

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPASE DE *ASPERGILLUS NIGER* VISANDO SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE LIPASE *ASPERGILLUS NIGER* AIMING ITS APPLICATION IN FOOD

Lívia Nolasco Macedo MURUCI¹, Regiane Ribeiro dos SANTOS¹, Sonia COURI², Edmar das Mercês PENHA³, Mônica Caramex Triches DAMASO⁴.

1 Estudantes de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

2 Professora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

3 Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ

4 Pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Brasília-DF

Palavras-chave: lipase, fungo filamentososo, óleos

Introdução

Lipases são enzimas pertencentes à família das hidrolases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) que tem como função biológica primordial catalisar a hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (JAEGER, 1998). As lipases possuem inúmeras aplicações: podem ser utilizadas na modificação de óleos e gorduras, na formulação de detergentes, na indústria farmacêutica, na fabricação de alimentos, na produção de biodiesel, nos curtumes, no tratamento de efluentes, dentre outras aplicações (CASTRO, et al., 2004; SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). No entanto, as enzimas devem apresentar características cinéticas adequadas ao processo industrial no qual será aplicada. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar as características físico-químicas de lipase de *Aspergillus niger* quanto a termoestabilidade, estabilidade ao pH, estabilidade a estocagem e especificidade ao substrato.

Material e Métodos

A produção de lipase de *A. niger* foi realizada em fermentação semi-sólida em colunas aeradas, incubadas a 32°C por 48 horas. Após a extração enzimática, foi realizada a concentração por precipitação com sulfato de amônio a 90%. Para a avaliação do efeito da termoestabilidade, a enzima foi incubada a 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. Em intervalos de 2h, 4h, 6h, 24h e 30h, alíquotas foram retiradas e a atividade residual foi mensurada conforme a metodologia descrita por Pereira et al. (2001). Para a avaliação do efeito do pH, o extrato foi diluído em 1:2 com diferentes tampões: citrato de sódio a pH 3,0; 4,0 e 5,0 e tampão fosfato de sódio a pH 6,0; 7,0 e 8,0 e posteriormente, incubado à 20°C. Em intervalos de 2, 4, 6, 24 e 30 horas, a atividade foi mensurada. Para avaliar a estabilidade a estocagem, o extrato enzimático foi mantido em geladeira a 5°C e em freezer a -18°C, por 150 dias. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 3, 6, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias, e análises de atividade residual da lipase foram realizadas. Foram obtidos no comércio local três óleos com características distintas, a saber: óleo de oliva extra-virgem Borges®, óleo de girassol Liza® e óleo de coco extra-virgem Copra®. Os óleos foram caracterizados quanto à composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa (HARTMAN e LAGO 1973) e posteriormente foi realizado o teste de especificidade com o extrato enzimático liofilizado. O intuito de concentrar a enzima por liofilização foi aumentar a sua atividade e poder elucidar a eficiência da hidrólise enzimática frente aos óleos de diferentes características.

Resultados e Discussão

A termoestabilidade é uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura (JAEGER e REETZ, 1998). Os resultados obtidos da termoestabilidade de *A. niger* podem ser observados na Figura 1.

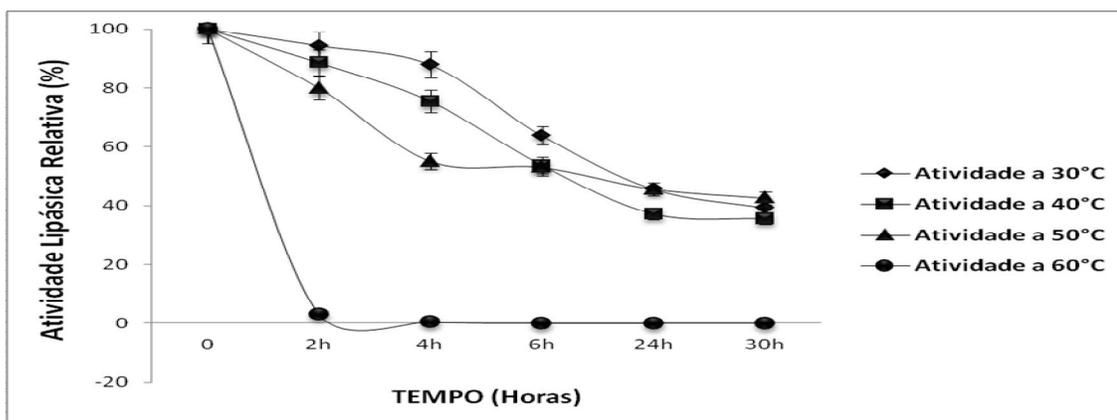


Figura 1. Termoestabilidade da lipase de *A. niger*.

