

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**AQUILA STEFANY SANTOS
JAQUELINE SILVA DE ALENCAR**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *ASPERGILLUS NIGER*
EMPREGANDO AZEITE DE OLIVA E ÓLEO DE
GERGELIM**

BAURU
2015

**AQUILA STEFANY SANTOS
JAQUELINE SILVA DE ALENCAR**

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *ASPERGILLUS NIGER*
EMPREGANDO AZEITE DE OLIVA E ÓLEO DE
GERGELIM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

BAURU
2015

Santos, Aquila Stefany

S2373p

Produção de lipase por *Aspergillus niger* empregando azeite de oliva e óleo de gergelim / Aquila Stefany Santos; Jaqueline Silva de Alencar. -- 2015.

42f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Lipase. 2. *Aspergillus niger*. 3. Azeite de oliva. 4. Óleo de gergelim. I. Alencar, Jaqueline Silva de. II. Queiroz-Fernandes, Geisiany Maria de. III. Título.

AQUILA STEFANY SANTOS
JAQUELINE SILVA DEALENCAR

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *ASPERGILLUS NIGER* EMPREGANDO
AZEITE DE OLIVA E ÓLEO DE GERGELIM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz Fernandes.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Cynthia Barbosa Rustiguel
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP)

Bauru, 19 de novembro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho a nossos pais que, com carinho e apoio, não mediram esforços para que alcançássemos nosso objetivo, e principalmente a Deus, que iluminou cada passo que demos até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois nada seria de mim sem a fé que tenho Nele.

À Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, com quem partilhamos desde o começo os esboços deste estudo, e sempre com muita prestatividade, nos ajudou a tornar possível a conclusão do mesmo.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, transmitindo conhecimento sempre com alegria e força de vontade, sendo essenciais para meu amadurecimento profissional e pessoal. Com eles aprendi a refletir, questionar e nunca encarar a realidade como algo imutável.

À meus pais, Osvaldo e Teresinha, que de forma especial e carinhosa me deram força e coragem, me apoiando nos momentos de alegrias e dificuldades, sempre me incentivando a continuar, não desistir, a querer mais de mim e do mundo ao meu redor. Ao meu irmão Abner, por ser meu porto seguro sempre que preciso de conselhos, apoiando sempre seja lá quais forem as minhas decisões. Também a minha namorada Hellen que é meu exemplo de pessoa e tudo para mim, a qual sempre acreditou em mim, sendo minha maior incentivadora.

À meus amigos, pelo companheirismo, carinho e amizade, se mostrando sempre presentes nos risos, choros, surpresas e adversidades da vida.

À Universidade do Sagrado Coração, que me proporcionou a realização deste curso de nível superior, fornecendo ferramentas para aquisição de experiências importantes para a minha formação acadêmica.

Às funcionárias Fabiane e Lígia do laboratório de Biologia, que mostraram sempre prontidão ao nos ajudar em nossos experimentos, sendo muito especiais para nós.

À todos que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo minha caminhada valer cada vez mais a pena.

Aquila Stefany Santos

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, me dando força e coragem não somente nestes anos de faculdade como também em todos os momentos, e provando a cada dia que nenhum sonho é impossível.

À Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, que nos orientou sempre com muito empenho, paciência e confiança, compartilhando conhecimentos e acompanhando cada etapa da pesquisa e elaboração dos estudos, sem a qual não seria possível a alegria de estar hoje colhendo os frutos de nosso trabalho.

Aos demais professores, que ao longo de todo o curso não se cansaram de ensinar o certo, mostrar o quão importantes eram os ensinamentos ali passados, e contribuíram em muito para o meu amadurecimento e preparação para o mercado de trabalho. Posso dizer com toda certeza, que minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a presença de todos eles.

À minha família, que nos momentos de dificuldades estiveram sempre ali presentes, acreditando e investindo em mim. Minha mãe, Zuleide, que com cuidado e dedicação fortaleceu minha esperança para seguir em frente. Meu pai, Erasmo, que foi minha base e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Também à minha irmã Janeili, meu namorado André e todos os amigos que compartilharam comigo tanto as alegrias quanto as tristezas, dando sempre força e incentivo às minhas atitudes.

À Universidade do Sagrado Coração com seu corpo docente, direção e administração, que tornaram realidade meu sonho de completar um curso de nível superior.

Às funcionárias Fabiane e Lígia do laboratório de Biologia, pelo suporte e principalmente prontidão, nos ajudando em muitos momentos sem pedir nada em troca.

Quero deixar também a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, meu muito obrigada.

Jaqueline Silva de Alencar

“A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas
paisagens, mas em ter novos olhos”.
(Marcel Proust)

RESUMO

A lipase é uma enzima de grande interesse biotecnológico, conhecida por sua capacidade de auxiliar em diversos setores industriais, como o alimentício, farmacêutico e químico. Fungos são micro-organismos que participam da obtenção de diferentes produtos de interesse industrial e comercial, sendo os sistemas biológicos mais frequentemente utilizados em processos biotecnológicos. Muitos deles são empregados na obtenção de enzimas utilizadas nas mais variadas indústrias e seus setores de produção. O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência da produção de lipase por *Aspergillus niger* empregando azeite de oliva e óleo de gergelim. Dentre os principais fungos conhecidos na literatura como produtores de lipase, o escolhido foi o *Aspergillus*, que se destaca em muitos dos trabalhos por ser um micro-organismo de comportamento termoestável, que já se mostrou eficiente na obtenção da lipase a partir de diferentes indutores por se multiplicar com facilidade. O cultivo deste se deu em placas de Petri com 25 mL de ágar Sabouraud incubado a 28°C, em estufa por 7 dias. Para produzir a lipase, utilizou-se erlenmeyers de 200 mL, com volume total de 50 mL de meio de cultura. As condições de produção utilizadas foram conforme descrito em literatura científica. Para avaliação dos dois indutores, incubou-se o meio acrescido de azeite de oliva e óleo de gergelim nas concentrações de 15% e 30%, separadamente, com pH inicial de 5,5, sob agitação a 200 rpm por sete dias a 28°C. A produção foi realizada em triplicata. A partir do extrato bruto enzimático obtido determinou-se a concentração de proteínas pelo método de Bradford, a atividade de lipase empregando o p-nitrofenol como substrato e calculou-se a atividade específica. O melhor indutor de lipase neste estudo foi o óleo de gergelim na concentração de 15%, apresentando os seguintes resultados: 0,018 mg/mL de concentração de proteínas, 0,025 U/min/mL atividade de lipase e 1,77 U/mg de atividade específica. A partir desses dados observou-se que o óleo de gergelim mostrou-se como um indutor de lipase produzida por *A. niger* mais eficiente do que o azeite de oliva, trazendo a possibilidade de novos estudos neste segmento.

Palavras chave: Lipase. *Aspergillus niger*. Azeite de oliva. Óleo de gergelim.

ABSTRACT

Lipase is an enzyme of great biotechnological interest, known for its ability to assist in various industrial sectors such as food, pharmaceutical and chemical. Fungi are microorganisms that participate in the achievement of different products for industrial and commercial interest, and biological systems most commonly used in biotechnological processes. Many of them are utilized in producing the enzymes used in various industries and their production sectors. This study aimed to compare the lipase production efficiency by *Aspergillus niger* using olive oil and sesame oil. Among the main fungi known in the literature as lipase producers chosen was *Aspergillus*, which stands out in many of the works to be heat-stable behavior of microorganism, which has proved effective in obtaining the lipase from different inductors for multiply with ease. Cultivation occurred in this Petri dishes with 25 mL of Sabouraud agar incubated at 28 °C for 7 days. To produce the lipase, flasks were used 200 mL with a total volume of 50 mL of culture medium. The production conditions used were as described in scientific literature. For evaluation of the two inductors, incubated the medium supplemented with the olive oil and sesame oil in concentrations of 15% and 30%, separately, with initial pH of 5.5 and agitation of 200 rpm for 7 days at 28°C. The production was performed in triplicate. Was determined the protein concentration by the Bradford method, the lipase activity using p-nitrophenol as substrate and was calculate the specific activity. The best inducer of lipase in this study was the sesame oil at the concentration of 15%, showed the following results: 0.018 mg/mL protein concentration, 0.025 U/min/mL lipase activity and 1.77 U/mg of activity specific. These data it was found that sesame oil has proved to be a lipase inducer produced by *A. niger* more efficient than olive oil, possibility of new studies in this segment.

