

# ESTUDOS BIOQUÍMICOS DE LIPASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma harzianum*

GUIMARÃES, Sejana Martins<sup>1</sup> ; ULHOA, Cirano José<sup>2</sup> .

Palavras-chave: purificação parcial, *Trichoderma harzianum* ,lipase.

## 1. INTRODUÇÃO

As lipases pertencentes ao grupo das serino hidrolases (E.C. 3.1.1.3) e são definidas como enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (Carvalho *et al.*, 2003). Sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa (Pastore *et al.*, 2003). Possuem um oligopeptídeo helicóide, uma espécie de “tampa” que protege o sítio ativo.

Tecnologias alternativas tem gradualmente surgido frente à importância das lipases nos processos industriais, determinando estratégias de purificação que são de baixo custo, rápidas e que permitam operação em larga escala. Estas enzimas geralmente não requerem cofatores e não realizam reações paralelas. No caso mais geral, lipídeos ou mesmo moléculas sintéticas, podem sofrer vários tipos de transformações catalíticas por lipases e associando a estas transformações a seletividade das reações, vislumbra-se um enorme escopo de aplicações constituindo o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas (Jaeger & Eggert, 2002), tendo em vista a comprovação de lipases permanecerem ativas em solventes orgânicos (Zaks & Klivanov, 1984) apresentando uma ferramenta ideal para a química orgânica. Podem ser amplamente usadas no processamento de óleos e gorduras, detergentes e formulações desengraxantes, processamento de alimentos, síntese de produtos para a química fina (síntese orgânica) e fármacos, manufatura de papel e produção de cosméticos (Sharma *et al.*, 2001), bem como na degradação de efluentes gordurosos (Masse *et al.*, 2001) e polurietano (Takamoto *et al.*, 2001).

As lipases são capazes de catalisar diferentes reações, tais como: hidrólise, esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação e alcoólise), aminólise e tiotransesterificação. Todas com especificidade quiral, (Villeneuve *et al.*, 2000). As lipases são produzidas por uma variedade de seres vivos, como vegetais, animais e microrganismos, destacando-se a produção por fungos devido a facilidade de extração e isolamento.

O fungo *Trichoderma harzianum* tem se destacado como um potente produtor de uma gama de enzimas hidrolíticas como:  $\alpha$ -amilase, celulase, lipase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fosfatases ácida e alcalina (Stendorff, 2006). Além de um excelente produtor de enzimas, este gênero se destaca pela sua importância no controle biológico representando muito interesse para fins biotecnológicos. Assim sendo, tornou-se de nosso interesse estudar a produção e caracterização de lipases produzidas por fungos da espécie *T. harzianum* .

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1. Origem e manutenção dos fungos**

A cepa do fungo *T. harzianum* (ALL 52) da coleção do Laboratório de Enzimologia ICB/UFG foi mantido em meio MYG (0.5% de extrato de malte; 0.25 % extrato de levedura; 1.0 % glicose; 2.0% de ágar).

### **2.2. Produção de lipase**

Discos de meio MYG com esporos do fungo foram inoculados em meio TLE (1g/L de bactotripton, 0.3g/L de uréia, 2.0g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e solução de elementos traços), suplementado com 0.5% ração animal para frangos como indutor por 72 horas de incubação em agitador rotatório a 28°C e 140 rpm. O sobrenadante da cultura foi utilizado como fonte de lipase.

### **2.3. Atividade enzimática**

A atividade de lipase foi determinada usando um método de Heinoen e Lahti (1981), acrescentando-se 100  $\mu\text{l}$  de substrato (5.0 mM) { $p$ -nitrofenol-palmitato-( $p$ -NPP) (Sigma Chemical Company<sup>®</sup>)} com adição de 1% de Triton X-100 em 700  $\mu\text{l}$  de solução tampão Tris HCl, pH 8.0 e 100  $\mu\text{L}$  de enzimas. A reação foi interrompida com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio (100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

### **2.4. Dosagem de proteínas totais**

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford *et al.* (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA–Sigma<sup>®</sup>) como padrão.