A lipase de *A. niger* apresentou perfis semelhantes nas temperaturas de 30, 40 e 50°C, embora na maior temperatura tenha ocorrido uma perda de atividade mais pronunciada nas primeiras 4 horas de incubação. A atividade residual após 30 h de incubação nas referidas temperaturas foi de cerca de 40%. Na temperatura de 60°C a enzima perdeu 97% de sua atividade, portanto, verificou-se que temperaturas acima de 50°C causam uma inativação mais rápida da lipase. Dantas e Aquino (2010) relataram que a lipase bruta de *A. niger* obtida por FES obteve a maior atividade em temperatura de 30°C após 60 minutos de reação de hidrólise. Ülker e Karaoglu (2012) estudaram a termoestabilidade de lipase purificada de *Mucor hiemalis* f. *Corticola* em temperaturas de 30 a 80°C e observaram que a enzima reteve 50% de atividade a 50°C por até 90 minutos de incubação.

Os resultados obtidos durante a avaliação da estabilidade da lipase ao pH estão apresentados na Figura 2.

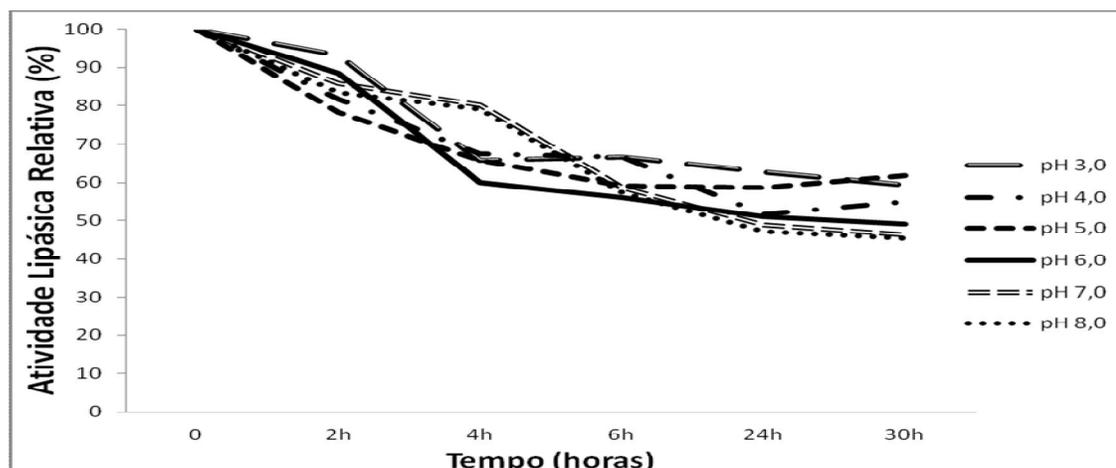


Figura 2. Estabilidade da lipase de *A. niger* ao pH a 20°C

A lipase de *A. niger* manteve 62% da atividade inicial em 30 horas de incubação em tampão citrato de sódio pH 5,0. Pôde-se observar que os perfis foram bastante semelhantes para todos os valores de pH testados, principalmente, a partir de 6 horas de incubação. Contudo, em até 30 horas a enzima apresentou estabilidade um pouco maior em valores de

pH ácido: pH 3,0 (59%); pH 4,0 (55%) e pH 5,0 (62%). Uma etapa importante para se avaliar a capacidade da enzima manter sua atividade intacta ao longo do tempo, consiste na estabilidade a estocagem. Este fator torna-se fundamental quando se deseja utilizar esta enzima em escala industrial.

Os resultados encontrados para a estabilidade da atividade lipásica sob armazenamento em geladeira (cerca de 5°C) durante 150 dias estão apresentados na Figura 3.

