unifal-mg.edu.br

RESUMO – O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos parâmetros nutricionais fontes de carbono e nitrogênio, bem como o pH na produção de lipase ligada ao micélio por células íntegras de *Aspergillus oryzae*. As células foram cultivadas em fermentação submersa a 30°C sob agitação orbital de 170 rpm. A curva de crescimento das células revelou um crescimento típico microbiano em que constatou-se que não há uma relação direta e proporcional entre a formação de biomassa e a produção da lipase ligada ao micélio. As condições que favoreceram a produção de lipase ligada ao micélio foram em pH 8 e com adição de óleo de oliva e mistura 1:1 de peptona de soja e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Lipases ligadas ao micélio vêm sendo cada vez mais estudadas visando identificar o potencial de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para utilização como biocatalisador (células íntegras) baseado na sua habilidade de imobilização e de exposição das proteínas funcionais de interesse na superfície de sua célula (Cortez *et al.*, 2017).

Como biocatalisadores, as lipases apresentam características como especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, que os catalisadores químicos não possuem, além de permitirem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos (Colla *et al.*, 2016). Lipases fúngicas ligadas ao micélio tem tido destaque, em especial quando provenientes de fungos dos gêneros *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que são citados como bons produtores de lipases (Iftikhar *et al.*, 2008). Entretanto, ainda são poucas as espécies estudadas e por isso, pouco utilizadas industrialmente.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar as melhores condições de cultivo para a produção de lipase ligada ao micélio a partir de células íntegras de *Aspergillus oryzae*. Espera-se produzir um biocatalisador eficiente e de baixo custo que possa ser utilizado em reações de interesse industrial, tais como hidrólise e transesterificação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais



O micro-organismo utilizado no desenvolvimento do trabalho foi o *Aspergillus oryzae* URM 5618 (Micoteca UFPE). Para o preparo do meio de cultura utilizou-se como fontes de carbono os óleos refinados de canola (Liza), girassol (Liza), soja (Liza) e oliva (Carbonell); como fonte de nitrogênio peptona de soja (Acumedia), extrato de levedura (Acumedia), resíduo de soja okara (produção caseira de tofu), NH_4Cl (Synth) e NH_4SO_4 (Synth); e os sais NaNO_3 (Synth), KH_2PO_4 (Synth) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Synth). Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico: goma arábica em pó pura (Synth) e acetona (Synth).

2.2. Preparo das células íntegras

As células íntegras foram preparadas conforme Andrade *et al.* (2012). Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio previamente autoclavado ($121^\circ\text{C}/15$ min) foram adicionados assepticamente 3 g de óleo refinado como agente indutor da produção de lipase. Para preparo do inóculo, os esporos foram raspados, suspensos em água estéril e submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão. Um volume de $200\mu\text{L}$ da suspensão foi inoculado em cada frasco agitado, os quais foram incubados por 96 h a 30°C sob agitação orbital em *shaker* (170 rpm). Ao final do cultivo, as células foram separadas do meio de cultura por filtração a vácuo, lavadas com água e acetona e secas em bomba de alto vácuo. A biomassa celular foi avaliada por meio de medida de peso seco e a atividade lipolítica foi quantificada pelo método da hidrólise do azeite de oliva modificado (Andrade *et al.*, 2014).

2.3. Influência dos parâmetros de cultivo

A fim de aumentar a produção de lipase ligada ao micélio nas células íntegras de *A. oryzae*, foram investigados a influência da fonte de carbono e nitrogênio e do pH. Foram avaliados como fonte de carbono os óleos de oliva, soja, canola e girassol na concentração de 30 g L^{-1} ; como fonte de nitrogênio investigou-se peptona de soja e extrato de levedura 1:1 (70 g L^{-1}), peptona de soja (35, 50 e 70 g L^{-1}) e okara (35, 50 e 70 g L^{-1}); e o pH do meio de cultura foi testado na faixa entre 5,0 a 8,0 com um incremento de 0,5, através da adição de HCl ou NaOH concentrados.

