



## Método para produção de lipase por fungo do gênero *Aspergillus sp.* usando óleo de coco

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

### Introdução

As lipases (triacilgliceroléster hidrolases, EC 3.1.1.3), correspondem a um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. Em meios com baixa concentração de água as lipases catalisam reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Esta ampla gama de reações catalisadas por essas enzimas faz com que sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores com grande potencial biotecnológico [1, 2].

Inicialmente, as lipases eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas em humanos com a finalidade de auxiliar na digestão. Atualmente, estas enzimas podem ser obtidas a partir de células de tecidos animais, vegetais ou produzidas por microrganismos [3, 4].

As lipases microbianas são de grande importância na indústria, pois além de apresentarem procedimento mais simples de obtenção, a partir de processos fermentativos, que permite o controle das condições de cultivo e maior eficiência na produção, possibilita a utilização em escala industrial com baixos custos, o que é difícil de obter com lipases advindas de outras fontes [5].

Várias espécies de microrganismos possuem a habilidade de produzir lipase, os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores [6]. As espécies de fungos filamentosos maiores produtoras de lipase são pertencentes aos gêneros *Aspergillus Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* [7]. Neste contexto este estudo tem como objetivo avaliar a capacidade do óleo de coco induzir a produção de lipase extracelular por um fungo do gênero *Aspergillus sp.* selvagem.

### 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, incubados durante 3 dias a 30 °C. Após este período a lâmina com as hifas aderidas foi retirada e coradas 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 7-10 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 coco, 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 sete. 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 usada 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 por espectrofotômetro a 410 nm no modo cinético. 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].



## Resultados

O fungo isolado foi inoculado em microcultivo para sua identificação morfológica, após três dias de cultivo o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus sp* (Fig. 1). A atividade enzimática máxima foi de 58,98 U/L após 120 horas de cultivo em meio líquido contendo óleo de coco (Fig. 2).

## Discussão

Oliveira [7] avaliou a capacidade lipolítica de diferentes microrganismos e teve como resultado que os fungos filamentosos são os melhores produtores de lipase, e o gênero *Aspergillus* pertence ao grupo de melhores produtores de lipase. Saxena *et al.* [10] também realizaram ensaios de indução de lipase por um fungo do gênero *Aspergillus carneus* em meio líquido contendo diferentes tipos de óleos como indutores, porém a atividade enzimática máxima foi obtida em meio suplementado com óleo de girassol.

## Conclusão

A espécie de *Aspergillus sp.* selecionada para este estudo foi capaz de produzir lipase quando cultivada em meio contendo óleo de coco como substrato. Assim podemos concluir que este óleo é eficiente na indução da síntese de lipase, e que o fungo isolado é um bom produtor da enzima.

## Agradecimentos

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

## Referências

- [1] JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. **Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipases hydrolyzation.** Journal of Hazardous Material, v. 137, p. 121-128, 2006.
- [2] PANDEY, A. **Lipases.** In: KEDEMI, A.; LEBLAC, D.; HOUD, A. Concise encyclopedia of Bioresource Technology, the Haworth press., New York; p. 552- 560, 2004.
- [3] KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. **Biotransformation with lipases.** In: REHM HJ, PIHLER G., STADLER A., KELLY P.J.W. (EDS). NEW YORK, v. 8, 37-192p, 1998.
- [4] CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, n. 1, 146-156p, 2004.
- [5] REED, G. **Enzymes in food processing.** 2. Ed. Wisconsin: Academic Press, 573p, 1975.
- [6] CARDENAS, F.; DE CASTRO, F.C; SANCHEZ-MONTERO, J. V.; SINISTERRA, M.; VALMASEDA, S. W.; ALVAREZ, E. **Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media.** Enzyme and Microbial Technology, v.28, p. 145-154, 2001.
- [7] OLIVEIRA, D. T. M. **Lipase extracelular de fungo filamentosos: isolamento e caracterização parciais.** Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000, p. 152 (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- [8] COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G; MORAES-SANTOS, T. **Isolation and screening of alkaline 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 biotransformation of castor bean waste and lipase production.** Enzyme and Microbial Technology, v. 44, p. 317-322, 2009.
- [10] R.K. Saxena, R.K.; Davidson, W.S.; Sheoran, A.B.G. **Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*.** Process Biochemistry, v. 39, 239 -247p, 2003.