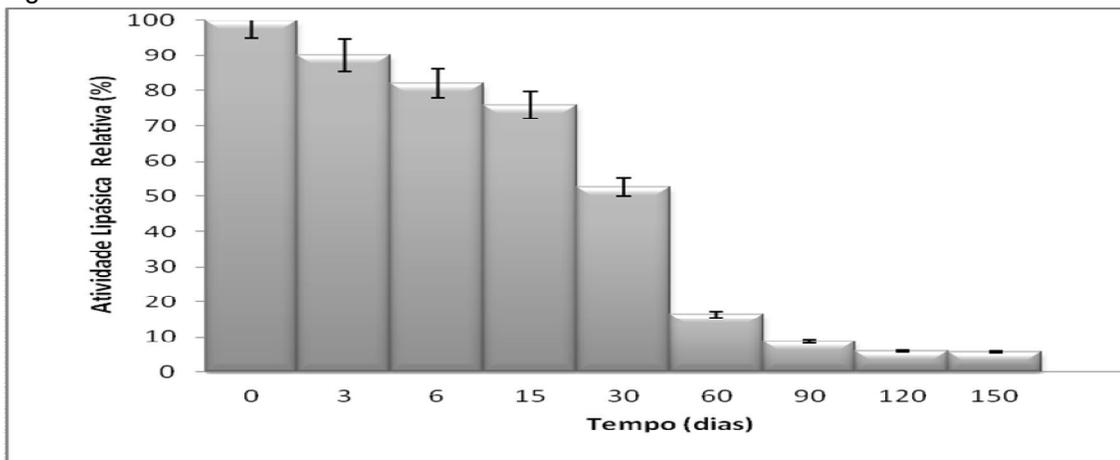


Figura 3. Estabilidade da lipase de *A. niger* a estocagem em geladeira a 5°C

Pode-se observar que em até 15 dias de estocagem a 5°C, não houve grande perda de atividade (24%), entretanto, com 30 dias a perda foi bem significativa (47%) e a partir de 60 dias, a atividade lipásica foi sendo reduzida drasticamente, com perda de 94% após 150 dias de estocagem. Apesar destes resultados desanimadores para estabilidade da lipase sob refrigeração, aqueles obtidos após congelamento são muito bons. Após 150 dias sob temperatura de congelamento, a lipase reteve 100% de sua atividade inicial. Portanto, a lipase de *A. niger* apresentou boa estabilidade a refrigeração por até 15 dias de estocagem a 5°C e por até 150 dias sob -18°C. Dessa forma, a lipase obtida no presente trabalho, deverá ser mantida em congelador para fins de uso comercial e/ou bancada. Lazari (2010) verificou perda total da atividade lipásica do extrato bruto de lipase de *S. thermophilum*, após 1 dia a -20°C, resultados contrários aos obtidos no presente trabalho. Quando mantida em geladeira a atividade também decaiu rapidamente, retendo 50% do valor inicial em 7 dias.

Segundo Castro et al. (2004) a especificidade das lipases é fator crucial na determinação de suas aplicações industriais. Elas são divididas em três grupos baseados em sua especificidade: lipases não específicas, lipases 1,3 específicas e lipase ácido graxo específica. Para a realização dos testes de especificidade, os óleos utilizados foram previamente caracterizados quanto à composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa como pode ser observado na Figura 4.

O óleo de coco apresentou predominância dos ácidos graxos de cadeia média e nos óleos de girassol e oliva, predominam ácidos graxos de cadeia longa, sendo que estes dois últimos que apresentam altos teores de linoléico e oléico, respectivamente, são úteis para avaliar especificidade a estes ácidos graxos.

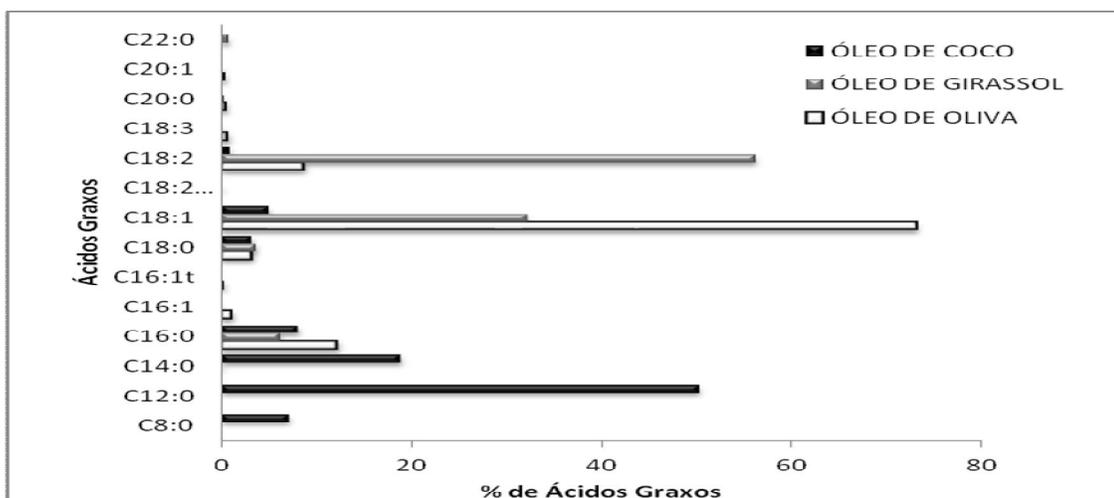


Figura 4. Perfil em ácidos graxos dos óleos de coco, girassol e oliva

Uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre os triacilgliceróis, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações (JENSEN et al., 1983). No presente trabalho, foram obtidas as seguintes taxas de hidrólise: óleo de coco (40%), óleo de girassol (26%) e óleo de milho (20%), resultantes de quatro repetições em triplicata, nas condições avaliadas.