2.4. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica das células foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Andrade *et al.* (2014). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de água destilada e goma arábica a 3% (m v^{-1}). Em frascos Erlenmeyer[®] de 125 mL foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e 1 g de células (massa seca) ou 1,0 ml do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em banho termostatzado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de etanol e água destilada (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 1, sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima que libera $1\mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades são expressas em $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ min}^{-1}$ (U g^{-1}).

$$A(U) = \frac{(V_a - V_b) * M_{KOH} * 10^3}{t * m_{seca}} \quad (4)$$

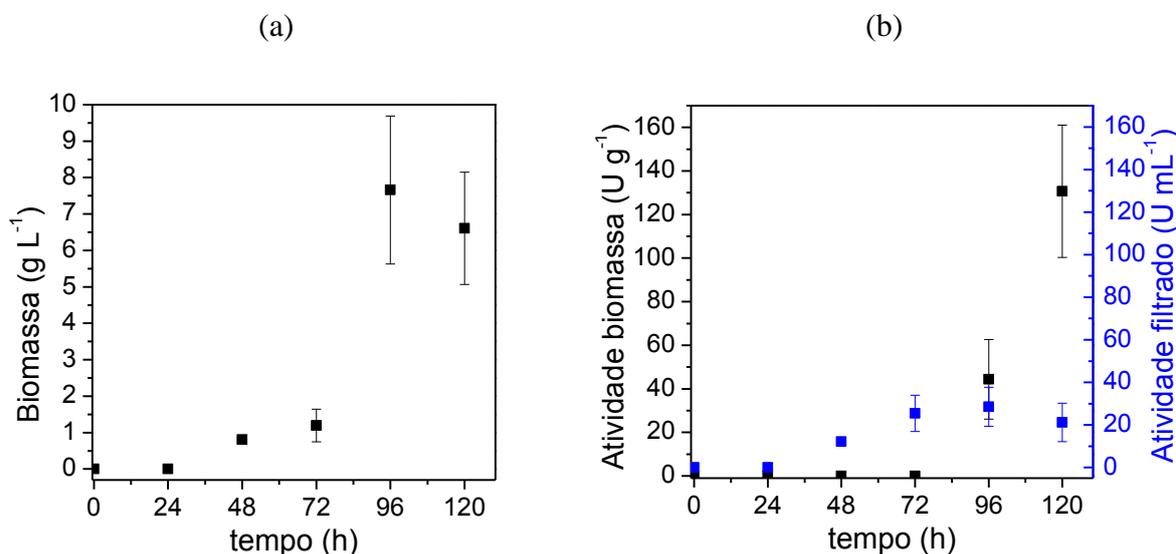
em que V_a representa o volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL), V_b representa o volume de titulante gasto na titulação do branco (mL), M_{KOH} representa a molaridade do titulante utilizado (mol L^{-1}), t representa o tempo de reação (min) e m_{seca} a quantidade de massa seca de biocatalisador utilizada durante a reação (g) ou a quantidade do caldo fermentado utilizado durante a reação (g).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção das células íntegras

A fim de avaliar a cinética de crescimento e a atividade hidrolítica das células íntegras de *A. oryzae*, bem como do filtrado obtido após a separação das células do meio fermentado, um cultivo inicial utilizando azeite de oliva como fonte de carbono e peptona de soja como fonte de nitrogênio em pH in natura (6,5) foi realizado. O perfil cinético e as atividades hidrolíticas da biomassa e do filtrado estão ilustrados na Figura 1a-b.

Figura 1 – Perfil cinético de crescimento (a) e atividades hidrolíticas das células íntegras de *A. oryzae* e do filtrado obtido após a fermentação (b). Condições: pH 6,5; azeite de oliva; peptona de soja; 30°C; 170 rpm.



