



IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS PRODUTORES DE LIPASE

Luana Dias Neves Ramalho (PIC/Uem), Luciana Pelissari Manin (PIC/Uem),
Rosane Marina Peralta (Co-orientadora), Gisele Cristina dos Santos
Bazanella (Orientadora), e-mail: gcsbazanella2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Departamento de
Engenharia de Alimentos/Maringá, PR.

Ciências Biológicas, microbiologia.

Palavras-chave: enzimas, *Aspergillus*, fungos.

Resumo

A lipase tem ampla aplicação na indústria de alimentos. Neste sentido, o presente trabalho verificou a capacidade de produção de lipase por três cepas fúngicas de *Aspergillus*, sendo elas: *A. niger*, *A. avamori* e *A. flavus*. Para isso foi feito um meio de crescimento para os fungos produzirem e secretarem ao meio externo a enzima. Depois de 13 dias de crescimento o micélio foi removido por filtração e o filtrado foi considerado extrato enzimático. Finalmente, foi medida a atividade lipolítica. Pode-se observar pelos resultados que todas as cepas estudadas produziram lipase.

Introdução

A lipase tem ampla aplicação industrial. Pode ser empregada, por exemplo, na produção de pães enriquecidos com fibras, visando a melhoria das características do produto, tais como maciez, textura e aumento da vida de prateleira (GANDRA et al., 2008), entre outras.

Somente as lipases microbianas são comercialmente utilizadas, elas constituem um importante grupo de enzima, pela sua versatilidade de propriedades e fácil produção em grande escala. O que a torna muito interessante a nível industrial (HASAN; SHAH; HAMMED, 2006).

Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi estudar a produção de lipase por *A. niger*, *A. avamori* e *A. flavus* em fermentação submersa.



Materiais e métodos

Manutenção dos fungos no laboratório

Os fungos foram mantidos em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose (BDA). Somente placas de no máximo 20 dias de vida foram utilizadas.

Meio de crescimento para produção de lipases

A produção da enzima foi estudada em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio mineral Vogel e diferentes óleos comerciais (óleo de oliva e óleo de soja) em 5% (m/v) como fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 28 °C num agitador rotativo a 120 rpm por 13 dias. Os micélios foram removidos por filtração e a atividade de lipase analisada foi do filtrado da cultura.

Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada através do método descrito por Pimentel et al. (1996). Inicialmente foram preparadas as soluções A e B, sendo 10 mL de p-nitrofenil palmitato dissolvido em isopropanol na concentração 3 mg/mL e 50 mL de tampão fosfato de sódio [0,1 M] pH 7 homogeneizado em 0,2 mL de Triton X-100 e 0,05 g de goma arábica, respectivamente. Uma parte da solução A e nove partes da solução B foram consideradas substrato de reação.

A primeira reação foi realizada em banho-maria a 37 °C, pela adição de 100 µL da amostra (diluída) em 900 µL de substrato. A mistura de reação foi encubada por 30 min na referida temperatura. Finalmente foram retirados os tubos, adicionado 2 mL de tetraborato de sódio (saturado) e, imediatamente, realizada a leitura da absorbância em 410 nm. O aparelho foi zerado com água destilada. Foi considerado branco a primeira reação, sem incubação por 30 min em banho-maria a 37 °C. A absorbância foi determinada descontando os valores das amostras dos valores dos brancos.

A atividade lipolítica foi determinada pela equação
$$U/ml = \frac{\text{Absorbância} * \text{fator} * 10 * \text{diluição}}{\text{tempo}}$$
. As análises foram realizadas em

duplicata. O fator de correção utilizado foi a partir da curva padrão de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto por mL de meio fermentado, nas condições do ensaio.



Análise estatística

Foi utilizado o programa *Statistic 8.0* para comparar as diferenças entre as amostras com 0,05% de significância. E comparados pelo teste de Tukey usando o mesmo software.

Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta as atividades lipolíticas dos extratos resultantes dos cultivos em fermentação submersa.

Tabela 1- Valores de atividade enzimática

Fungos	Lipase (U/ml)
<i>Aspergillus flavus</i> ¹	2,89 ^a ± 0,39
<i>Aspergillus flavus</i> ²	3,01 ^a ± 0,27
<i>Aspergillus avamori</i> ¹	3,26 ^a ± 0,12
<i>Aspergillus avamori</i> ²	3,02 ^a ± 0,26
<i>Aspergillus niger</i> ¹	3,28 ^a ± 0,22
<i>Aspergillus niger</i> ²	3,78 ^b ± 0,24

Dados: 1 - azeite e 2 - óleo. Letras iguais não apresentam diferença significativa entre as amostras a 95% de confiança.

Pode-se observar pela tabela 1 que houve produção de lipase, independente da espécie de fungo utilizada, inclusive não houve diferença significativa de produção enzimática, entre óleo ou azeite como fonte de carbono, com exceção do *A. niger* que apresentou maior produção da enzima para óleo de soja como fonte de carbono.

Os resultados também demonstram que houve diferença significativa de produção de lipase, apenas para o *A. niger* entre as espécies de *Aspergillus* estudadas, inclusive foi em sua utilização que se obteve a máxima produção da enzima, no caso, 3,78 U/mL.

Lima, Silva, Pinotti (2014) estudaram a produção de lipase por *Penicillium sp* e encontraram o valor máximo de 0,60 U/mL no azeite de oliva. Neste sentido, em comparação aos resultados dos referidos autores o presente trabalho obteve excelentes resultados de produção de lipase.

Entretanto, Penha et al (2014) apresentaram uma produção de 36,13 U/ml de lipase, utilizando *Aspergillus niger*. Comparando a produção de lipase



pelo mesmo fungo no presente trabalho, a produção não foi significativa, já que mostrou uma atividade da enzima bem abaixo do trabalho citado.

Conclusões

Conclui-se que são necessários mais estudos de condições de cultivo, com intuito de otimizar os tipos de processo. Com isso, visa maior produtividade, haja visto que comparados à outros autores houve bastante variação na produção de lipase.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá e ao laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade.

Referências

GANDRA, K.M.; DEL BIANCHI, M.; GODOY, V.P.; QUEIROZ, F.P.C.; STEEL, C.J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p.182-192, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
LIMA, R. C.; SILVA, H. N. L.; PINOTTI, L. M. Produção de lipases por *Penicillium sp.* In: X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica, 2014. **Anais: X COBEQ IC - Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Vassouras, RJ, 2014, p. 679-682.

PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SOUZA, E. F.; TERZI, S. C. Avaliação da estabilidade de lipases por *Aspergillus niger* 11T53A14 para aplicação na síntese de biodiesel em meio etanólico. In: XI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2014. **Anais: XI Enzitec - Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro, RJ, 2014, p.131-132.

PIMENTEL, M. C. B. et al. Lipase from a brasilian strain *Penicillium citrinum* culture in a sample and inexpensive médium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 185-195, 1996.