

25 e 26 de setembro de 2007



em Passo Fundo, RS

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE LIPASES A PARTIR DE EFLUENTE DE LATICÍNIOS

Mirela Roveda¹, Luciane M. Colla², Marcelo Hemkemeier^{1,2*}

¹ Mestrado em Engenharia: Infra-estrutura e Meio Ambiente, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, *Email: marceloh@upf.br

² Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Email: lmcolla@upf.br

RESUMO

A produção enzimática está em constante crescimento pela grande capacidade dos microrganismos de realizarem transformações químicas. As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos transformando-os em glicerídeos e ácidos graxos livres. Os fungos são os principais produtores de lipases. Objetivou-se a seleção de fungos produtores de lipases. Os fungos foram isolados de efluente de laticínios através da técnica de diluições sucessivas e repicagens. Os fungos isolados foram testados quanto à habilidade de crescimento em meio agar-batata-dextrose (ABD) adicionado de azeite de oliva como indutor. O crescimento foi avaliado através do cálculo da velocidade de crescimento radial (VCR). Isolaram-se 21 microrganismos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. Os fungos E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₇, E₂₀ e E₂₁, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, por apresentarem as maiores VCRs a partir do crescimento em meio ABD adicionado de azeite de oliva.

Palavras-chave: fungos filamentosos, lipases, efluente.

1 INTRODUÇÃO

As lipases são encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. A grande diversidade de microrganismos brasileira justifica a busca por novos produtores de enzimas com características especiais, que possam ser aplicadas na produção de compostos de química fina através da biocatálise. Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas, e as lipases fúngicas são as preferidas para aplicação industrial.

Processos alternativos vêm sendo utilizados na redução da concentração de lipídeos contidos em efluentes por meio de ação de enzimas, particularmente as lipases. As enzimas apresentam uma importância particular pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura. As lipases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquoso, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílico, presentes em

acilgliceróis. A utilização das lipases reduz os níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento anaeróbio e desobstrui filmes de óleos em tubulações, resultando no aumento da vida útil dos equipamentos.

Objetivou-se isolar fungos produtores de lipase a partir de efluentes de laticínios e produzir lipases via fermentação submersa utilizando os fungos selecionados e o próprio efluente como meio de cultivo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e métodos

2.1.1 Isolamento de microrganismos

O isolamento de microrganismos foi realizado através da semeadura direta do efluente de laticínios coletado na saída do equalizador e na saída do aerador em meio ABD acidificado. As placas foram incubadas a 30 °C durante cinco dias. A seqüência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias. Os microrganismos isolados foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio ABD a 4 °C.

Os fungos isolados foram identificados quanto ao gênero através da realização de microcultivos (RIBEIRO et al., 2001)

2.1.2 Seleção de microrganismos produtores de lipases

Os fungos isolados na etapa anterior foram testados quanto à habilidade de crescimento em meio ABD adicionado de azeite de oliva a 5%. Os cultivos foram mantidos em estufa a 30 °C por 144 horas. As medidas dos raios foram realizadas a cada 24 horas através do uso de um paquímetro. Os experimentos foram realizados em triplicata. A velocidade de crescimento radial foi calculada através da regressão linear dos dados de raio das colônias *versus* tempo, segundo a Equação 1. Os dados de VCR dos fungos foram analisados através de Anova e teste de Tukey para comparação de médias.

$$r(cm) = VCR.t + b \quad (1)$$

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Isolamento dos microrganismos

Foram isolados 21 fungos a partir do efluente de laticínios (denominados fungos E₁ até E₂₁). A realização dos microcultivos possibilitou identificar os fungos isolados através da análise microscópica dos micélios. Os fungos E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₅, E₁₇ e E₂₁ foram identificados como do gênero *Aspergillus*; os fungos E₃, E₁₂, e E₂₀ como *Penicillium*; os fungos E₂, E₁₃, E₁₈ e E₁₉ como *Trichoderma*, os fungos E₁, E₄, E₅ e E₁₄ como *Fusarium* e o fungo E₁₆ não foi identificado.

2.2.2 Seleção de microrganismos produtores de lipases

A Tabela 1 apresenta as velocidades de crescimento radial para os fungos isolados do efluente de laticínios cultivados em ABD adicionado de 5% de azeite de oliva.