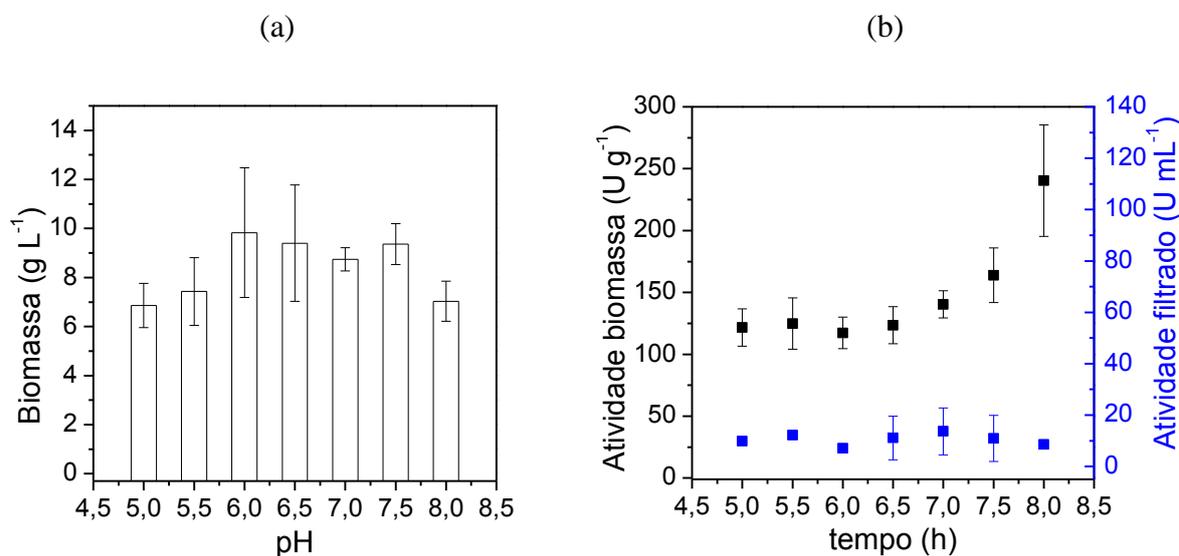
O perfil de crescimento (Fig. 1a) mostra um perfil típico de crescimento microbiano, em que não houve crescimento nas primeiras 24 h e uma fase lag de até 72 h. A partir desse momento, o crescimento é exponencial e se estabiliza entre 96 e 120 h com valores máximos de $7,66 \pm 2,03 \text{ g L}^{-1}$. Durante esse período o pH foi monitorado e se manteve estável em 6,60 até 96h, sendo que em 120h observou-se um decréscimo para 5,9. No mesmo período a atividade hidrolítica da biomassa e do filtrado também foi monitorada (Fig.1b). Os dados revelam que a maior atividade do filtrado foi cerca de 4 vezes menor em relação a da biomassa, indicando que a maior parte da lipase produzida ficou ligada ao micélio e não foi secretada para

o meio. Até 72h não foi observado atividade na biomassa, sendo a lipase produzida somente a partir de 96h. O máximo valor de atividade da biomassa foi de $130,65 \pm 30,65 \text{ U g}^{-1}$ em 120 h.

3.2. Influência dos parâmetros de cultivo na produção de células íntegras

A fim de maximizar a produção de lipase ligada ao micélio, o meio de cultivo das células íntegras de *A. oryzae* foi avaliado sob diferentes valores de pH, fontes de carbono e fontes de nitrogênio. Inicialmente avaliou-se a influência da fonte de carbono na produção de biomassa e de lipase ligada ao micélio sob cultivo em pH in natura (6,5) e peptona de soja (70 g L^{-1}) como fonte de nitrogênio. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 2a-b.

