XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática
ENZITEC 2016

Caracterização das lipases obtidas por duas cepas de *Aspergillus niger*

Filipe do Carmo Aleixo de Sousa[2], Erika Fraga de Souza[1], Selma da Costa Terzi[1], Ana Iraidy Santa Brígida[1], Leda Maria Fortes Gottschalk[1], Edmar das Mêrces Penha[1]

[1] Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas 29501, 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: leda.fortes@embrapa.br
[2]Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Escola de Nutrição Av. Pasteur, 296, Urca - 22290-240 Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise parcial ou total de triacilglicerois produzindo ácidos graxos livres, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol. Este trabalho caracterizou a especificidade, a temperatura ótima e o pH ótimo das lipases obtidas por duas cepas de Aspergillus niger, sendo uma selvagem C e outra mutante 11T53A14. Os resultados mostram que os extratos enzimáticos apresentam especificidade diferentes, sendo a cepa selvagem mais específica para ácidos graxos de 8 carbonos e a cepa mutante inespecífica em relação ao tamanho do ácido graxo. As duas cepas apresentaram atividade em uma ampla faixa de pH, porém observou-se uma redução da atividade de mais de 50% em pH acima de 9,0. Em relação à temperatura, as lipases das duas cepas se mostraram mais ativas a 35°C.

Palavras-chave: *Aspergillus*; lipase; especificidade; temperatura; pH.

INTRODUÇÃO

As enzimas lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que podem hidrolisar a ligação de ésteres de glicerol em diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres e, ainda, atuam na reação síntese de ésteres através da reação de interesterificação. São enzimas aplicadas na indústria de alimentos, farmacêutica, de química fina, oleoquímica, biodiesel e detergentes (Guncheva & Zhuryakova, 2011; Pereira *et al*., 2001).

As lipases atuam na interface água-óleo, hidrolisando moléculas com ligações éster-carboxílicas e tendo como produto final da reação: ácidos e álcoois orgânicos. Entretanto em ambientes aquo-restritos, a reação de esterificação e/ou diversas reações de transesterificação também podem ocorrer. As enzimas lipolíticas quando imobilizadas em diferentes tipos de suporte possuem alguns benefícios para aplicações industriais como estabilidade térmica e ao pH, fácil recuperação, redução de inibição por produtos e, principalmente, possibilidade de operar em sistemas de modo contínuo, de modo que o custo de obtenção de um determinado produto seja reduzido (Freire & Castilho, 2008; Nelson & Cox 2002).

As características específicas de cada lipase, como especificidade, temperatura ótima e pH ótimo, direcionará a enzima para a sua aplicação final. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as lipases produzidas por duas cepas de *Aspergillus niger*, uma cepa mutante 11T53A14 e uma cepa selvagem denominada C.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram: a cepa *Aspergillus niger 11T53A14*, geneticamente modificada através de métodos clássicos e a cepa selvagem de *Aspergillus niger C*, isolada em amostras de margarina, ambas da Coleção de Microrganismos de Interesse da Indústria de Alimentos e Agroenergia, da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Produção de lipase por fermentação em estado sólido

Os extratos enzimáticos lipolíticos foram produzidos por fermentação em estado sólido pelos fungos *Aspergillus niger 11T53A14* pela cepa selvagem de *Aspergillus niger C*. Os experimentos foram conduzidos em bandejas, incubadas em câmara BOD a 32ºC por até 72 horas em meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono. A enzima foi extraída com adição de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) e o extrato enzimático bruto foi obtido após filtração com papel de filtro seguido de filtração em membrana de microfiltração para posterior determinação das atividades enzimáticas.

Avaliação da especificidade

Para avaliar a especificidade das enzimas produzidas por *A. niger* 11T53A14 e *A. niger* C, foi determinada a atividade pelo método espectrofotométrico, que consiste na hidrólise de diferentes substratos sintéticos de p-nitrofenil (palmitatos, lauratos, octanoatos, butiratos, acetatos) catalisadas por lipases, em produtos capazes de serem detectados espectrofotometricamente em 405-410 nm, pela formação do p-nitrofenol, um composto de cor amarelada (Stoytcheva et al., 2012). A especificidade foi determinada pela medida de atividade das lipases nos diferentes em substratos com diferentes tamanhos das cadeias carbônicas.

