

CINÉTICA DE LIPASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Aspergillus* sp. VIA FERMENTAÇÃO SUBMERSA FRENTE A SUBSTRATOS COMPLEXOS

**Cristina Pasqualli, Maitê Guazzelli, Renata Eberth, Telma Elita Bertolin, Christian
Oliveira Reinehr, Luciane Maria Colla***

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo

**Email: lmcolla@upf.br*

RESUMO

As lipases são enzimas que realizam a hidrólise dos triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis e ácidos graxos livres, sendo aplicáveis em diversos setores industriais. Estas enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, como vegetal, animal ou microbiana. As enzimas microbianas podem apresentar diferentes características dependendo de fatores como o método e microrganismo utilizado na produção, o que torna necessário a caracterização da especificidade destas enzimas por diferentes substratos. Objetivou-se determinar os parâmetros cinéticos segundo Michaelis-Menten das lipases obtidas via processo submerso através do fungo *Aspergillus* sp (cepa O-8) utilizando-se como substratos os óleos de soja, girassol, milho e canola, e o azeite de oliva. A atividade lipolítica foi determinada através do método proposto na literatura, onde se variaram as concentrações dos substratos de 10 % a 70 %. A determinação da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima da reação enzimática foi obtida a partir da linearização dos dados de atividade lipolítica e concentração de substrato. A lipase demonstrou ter maior afinidade pelo óleo de soja, seguido do óleo de canola e menor especificidade para os óleos de milho, girassol e azeite de oliva

Palavras-chaves: enzima, lipase, substrato, parâmetros cinéticos, afinidade.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas que realizam reações de hidrólise, inter e transesterificação de lipídios, de onde derivam seus principais usos, nas indústrias de detergentes (SAISUBRAMANIAN et al., 2006), médica (HASAN et al., 2005) e alimentícia (SHARMA et al., 2001). Algumas destas aplicações são a maturação de queijos (DUPUIS; CORRE;

BOYAHVAL, 1993), a síntese de aromas (SALAH et al., 2007, LARIOS et al., 2004), a produção de lipídios com elevados teores de ácidos graxos insaturados (WANG et al., 2007, RESHMA et al., 2008), a produção de metil-ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (PARK; SATO; KOJIMA, 2006, MACEDO; MACEDO, 2004, DEMIRBAS, 2003; ABIGOR et al., 2000), entre outros.

As diferentes aplicações industriais das lipases dependem da fonte das quais são obtidas. As lipases microbianas podem ser obtidas a partir de uma gama variável de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos ou leveduras) por bioprocessos submersos ou em estado sólido. Estes bioprocessos, por sua vez, podem ser conduzidos tendo como fatores que afetam a produção da enzima, o pH, a temperatura, o meio de cultivo, entre outros. Estes fatores influenciam na produtividade e afetam a enzima no que diz respeito a sua atividade catalítica.

A especificidade das enzimas por seus substratos pode ser determinada através da constante de Michaelis-Menten, que corresponde à concentração de substrato na metade da velocidade máxima de reação. O conhecimento do valor desta constante para uma determinada enzima é útil, pois descreve a cinética da reação em ensaios que determinam a atividade enzimática, a forma de purificação da enzima em diferentes substratos, a análise dos mecanismos reguladores em metabolismos e para se trabalhar industrialmente em condições de maior rendimento de produto.

O conhecimento da especificidade das lipases frente a diferentes substratos é de fundamental importância, devido à extensiva utilização de lipases na indústria de laticínios para a hidrólise da gordura do leite. Aplicações correntes incluem a produção de compostos característicos de aromas em queijos, a aceleração da maturação dos queijos, a produção de produtos similares a queijos e a lipólise da manteiga e creme de leite. Os ácidos graxos livres gerados pela ação das lipases sobre do leite permitem o desenvolvimento de inúmeros novos produtos como os queijos leves, que apresentam características próprias de aromas, geradas pela produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser metabolizados por microrganismos e transformados em compostos como álcoois, cetonas, ésteres e lactonas.

Objetivou-se a determinação dos parâmetros cinéticos das lipases obtidas via processo submerso através do fungo *Aspergillus* sp (cepa O-8) utilizando-se diferentes substratos oleosos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Produção das enzimas

As lipases utilizadas no desenvolvimento do projeto foram produzidas a partir do microrganismo *Aspergillus* sp (cepa O-8) via bioprocesso submerso.

O preparo do inóculo foi realizado em placas de Petri contendo 30 mL de meio ágar-batata-dextrose (ABC) solidificado. O inóculo foi incubado durante 5 d em estufa a 30 °C.