Keywords: Lipase. *Aspergillus niger*. Olive oil. Sesame oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estruturas microscópicas características do gênero <i>Aspergillus</i> sp...	15
Figura 2 – Características macroscópicas de <i>A. niger</i>	16
Figura 3 – Características microscópicas de <i>A. niger</i> , com presença de conídios visíveis e esporulados	17
Figura 4 – Indutores utilizados na produção de lipase fúngica.....	24
Figura 5 – Cultivo de <i>A. niger</i> em placas de ágar Saboraud	29
Figura 6 – Curva analítica de albumina de soro bovino	30
Figura 7 – Curva analítica de p-nitrofenol	31
Figura 8 – Atividade de lipase produzida por <i>A. niger</i> empregando azeite de oliva (AO) e óleo de gergelim (OG).....	32
Figura 9 – Atividade específica de lipase produzida por <i>A. niger</i> empregando azeite de oliva (AO) e óleo de gergelim (OG)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Constituição dos meios com diferentes concentrações de azeite de oliva.....	25
Tabela 2 –	Constituição dos meios com diferentes concentrações de óleo de gergelim	25
Tabela 3 –	Média do peso úmido e seco das biomassas obtida após produção de lipase com diferentes indutores.....	29
Tabela 4 –	Concentração de proteínas totais.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	APLICAÇÃO DE FUNGOS NOS PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	13
2.2	<i>ASPERGILLUS</i>	14
2.3	ENZIMAS	18
2.4	LIPASES	18
2.5	PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAIS	22
4.1.1	Solventes, reagentes e meios de cultura	22
4.1.2	Equipamentos	22
4.2	METODOLOGIA.....	23
4.2.1	Manutenção de <i>A. niger</i>	23
4.2.2	Obtenção do inóculo	23
4.2.3	Produção de lipase com diferentes indutores	24
4.2.4	Recuperação da enzima	26
4.2.5	Determinação do peso úmido e seco de biomassa	26
4.2.6	Métodos analíticos	26
4.2.6.1	<i>Determinação do coeficiente de extinção molar</i>	26
4.2.6.2	<i>Determinação de proteínas pelo método de Bradford</i>	27
4.2.6.3	<i>Determinação da atividade de lipase</i>	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
6	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia se faz presente na sociedade atual, abrangendo diferentes áreas do conhecimento como Biologia Molecular, Microbiologia, Biologia celular, Genética, Embriologia, entre outras. Algumas de suas aplicações envolvem técnicas imunológicas, químicas e bioquímicas, informática robótica e controle de processos, que favorecem e inovam muitos setores produtivos, oferecendo novas oportunidades de emprego e facilitando cada vez mais processos que antes demandavam maior custo e tempo, além de apresentarem caráter multidisciplinar. Em geral, envolve a manipulação de micro-organismos, animais e plantas, para gerar processos, produtos e serviços. O emprego de agentes biológicos na obtenção de bens e serviços contribui para um aumento de produtividade, minimização de custos de produção e implementação de sistemas sustentáveis. A biotecnologia moderna possui grande importância socioeconômica que movimenta o mercado mundial em mais de 50 bilhões de dólares por ano (ARAÚJO FILHO et al., 2015; VALOIS, 1998).

A busca pelo desenvolvimento sustentável é um dos maiores desafios mundiais e um dos intuitos da biotecnologia moderna é a melhoria e recuperação dos recursos biológicos. Pode-se citar, por exemplo, processos como a biorremediação, que utiliza micro-organismos para recuperação de solos contaminados, que modificam ou decompõem estes poluentes alvos, sendo uma excelente alternativa de tratamento para solos contaminados. Outro exemplo é a obtenção de produtos a partir de resíduos de outras produções, garantindo muitas vezes maneiras alternativas de reduzir custos, e maior reaproveitamento destes (LOPES, 2005).

Os fungos que dão origem a vários produtos de interesse industrial e comercial são os sistemas biológicos mais frequentemente utilizados em processos biotecnológicos. Muitos deles são empregados na obtenção de enzimas, utilizadas nas mais variadas indústrias e seus setores de produção. Surge daí então o imenso interesse em aprofundar-se no uso e conhecimento destes micro-organismos de grande importância (LOPES, 2005).

Entre as vantagens do uso destes micro-organismos há o fato de que não há um número limitado na natureza a serem estudados, apresentando uma ampla gama de características diferentes entre si. Micro-organismos estes que apresentam

curto período de geração e são capazes de gerar produtos metabólicos e enzimas de grande importância. Entre as enzimas hidrolíticas que mais despertam interesse estão as lipases, que são biocatalisadores com capacidade de catalisar diversas reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico. As lipases microbianas têm propriedades enzimáticas variadas e especificidade do substrato, o que as torna propícias para a aplicação industrial (CARVALHO et al., 2005; HASAN; SHAH; HAMMED, 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A biotecnologia utiliza sistemas celulares para desenvolver produtos e processos de interesse social ou econômico. Os fungos, dentre os sistemas celulares, são de grande interesse, pois são os que mais contribuem com produtos e processos para o bem estar da população (VALOIS, 1998).

2.1 APLICAÇÃO DE FUNGOS NOS PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Entre os exemplos do uso biotecnológico de fungos estão a produção de antibióticos, ácidos orgânicos, etanol, entre outras. Os fungos podem ainda ser utilizados para tratamento biológico de efluentes, pois mostram-se hábeis em degradar compostos tóxicos (SANTAELLA et al., 2009). Além disso, são utilizados nos processos de produção de produtos fermentados e bebidas alcoólicas, atuam na biotransformação e na produção enzimática de interesse para a indústria farmacêutica. No âmbito ecológico e agrícola, decompõem restos vegetais, degradam componentes de alta toxicidade, e auxiliam as plantas no crescimento e proteção contra agentes patogênicos proporcionando um equilíbrio do ambiente (ABREU et al., 2015).

Frente ao fato de que seu isolamento e seleção auxiliam no desenvolvimento de novos e variados fármacos, além de aplicações em diversos segmentos industriais, os fungos são uma fonte de recursos genéticos que contribuem em muito para o avanço biotecnológico e também para o desenvolvimento econômico. Esses micro-organismos são grande fonte de enzimas pois são de fácil manipulação genética e imensa diversidade bioquímica, com características bem diferentes entre si. Os fungos filamentosos constituem o maior grupo em quantidade de espécies, além de grande variedade em relação à estrutura e às características fisiológicas e bioquímicas. Essa diversidade permite ao homem explorar essas linhagens e produzir a partir delas enzimas com diversas aplicações industriais de forma eficiente. Para que estes possam ser explorados de maneira adequada, deve-se preservar ao máximo suas características originais. Essa manutenção é essencial

para aplicação em pesquisas e desenvolvimento de processos biotecnológicos, sendo ela uma grande garantia de reprodutibilidade de resultados (BARBOZA et al., 2009; PIRES et al., 2015).

2.2 ASPERGILLUS

Aspergillus é um gênero fúngico que possui mais de 200 espécies 11 variedades e 9 formas validadas na literatura. Foi catalogado pelo padre Florentino e pelo micologista Pietro Antonio Micheli em 1729, que ao observar o fungo no microscópio se lembrou de um *Aspergillum*, que na época era um instrumento utilizado para borrifar água benta na igreja (KLICH, 2002). Por este motivo, deu à espécie este nome. Segundo Chehri (2013), *Aspergillum* seria o nome de uma estrutura em forma de esporos assexuais comum a todos os *Aspergillus*, porém cerca de um terço das espécies também são conhecidos por ter uma fase sexual.

A forma como se reproduzem os fungos está totalmente relacionada com sua morfologia, ou seja, tipos diversos de reprodução na maioria das vezes geram diferentes morfologias. Uma reprodução sexuada entre fungos permite, por exemplo, recombinação genética, o que garante variabilidade e consequente aperfeiçoamento da espécie. Existem fungos que em fases do seu ciclo se apresentam de forma sexuada e em outras fases produzem estruturas assexuadas. Os esporos presentes numa reprodução assexuada são conhecidos como conídios, e são eles os responsáveis pela disseminação do micro-organismo na natureza (TRABULSI et al., 2002).

Observa-se na Figura 1 estruturas microscópicas características de *Aspergillus* sp. com conídios formando cadeias sobre fiálides, estruturas em forma de garrafa. Essas fiálides localizam-se em torno de uma vesícula, que é uma dilatação na extremidade do conidióforo, sendo este uma ramificação da hifa (TRABULSI et al., 2002).