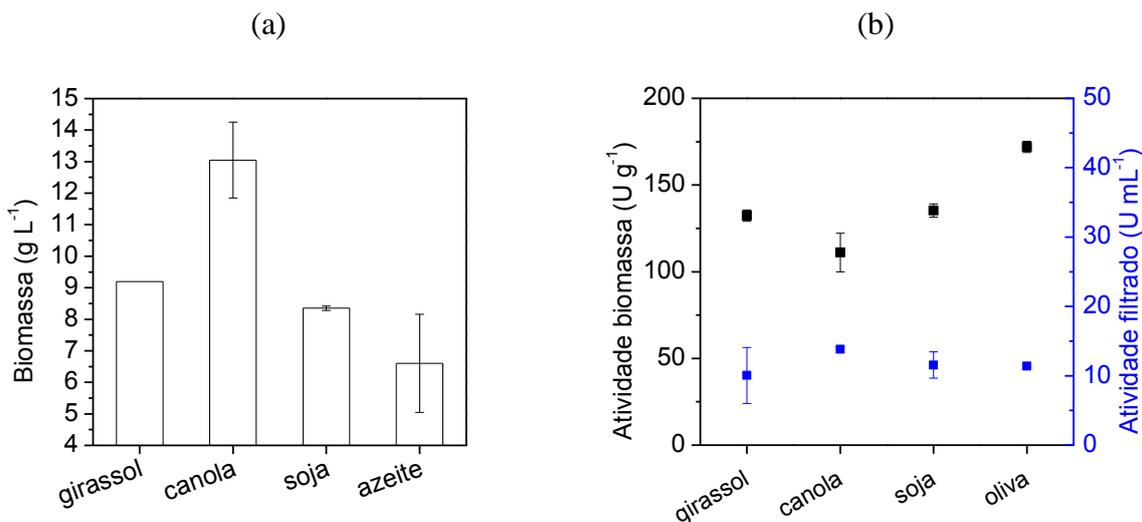
Figura 2 – Perfil cinético de crescimento (a) e atividades hidrolíticas das células íntegras de *A. oryzae* e do filtrado obtido após a fermentação (b). Condições: azeite de oliva; peptona de soja; 30°C ; 170 rpm.



Verificou-se na Fig. 2a que a mudança de pH do meio não provocou uma variação expressiva na produção da biomassa que ficou entre $6,85 \pm 0,90$ e $9,83 \pm 2,65 \text{ g L}^{-1}$. Comportamento semelhante ocorreu para a atividade do filtrado que manteve-se baixa com valores médios de $10,48 \pm 1,29 \text{ U g}^{-1}$. Por outro lado a atividade da biomassa aumentou com o aumento do pH do meio, atingindo o valor máximo de $240,37 \pm 45,09 \text{ U g}^{-1}$ em pH 8,0.

Definido pH 8,0 como o ideal, testou-se diferentes óleos refinados como fontes de carbono e fixou-se peptona de soja como fonte de nitrogênio. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3a-b.