As velocidades de crescimento radial (VCR) são o coeficiente angular da reta obtida a partir da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo; portanto, quanto maior a

inclinação da reta, maior é a velocidade de crescimento radial, maior o potencial de crescimento do fungo e o potencial de degradação da fonte de carbono.

Foram observadas diferenças significativas entre as VCRs dos fungos isolados do efluente de laticínios cultivados em ABD adicionado de azeite de oliva a 5% ($p < 0,001$). A comparação das médias de VCR dos fungos através do teste de Tukey demonstrou que os fungos E₆, E₁₇, E₁₀, E₂₁, E₈, E₉, E₇, E₂₀, e E₁₂ apresentaram VCRs significativamente superiores ($p < 0,05$) que os demais fungos.

Tabela 1 - Velocidade de crescimento radial para os fungos isolados de efluente de laticínios, cultivados em ABD adicionado de 5% de azeite de oliva

Fungo	Gênero	VCR ^{1,2} (cm/d)
E ₆	<i>Aspergillus</i>	1,7742±0,004 ^a
E ₁₇	<i>Aspergillus</i>	1,6814±0,018 ^{ab}
E ₁₀	<i>Aspergillus</i>	1,6628±0,032 ^{ab}
E ₂₁	<i>Aspergillus</i>	1,5528±0,034 ^{abc}
E ₈	<i>Aspergillus</i>	1,53±0,042 ^{abc}
E ₉	<i>Aspergillus</i>	1,425±0,148 ^{bcd}
E ₇	<i>Aspergillus</i>	1,3671±0,006 ^{cd}
E ₂₀	<i>Penicillium</i>	1,3442±0,038 ^{cd}
E ₁₂	<i>Penicillium</i>	1,16±0,000 ^d
E ₁₆	Não identificado	0,6839±0,002 ^e
E ₁₄	<i>Fusarium</i>	0,6528±0,054 ^e
E ₁₈	<i>Trichoderma</i>	0,6392±0,222 ^{ef}
E ₁	<i>Fusarium</i>	0,4857±0,050 ^{efg}
E ₁₃	<i>Trichoderma</i>	0,3857±0,024 ^{efgh}
E ₁₉	<i>Trichoderma</i>	0,3946±0,012 ^{fghi}
E ₅	<i>Fusarium</i>	0,2971±0,000 ^{ghij}
E ₁₁	Levedura	0,1660±0,088 ^{ghijl}
E ₁₅	<i>Aspergillus</i>	0,1042±0,026 ^{ilm}
E ₃	<i>Penicillium</i>	0,0798±0,015 ^{lm}

¹Resultados de média ± desvio-padrão

²Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

As elevadas velocidades de crescimento radial apresentadas pelos fungos E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₇, E₂₀ e E₂₁ indicam a sua habilidade, pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, de crescerem em meios contendo azeite de oliva como fonte de carbono, o que pode indicar que estes fungos sejam bons produtores de lipases, visto que necessitam sintetizar essas enzimas para que utilizem a fonte de carbono (azeite de oliva) no metabolismo.

Os fungos são considerados bons produtores de enzimas (MAIA et al., 2001) e as lipases fúngicas são preferidas para a aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos (MAHADIK et al., 2002). Sharma et al. (2001) citam inúmeras cepas de fungos como boas produtoras de lipases, entre elas *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Acremonium* e *Alternaria*. Segundo Carvalho et al., (2005); Hasan et al., (2005); Mendes e Castro, (2003), os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* são bons produtores de lipase.

Na literatura não foram encontrados relatos da produção de lipases por cepas de *Trichoderma*. Entretanto, os fungos do gênero *Fusarium* têm se mostrado bons produtores, entre estes a cepa de *Fusarium solani*, como demonstrado por Maia et al. (2001).

3 CONCLUSÃO

Foram isolados 21 fungos de efluente de laticínios pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma*. Os fungos E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₂, E₁₇, E₂₀ e E₂₁ são pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e apresentaram elevadas velocidades de crescimento radial em meio contendo azeite de oliva, o que pode indicar que sejam bons produtores de lipases.

4 REFERÊNCIAS

- CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- HASAN, F.; SHAH, A. A; HAMMED. A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MAIA, M. M. D. et al. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Aplicação de lípases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing Gum Arabic emulifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.
- RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. *Microbiologia prática*. Roteiro e manual, bactérias e fungos. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 112 p.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.