

## NOTA CIENTÍFICA

### POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE LIPASES E FOSFOLIPASES POR *Trichoderma harzianum* PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

SILVA, Diego Pereira da\*, GELLEN, Luís Fernando Albarello\*\*, CHAGAS JÚNIOR, Aloísio Freitas\*\*\*, SCHEIDT, Gessiel Newton\*\*\*\*

#### Resumo

A indústria de processamento de alimentos emprega diversas enzimas de caráter tecnológico e que tenham características desejáveis. Novas fontes de produção de enzimas são de extrema importância para o desenvolvimento de inovações técnicas de processamento e expansão do mercado da indústria de alimentos. O fungo *Trichoderma harzianum* já vem se destacando como um potente produtor de uma gama de enzimas hidrolíticas utilizadas no combate a pragas de áreas de cultivo. No presente trabalho foi avaliado o potencial de produção de lipases a partir da mensuração do halo de degradação em placapor *T. harzianum* contendo rodamina B e Ágar Sabouraud ambos modificados nas temperaturas 28 °C e 37 °C por um período de sete dias em quatro ensaios. Foram utilizados os meios de cultura Ágar Sabouraud acrescido de lecitina de ovo para o teste de lípases, e para a ação fosfolipídica meio YMG acrescido de Ômega 9 de azeite de oliva e rodamina (indicador de atividade). Ao final do período de incubação, foi possível observar a formação de um halo de degradação do meio,

\* Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Departamento de Ciências Agrárias e Tecnológicas; Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; Gurupi, TO; diego\_tecnologo@hotmail.com

\*\* Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Departamento de Ciências Agrárias e Tecnológicas; Universidade Federal do Tocantins; gellenbiomedico@hotmail.com

\*\*\* Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; chagasjraf@mail.uft.edu.br

\*\*\*\* Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; 77402-970; gessielscheidt@yahoo.com.br

característica da produção de lipases, que posteriormente foram mensuradas com um paquímetro. A atividade lipídica medida a partir dos ensaios 1 e 2 obtiveram médias de 0,4 mm. Para o ensaio 3, foram encontrados 0,2 mm e o ensaio 4 com média de 0,1 mm de degradação do meio, que corresponde à atividade de lipases.

Palavras-chave: Halo. Degradação. Mensuração. Enzimas.

### ***Potential production of lipases and phospholipases by trichodermaharzianum for the food industry***

#### *Abstract*

*The food processing industry employs several enzymes with technological character and which have desirable characteristics. New sources of enzymes production are of utmost importance for the development of processing and expansion technical innovations of the food industry market. The Trichodermaharzianum already has emerged as a potent producer of a range of hydrolytic enzymes used to combat pests of cultivated land. The present study evaluated the potential of lipase production from the measurement of the halo of degradation plaque by T. harzianum containing rhodamine B and Agar sabouraud, both modified in temperatures of 28 °C and 37 °C for a period of seven days, four essays. It was used agar growing media sabouraud plus egg lecithin to test lipase and phospholipid share the YMG medium supplemented with Omega 9 olive oil and rhodamine (activity indicator). At the end of the incubation period, it was possible to observe the formation of a halo of environment degradation, characteristic of lipase production, which subsequently was measured with a caliper. The lipid activity from the measured tests 1 and 2 had average of 0.4 mm. For test 3, 0.2 mm. were found, and the test 4, with an average of 0.1 mm. for environment degradation, which corresponds to lipase activity.*

*Keywords: Halo. Degradation. Measurement. Enzyme.*

## **1 INTRODUÇÃO**

A investigação por novas fontes enzimáticas e substâncias antimicrobianas vem se intensificando nas últimas décadas. Fungos e algumas bactérias que antes eram apenas utilizados em áreas muito específicas estão sendo explorados e aplicados em outros setores, como o caso do *Trichoderma harzianum* utilizado em processos de combate a pragas de áreas e cultivos agropecuários, começam a ser explorados para outras aplicações (FONSECA et al., 2012).

Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. vivem livremente no meio ambiente ou parasitando outras espécies de fungos, podendo ser encontrados tanto em rizosfera de plantas quanto em qualquer tipo de solo em que há matéria orgânica em abundância como fonte de carbono e nitrogênio (VITERBO; CHET, 2006; HARMAN, 2006).

Fungos e bactérias têm sido os alvos de estudos em razão das suas capacidades de secretar enzimas e produtos para fins industriais, alimentícios, agrícola, farmacológicos e têxteis (GANDA et al., 2005). O fungo *T. harzianum* já vem 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 (STEINDORFF, 2006).

A utilização de enzimas nos processos industriais apresenta um grande potencial em razão da sua alta especificidade e eficiência. As enzimas podem executar uma série de transformações químicas de modo seletivo, rápido e versátil, e não requerem altas temperaturas ou valores hostis de pH para execução das suas atividades enzimáticas (GONÇALVES, 2007; SALUM et al., 2007).

As lipases (triacilglicerolacilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, atuando na interface orgânico-aquosa, demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não aquosos, ao contrário de outras enzimas (SAXENA et al., 1999; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, as lipases microbianas são as mais utilizadas e, na sua maioria, não são nocivas à saúde humana (JAEGER et al., 1994). As lipases são utilizadas nas mais diversas áreas industriais, promovendo hidrólises, esterificações, transesterificação, especificamente em hidrólise de gorduras do leite, agentes flavorizantes, remoção de manchas de óleos e produção de biodiesel (DURLI, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipases a partir da cinética de crescimento do halo de *T. harzianum*, em meios modificados sob condições diferentes de temperatura e tempo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da Fundação Universidade Federal do Tocantins, *Campus* universitário de Gurupi no Sul do Estado de Tocantins (11°74'S e 49°04'W, altitude 287 m).

As cepas utilizadas de *T. harzianum* foram obtidas previamente do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia da Incubadora de Empresas da UFT. A cepa foi escolhida de acordo com a avaliação das melhores características observadas no controle biológico evidenciadas em outros estudos.

As cepas foram repicadas em meios de nutrição e conservação ágar nutriente 0,15% de nitrogênio, 2,3% de cinzas, 0,16% de cinza ácida insolúvel, 0,12% de magnésio, 0,34% de cálcio, 0,018% de ferro e temperatura gelificante entre 36 °C e 38 °C e ágar batata dextrose.

Após a nutrição do *T. harzianum*, as cepas foram repicadas em dois meios diferentes, Ágar Sabouraud, e YMA (extrato de levedura, manitol e Ágar), ambos modificados para a evidênciação de ação de lipases.

O Ágar Sabouraud composto de agarose, pectina e D-glucose foi acrescido de cloreto de sódio (0,005 M), cloreto de cálcio (0,005 M) e 8% de lecitina de ovo. O YMA foi suplementado com 2,5% de azeite de oliva (ômega 9) e 0,001% de rodamina (corante indicador).

Os meios YMA acrescidos com azeite de oliva, corante indicador rodamina e Ágar Sabouraud com lecitina de ovo, contendo as estirpes inoculadas, foram incubados em duas temperaturas diferentes 37 °C e 28 °C. A mensuração da degradação do meio foi realizada a cada 24 horas em um intervalo de sete dias com um paquímetro dos raios das circunferências degradadas. A Tabela 1 evidencia os métodos de incubação e mensuração dos halos no decorrer do trabalho.

Tabela 1 – Esquematização do método de incubação dos meios modificados para a ação do *T. harzianum*

Meio	Leituras (horas)
Sabouraud de Rodamina B37 °C	24, 48, 72, 96, 120, 144, 168
Sabouraud de Rodamina B28 °C	

Fonte: os autores.

