



Método para produção de lipase por fungo do gênero *Aspergillus sp.* usando tributirina

Jéssica Simões Pereira, Amanda Souto Machado, 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 pelas lipases faz com que sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores com grande potencial biotecnológico [1, 2].

O fungos produtores de lipase mais importantes comercialmente pertencem aos gêneros: *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A crescente demanda por novas fontes de lipases com características enzimáticas diferentes estimulou a busca e o isolamento de novas cepas de fungos lipolíticos. Uma vez que, a produção de lipase pelos fungos filamentosos variam de acordo com a cepa, a composição do meio de crescimento e as condições de cultivo, como fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura. Assim, este estudo tem como objetivo analisar a síntese de lipase pelo fungo *Aspergillus sp.* quando cultivado em meio contendo tributirina como fonte de carbono [3, 4].

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 sete a dez 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 tributirina, 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 7,0. 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 filtração com auxílio de filtros de papel da marca *Whatman* número 1, e o filtrado da cultura foi usada para determinar a atividade enzimática. Os resultados foram expressos como a média de pelo menos três medições independentes [5]

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 em espectrofotômetro a 410 nm no modo cinética. 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 [6].



FÓRUM ENSINO · PESQUISA EXTENSÃO · GESTÃO FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

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



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Resultados

O fungo isolado foi plantado em microcultivo para sua identificação morfológica, após três dias de cultivo o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus sp.* (Fig. 1), que apresentou atividade enzimática máxima após 72 horas de cultivo em meio contendo tributirina, a atividade enzimática foi de 54,28 U/L (fig. 2).

Discussão

Estudo realizado por Sharma *et al.* [3] cita inúmeras cepas de fungos como boas produtoras de lipases, como: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. Em estudo realizado por Colen *et al.*[6] com o fungo *Colletotrichum gloesporioides*, foram testados diferentes substratos como indutores da síntese de lipase, a tributirina foi o substrato identificado como melhor indutor na síntese da enzima, apresentando uma taxa relativa de hidrólise de 132%.

Conclusão

A espécie de *Aspergillus sp.* selecionada foi capaz de produzir lipase em concentração acima do esperado quando cultivado em meio contendo tributirina. Então, o fungo isolado é um bom produtor de lipase e a tributirina um bom indutor da síntese 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, 121-128p, 2006.
- [2] PANDEY, A. **Lipases.** In: KEDEMI, A.; LEBLAC, D.; HOUD, A. Concise encyclopedia of Bioresource Technology, the Haworth press., New York; 552- 560p, 2004.
- [3] SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERGEE, V.C. **Production, purification, characterization and applications of lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, 627-662p., 2001.
- [4] CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. **Investigation of lipase producing by a new isolate of *Aspergillus sp.*** World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 20, 193-197p., 2004.
- [5] 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 biodegradation of castor bean waste and lipase production.** Enzyme and Microbial Technology, v. 44, 317-322p., 2009.
- [6] 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.

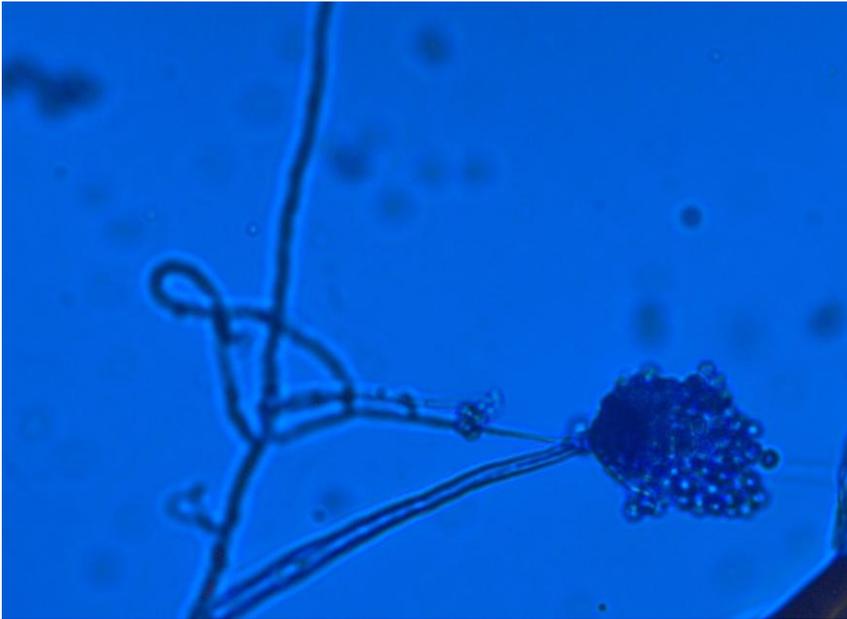


Figura 1. Foto do *Aspergillus sp.* em microcultivo (aumento de 1000X) escala 20mm.

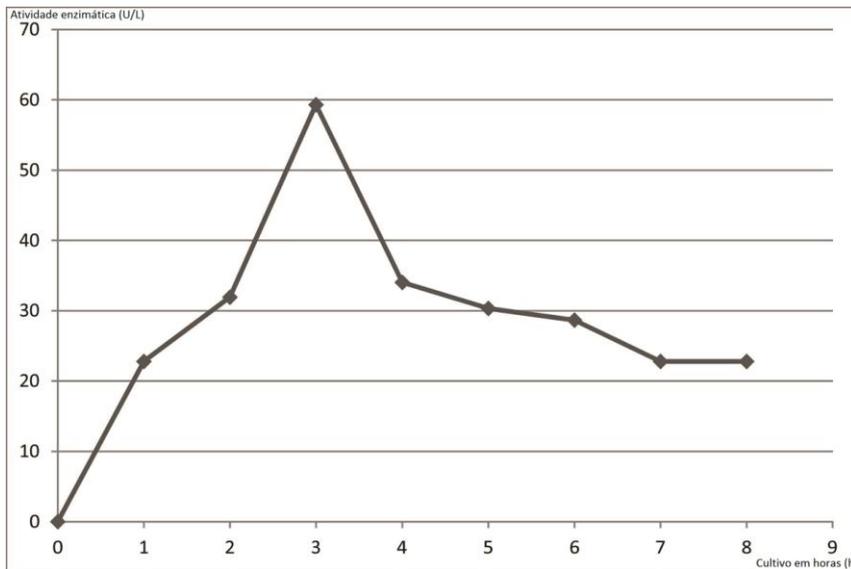


Figura 2. Atividade enzimática do *Aspergillus sp.* em 196 horas de cultivo submerso contendo tributirina.