



Produção de lipase extracelular por fungo do gênero *Aspergillus sp.* selvagem isolado no Norte de Minas Gerais

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

Introdução

As lipases (triacilgliceroléster hidrolases, EC 3.1.1.3), correspondem a um grupo de enzimas que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando a hidrólise de triglicérides 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].

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 [2].

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 [3].

Várias espécies de microrganismos possuem a habilidade de produzir lipase, os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores [4]. As espécies de fungos filamentosos maiores produtoras de lipase são pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* [4]. 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 em uma placa de petri, a qual foi 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 oliva, 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. Também foram testados como substratos o óleo de coco e a tributirina. 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 [6].

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 [7].

Resultados

O fungo isolado foi inculado em microcultivo para sua identificação morfológica, após três dias de cultivo o isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus sp.* (Fig. 1). Em relação a fermentação, quando o óleo de oliva foi usado como substrato indutor, a atividade enzimática máxima foi de 95,76 U/L após 120 horas de cultivo. No meio contendo óleo de coco a atividade máxima também foi obtida após 120 horas de cultivo, e foi de 58,98 U/L. Já no meio contendo tributirina a atividade máxima foi de 59,28 U/L após 72 horas de cultivo (Fig. 2).

Discussão

Vários microrganismos são capazes de produzir lipase, porém os fungos filamentosos são os melhores produtores desta enzima. Dentre os gêneros de fungos que mais se destacam como produtores de enzimas lipolíticas está o gênero *Aspergillus sp.* [4].

Iodita *et al.* [8] analisaram a capacidade lipolítica de alguns fungos quando cultivados em meio líquido contendo óleo de oliva como substrato indutor, duas espécies de *Aspergillus* se destacaram como bons produtores de lipase, o *Aspergillus oryzae* CPhI-20-9 que produziu 9,5 U/L e o *Aspergillus niger* CPhI-8-N-9 que produziu 7,6 U/L.

Entretanto, Saxena *et al.* [9] 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.

Estudo realizado por Colen *et al.* [10] com o *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 para este estudo se mostrou um bom produtor de enzimas lipolíticas, uma vez que, foi capaz de produzir lipase em meio líquido contendo três substratos indutores diferentes. O óleo de oliva se destacou como melhor indutor na síntese da enzima, apresentando uma atividade enzimática máxima maior do que o óleo de coco e a tributirina.

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 pres., 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 filamentosso: isolamento e caracterização parciais.** Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000, p. 152 (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- [8] IONITA, A.; MOSCOVICI, M.; POPA, A.; VAMANU, O.; Dinu, P. L. **Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 3, 147-151p, 1997.
- [9] 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.
- [10] 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.

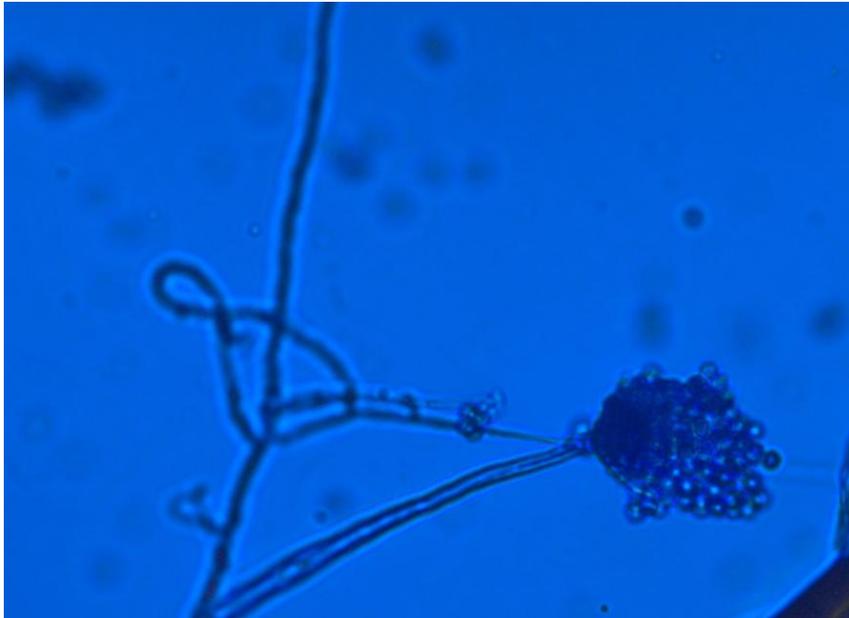


Figura 1. Foto do *Aspergillus sp.* em microcultivo (aumento de 1000X) escala 20mm.

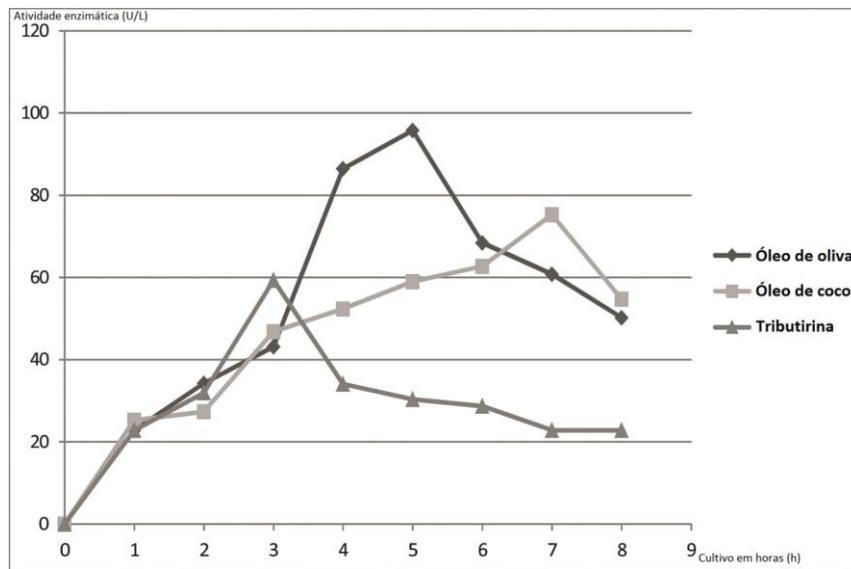


Figura 2. Atividade enzimática do *Aspergillus sp.* em 196 horas de cultivo submerso.