Para o teste de especificidade, o extrato enzimático foi liofilizado com o intuito de aumentar a atividade da enzima e poder elucidar a eficiência da hidrólise enzimática frente aos óleos de diferentes características. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.

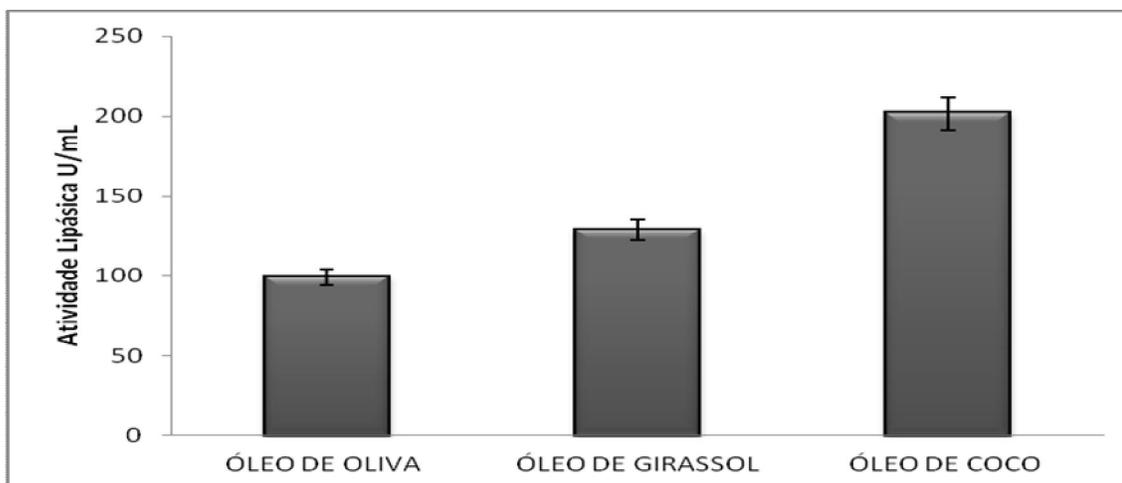


Figura 5. Avaliação da atividade hidrolítica de lipase de *A. niger* liofilizada sobre diferentes óleos. Os resultados são médias de quatro repetições em triplicata.

O extrato enzimático liofilizado catalisou a hidrólise de todos os substratos utilizados, porém, a maior atividade lipásica (201 U/mL) e taxa de hidrólise (40%), foram obtidas com a utilização de óleo de coco, como pode ser observado na Figura 16. Resultados similares foram obtidos por Couri, Dutra e Damaso (2007), que observaram que a maior atividade lipásica de *A. niger* 11T53A14 foi obtida também com óleo de coco (193,2 U/gms) e por Pastore, Costa e Koblitz (2003), que constataram que a lipase de *Rhizopus sp.* apresentou maior atividade hidrolítica sobre óleo de coco, indicando boa afinidade por ácidos graxos de cadeia média, como o láurico (C12:0).

Conclusão

A lipase de *A. niger* apresentou um perfil de termoestabilidade semelhante para as temperaturas de 30°, 40° e 50°C, restando cerca de 42% de sua atividade inicial por até 30 horas de incubação. Embora o perfil de estabilidade ao pH também tenha sido semelhante com os valores testados, após 30 horas de incubação as maiores atividades lipásicas residuais foram observadas em pH ácido: pH 3,0 (59%); pH 4,0 (55%) e pH 5,0 (62%). Além disso, a enzima poderá ser congelada por períodos de até 150 dias, sem perder sua atividade. A lipase demonstrou ter afinidade por ácidos graxos de cadeia média, obtendo atividade hidrolítica de (201 U/mL), quando o substrato testado foi óleo de coco. Sugere-se que a enzima poderá ser aplicada em processos que utilizem faixas de pH relativamente ácidas, como por exemplo, maturação de queijos que visa aprimorar o aroma do produto. Além disso, a enzima estudada no presente trabalho poderá ser utilizada em faixas de temperatura de até 50°C.

Referências Bibliográfica

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleo e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p. 146-156, 2004.
- COURI, S.; DUTRA, J. C.; DAMASO, M. C. T. (2007), Avaliação da seletividade de lipases produzidas por meio semi-sólido em colunas aeradas. **Anais do Simpósio Nacional De Bioprocessos - SINAFERM**, Curitiba, 6p.
- DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 81-87, 2010.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 474-476, 1973.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v.18, p.650-657, 1983.
- LAZARI, S. A. **Caracterização bioquímica da atividade lipásica de *Scytalidium thermophilum* RP-250: uma linhagem hipersecretora de lipases**. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- PASTORE, G. M., COSTA, V. S. R. KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-93, p.739-752, 2001.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances, Oxford**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- ÜLKER, S.; KARAOGLU, S.A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.114, n. 4, p. 385-390, 2012.