Avaliação da temperatura e pH ótimos

A avaliação da temperatura das enzimas produzidas pelos fungos *A. niger* 11T53A14 e *A. niger* C foi feita pela determinação da atividade pelo método titulométrico, que consiste na reação de hidrólise de um substrato de água e azeite de oliva (1:1) durante um período de 15 minutos, em seguida, titulação dos ácidos graxos livres liberados na reação com hidróxido de sódio em diferentes temperaturas. O pH foi avaliado pela determinação da atividade pelo método titulométrico utilizando diferentes tampões para variação do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos para a especificidade das duas lipases são apresentados na Figura 1. Para isso, considerou-se a maior atividade obtida como 100%, ou seja, maior afinidade pelo substrato utilizado. As outras atividades obtidas para os outros substratos foram calculadas proporcionalmente ao valor máximo.

As lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de TAG (Castro et al., 2004). Os resultados mostraram que a especificidade da enzima produzida por *A. niger* C produziu um extrato com alta especificidade para hidrólise de cadeias carboxílicas de 8 carbonos de ésteres de p-nitro-

fenil, apresentando menor atividade para 12 e 16 carbonos e atividade pouco expressiva para cadeia curta (2 e 4 carbonos). Já a cepa do fungo *A. niger* 11T53A14 produziu um extrato menos específico quando comparado à enzima produzida por *A. niger* C, mostrando que hidrolisa melhor ésteres com 12 e 16 carbonos.

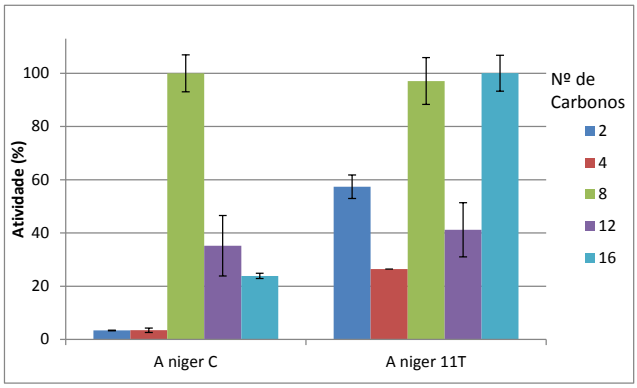

Figura 1: Especificidade de lipases produzidas pelas duas cepas de *A. niger* aclimatadas a 37ºC, utilizando como substrato os p-nitro-fenil de diferentes tamanhos.

A figura 2 apresenta as atividades das lipases produzidas por *A. niger* 11T53A14 e por *A. niger* C em diferentes valores de pH. Para a cepa *A. niger* 11T53A14, os melhores resultados obtidos foram em pH 6,0. Em pH 8,0 a lipase reduz 27% de sua atividade e em pH 9,0 a redução é de 51%, portanto, não é aconselhável a utilização dessa enzima em pH muito alcalino. Já para a lipase produzida pela cepa selvagem de *A. niger* C o melhor rendimento de atividade foi obtido em pH 5. Em pH 8,0 foi observado uma redução de 36% e em pH 9,0 uma redução de 62%. Os resultados obtidos para os dois extratos estudados mostraram que além do pH utilizado, o tipo de tampão utilizado na reação também pode afetar a atividade enzimática.