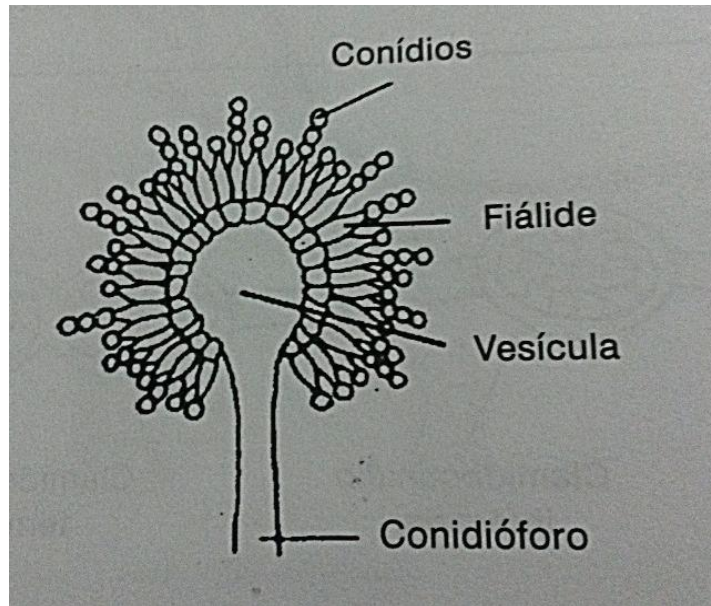


Figura 1 - Estruturas microscópicas características do gênero *Aspergillus* sp.
 Fonte: TRABULSI et al. 2002, pg 370

As espécies de *Aspergillus* são encontradas em ambientes que são ricos em oxigênio, pelo fato de serem aeróbios, e seus conídios estarem dispersos no ar. Crescem em muitas plantas e árvores e contaminam restos de alimentos, como por exemplo, o pão e a batata. Têm grande importância comercial, pois são importantes para a fermentação microbológica e obtenção de produtos e processos biotecnológicos, porém certas espécies podem causar infecções em humanos e outros animais. *Aspergillus fumigatus* e outras espécies de *Aspergillus* causam infecções tão importantes quanto às causadas por *Candida* spp. Por estarem presentes no ar, podem gerar reações de hipersensibilidade caso seus esporos sejam inalados (DUTKIEWICZ et al., 2002).

Aspergillus niger é bastante utilizado em processos industriais e representa 99% do número total de fungos no ar (DUTKIEWICZ et al., 2002). Dentre as características de *A. niger*, destaca-se o fato de ser um fungo mesófilo, com temperatura ideal de crescimento entre 20 e 40°C, com crescimento bom a 37°C, podendo sobreviver a até 60°C (BUDZKO; NEGRONI, 1975). As colônias deste fungo crescem primeiramente brancas amareladas, que após o período completo de produção do mesmo, passa a ter um aspecto aveludado, geralmente enegrecido com colônias variantes entre marrom, cinza e preto, onde há micélio aéreo e

conidióforos retos/erguidos que ficam bem distribuídos sobre a placa, com inúmeros conídios produzidos (SANTOS, 2007).

As características macroscópicas e microscópicas deste fungo estão representadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Na Figura 2 pode-se observar o aspecto enegrecido e aveludado das colônias, em cultivo em tubo. A Figura 3 representa uma visão microscópica do fungo, onde observa-se o conidióforo resultando em uma abertura em forma de vesícula, e ao redor desta abertura a presença de conídios esporulados, prontos para serem dispersos no ambiente.



Figura 2 - Características macroscópicas de *A. niger*
Fonte: OLIVEIRA, J. C. Atlas de Micologia (2013)

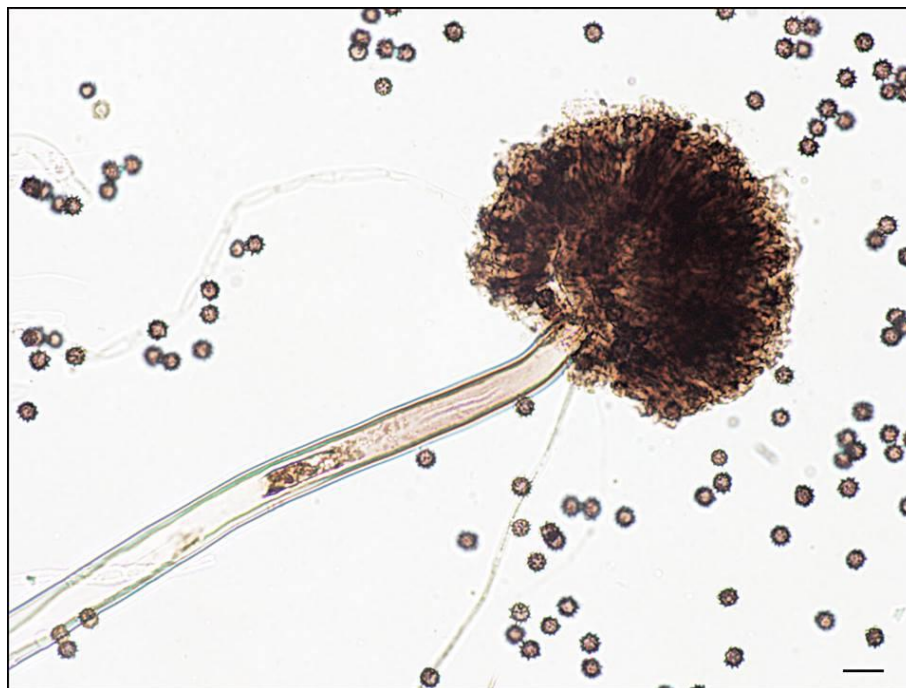


Figura 3 – Características microscópicas de *A. niger*, com presença de conídios visíveis e esporulados
Fonte: Institut National de Santé Publique (2015).

Dentre as aplicações biotecnológicas do fungo *A. niger*, estão a produção de enzimas como lipases, proteases, xilanases e queratinases (SILVA et al., 2011; ZANETI, 2012).

Este fungo é eficientemente empregado para degradar compostos recalcitrantes em resíduos de indústrias farmacêuticas, indústria de castanha de caju, refinarias de petróleo, cervejarias, indústrias de azeite de oliva, e remoção do pesticida agrícola paration em água (SANTAELLA et al., 2009). Outro exemplo é sua aplicação na obtenção do ácido cítrico. Esse micro-organismo aumentou a produção global de ácido cítrico em mais de 99%, ou mais que 4,5 milhões de toneladas por ano. Esta mesma espécie é utilizada também na produção de enzimas como a glucoamilase, utilizada para fazer xaropes que necessitem de alto teor de frutose; a pectinase, responsável por clarificar a sidra; o vinho e as oxidases (BARRETO, 2005).

No âmbito industrial, há uma grande valorização dos fungos, pois as enzimas por eles produzidas geralmente são extracelulares, facilitando sua recuperação do meio de fermentação. Os fungos filamentosos, em especial os *Aspergillus*, são considerados bons produtores de enzimas (MAIA et al., 2001).

2.3 ENZIMAS

Inúmeros processos biotecnológicos utilizam-se de catalisadores biológicos em suas reações e conversões. Estes catalisadores aumentam a velocidade das reações quando colocadas em condição de afinidade com o substrato, e, além disso, catalisam reações de síntese e degradação sendo seletivos quanto ao tipo de reação. Enzimas são ótimos catalisadores, e são utilizados pela indústria, pois permitem que processos tecnológicos desenvolvam-se como os realizados na natureza, contribuindo ainda para a redução de riscos ambientais (WARNER; CANNON; DYE, 2004).

Conseqüentemente, a demanda por essas enzimas vem crescendo a cada ano, com uma comercialização de aproximadamente 90% concentradas entre Estados Unidos, Europa e Japão. Mais de 4.000 enzimas são conhecidas e identificadas, dentre elas aproximadamente 200 utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Mais de 75% das enzimas industrializadas são hidrolases. Hidrolases são um tipo específico de enzimas que funcionam como catalisadores no desdobramento de compostos em reações com moléculas de água. Exemplos de hidrolases são as lipases, amilases e as peptidases, sendo 90% delas produzidas por micro-organismos através de processos fermentativos. Após as proteases e as amilases, as lipases são o terceiro maior grupo comercializado no mundo (JAEGER et al., 1997; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

2.4 LIPASES

Lipases são as enzimas responsáveis pela degradação de lipídios em nosso organismo, porém abrangem uma proporção bem maior que somente digestão no corpo humano. Envolvem uma grande diversidade de enzimas que apresentam em comum a digestão dos lipídios, por meio da quebra destas moléculas, através de processos de hidrólise. Sua função é catalisar reações nas quais converte-se triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Seu potencial biotecnológico está na sua capacidade de catalisar reações de síntese orgânica em meio não aquoso e geralmente estão relacionadas a processos simples, porém de alta eficiência. Sua

obtenção é trabalhosa, pois envolve substratos e micro-organismos que nem sempre a produzem com eficiência (PASTORE, 2003).

