



Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase Intracelular

Grazielle dos Santos Silva¹, Laura Maria Bruno², Heizir Ferreira de Castro¹

¹Escola de Engenharia de Lorena – Depto. de Engenharia Química
Caixa Postal 116 – 12.602-810 Lorena – SP - E-mail: grazielle@debiq.eel.usp.br

²Embrapa Agroindústria Tropical – Laboratório de Microbiologia de Alimentos,
CEP: 60511-110 – Fortaleza - CE - Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar linhagens de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular a partir de linhagens disponíveis em banco de cultura no país. Foram testados 5 isolados, provenientes de diferentes habitats, e depositados em banco de Cultura da UFPE. Os fungos Rhizopus oryzae e Pencillium citrinum, que apresentaram elevada atividade lipolítica no micélio da ordem de 20,98 e 30,92 U/g e baixa atividade no filtrado (< 7,0 U/mL), foram selecionados para experimentos posteriores, nos quais foi verificada a adequação de diferentes suportes para imobilização do micélio. Entre os suportes testados: esponja de poliuretano, Polihidroxibutirato (PHB) e Celite, o melhor desempenho foi obtido com a utilização de esponja de poliuretano utilizando o fungo R. oryzae, pois o derivado imobilizado apresentou estabilidade à agitação, boa aderência e atividade lipolítica de 69,36U/g.

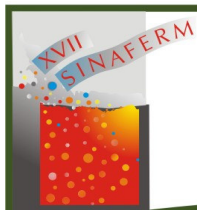
Palavras-chave: fungos, lipase, biomassa, imobilização.

INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra e ligações ésteres de acil gliceróis. Elas não requerem cofatores, são regioespecíficas e atuam em uma larga faixa de pH (Essamri *et al.*, 1998).

A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triglicerídeos, entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases são capazes de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), entre outras (Freire e Castilho, 2000).

As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e micro-organismos. As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo, são geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. Nesse aspecto, os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (Cardenas *et al.*, 2001).



A produção de lipase por fungos filamentosos é influenciada por uma variedade de fatores ambientais. Além disso, as respostas aos fatores ambientais são também diferentes entre as cepas fúngicas sendo que, para uma determinada cepa o mesmo fator pode estimular a produção, mas para outra pode não afetar, ou até mesmo inibir a produção de lipase (Colen, 2006).

No mundo ocidental a produção de lipases fúngicas em escala industrial tem sido realizada pelo cultivo em meio de cultura líquido (fermentação submersa) como processo majoritário, provavelmente por ser tecnologicamente fácil de executar e controlar bem como apresentar rendimentos de produção considerados satisfatórios (Colen, 2006). Entretanto, essas lipases são em sua maioria extracelulares, o que requer etapas posteriores de separação, purificação e imobilização em um suporte, por processos complexos para uso prático, gerando lipases instáveis e de custo elevado (Ban *et al.*, 2002).

Nesse contexto, lipases intracelulares vem despertando o interesse pelo seu potencial de uso na biotecnologia, principalmente devido a sua disponibilidade e estabilidade. Entretanto, são poucos os artigos publicados sobre a produção de lipases intracelulares com alta atividade lipolítica e sua aplicação em reações de esterificação e transesterificação. Alguns poucos trabalhos descrevem a produção de lipase intracelular a partir dos fungos do gênero *Rhizopus* (Ban *et al.*, 2001; Tamalampudi *et al.*, 2008) para a produção de biodiesel e *Mucor* (Antczak *et al.*, 2004; Antczak *et al.*, 2002) utilizado na síntese de ésteres. Esses poucos trabalhos descrevem que a viabilidade econômica do processo encontra-se na imobilização dessas células íntegras, ou seja, a imobilização do micélio contendo a lipase intracelular em um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao fungo.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo selecionar diferentes cepas selvagens de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular, para a realização de testes de imobilização em diferentes suportes, visando sua aplicação em posteriores reações de transesterificação de óleos vegetais.