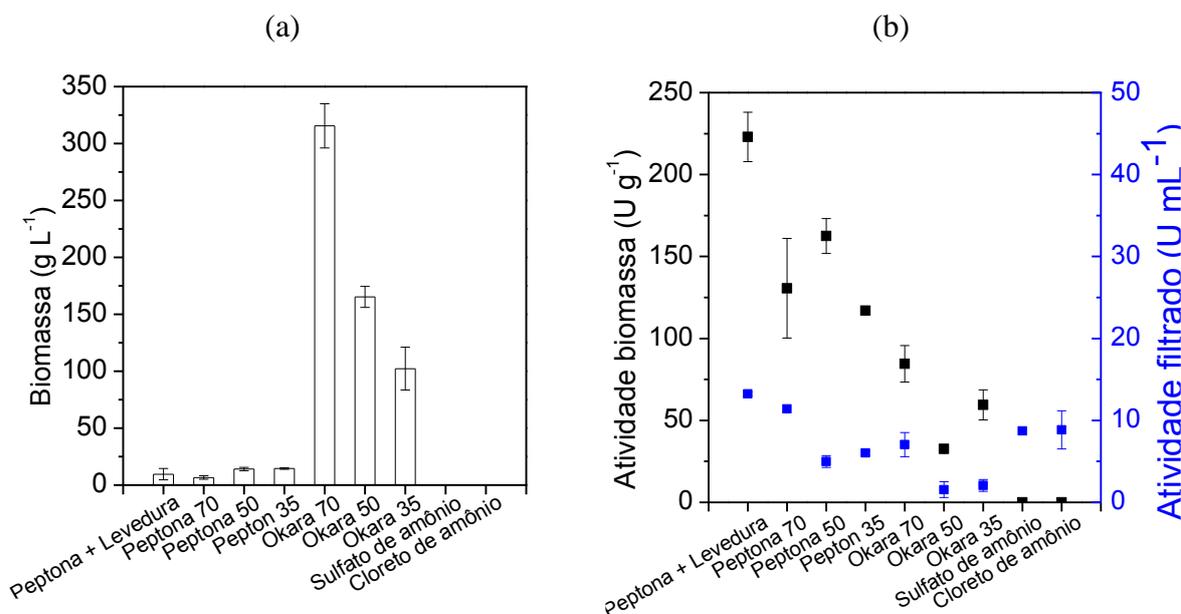
Figura 3 – Perfil cinético de crescimento (a) e atividades hidrolíticas das células íntegras de *A. oryzae* e do filtrado obtido após a fermentação (b). Condições: pH 8,0; peptona de soja; 30°C ; 170 rpm.



A Fig.3a mostra que o óleo de canola favoreceu a produção de biomassa ($13,05 \pm 1,20$ g L⁻¹), porém não favoreceu a produção de lipase ligada ao micélio, visto que a maior atividade da biomassa ($171,97 \pm 3,2$ U g⁻¹) foi obtido com o emprego de óleo de oliva no cultivo. A atividade do filtrado manteve-se baixa, indicando que a mudança na fonte de carbono não influenciou a retenção da lipase produzida.

O último teste foi avaliar a fonte de nitrogênio, fixando-se óleo de oliva como fonte de carbono e pH 8,0. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4a-b.

Figura 4 – Perfil cinético de crescimento (a) e atividades hidrolíticas das células íntegras de *A. oryzae* e do filtrado obtido após a fermentação (b). Condições: pH 8,0; óleo de oliva; 30°C; 170 rpm.





A Fig. 4 mostra que o okara favorece o crescimento celular, porém a máxima atividade de biomassa ($223,02 \pm 15,07 \text{ U g}^{-1}$) foi atingida utilizando a mistura 1:1 de peptona de soja e extrato de levedura na concentração de 70 g L^{-1} . A presença dos sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4Cl não promoveram crescimento da biomassa no meio de cultivo. Observa-se ainda que a fonte de nitrogênio também não afetou a retenção de lipase na biomassa, uma vez que as atividades de filtrado permaneceram baixas.

4. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a produção de lipase ligada ao micélio pode ser otimizada variando apenas as condições de cultivo das células íntegras. Ao empregar azeite de oliva como fonte de carbono, a mistura de peptona de soja e extrato de levedura como fonte de nitrogênio e o ajuste do pH do meio para 8,0, obteve-se a máxima atividade hidrolítica da biomassa, o que evidencia que essas são as condições que favorecem a retenção da lipase ao micélio.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da CAPES Código Financeiro 001 e FAPEMIG (APQ-01391-18).

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M., OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. *Bioprocess Biosyst. Eng.* v.37, n. 12, p. 2539-2548, 2014.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H.F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. *J Mol Catal B Enzym.* v. 84, p. 183-188, 2012.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; DE LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian J Microbiol.* v. 47, n. 2, p. 461-467, 2016.
- CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Quím. Nova.* v. 40, n.1, p. 85-96, 2016.
- IFTIKHAR, T. MUBASHIR, N.; AFZAL, M.; HAQ, I.; RAJOKA, M. I. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: a kinetic study. *Food Technol. Biotechnol.* v. 46, n. 4, p. 402-412, 2008.