É uma enzima muito estudada, pois pode ser utilizada em diversos setores industriais como o alimentício, farmacêutico e químico. A produção de enzimas por micro-organismos pode se dar através de bioprocessos submersos ou em estado sólido. Todo processo de produção pode ser afetado por fatores como pH, temperatura, concentração de oxigênio, inóculo, aeração, agitação, fontes de carbono e nitrogênio, composição do meio, cepa do micro-organismo, entre outros (MESSIAS et al., 2011).

As lipases produzidas por micro-organismos podem ser empregadas como aditivos em alimentos para modificar e realçar as propriedades desses alimentos; também para hidrolisar gorduras, em detergentes; e no tratamento de efluentes oleosos. As lipases microbianas são dotadas de características importantes, tais como a estabilidade e a seletividade, contribuindo para uma procura muito grande de sua utilização na área industrial (SALGADO et al., 2015).

Na indústria de detergentes biológicos de alta qualidade, são muito úteis. Na indústria farmacêutica também são importantes, pois podem ser quimiosseletivas, agindo sobre uma região específica estrutural ou sobre funções químicas específicas. Na indústria oleoquímica tem papel importante, pois ajuda a enriquecer óleos vegetais e animais como ácidos graxos poliinsaturados, azeite e outros. São uma alternativa a hidrogenação, que é uma técnica que converte ligações transformando óleos líquidos em óleos sólidos, como margarina. As lipases também têm sido utilizadas em reações de transesterificação para converter óleos em biodiesel e glicerol (MESSIAS, 2011).

Os trabalhos presentes na literatura sobre lipases fúngicas são muitos, e os fungos que mais estão relacionados a estes estudos são *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemare* e *Penicillium cyclopium* (CARVALHO et al., 2005).

2.5 PRODUÇÃO DE LIPASES POR *ASPERGILLUS NIGER*

São vários os estudos relacionados com o uso industrial do *A. niger*. Castro (2006) analisou o potencial de oito diferentes micro-organismos, inclusive linhagens

de *A. niger* que apresentaram grande potencial para produção de β -glucosidase. Carvalho et al. (2005) estudou propriedades de lipases provindas de cepas isoladas em território brasileiro, para testes de biocatálise orgânica, termoestabilidade e estabilidade frente ao pH, no intuito de descobrir novos biocatalisadores com características especiais.

Gomes (2006) realizou um estudo sobre fatores de otimização da produção de lipase, caracterização, imobilização e aplicação industrial. Após o levantamento, os dados foram comparados com os descritos na literatura referentes à caracterização da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes orgânicos.

Dutra (2007) investigou as condições mais propícias para a produção de lipase por *A. niger* em fermentação em estado sólido. A cepa foi cultivada utilizando como suporte farelo de trigo previamente enriquecido com sulfato de amônio 0,91% m/v e utilizou-se como indutores óleos de mamona, milho, soja, oliva e palma como fontes de carbono suplementares para aumentar a produção de lipase.

Neste mesmo segmento, Moura et al. (2013) realizou a bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos, encontrados regularmente no ar atmosférico e que podem deteriorar materiais, dentre estes um *A. niger* utilizando o azeite de oliva como substrato específico de lipase. Seus estudos mostraram que de todos os micro-organismos utilizados, o *A. niger* apresentou elevada atividade lipolítica, mostrando-se então como um eficiente produtor de lipases.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste estudo foi comparar a eficiência da produção de lipase por *Aspergillus niger* (CCFF OIC 40067) empregando azeite de oliva e óleo de gergelim como indutores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a manutenção da linhagem de *A. niger* (CCFF OIC 40067);
- Realizar produção de lipase por *A. niger* empregando azeite de oliva;
- Realizar produção de lipase por *A. niger* empregando óleo de gergelim;
- Monitorar as biomassas geradas após esta produção;
- Determinar a concentração de proteínas totais no extrato bruto enzimático obtido a partir da produção com os diferentes indutores;
- Determinar a atividade de lipase de ambos os extratos brutos enzimáticos obtidos;
- Calcular a atividade específica das lipases obtidas;
- Comparar a eficiência de indução de lipase fúngica por azeite de oliva e óleo de gergelim.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

Ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol - Acumedia

Glicose - Nuclear

Peptona - Acumedia

Extrato de levedura - Merck

Fosfato de potássio dibásico- Merck

Cloreto de potássio- Dinâmica

Nitrato de sódio- Dinâmica

Sulfato de magnésio - Dinâmica

P-nitrofenol- Sigma Aldrich

P-nitrofenilpalmitato- Sigma Aldrich

Reagente de Bradford - Sigma Aldrich

NaOH - Dinâmica

Fenol - Dinâmica

Albumina de soro bovino- Sigma Aldrich

Triton X-100- Sigma Aldrich

Goma arábica- Tinn-Kol

Isopropanol- Vetec

Azeite de oliva - GALLO extra virgem

Óleo de gergelim torrado - KENKO

4.1.2 Equipamentos

Shaker - Tecnal TE 420

Fluxo laminar - VECO

Estufa micológica - FANEM

Banho maria - FANEM

Microscópio - Nikon E 100

Espectrofotômetro - BEL
Autoclave vertical - Phoenix
Placas de Petri
Pipetas de volume variável
Ponteiras
Tubos Falcon
Espátulas
Câmara de Neubauer
Balança analítica

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Manutenção de *A. niger*

Foi utilizada a cepa do fungo *Aspergillus niger* (CCFFOIC40067) disponibilizado pelo Instituto Oswaldo Cruz para produzir a enzima lipase, o qual foi mantido no cepário do Laboratório de Biociências da Universidade do Sagrado Coração. O meio Sabouraud Agar (SDA) foi utilizado para fazer a manutenção deste fungo a 28°C com repiques quinzenais.

4.2.2 Obtenção do inóculo

Cultivou-se esse micro-organismo em Placas de Petri, com 25mL do meio SDA, incubado a 28°C em estufa por 7 dias. Após esse período raspou-se as placas para ressuspensão em água destilada previamente esterilizada. Realizou-se em seguida a contagem dos esporos em câmara de Neubauer para obter a concentração 10^7 célula/mL, utilizada na produção enzimática.

4.2.3 Produção de lipase com diferentes indutores

Para produzir a lipase, utilizou-se Erlenmeyers de 200 mL, com volume total de 50 mL de meio de cultura.

As condições para o cultivo e o meio de cultura usados foram os mesmos descritos por Mahadik et al. (2004). Este consistiu de 0,5 g de NaNO_3 ; 0,5 g de MgSO_4 ; 0,5 g de KCl ; 2,0 g de K_2HPO_4 ; 2,0 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura e 5,0 g de peptona, dissolvidos em 1 L de água destilada.

Avaliou-se dois indutores, o azeite de oliva e o óleo de gergelim torrado, em duas concentrações diferentes: 15% e 30%. Ajustou-se o pH inicial do meio para 5,5 com ácido e/ou base fraca; e incubou-se sob agitação a 200 rpm por 7 dias a 28°C.

A seguir estão representados os indutores utilizados (Figura 4) e as constituições dos meios (Tabela 1 e 2). A produção foi realizada em triplicata biológica.



Figura 4 – Indutores utilizados na produção de lipase fúngica

Fonte: Elaborada pelas autoras.

Tabela 1 - Constituição dos meios com diferentes concentrações de azeite de oliva

COMPONENTES	15%	30%
NaNO ₃	0,0755 g	0,0750 g
MgSO ₄	0,0754 g	0,0753 g
KCl	0,0759 g	0,0755 g
K ₂ HPO ₄	0,3540 g	0,3041 g
Glicose	0,3580 g	0,3480 g
Extrato de Levedura	0,0756 g	0,0757 g
Peptona	0,7549 g	0,7501 g
Azeite de Oliva	0,3 g	0,6 g

Fonte: Elaborada pelas autoras.

Tabela 2 - Constituição dos meios com diferentes concentrações de óleo de gergelim

COMPONENTES	15%	30%
NaNO ₃	0,0754 g	0,0758 g
MgSO ₄	0,0759 g	0,0756 g
KCl	0,0750 g	0,0756 g
K ₂ HPO ₄	0,3513 g	0,3539 g
Glicose	0,3673 g	0,3386 g
Extrato de Levedura	0,0759 g	0,0752 g
Peptona	0,7533 g	0,7520 g
Óleo de gergelim	0,3 g	0,5 g

Fonte: Elaborada pelas autoras.