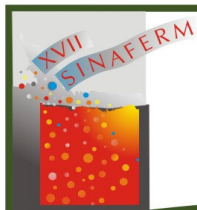
MATERIAL E MÉTODOS

1. Micro-organismos e manutenção das culturas

Foram utilizadas linhagens adquiridas da coleção de culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia (CCB/UFPE), conforme listado na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de fungos filamentosos adquiridos do Departamento de Micologia da UFPE.

Espécie	Informações
<i>Rhizopus oryzae</i> 3231	Isolado de castanha-do-Pará
<i>Mucor circinelloides</i> 4140	Isolado de fezes de bizão
<i>Mucor hiemalis</i> 4144	Isolado de fezes de cavalo
<i>Mucor piriformis</i> 4145	Isolado de fezes de cavalo
<i>Penicillium citrinum</i> 4216	Isolado de óleo de oliva



Os fungos, mantidos sob refrigeração a 4°C em meio BDA (Batata Dextrose Agar), foram repicados a cada dois meses em BDA inclinado, e incubados a 30°C por 7 dias, sendo em seguida, conservados em geladeira a 4°C.

2. Meio de cultivo

Os fungos foram cultivados em meio de cultura sintético líquido composto por óleo de oliva 30g/L, peptona 70g/L, NaNO₃ 1g/L, KH₂PO₄ 1g/L e MgSO₄.7H₂O 0,5g/L, autoclavados (121°C/15 minutos) separadamente.

3. Condições de cultivo

Um inóculo de 10⁶ esporos de cada fungo foi transferido assepticamente para Erlenmeyers de 250 mL, contendo volume final de meio de cultura de 100 mL. Em seguida, os frascos foram incubados por 72 h a 35°C sob agitação (130 rpm).

4. Suportes de imobilização

Três suportes com diferentes características foram utilizados: esponja de poliuretano (cubo 6 X 6 mm), Polihidroxibutirato (PHB) e Celite Bio-Catalyst Carrier R-630 (Manville).

5. Imobilização da biomassa

Para a imobilização da biomassa, os cubos de poliuretano foram adicionados juntamente com o meio de cultura e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito em 3. A imobilização da biomassa em Celite e PHB foi realizada após o crescimento das cepas no meio de cultura, sendo ambos os suportes adicionados ao final do cultivo.

6. Separação e recuperação do micélio

Amostras foram retiradas em intervalos de 24 h e o micélio foi separado do caldo fermentativo por meio de filtração à vácuo. Tanto no micélio como no filtrado foi determinada a atividade lipolítica. A umidade no micélio foi determinada em balança com lâmpada de infra-vermelho (Marte, Modelo ID 50)

7. Determinação da atividade lipolítica

A atividade enzimática da biomassa, filtrado e células imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares *et al.* (1999). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmoles/g.min (U/g).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. Seleção dos fungos produtores de lipase intracelular

A etapa inicial do trabalho consistiu em selecionar diferentes linhagens de fungos filamentosos selvagens que produzissem lipase intracelular. Os perfis de biomassa seca de micélio, atividade no filtrado e na biomassa ao longo do tempo de cultivo estão mostrados nas Figuras 1 a 3. Os dados da Figura 1 indicam que o fungo *M. circinelloides* foi o mais eficiente em termos de produção de biomassa fúngica, atingindo um valor de 5,3 g de massa seca de micélio em 72 h de cultivo. Os fungos *M. piriformis*, *M. hiemalis* e *P. citrinum* não

produziram biomassa até o tempo de 24 h, sendo a linhagem *M. piriformis* o micro-organismo que obteve menor crescimento ao longo do tempo de cultivo (72 h), com massa seca de 1,65g.

