

Potencial da farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase de *Aspergillus niger*: Influência da temperatura e umidade no processo

Potential mangaba seed meal for production of lipase from *Aspergillus niger*: Influence of temperature and moisture in process

F. M. Souza & L. C. L. Aquino

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

lcl@ufs.br

Neste trabalho foi avaliado o potencial da farinha de sementes de mangaba para a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, verificando a influência da umidade inicial do resíduo e da temperatura na cinética de produção da enzima. A farinha de sementes de mangaba apresentou potencial para a produção de lipase microbiana sendo a máxima produção (402 U/g) obtida em 216 h de fermentação quando utilizado o substrato contendo 30% de umidade inicial e temperatura de 40°C. Contudo verificou-se a importância da variação de parâmetros da fermentação em estado sólido para determinar as melhores condições para obtenção do produto de interesse.

Palavras-chave: enzima; fermentação em estado sólido; resíduo agroindustrial; *Aspergillus niger*

In this study we evaluated the potential of the seed meal mangaba to obtain lipase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation, checking the influence of initial residual moisture and temperature on the kinetics of enzyme production. The mangaba seed meal has potential for the production of microbial lipase production and the maximum (402 U/g) was obtained in 216 h of fermentation when using the substrate containing 30% of water content and temperature of 40°C. However it was found the importance of the parameters of solid-state fermentation to determine the best conditions for obtaining the product of interest.

Keywords: enzyme; state solid fermentation; agroindustrial waste; *Aspergillus niger*

1. INTRODUÇÃO

As lipases, triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas largamente distribuídas na natureza, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas enzimas, encontradas em tecidos animais, vegetais e em microrganismos, têm papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reserva energética e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares [1,2,3].

As lipases microbianas podem ser obtidas por fermentação submersa, a qual caracteriza-se pela utilização de meio líquido ou por fermentação em estado sólido (FES) em que o desenvolvimento microbiano se dá em condições de atividade de água baixa menor que 60%. A FES apresenta uma série de vantagens, tais como: obtenção de produtos concentrados, necessita de menor quantidade de solvente para extração; possibilita a exclusão das etapas de concentração e/ou extração; redução dos problemas de contaminação; emprega substratos simples e de baixo custo; a esterilização do meio é muitas vezes desnecessária; ausência de espuma; eliminação da necessidade de solubilização do substrato; eliminação da necessidade de rigoroso controle sobre diversos parâmetros durante a fermentação. A FES é aplicada para produção de alimentos, biopesticidas e substâncias químicas diversas. O grande potencial é principalmente na produção de enzimas como as lipases através de fungos filamentosos tais como: *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium* [3-6].

O descarte dos resíduos do processamento das frutas tropicais e subtropicais representa um crescente problema devido ao aumento da produção. Como este material é geralmente propenso à degradação microbiológica, isto limita uma exploração futura. Por outro lado, o custo da secagem, armazenagem e transporte de subprodutos são fatores economicamente limitantes. Por isso, os resíduos industriais são muitas vezes utilizados como ração animal ou na forma de fertilizantes [7]. Grande parte destes resíduos pode ser reaproveitado para a elaboração de novos produtos como farinhas para incorporação em bolos e biscoitos [8], elaboração de geléias [9], elaboração de rações para animais [10] ou para obtenção de produtos de alto valor agregado como enzimas, proteínas, ácidos e compostos de aromas [11, 12].

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregado [7].

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi a obtenção de lipase de *Aspergillus niger* através da fermentação em estado sólido da farinha de sementes de mangaba e avaliar a influência dos parâmetros umidade unicial da farinha e temperatura de fermentação no processo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As sementes de mangaba foram adquiridas da indústria processadora de polpas de frutas Pomar do Brasil (Aracaju, SE) e o microrganismo *Aspergillus niger* foi adquirido da coleção de culturas do instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), em tubos com ágar nutriente inclinado e estocados a 4°C, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

As sementes foram inicialmente lavadas em água corrente a seguir foram realizados os seguintes tratamentos: a) secagem em secador (Pardal-PE 100 Semi industrial, Brasil) à temperatura de 60°C, durante 6 h; c) moagem em moinho tipo Wiley, com diâmetro de 1,06mm e d) esterilização em autoclave à temperatura de 121°C durante 15min. A farinha obtida foi caracterizada físico-quimicamente quanto aos teores de: umidade, proteínas, lipídios, carboidratos, acidez e pH. Todas as análises foram executadas em triplicata, de acordo com metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz [13].