4.2.4 Recuperação da enzima

Após a produção, os extratos brutos enzimáticos foram filtrados em papel de filtro de 0,45 μm , com o auxílio de bomba a vácuo, para separar os extratos brutos enzimáticos das biomassas, e seguiu-se com as posteriores análises.

4.2.5 Determinação do peso úmido e seco de biomassa

Após a filtração, imediatamente os papéis de filtro com a biomassa úmida foram pesados em balança analítica.

Depois dessa primeira pesagem, incubou-se esses papéis filtro em estufa a 28°C para eliminar a umidade e foram feitas demais pesagens, no intuito de obter o peso seco até peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

4.2.6 Métodos analíticos

4.2.6.1 Determinação do coeficiente de extinção molar

Para que fossem obtidas as concentrações de proteínas e as atividade de lipase em cada condição de indutor, fez-se necessário a determinação de um coeficiente de extinção molar. Essa determinação ocorreu a partir de curvas analíticas baseadas em duas soluções-padrão, sendo uma curva de albumina de soro bovino e uma de p-nitrofenol, para determinação da concentração de proteínas e da atividade de lipase, respectivamente. Preparou-se essas soluções nas concentrações de 0,1 a 2 mg/mL, e submeteu-se ao mesmo procedimento das amostras. Utilizou-se a lei de Lambert-Beer para fazer a determinação do coeficiente de extinção molar, o qual se deu dessa forma: para determinar o coeficiente angular, foi traçado o gráfico da curva da absorbância x concentração da amostra ($\mu\text{mols/mL}$), e, para a determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) empregou-se a seguinte equação: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, onde A = Absorbância, ϵ = absortividade, b =

caminho óptico (1 cm) e c = concentração. Como $b = 1$, obtivemos: $\epsilon = A \div c$, em que ϵ é dado por $\mu\text{mols. } \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.2.6.2 Determinação de proteínas pelo método de Bradford

Foram adicionados 50 μL dos extratos brutos enzimáticos a serem dosados e 1,5 mL do reagente de Bradford, adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich) em tubo de ensaio. Manteve-se esta mistura por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a leitura a 595 nm em espectrofotômetro (BRADFORD, 1976).

4.2.6.3 Determinação da atividade de lipase

Para quantificação da atividade enzimática foi utilizado o método descrito por Liu et al. (2008), com modificações, que utiliza p-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato. Primeiramente preparou-se tampão fosfato 50 mM de pH 6,5. Após, foram preparadas duas soluções: A e B. A solução A continha 0,14g de Triton X-100 e 0,035g de goma arábica, que foram diluídos em 35 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 6,5. A solução B foi preparada com 0,006 g de pNPP diluído em 4 mL de isopropanol. A partir disso, foram separados 26 tubos (12 para cada ocasião, 1 para o branco/azeite de oliva e 1 para o branco/óleo de gergelim), e em cada tubo foram adicionados 2.430 μL de solução A e 270 μL de solução B. Após repouso de uma hora, em cada tubo foram adicionados 300 μL de extrato enzimático obtidos das produções com os diferentes indutores (azeite ou óleo de gergelim), inclusive nos tubos brancos, porém para estes o extrato bruto enzimático foi previamente desnaturado, por fervura prévia durante 15 minutos.

Então, as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 40°C durante 20 minutos. A reação foi interrompida por resfriamento em gelo durante 5 minutos e a densidade óptica foi medida a 410 nm zerando o aparelho com o tubo branco correspondente a cada indutor (azeite de oliva ou óleo de gergelim).

Em seguida, a atividade enzimática foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{absorbância (410 nm)} \times \text{vol. ensaio}}{\epsilon \times \text{tempo (min)} \times \text{vol. amostra}}$$

Cada unidade de atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima suficiente para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto de reação, conforme as condições descritas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O cultivo dos fungos para obtenção do inóculo para a produção enzimática pode ser observado na Figura 5.

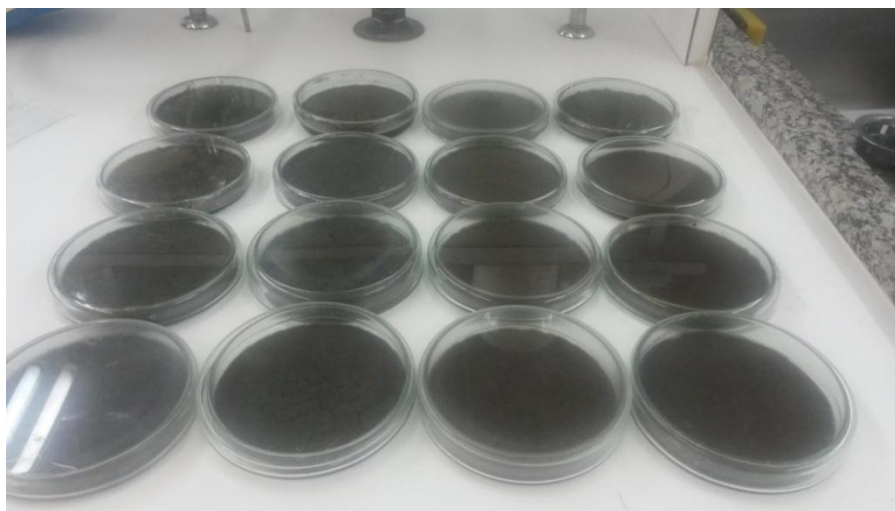


Figura 5 - Cultivo de *A. niger* em placas de Ágar Saboraud
Fonte: Elaborada pelas autoras.

Observa-se nesta imagem o crescimento esperado das colônias puras do *Aspergillus niger*, com características específicas desta espécie encontradas em literaturas, tendo a cor enegrecida e seu aspecto aveludado.

Após a produção enzimática pesou-se as biomassas e na Tabela 3 seguem os resultados das médias de cada pesagem realizada.

Tabela 3 - Média do peso úmido e seco das biomassas obtida após produção de lipase com diferentes indutores

INDUTORES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	PESO ÚMIDO (g)	PESO SECO (g)
15% Azeite de Oliva	2,77	0,86
30% Azeite de Oliva	3,29	0,89
15% Óleo de gergelim	2,97	0,86
30% Óleo de gergelim	3,54	0,90
Desvio Padrão	0,34	0,02

Fonte: Elaborada pelas autoras.

Observa-se que o indutor que mais induziu positivamente o crescimento do fungo foi o óleo de gergelim a uma concentração de 30%. Porém, essa condição não foi quem induziu maior atividade de lipase, até mesmo porque através do valor de desvio padrão, conclui-se que a variação não foi significativa.

Na determinação do coeficiente de extinção molar utilizou-se duas soluções padrão gerando curvas analíticas para determinação da concentração de proteínas e da atividade de lipase, respectivamente observadas nas Figuras 6 e 7.

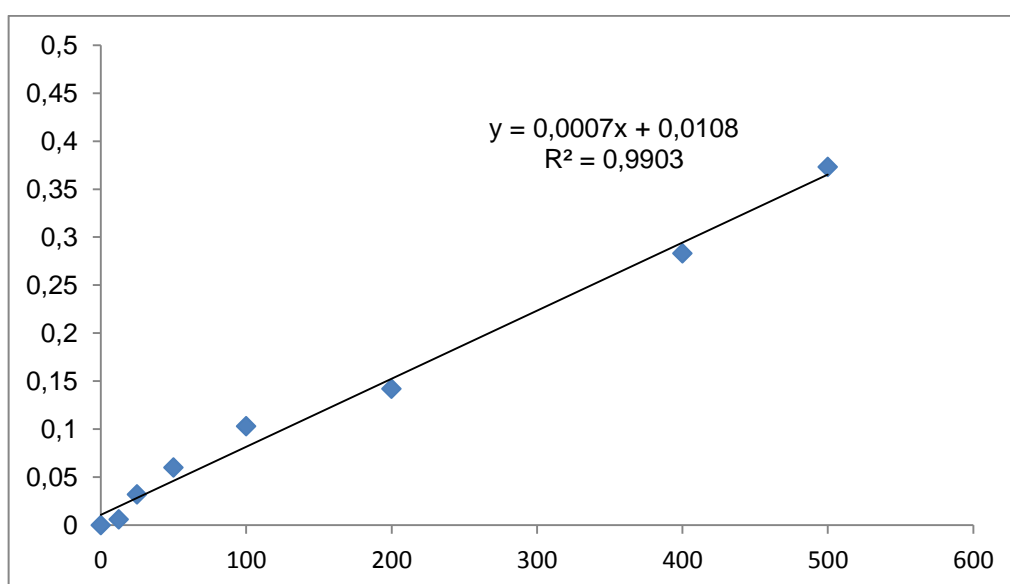


Figura 6 - Curva analítica de albumina de soro bovino
Fonte: Elaborada pelas autoras.