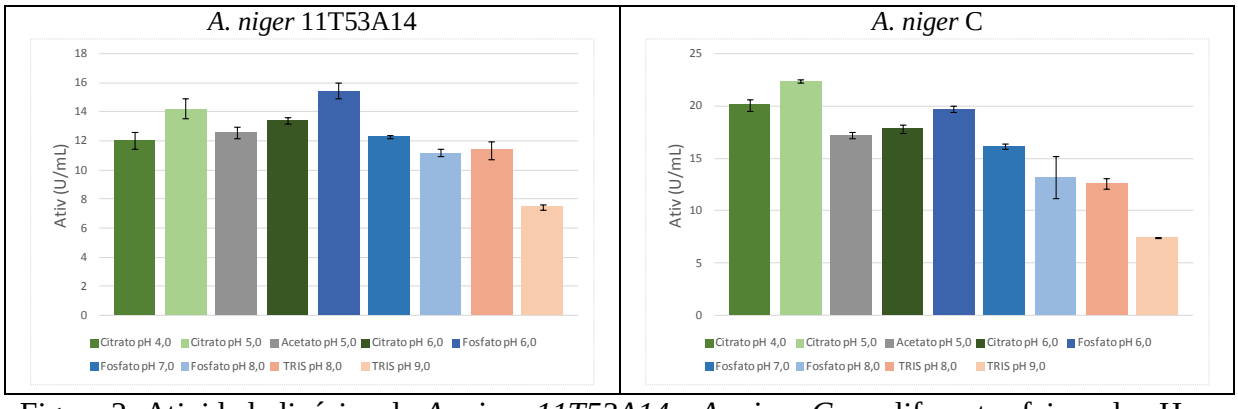

Figura 2: Atividade lipásica do *A. niger 11T53A14 e A. niger C* em diferentes faixas de pH.

Em relação à temperatura ótima, os melhores resultados de atividade lipásica foram obtidos a 35ºC para ambas as cepas avaliadas, como mostra a Figura 3, indicando que essas enzimas atuam melhor em condições brandas de temperatura. Para a enzima de *A. niger* C, a redução da atividade em 25ºC foi de apenas 5% e em 45ºC a redução de atividade foi de 14%. Já a lipase produzida pela cepa de *A. niger* 11T53A14, mostrou redução da atividade de 18%

em 25ºC e de 29% em 45ºC. Logo a lipase produzida pelo *A. niger* C apresentou atividade elevada em uma maior faixa de temperatura quando comparada a lipase do *A. niger* 11T53A14.

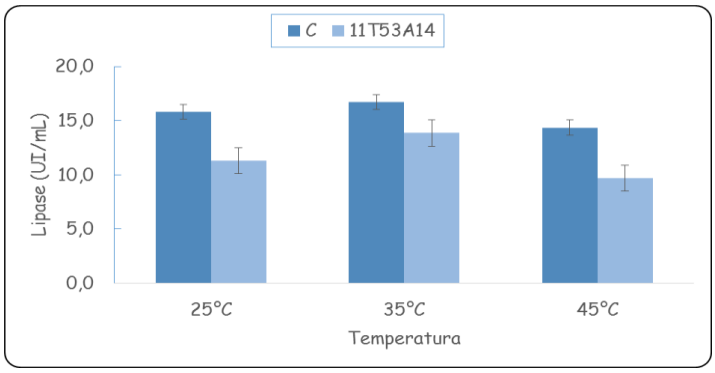

Figura 3: Atividade lipásica de duas cepas de *A. niger* em diferentes temperaturas.

CONCLUSÕES

O conhecimento das condições ótimas da aplicação das lipases e as diferenças e similaridades entre os extratos enzimáticos lipásicos produzidos pelas duas cepas do fungo *A. niger* permitem um melhor aproveitamento das enzimas em diversos processos industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castro HF, Mendes AA, Santos JC. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química Nova 27(1): 146-156.

Freire DMG; Castilho LR. Lipases em Biocatálise. in: BON, E.P.S et al. Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. 1 ed. Rio de Janeiro, 2008. Cap 7, p. 153-173.

Guncheva M, Zhiryakova D. 2011. Catalytic properties and potential applications of Bacillus lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 68: 1-21.

Nelson DL, Cox MM. Enzimas. In: Lehninger Princípios de bioquimica. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. Cap. 8, p.189-222

Pereira EB, Castro HF, Moraes FF, Zanin GM. 2001. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 91-93: 739-752.

Stoytcheva M, Montero G, Zlatev R, Leon JA, Gochev V. 2012. Analytical Methods for Lipases Activity Determination: A Review. Current Analytical Chemistry 8 (3), 400-407.