### **2.5. Eletroforese Desnaturante (SDS-PAGE)**

Para a análise do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *T. harzianum* e o grau de pureza da enzima estudada nas etapas de purificação, foram utilizados o sistema de eletroforese (Hoefler mini VE system – Amersham Biosciences<sup>®</sup>) em gel de poliacrilamida a 12%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). A coloração foi realizada com nitrato de prata de acordo com o método descrito por Blum *et al.* (1987).

### **2.7. Purificação parcial da lipase**

O sobrenadante do meio de cultura TLE inoculado com o *T. harzianum* por 72 horas foi filtrado e aplicado em uma coluna de troca iônica Q-Sepharose High Performance (1.5 cm x 16.0 cm), previamente equilibrada com o tampão acetato pH 5.0, com um fluxo de 60  $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$ . A coluna foi lavada com tampão acetato; posteriormente foi aplicado um gradiente variando a concentração do tampão de 0 a 1.0  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de cloreto de sódio, e finalmente, lavada com tampão acetato de sódio pH 5.0, 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 1.0  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de NaCl.

### **2.8. Caracterização da lipase DE *T. harzianum***

O extrato bruto aplicado em coluna de cromatografia Q-Sepharose (figura 1) apresentou dois picos de atividade de lipase, as frações de maior atividade (pico II) foram reunidas para caracterização. Durante a

caracterização da lipase foram determinados: massa molecular, pH ótimo, temperatura ótima, termoestabilidade, efeito de íons metálicos e outros compostos, estabilidade em solventes orgânicos, constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), velocidade máxima da reação ( $V_{máx}$ ) e análise cromatográfica da lipase em óleo de soja. Para determinação da massa molecular as frações do pico II foram reunidas e concentradas por liofilização e posteriormente aplicado em coluna de cromatografia de gel filtração Sephacryl S-200 apresentando apenas um pico de atividade de lipase (figura 2).

Figura 1

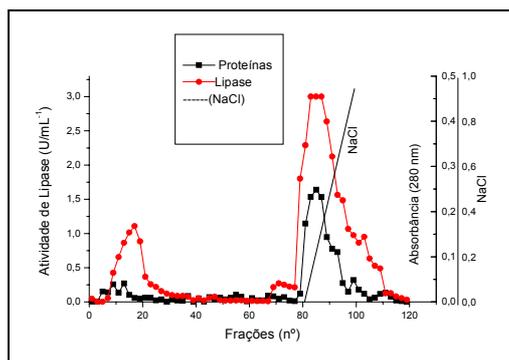
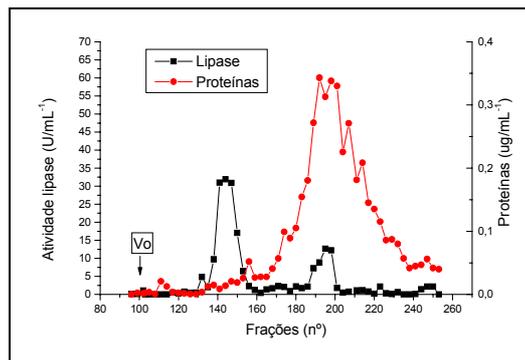


Figura 2



**Figura 1.** Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *T. harzianum* aplicado em coluna de interação hidrofóbica, Q-Sepharose -■- Proteína ( $A_{280nm}$ ); -●-Atividade de lipase; - ---- gradiente de NaCl (0 – 1.0 mol.L<sup>-1</sup>).

**Figura 2.** Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *T. harzianum* aplicado em Sephacryl S-200 -●- Proteína ( $A_{280 nm}$ ); -■-Atividade de lipase;  $V_0$  = volume vazio.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sobrenadante de TLE aplicado em coluna de cromatografia Q-Sepharose apresentou dois picos de atividade de lipase evidenciando a presença de duas lipases. Entretanto, apenas a lipase das frações de maior atividade foi parcialmente purificada e caracterizada.