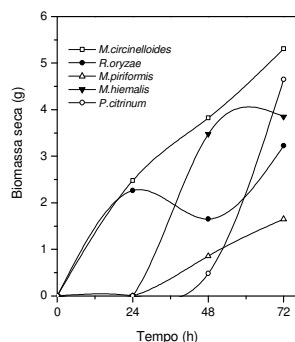


Figura 1. Produção de biomassa em função do tempo de fermentação.

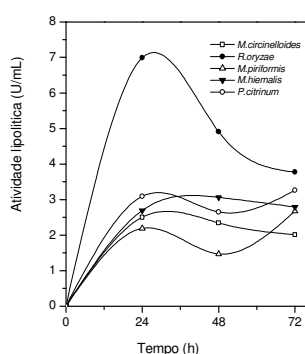


Figura 2. Atividade lipolítica quantificada no filtrado

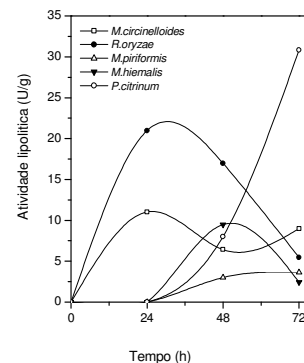


Figura 3. Atividade lipolítica quantificada na biomassa celular

As Figuras 2 e 3 demonstram que de maneira geral, a atividade lipolítica obtida no filtrado foi bem menor que a atividade obtida no micélio para todos as linhagens testadas, sugerindo que a maior parte da lipase produzida se encontra no micélio, ou aderida a ele. Os dados sumarizados na Tabela 2 indicam o tempo de cultivo no qual foram obtidos os valores máximos de atividades no filtrado e na biomassa para cada fungo, bem como a relação entre atividade na biomassa (intracelular) e atividade no filtrado (extracelular).

Tabela 2. Valores máximos de atividade no filtrado e na biomassa em seus respectivos tempos de cultivo para cada fungo.

Espécie	Tempo (h)	Biomassa seca (g)	Atividade filtrado (U/mL)	Atividade biomassa (U/g)	Relação atividade biomassa /filtrado
<i>R. oryzae</i>	24	2,26	6,99	20,98	3,0
<i>M. circinelloides</i>	24	2,47	2,50	11,03	4,4
<i>M. hiemalis</i>	48	3,47	3,06	9,49	3,1
<i>M. piriformis</i>	72	1,65	2,67	3,65	1,4
<i>P. citrinum</i>	72	4,65	3,26	30,82	9,5

Com relação a atividade lipolítica na biomassa celular, a atividade mais elevada foi obtida com o cultivo do *P. citrinum* (30,82 U/g) em 72 h, seguida da linhagem de *R. oryzae* com valor de 20,98 U/g em 24 h. No caso específico da linhagem *R. oryzae*, verifica-se um decréscimo acentuado na atividade de lipase após 24h, que pode ter ocorrido pelo consumo da fonte de carbono (azeite de oliva) para o crescimento. A menor relação entre atividade lipolítica na biomassa e no filtrado foi obtida pelo fungo *M. piriformis* (1,4) e maior relação pelo fungo *P. citrinum* (9,5). Com base nos dados listados na Tabela 2, selecionou-se as

linhagens dos fungos *R. oryzae* e *P. citrinum* como os mais promissores para produção de lipase intracelular.

2. Imobilização das cepas de *R. oryzae* e *P. citrinum*

Testes posteriores foram efetuados para selecionar o suporte adequado para imobilização das linhagens mais promissoras. A imobilização em Celite e PHB foi realizada após o cultivo de 24 horas para *R. oryzae* e de 72h para *P. citrinum*, tempos nos quais foram obtidas as atividades mais elevadas na biomassa fúngica. Os resultados em termos de retenção de atividade no suporte e atividade residual no filtrado estão ilustrados nas Figuras 4 e 5.

A Figura 4 revela que as atividades lipolíticas obtidas no filtrado apresentam valores similares aos obtidos no cultivo sem adição do suporte, o que sugere que não houve incorporação das atividades extracelulares de lipase no suporte.