Os experimentos foram realizados em placas de Petri contendo 10g do resíduo e um volume de suspensão de esporos de *Aspergillus niger* na concentração de 10^6 esporos/mL, o qual variou de acordo com a umidade desejada para o resíduo. Para avaliar a influência de parâmetros da fermentação realizou-se experimentos variando-se a temperatura entre 28 e 40°C e a umidade do substrato entre 24 e 66%. A cinética de produção de lipase foi avaliada retirando-se a cada 24 h uma placa de fermentado para a extração da enzima e determinação da atividade hidrolítica. O fermentado foi misturado com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 na proporção de 1g de fermentado para 5mL de tampão, mantendo-se sob agitação à temperatura de 37°C durante 15 min. Após esta etapa, centrifugou-se à 550 rpm durante 10 min, filtrou-se em papel de filtro. O extrato bruto enzimático obtido foi avaliado quanto à atividade hidrolítica.

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento descrito por Soares et al. [14], com algumas modificações. O substrato foi preparado utilizando-se 25 mL de azeite de oliva e 25 mL de goma arábica a 7% em água destilada. Em frascos Erlenmeyers, foram adicionados 5 mL do substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,0, e 1 mL de extrato bruto enzimático, sendo a mistura incubada à 37°C por 5 min. A reação foi paralisada com acetona e etanol (1:1; v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH a 0,04 M, utilizando fenoftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida em termos de quantidade de enzima para liberar 1µmol de ácido graxo por min. de reação, nas condições experimentais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A farinha de sementes de mangaba apresentou teores de proteínas (10,25%), lipídeos (23%), cinzas (2,09%) e carboidratos (58,66%) similares aos obtidos por Vieira [15] (proteínas de 11,40%, lipídeos de 24,68%, cinzas de 2,13% e carboidratos de 60,89%) (Tabela 1). A diferença observada no teor de umidade pode ser devido ao tratamento térmico realizado no processamento da farinha obtida neste trabalho. Devido ao fato da farinha de sementes de mangaba conter um elevado teor de lipídeos (23%), esta foi utilizada para a obtenção de uma enzima lipolítica, a lipase, a partir da fermentação com *Aspergillus niger*, sem a necessidade de ser adicionado óleo de oliva como agente indutor da produção.

Tabela 1: Características físico-químicas da farinha de sementes de mangaba

	Farinha de sementes de mangaba (Este trabalho)	Literatura*
Umidade (%)	6,00	3,03
Proteínas (%)	10,25	11,4
Lipídios (%)	23,00	24,68
Acidez total (%)	8,54	-
Cinzas (%)	2,09	2,13
Carboidratos (%)	58,66	60,89
pH	5,82	-

*Vieira [15]

A farinha de sementes de mangaba tem demonstrado potencial para a obtenção de lipase microbiana tendo em vista que, durante as fermentações observou-se variações na produção da enzima ao longo do tempo, com valores de atividade enzimática que atingiu um máximo seguido de diminuição ou estabilidade (Tabela 2). Provavelmente a potencialidade deste resíduo para a produção de lipase está relacionada ao teor de lipídeos, o qual favorece a produção de enzimas lipolíticas e ao teor de carboidratos (58,66%), o qual serve de fonte de energia para o crescimento do microrganismo.

As atividades máximas obtidas nas fermentações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foram 243,72 U/g seca em 144 h; 402,00 U/g seca em 216h; 37,00 U/g seca em 216h; 119,10 U/g seca em 144h; 80,00 U/g seca em 120h; 213,00 U/g seca em 144h; 286,67 U/g seca em 120h; 43,24 U/g seca em 120h; 130,23 U/g seca em 168h; 160 U/g seca em 216h e 145,45 U/g seca em 240h respectivamente (Tabela 2). A máxima produção de lipase foi obtida quando utilizado farinha contendo 30% de umidade inicial e temperatura de fermentação de 40°C (ensaio 2).

Não há relatos na literatura de fermentação em estado sólido de farinha de sementes de mangaba para a produção de lipase microbiana. Em comparação à fermentação de outros resíduos, os resultados obtidos neste trabalho foram maiores do que os encontrados por Kamini et al.[16], Colla et al.[17], Mahadik et al.[18] e Edwinoliver et al.[19], os quais fermentaram com *Aspergillus sp.* torta de amendoim, farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, uma mistura de farelo de soja e casca de arroz, torta de sésamo, farelo de trigo e farelo de trigo e obtiveram máxima atividade hidrolítica de 10,2; 35,4; 5,0; 25,7; 169,0; 198,3 e 340,0 U/g seca, respectivamente.