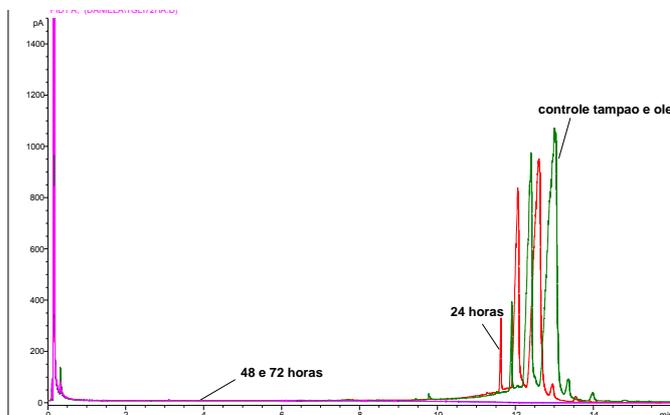
**Tabela 01.** Propriedades bioquímicas da lipase produzida por *T. harzianum*

Massa molecular (kDa)	78
pH ótimo	8,0
Temperatura ótima	40°C
Termoestabilidade pH 8.0/30min/40°C	80%
$K_m$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	660.4
$V_{máx}$ (U)	33.64

A lipase foi estável em relação a íons e outros compostos como:  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\beta$ -2-mercaptoetanol, EDTA,  $\text{CaCl}_2$ , e  $\text{MnCl}_2$ , nas concentrações de 2 e 5 mmol.L<sup>-1</sup>, porém, foi ativada por  $\text{CuSO}_4$  na concentração 5mmol. L<sup>-1</sup> e inibida por NaCl na concentração de 5 mmol.L<sup>-1</sup>. Em relação aos solventes, na presença de 5%(v/v) de acetona, benzeno, etanol, isopropanol, isobutanol e heptano a enzima foi inibida. Em relação ao metanol a atividade da lipase foi ativada na concentração de 1% e manteve atividade relativa acima de 74% para as demais concentrações. Para o heptano na concentração de 1% a

enzima mantém 91% de sua atividade, entretanto, nas demais concentrações a enzima teve decréscimo significativo de sua atividade.

O efeito da lipase em óleo de soja pode ser demonstrado na figura 3, onde observa-se que houve degradação total à partir de 48 horas.



**Figura 3.** Efeito da ação da lipase em óleo de soja em 24, 48 e 72 horas.

#### 4. CONCLUSÃO

- Otimização da produção da lipase através de estudos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio;
- Desenvolvimento de metodologia de purificação parcial lipase produzida por *T. harzianum*;
- Caracterização bioquímica da lipase produzida por *T. harzianum*;
- Estabilidade da lipase em relação ao metanol;
- Atividade hidrolítica da lipase em óleo de soja.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLUM, H.; Beier, H. & Groos, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93 – 99, 1987.

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*, 1976.

HEINOEN, J. K., and R. J. Lahti. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphate. *Anal. Biochem.* 133:313–317, 1981.

JAERGER, K-E.; Eggert, T.; “Lipases for biotechnology”. In: *Current Opinium in Biotechnology*. V.13, n. 4. p. 390-397, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.

MASSE, *et al.*, The effect on an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles, in slaughterhouse wastewater. In: journal of Chemical Technology and Biotechnology. V. 76, n. 6, p. 629-635, 2001.

PASTORE, G. M; Vinicius dos Santos R. da Costa; Maria Gabriela B. Koblitz. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003.

SHARMA, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. Biotechnology Advances. v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

STEINDORFF A. S.; Ulhoa C. J. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Thichoderma harzianum* e sua aplicação biotecnológica em ração animal. VII seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Caxias do Sul/RS, 21 a 24 de maio de 2006.

TAKAMOTO, T. Shirasaka, H. Uyama, H Kobaysho, S. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. In: Chemistry Letters. N. 6, p. 492-493, 2001.

VILLENEUVE, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.M. Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 9, p. 113-148, 2000.

ZAKS, A. & Klivanov, A.M. "Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. In: Science. V. 224, n. 4654, p. 1249-1251, 1984.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/Capes

<sup>1</sup> Pós – graduação. Instituto de Ciências Biológicas-Laboratório de Enzimologia / UFG, [sejanamartins@yahoo.com.br](mailto:sejanamartins@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Orientador/Instituto de Ciências Biológicas /UFG, [ulhoa@icb.ufg.br](mailto:ulhoa@icb.ufg.br)