A curva analítica de albumina de soro bovino utilizada para determinação da concentração de proteínas apresentou coeficiente de extinção molar igual a 0,0007.

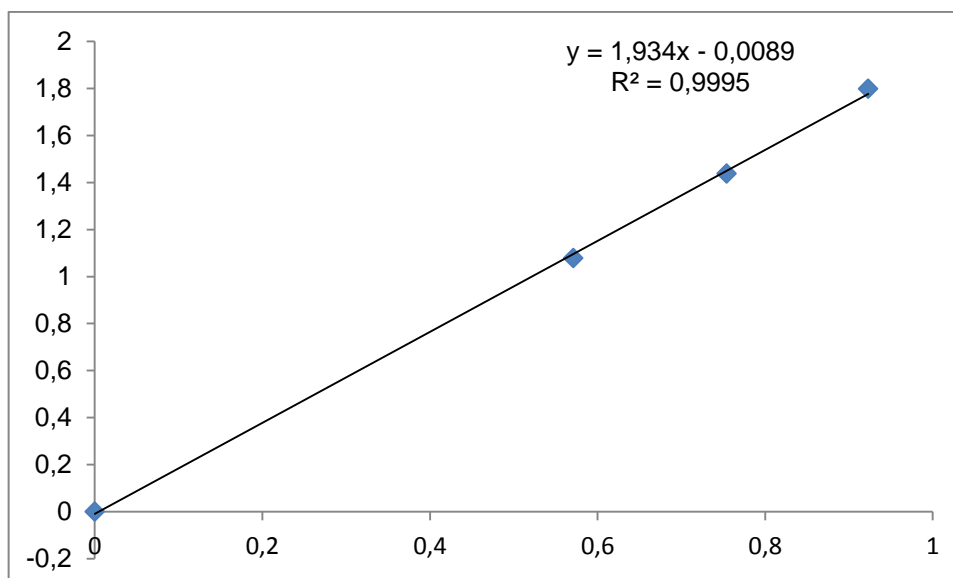


Figura 7 - Curva analítica de p-nitrofenol

Fonte: Elaborada pelas autoras.

A curva analítica de p-nitrofenol utilizada para determinação da atividade de lipase apresentou coeficiente de extinção molar igual a 1,934.

Os resultados de concentração de proteína, atividade de lipase e atividade específicas obtidos através da média das triplicatas de cada produção com os diferentes indutores estão demonstrados na Tabela 4, Figura 8 e Figura 9.

Tabela 4 - Concentração de proteínas totais

Concentração de Indutores (%)	D.O.*	Concentração de Proteínas (mg/mL)*
Óleo de gergelim		
15	0,020	0,014
30	0,021	0,014
Azeite de Oliva		
15	0,024	0,018
30	0,018	0,011

Fonte: Elaborada pelas autoras.

Nota: * média de triplicatas

Os resultados de concentração de proteínas mostraram que o azeite de oliva a uma concentração de 15% foi o que mais induziu a secreção de proteínas, com valor de 0,018 mg/mL, porém esta não foi a condição que obteve maior sucesso na indução de atividade de lipase.

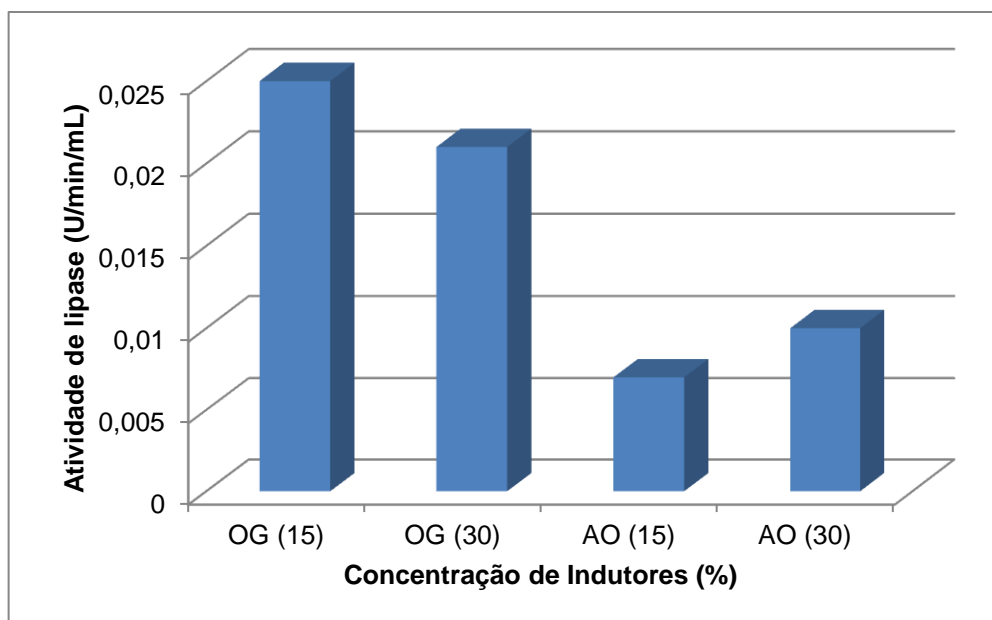


Figura 8 - Atividade de lipase produzida por *A. niger* empregando azeite de oliva (AO) e óleo de gergelim (OG)

Fonte: Elaborada pelas autoras.

Comparando os resultados de atividade de lipase obtidos a partir das diferentes concentrações de indutor, foi possível identificar o óleo de gergelim na concentração de 15% como maior indutor de atividade de lipase, com valor de 0,025 U/min/mL, superior aos resultados obtidos nas demais concentrações.

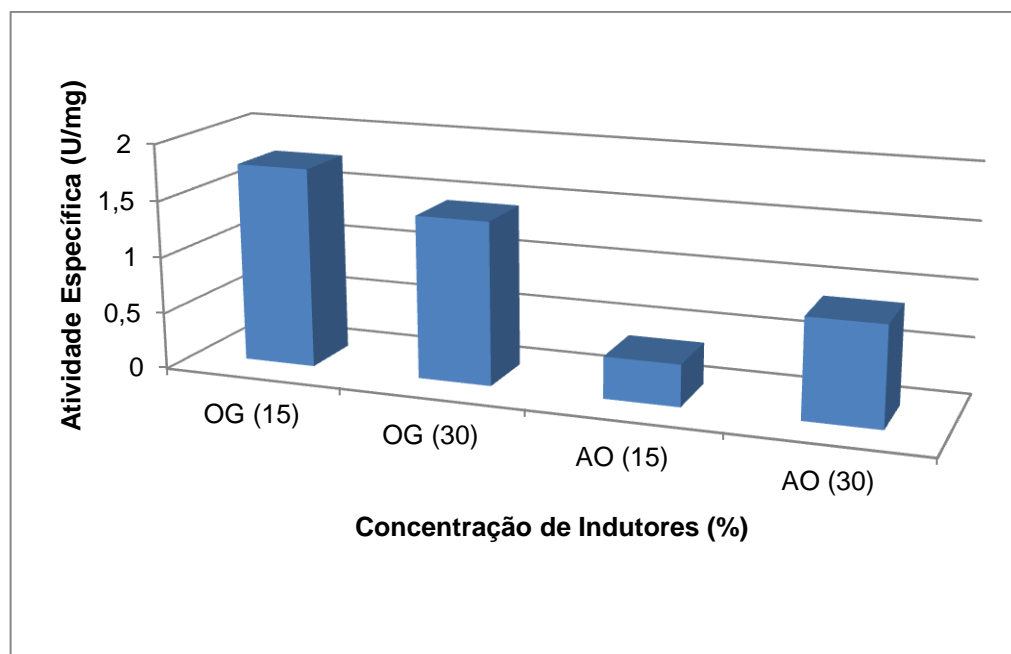


Figura 9 - Atividade específica de lipase produzida por *A. niger* empregando azeite de oliva (AO) e óleo de gergelim (OG)
Fonte: Elaborada pelas autoras.