# FÓRUM ENSINO • PESQUISA EXTENSÃO • GESTÃO FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

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

REALIZAÇÃO:



APOIO:



FAPEMIG

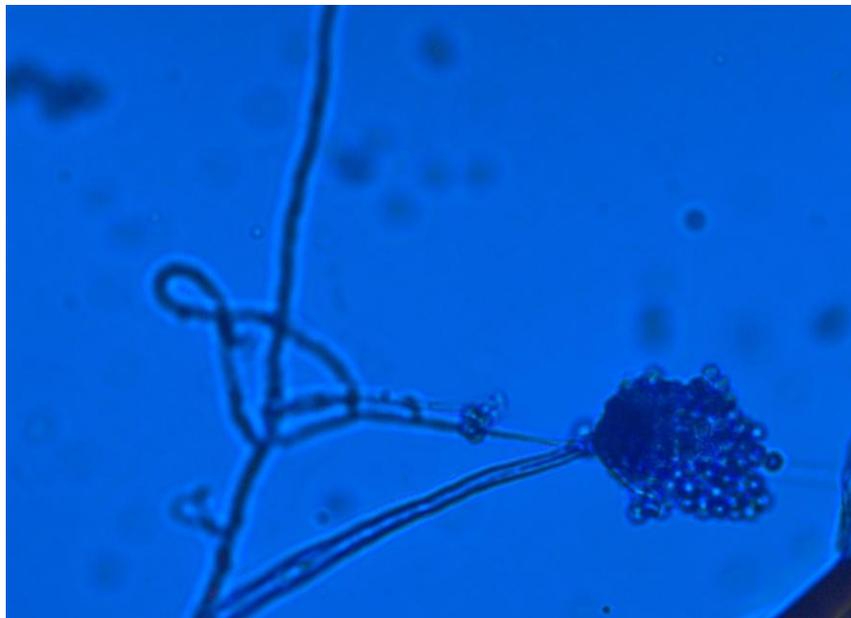


FADENOR

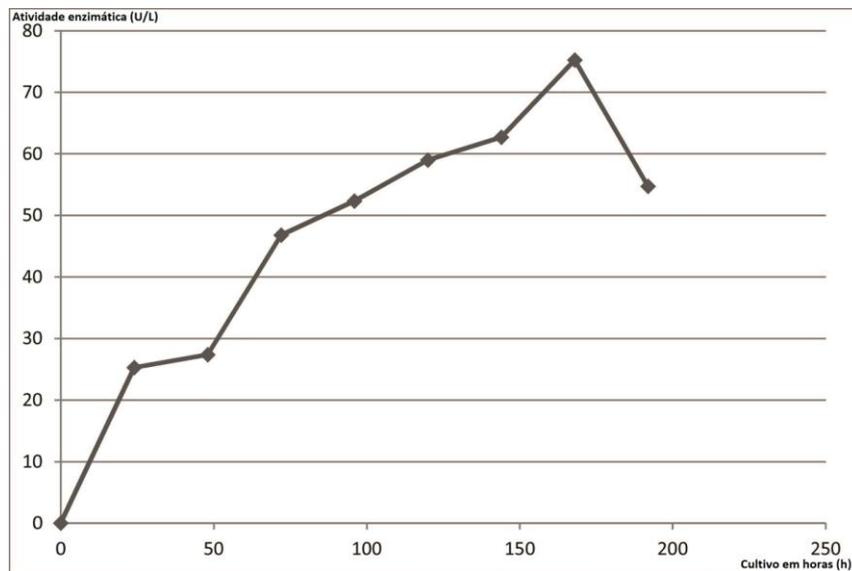
# 24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

[www.fepeg.unimontes.br](http://www.fepeg.unimontes.br)



**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 coco.