



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

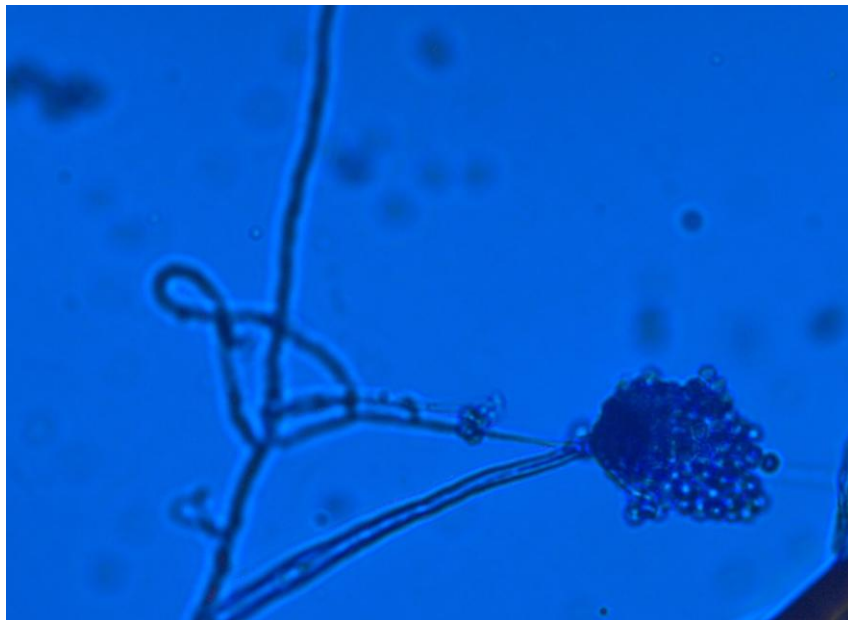


Figura 1. Foto do *Aspergillus sp.* em microcultivo (aumento de 1000X) escala 20mm.

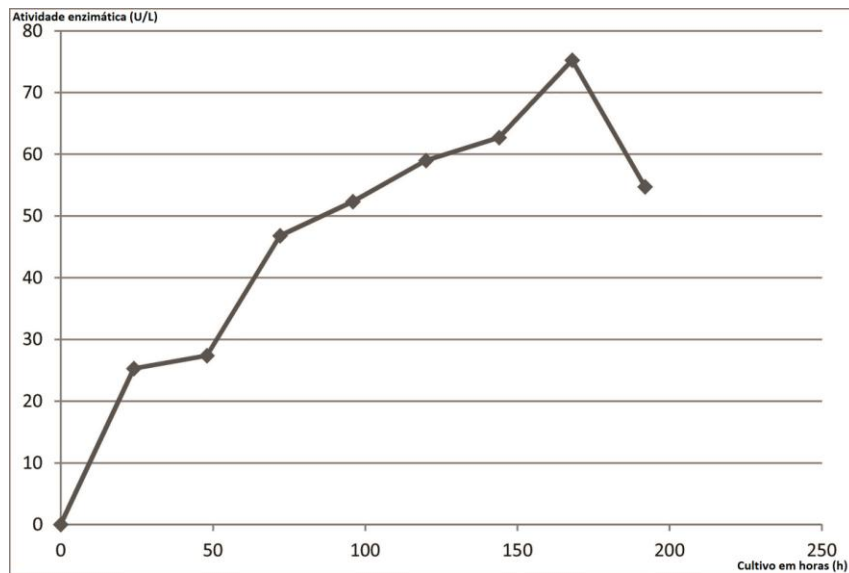


Figura 2. Atividade enzimática do *Aspergillus sp.* em 196 horas de cultivo submerso contendo óleo de coco.