Por mais que um ensaio mostre boa atividade enzimática, nem sempre todas as enzimas presentes ali são eficientes. Assim, realizou-se o cálculo de atividade específica de lipase, onde se observou que a condição óleo de gergelim a 15% mostrou-se com maior atividade específica, com valor de 1,77 U/mg.

A lipase, enzima obtida neste estudo, por ter grande potencial biotecnológico, há tempos é conhecida. No ano de 1856, Claude Bernard isolou a lipase pela primeira vez de suco pancreático e observou que essa enzima diluía gotas de óleo. Anos depois desse acontecimento, o interesse por lipase só vem aumentando e tende a crescer, pelo fato de que quando é produzida por micro-organismo, é mais estável e de fácil obtenção quando comparada com as de origem animal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Tendo em vista o interesse biotecnológico, os fungos podem produzir enzimas através de fermentação, dentre elas a lipase, encontrada em tecidos de plantas e animais. Para a produção de lipase os fungos filamentosos tem um interesse específico, já que em relação às fontes animais e vegetais, o tempo de produção é menor, em grande parte suas enzimas são extracelulares, facilitando sua recuperação e essa produção não necessita de muitos nutrientes (CARVALHO et al., 2005).

Pode-se avaliar a atividade enzimática através da velocidade utilizada para gerar o produto final ou na medição da velocidade de consumo do substrato. Essa atividade depende de alguns fatores que podem afetar a produtividade, como por exemplo, o tempo de reação, concentração de nutrientes, enzima, presença e concentração dos indutores, substratos, pH, agitação, temperatura e cofatores ou inibidores. Já a atividade específica se dá pela quantidade de enzima, calculada pelo número de unidade por miligrama de proteína, a qual faz a medição da pureza dessa enzima. Conseqüentemente, quanto maior a atividade específica da enzima, maior será a probabilidade de que a mesma não está associada a outras enzimas, garantindo a pureza do produto final (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

As lipases derivadas de micro-organismos podem ser obtidas a partir de cultivos submersos, em alguns casos utilizam-se células imobilizadas onde vários estudos vêm sendo realizados para tentar definir as melhores condições e o que a lipase necessita como nutriente para ser produzida. Quando produzida, a lipase pode sofrer influência do tipo e concentração das fontes de carbono, temperatura, pH do meio, e a concentração de oxigênio disperso no caso do bioprocessamento submerso (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). De uma forma geral, as lipases são estáveis à temperaturas elevadas, atuam em ampla faixa de pH, possuem grande especificidade e seletividade, a qual faz com que a mesma seja aplicável em uma grande variedade de processos industriais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; VILLENEUVE et al., 2000).

Entre os métodos de produção de lipase o principal é o de fermentação submersa que propicia o crescimento microbiano, perante diferentes condições de cultivo e composições necessárias a esse crescimento (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Essas enzimas podem ser produzidas também por fermentação em estado sólido, onde utiliza-se substratos que são insolúveis e com pouca água em sua composição, os quais podem servir como fonte de nutrientes e suporte fisiológico (PANDEY, 2003).

Muitos são os estudos cujo objetivo foi produzir lipase utilizando diferentes metodologias, substratos e micro-organismos.

Carvalho et al. (2005) utilizaram fungos isolados de amostra de solo próximas à plantações de cana-de-açúcar, inclusive *Aspergillus niger*, cultivados em meio

batata dextrose ágar para produzirem lipase a partir dos indutores azeite de oliva extra virgem de baixa acidez e ibuprofeno. A atividade específica da lipase produzida pela cepa de *A. niger* foi de 0,56 U/mg, valor inferior ao obtido neste estudo, o qual foi 1,77 U/mg para óleo de gergelim a uma concentração de 15%.

Mahanta et al. (2008) utilizaram a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de lipases e proteases, empregando como substrato sementes de *Jatropha curcas* (pinhão) pelo método de fermentação em estado sólido. Fernandes et al. (2007) utilizaram outro substrato, o farelo de trigo enriquecido com 5% de óleo de milho, em um período de 72 horas de cultivo, pelo método de fermentação em estado sólido, com a bactéria *Burkholderia cepacia*, ambos os autores observaram resultados superiores aos encontrados neste trabalho, porém ressalta-se que foram utilizados micro-organismos diferentes.

Kamini et al. (1998) utilizaram *A. niger* para a produção de lipase, empregando como substrato torta de gergelim, que consiste de um resíduo da indústria do óleo de soja obtido após a prensagem dos grãos, por um período de 72 horas. Moura et al. (2013), utilizaram fungos anaeróbios, como o *A. niger* empregando azeite de oliva em placas de Petri e por meio de teste apenas qualitativos juntamente com a rodamina (reagente colorimétrico) para dar a fluorescência quando colocada sob a luz UV a 365 nm, a atividade enzimática de lipase foi expressada apenas medindo os halos fluorescentes que se formaram na placa ao redor da colônia. Esses halos foram medidos através de um paquímetro, cuja atividade enzimática foi expressa através da fórmula $AL = R/r$ (AL: atividade lipolítica, R: valores de halos fluorescentes, e r: valores de halos não fluorescentes), onde os isolados foram classificados com baixa atividade lipolítica (halos $\leq 1,5$), moderada atividade lipolítica (halos de $1,5 \leq 3,0$) e elevada atividade lipolítica (halos maiores que 3,0). O micro-organismo expressou as enzimas lipases, as quais foram excretadas para o meio extracelular e hidrolisam os triglicérides do indutor azeite de oliva em ácidos e glicerol, cujos ácidos graxos quando formados acabam se complexando com o reagente colorimétrico Rodamina, o que resulta nos halos fluorescentes em volta das colônias após irradiação da mesma sob a luz UV. No meio sem substrato isso não acontece, pois não há expressão da enzima. Esta atividade enzimática foi comparada com a produção pelo *Aspergillus flavus* (controle positivo). Ambos os trabalhos mostraram atividade específica maior que a obtida em

nosso estudo. Porém, deve-se levar em consideração que foram utilizados meios de cultivo, metodologia, substratos e micro-organismos diferentes.

A produção de lipases com boa atividade específica por meio do emprego de indutores de baixo custo, como por exemplo, o óleo de gergelim, que neste estudo apresentou potencial, pode ser melhorada através de estudos que propiciem condições variadas de produção. Roveda et al. (2010), por exemplo, utilizaram efluentes industriais para a obtenção de lipase por fermentação submersa empregando fungos e relataram que a utilização de efluentes na produção de lipase é um processo de baixo custo, portanto viável.

Vargas (2004) realizou estudo utilizando torta de soja juntamente com outros subprodutos agroindustriais para a obtenção de lipase demonstrando que o emprego destas matérias primas de baixo custo podem vir a diminuir o preço final desta enzima.

A partir de todos os resultados obtidos, conclui-se que mesmo que as condições com os indutores óleo de gergelim a 30% e azeite de oliva a 15% mostrassem, respectivamente, valores de biomassa e proteínas superiores, isso não foi suficiente para que induzisse com eficiência uma boa atividade de lipase, a qual foi obtida a partir do indutor óleo de gergelim a 15%. Isto porque nem sempre há correlação entre a quantidade de biomassa e a produção da enzima, uma vez que o peso seco celular pode variar nos diferentes estágios de vida da cultura (BROOKS et al., 2014). Outro fator que influenciou na divergência de valores é que no extrato bruto utilizado para dosar as proteínas nem todas as enzimas presentes eram lipases.

Conney (1981) afirma que as condições às quais se submete o micro-organismo afetam em muito no crescimento do mesmo e na formação do produto a ser obtido, portanto é preciso avaliar a relação entre o ambiente físico e químico e a regulação do metabolismo do micro-organismo. Todos os fatores envolvidos neste estudo influenciaram de forma positiva ou negativa na indução da atividade de lipase, tais como substrato utilizado, temperatura, período de produção, pH, concentração dos indutores, e até mesmo a oxigenação oferecida.

Observou-se ainda que por mais que a condição com óleo de gergelim a 15% possuísse uma das menores concentrações de indutores este foi capaz de induzir boa atividade enzimática com mais sucesso que indutores empregados em maiores

concentrações. Pode-se sugerir que um dos motivos que levou o *A. niger* a produzir mais lipase com menor concentração de indutor seria que ao estar diante de uma situação de "escassez de alimento" a alternativa foi liberar o máximo de enzima possível para garantir sua sobrevivência. Substratos e condições fisiológicas diferentes alteram o metabolismo do fungo, resultando na secreção de enzimas, que vão degradar nutrientes necessários para sua sobrevivência, ou seja, a variação de indutores pode levar a variação de sua resposta na produção de interesse (RUTZ et al., 2008; SILVA et al., 2003).