Entre os três suportes testados apenas Celite não foi efetivo para imobilização das biomassas fúngicas, apresentando uma baixa retenção de atividade no suporte, provavelmente devido a configuração desse suporte em forma de pequenas esferas. Tanto a esponja de poliuretano como o PHB apresentaram uma satisfatória aderência para ambos os fungos, entretanto a esponja de poliuretano foi mais eficiente alcançando uma retenção de atividade lipolítica entre 30 a 70 U/g (Figura 5).

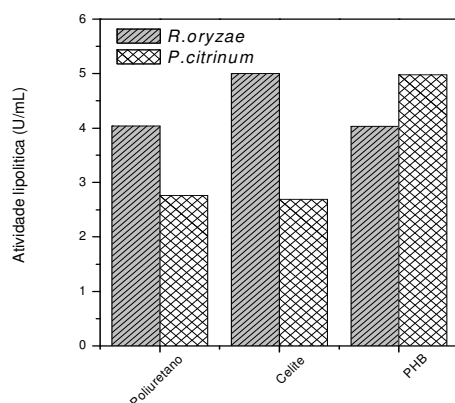


Figura 4. Atividade lipolítica obtida no filtrado.

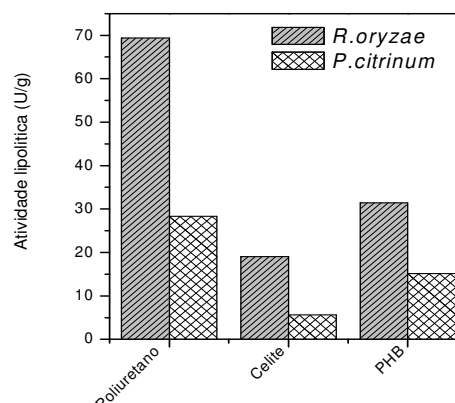
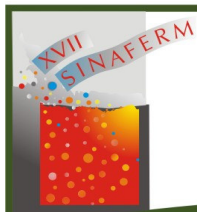


Figura 5. Atividade lipolítica obtida no derivado imobilizado.

CONCLUSÕES

Dentre as diferentes cepas testadas, os fungos *Rhizopus oryzae* e *Penicillium citrinum* apresentaram atividades lipolíticas mais elevadas após 24 e 72 h de cultivo, respectivamente. A imobilização da biomassa fúngica de ambos os fungos foi alcançada com sucesso empregando como suporte esponjas de poliuretano. Experimentos adicionais estão em fase de desenvolvimento visando testar o potencial da utilização de células produtoras de lipase intracelular, imobilizadas em poliuretano, em reações de transesterificação e esterificação, em particular, para a produção de biodiesel a partir de fontes renováveis.



AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antczak, M. S.; Antczak, T.; Rzycka, M.; Bielecki, S. (2002) Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p. 261-268.

Antczak, M. S.; Antczak, T.; Rzycka, M.; Modrezejewska, Z.; Patura, J.; Kalinowska, H.; Bielecki, S. (2004), Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, p. 163-171.

Ban, K.; Hama, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. (2001), Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 8, p. 39-43.

Ban, K.; Hama, S.; Nishizuka, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Noda, H.; Fukuda, H. (2002), Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, p. 157-165.

Cardenas, F.; Castro, M. S.; Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Valmaseda, M.; Elson, S. W.; Alvarez, E. (2001), Novel Microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme Microbial Technologies*, v. 28, p. 145-154.

Colen, G. (2006), Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Essamri, V.; Deyris, V.; Comeau, L. (1998), Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Journal of Biotechnology*, v. 60, p. 97-103.

Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. (2000), Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 81, p.48-56.

Soares, C. M. F.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M (1999), Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77/79, p. 745-757.

Tamalanpudi, S.; Talukder, M. R.; Hama, S.; Numata, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. (2008), Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*.v. 39, p. 185-189.