Tabela 2: Cinética de produção de lipase nas fermentações da farinha de sementes de mangaba utilizando o microrganismo *Aspergillus niger*.

Atividade Hidrolítica (U/g seca)												
Tempo de Fermentação (horas)												
EXP	T	U	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
1	30°C	30%	39,57	169,84	83,93	165,75	156,61	243,72	99,63	116,47	229,93	193,43
2	40°C	30%	64,45	66,36	157,65	-	161,47	120,68	241,09	321,83	402,00	399,53
3	30°C	60%	15,72	13,30	37,00	11,40	17,21	18,35	19,94	18,53	-	-
4	40°C	60%	23,99	14,58	15,94	14,90	15,95	119,10	80,36	48,11	30,15	-
5	28°C	45%	34,02	52,17	45,45	47,06	80,00	58,83	61,69	77,11	48,94	-
6	42°C	45%	27,27	47,64	11,65	110,33	83,33	213,33	109,09	67,60	-	-
7	35°C	24%	34,04	76,19	140,44	217,39	286,67	124,71	183,24	138,59	127,84	-
8	35°C	66%	22,47	19,67	16	29,09	43,24	23,08	33,33	33,33	-	-
9	35°C	45%	40	34,28	45,71	41,56	70	43,64	130,23	32,88	23,88	-

T : temperatura de fermentação; U= umidade inicial da farinha

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado a influência da temperatura e da umidade na produção de lipase *Aspergillus niger* através da fermentação de farinha de sementes de mangaba. A maior produção de lipase (402 U/g) foi obtida quando utilizado 30% de umidade de substrato e temperatura de 40°C. Através deste trabalho foi desenvolvido um processo fermentativo de obtenção de lipase de *Aspergillus niger* a partir de sementes de mangaba, comumente tratadas como resíduo proveniente do processamento de polpas de frutas.

-
1. DEMIR, B. S.; TUKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64: 123-128 (2010).
 2. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipase. *Biotechnology Advances* 19: 627-662 (2001).
 3. HASSAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251 (2006).
 4. SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18 (2009).
 5. PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:81-84 (2003).
 6. COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- a review. *Journal of Food Engineering* 76: 291-302 (2006).
 7. PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I.O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management and Innovation* 2: 118-127 (2007).
 8. ABUD, A.K.S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha do resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. *Brazilian Journal of Food Technology* 12:4: 257-265 (2009).
 9. DAMIANI, C.; VILAS BOAS, E.V.B.; SOARES JÚNIOR, M.; CALIARI, M.; PAULA, M.L.; PEREIRA, D.E.P.; SILVA, A.G.M. Análise física, sensorial e microbiológica de geléias de manga formuladas com diferentes níveis de cascas em substituição à casca. *Ciência Rural* 38:1418-1423 (2008).
 10. LOUSADA JUNIOR, COSTA, J.M.C.; NEIVA, J.N.M.; RODRIGUEZ, N.M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica* 37:70-76 (2006).
 11. VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C.S.; ESPOSITO, E.; NINOW, J.L. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152:74-87 (2009).
 12. NOVAKI, L.; HASAN, S.D.M.; KADOWAKI, M.K.; ANDRADE, D. Produção de invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. *Engevis* 12:131-140 (2010).
 13. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Inst. Adolfo Lutz. 4ª Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018f.
 14. SOARES, C.M.F.; CASTRO, H.F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 77/79:745-758 (1999).
 15. VIEIRA, G.S. *Desenvolvimento e Caracterização de Barras de Cereais com Mangaba*. Trabalho de conclusão de curso de engenharia de alimentos da Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2007.
 16. KAMINI, N. R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry* 33: 505-511 (1998).
 17. COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid substrate process. *Bioresource Technology* 101: 8308-8314 (2010).
 18. MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 38: 715-721 (2002).
 19. EDWINOLIVER, N.G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R.B.; GOWTHAMAN, M.K.; KAMBE, T.N.; KAMINI, N.R. Scale-up of a novel of a tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. *Bioresource Technology* 101: 6791-6796 (2010).