Outra hipótese que justifica este resultado, seria a descrita por Pandey et al. (1999), de que partículas de substrato de menor tamanho podem causar aglomeração do substrato, e interferir na respiração microbiana, resultando em pouco crescimento. Sendo assim, partículas de maior tamanho oferecem uma aeração melhor devido aos espaços entre as partículas, limitando a superfície para um ataque microbiano. Segundo Mitchell et al. (2000), um tamanho ótimo de partícula facilita o acesso do fungo aos nutrientes e disponibiliza a quantidade necessária de oxigênio. Neste estudo, pode-se sugerir que o indutor a 30% tornou o meio muito concentrado, causando aglomeração deste substrato, o que interferiu no metabolismo e conseqüentemente no sucesso de produção do fungo e quando estes indutores estavam em menores concentrações houve uma melhoria das condições de aeração, o que facilitou a ação do micro-organismo frente ao substrato disponibilizado (CORREIA, 2004).

6 CONCLUSÃO

Conclui-se a partir da análise dos dados obtidos que entre os dois indutores utilizados, azeite de oliva e óleo de gergelim, o que mostrou maior sucesso em induzir a produção de lipase foi o óleo de gergelim, na concentração de 15%, sugerindo a possibilidade do emprego de um indutor de baixo custo para obtenção de lipases fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Revista Uningá**, Maringá: v.21, n.1, p 55-59, jan./mar. 2015.
- ADHIKARI, A. et.al. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. **Environment International of Bose Institute Kolkata**, Bangal: v.29, n.8, p 1071-1078, fev. 2004.
- ARAÚJO FILHO, G. et al. Políticas públicas para a biotecnologia no Brasil. **Revista Biotecnologia e (Bio)Negócio no Amazonas**. Manaus: Editora da Universidade Federal do Amazonas. v.1, cap.1, p14-16, 2015.
- BARBOZA, D. C.; FARINAS, C. S.; COURI, S. Efeito do método de conservação do fungo *Aspergillus niger* na produtividade enzimática. **Anais da I Jornada Científica – Embrapa São Carlos**. São Carlos: v.1, n.1, p4, out. 2009.
- BARRETO, M.. Doenças do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Camargo, L.E.A, Eds. **Manual de Fitopatologia– Doenças das Plantas Cultivadas**. 4^a. ed., São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda v.2, cap.10, p. 65-72, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry of University of Georgia**. Georgia: v.72, n.1, p. 248-254, may. 1976.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. AMGH Editora Ltda. 26^a edição. 2014.
- BUDZKO, D. B.; NEGRONI, R. Hemolytic, cytotoxic and complement inactivating properties of extracts of different species of *Aspergillus*. **Mycopathologia**, v.57, n.1, p23-26, jan. 1975.
- CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas. **Universidade Estadual de Campinas- Revista Química Nova**. Campinas: v. 28, n. 4, p 614-621, abr. 2005.
- CASTRO, A. M. Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidos a partir de celulignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.). **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro**. 240p, 2006.
- CHEHRI, J. Factors affecting the growth of biomass of *Aspergillus Niger*. **PhD Scholar at Moscow State Academy of Veterinary Medicine.Biotechnology (K.I. Skryabin)**. **Medical Sciences and Public Health**. Moscow: v.1, n.1, p1–5, apr. 2013.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**. Passo fundo: v.4, n.2, p 1-14. 2012.

CONNEY, C. L. Growth of Microorganism. In: **Biotechnology, 1. Microbial Fundamentals**, H. J. Rehm e G. Red (ed.). Florida: v. 2, p 73-112. 1981.

CORREIA, R. T. P. Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. **Tese-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. Natal: p. 31. Abril. 2004.

DUTKIEWICZ, J., et al. Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in a potato processing plant. **Ann Agric Environ Medicine of Department of Occupational Biohazards, Institute of Agricultural Medicine**. Lublin: v.9, n.2, p 225-235, feb. 2002.

DUTRA, J. C. V. Produção de lipase por *Aspergillus niger* 11t53a14 através de fermentação em estado sólido para a síntese de biodiesel. **Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de química, Programa de pós-graduação em Engenharia Química**. Rio de Janeiro, ago. 2007.

FERNANDES, et. al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Department of Chemistry, Universidade Federal do Paraná. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Amsterdam: v.44, n.1, p. 8-13, jan. 2007.

GOMES, et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Revista Química Nova**. Lorena-SP: v.29, p710, mar. 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. New York: v. 39, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K. E., et al. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Amsterdam: v. 3, p. 3-12, 1997.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillusniger* by solidstate fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**. London: v. 33, p. 505-511, 1998.

KLICH, M. A. Biogeografy of *Aspergillus* species in soil an litter. **Mycology**. New York: v.94, n.1, p 21-27, jan. 2002.

LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracelular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**. China: v.40, p 445-451, jan. 2008

LOPES, M. A.; NASS, L. L.; MELO, I. S. Bioprospecção: Biotecnologia aplicada a prospecção e uso de serviços e funções da biodiversidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. São Paulo: n. 34, p. 29-35, jun. 2005.

MAHADIK, et al. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**. London: v. 39, n. 12, p. 2031–2034, 2004.

MAHADIK, et al. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation**. *Process Biochemistry*, London, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**. Essex: v. 99, p. 1729-1735, 2008.

MAIA, M. M. D. et a. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**. Orlando: v.76, n.1, p.23-27, 2001.

MESSIAS J. M. ,1 ; Costa B. Z., Lima, V. M. G. ; Giese, E C. ; Dekker R. F.H. ; Barbosa, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina: v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v. 68, p. 61 – 138, 2000.

MOURA, L. et al., Bioprospecção de atividade lipolítica de fungos anemófilos isolados do centro vocacional tecnológico de Tauá-CE. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande: v.15, n.2, p.157-165, 2013.

OLIVEIRA, J. C. **Atlas de Micologia Médica**. 52 p. 2013.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162. 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. Amsterdam: v. 13, p. 81-84, 2003.

PASTORE, G., COSTA, V. S. R., KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Revista Ciência e Tecnologia Alimentar**. Campinas: v.23 n.2, May/Aug. 2003.

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrocosum* como microrganismo.

Departamento de Ciências Agrárias- Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Erechim- RS: v.1, p36, mar. 2006.

PIRES, et al., Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da caatinga, uma floresta tropical seca no nordeste do Brasil. **Revista Gaia scientia (2015)- Edição Especial Cactaceae.** Pernambuco: v.9, n.2, p 155-161, out. 2015.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Revista Ciência e tecnologia de alimentos,** Campinas: v. 30 n.1, p. 126-131, jan./mar. 2010.

RUTZ, F., TORERO, A, FILER, K. Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas. **Revista Aveworld.** v.29. 2008.

SALGADO, V. M. B. Optimization of lipase production in lipase-producing yeasts strains isolated from olive mil wastewater. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada).** Departamento de biologia vegetal, Universidade de Lisboa. Lisboa, 2015.

SANTAELLA, S. T. et al. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus Niger*. **Engenharia Sanitária Ambiental.** v.14, n.1, p.139-148, 2009.

SANTOS, S. F. M. Estudo da Produção de Pectinases por Fermentação em Estado Sólido Utilizando Pedúnculo de Caju como Substrato. **Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.** Natal-RN, 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances.** v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, C.M. M. de S. et al. Production of phenol-oxidases and peroxidases by fungi isolated from irrigated rice. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.34, p53-55. 2003.

SILVA et al. Naringinase de *Aspergillus niger*. Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. **Semina: Ciências Agrárias.** Londrina, v. 32, n. 3, p. 1049, jul/set, 2011.

TRABULSI, L. R. et.al. **Microbiologia.** Editora Atheneu, São Paulo: v.3, 718 p, 2002.

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO. **Guia para normalização de trabalhos acadêmicos.** Bauru: v.5, p 1-105, fev. 2015.

VALOIS, A. C. C. Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual. **Brasília, Cadernos de Ciência & Tecnologia.** v.15, n. especial, p. 21-31, 1998.

VARGAS, G. D. L. P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. **Departamento de Ciências Agrárias-**

Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Erechim- RS: v.1, p36, mar. 2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. "Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches". **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v. 9, p. 113–148, 2000.

WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. "Green Chemistry". **Environmental Impact Assessment Review.** New York: v. 24, p. 775-799, 2004.

ZANETI, V. M. Produção de xilanases por *Aspergillus niger* utilizando planejamento experimental: purificação de xilanase. 74 f. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química.** Araraquara: 74 f, out. 2012.