O meio de cultivo utilizado para a produção de lipases foi preparado a partir de farelo de trigo, solução salina, extrato de levedura como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor para a produção de lipases. A solução salina continha KH_2PO_4 – 2 g/L; MgSO_4 – 1 g/L e solução traço – 10 mL/L ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,63 mg; MnSO_4 – 0,01mg; ZnSO_4 – 0,62 mg e água destilada até completar o volume de 1L). O meio de cultivo foi autoclavado durante 20 min a 121°C e o pH ajustado para 7,0. O meio de cultivo foi colocado em erlenmeyers de 250 mL com volume inicial de meio de 120 mL. A inoculação dos meios foi realizada utilizando-se uma área circular de 2 cm de diâmetro de meio ABD contendo esporos do fungo *Aspergillus* sp. Após a inoculação, os cultivos foram incubados durante 7 d a 30 °C com agitação de 120 rpm. Ao término da fermentação, os meios fermentados foram filtrados, misturados e congelados a -20°C até sua utilização.

2.1.2 Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada através do método proposto por Burkert et al. (2004), modificado. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela enzima lipase, sobre os triglicerídios dos substratos emulsionados em goma arábica.

O preparo das emulsões de óleos vegetais (milho, canola e azeite de oliva) e goma arábica foram realizados em balões volumétricos de 10 mL, aos quais foram adicionadas quantidades crescentes de óleos vegetais, resultando em 12 concentrações de substrato que variaram de 10 % a 70 % (1g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 3 g, 3,5 g, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g e 7 g). A solução de goma arábica a 7% foi preparada dissolvendo-se a goma arábica em solução de tampão fosfato pH

7,2, a fim de estabelecer o pH da reação enzimática. A solução de goma arábica foi utilizada para completar o volume dos balões volumétricos contendo os óleos vegetais.

As soluções de goma + óleo vegetal foram adicionadas em erlenmeyers de 250 mL e levadas a agitação de 160 rpm durante 30 minutos a 37 °C, em banho-maria, a fim de formar a emulsão. A reação enzimática foi realizada utilizando-se 4 mL de emulsão e 1 mL de extrato enzimático, em erlenmeyers de 250 mL, sob agitação de 160 rpm durante 30 minutos a 37 °C em banho-maria. A reação foi inativada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol:água (1:1:1 v/v/v). Os ácidos graxos foram titulados com uma solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Os brancos foram realizados adicionando-se os extratos enzimáticos aos sistemas reacionais simultaneamente à adição da solução de inativação. A atividade lipolítica foi determinada através da Equação 1, onde AL: atividade lipolítica (U); V_{NaOH}: volume gasto na titulação de NaOH (mL); M_{NaOH}: molaridade do NaOH (mol/L); V_{extrato}: volume adicionado de extrato (mL); t: tempo de reação (minutos).

$$AL = \frac{V_{NaOH} * M_{NaOH}}{V_{extrato} * t} \quad (1)$$

2.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de K_m e V_{máx}

A determinação da constante de Michaelis-Menten e da velocidade máxima da reação enzimática foi realizada a partir da linearização gráfica de atividade lipolítica e da concentração de substrato, segundo Lineweaver-Burk, Equação 2, onde:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (2)$$

Os dados do inverso da atividade lipolítica versus inverso da concentração de substrato foram plotados e, através de regressão linear, obteve-se o coeficiente angular representado por Km/Vmax e o coeficiente linear pelo inverso da velocidade máxima.

A partir dos resultados de Km e velocidade máxima foi realizado o cálculo das velocidades para cada concentração de substrato utilizada.

2.2 Resultados e discussão

As Figuras 1a a 1c apresentam a linearização de Lineweaver Burk para a reação enzimática realizada utilizando a lipase e como substratos o azeite de oliva e os óleos de canola e milho.

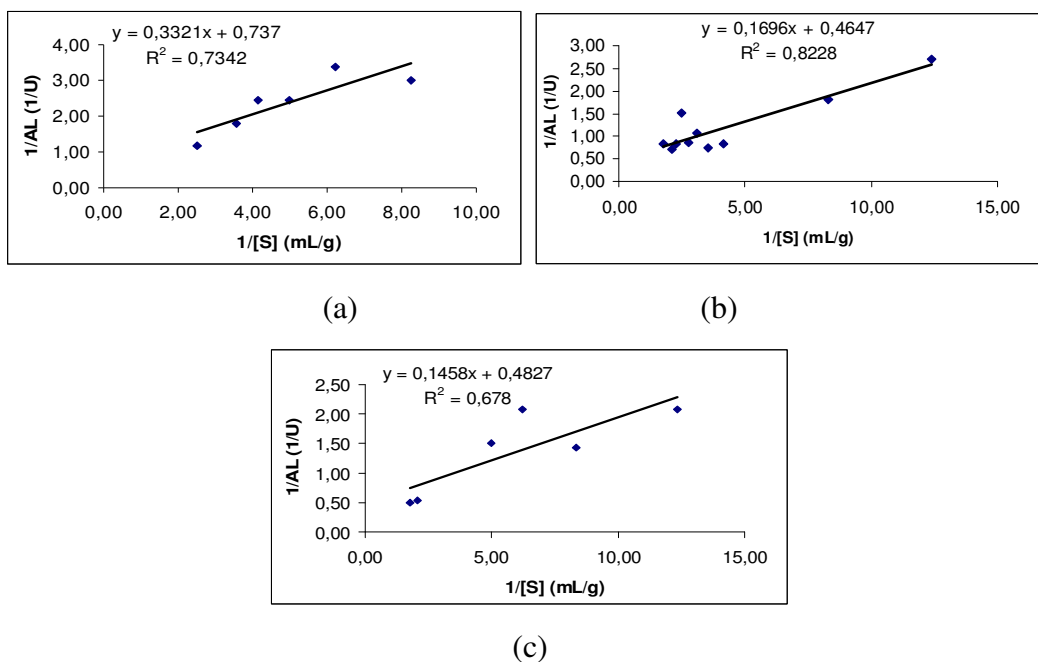


Figura 1 Linearização de Lineweaver-Burk da reação enzimática utilizando lipase produzida por *Aspergillus* sp. (cepa O-8) e como substratos (a) azeite de oliva, (b) óleo de canola e (c) óleo de milho

A Tabela 1 apresenta os resultados de velocidade de reação enzimática ($V_{m\acute{a}x}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_M), obtidos a partir da linearização de Lineweaver-Burk para as reações enzimáticas realizadas utilizando óleos vegetais e a enzima lipase.

Tabela 1 Velocidade de reação enzimática e constante de Michaelis Mentem para diferentes substratos

Substratos	$V_{m\acute{a}x}$ (U)	K_m (g/mL)
Azeite de oliva	1,36	0,45
Óleo de milho	2,07	0,30
Óleo de canola	2,15	0,36

A Tabela 2 apresenta a composição de ácidos graxos percentual do azeite de oliva e dos óleos de soja, milho, canola e girassol. Os substratos utilizados são óleos vegetais, os quais diferem na composição em ácidos graxos.

Tabela 2 Composição de ácidos graxos percentuais dos óleos vegetais

Óleo vegetal	Monoinsaturado (%)	Saturado (%)	Linoléico (%)	Linolênico (%)
Azeite de oliva	77	14	8	<1
Óleo de milho	25	13	61	1
Óleo de canola	58	6	26	10

Fonte: Moretto et al. (1998)

Segundo Carvalho et al. (2003), as lipases microbianas podem ser 1,3 específicas, atuando sobre as ligações *sn1* e *sn3* dos acilgliceróis, não atuando sobre a ligação *sn2* que em geral contém os ácidos graxos poliinsaturados. As lipases microbianas também podem ser específicas por determinados ácidos graxos, hidrolisando preferencialmente grupos acila de cadeia longa que contenham dupla ligação *cis* na posição 9. Avaliando-se os resultados obtidos de K_m para o azeite de oliva (0,45 g/mL), óleo de canola (0,36 g/mL) e óleo de milho (0,30 g/mL) verifica-se uma concordância com os percentuais de ácido linoléico presentes nestes óleos, de 8 %, 26 % e 61 %, respectivamente. Assim quanto maior o percentual de ácido linoléico, menor o K_m , indicando que a enzima atuasse por um mecanismo de especificidade pelo ácido graxo presente.

3 CONCLUSÃO

A enzima lipase produzida a partir do microrganismo *Aspergillus* sp (cepa O-8), apresentou maior especificidade para os óleos de milho, canola e oliva, respectivamente, com K_m s de 0,30 g/mL; 0,36 g/mL e 0,45 g/mL.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos

graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p. 22-24, 2003.

DUPUIS, C.; CORRE, C.; BOYAVAL, P. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. **Applied and environmental microbiology**, v.59, n.12, p. 4004-4009, 1993.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

PARK, E.Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipase-immobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889-896, 2006.

RESHMA, M.V.; SARITHA, S.S.; BALACHANDRAN, C.; ARUMUGHAN, C. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. **Bioresour Technol.**, v. 99, n. 11, p.5011-5019, 2008.

SAISUBRAMANIAN, N.; EDWINOLIVER, N.G.; NANDAKUMAR, N.; KAMINI, N.R.; PUVANAKRISHNAN, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 669-676, 2006.

SALAH, R.B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl Acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, 19, 627-662, 2001.