A ação da enzima lipase foi aferida pelo método descrito por Kouker e Jaegger (1987), modificado por Nascimento e Campos Takaki (1993) e a ação de fosfolipase, pelo método descrito por Hankin e Anagnostakis (1975).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras horas de incubação dos meios nas duas diferentes temperaturas 28°C e 37 °C não foi possível observar modificações e características de degradação ou descoloração do meio, entretanto, a partir das 72 horas, pôde-se evidenciar a produção de lipases. O resultado positivo é visualizado pela descoloração do meio, o reagente de cor avermelhado adicionado anteriormente, a rodamina, que está aderida ao meio, é degradada de acordo com a ação das lipases, ou seja, é observada a formação de halos claros ao redor das colônias, que correspondem às zonas do substrato hidrolisado.

Os valores das medições dos halos de degradação dos ensaios estão dispostos na Tabela 2:

Tabela 2 – Leituras dos ensaios de mensuração (mm) do halo de degradação de lipases produzidas por *T. harzianum*

Leituras (horas)	Ensaio 1 (Rodamina B) (37 °C)	Ensaio 2 (Sabouraud) (37 °C)	Ensaio 3 (Rodamina B) (28 °C)	Ensaio 4 (Sabouraud) (28 °C)
24	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	0	0	0	0
96	0,4	0,3	0,1	0,2
120	0,5	0,5	0,3	0,2
144	0,8	0,7	0,5	0,4
168	1,1	1,3	0,7	0,5

Fonte: os autores.

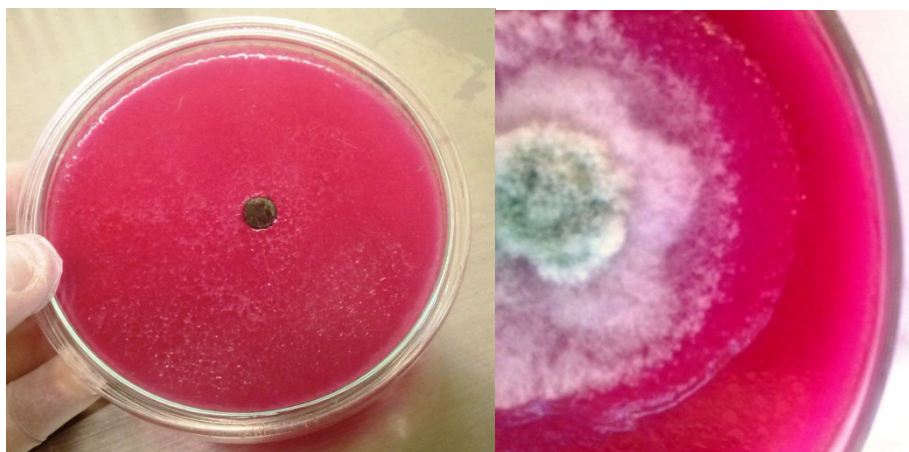
Com base nos dados obtidos, é possível observar a ação enzimática de cada teste nos períodos de avaliação, sendo os seguintes resultados: ensaios 1 e 2 com médias de 0,4 mm, ensaio 3 com média de 0,2 e ensaio 4, com 0,1 mm. O ensaio 1 obteve uma amplitude de crescimento de 0,7 mm comparando o tempo de 96 a média de 168 horas. Ainda na temperatura de 37 °C, foi observada a maior degradação do meio, o ensaio 2 obteve 1,3 mm na mensuração final, um crescimento de 1 mm em 72 horas.

Os ensaios 3 e 4 alcançaram resultados um pouco menores em virtude da temperatura que não corresponde à temperatura ótima do fungo e da enzima produzida. Os ensaios 2 e 4 são controles negativos, ou seja, para avaliar o crescimento natural do micro-organismo perante o meio nutritivo, para, desse modo, não ocorrerem resultados falso-positivos.

Durante os dois dias iniciais da avaliação do teste de fosfolipase não foi observada degradação nos ensaios; isso é decorrente da fase lag de aclimatação e acondicionamento do meio. Após as 72 horas, pôde-se verificar a formação de halo em ambas as temperaturas de incubação (28 °C e 37 °C). Contudo, o teste a 28 °C obteve uma discreta redução de diâmetro de seu halo (0,9 mm), apesar disso, as placas incubadas a 37 °C evidenciaram uma formação de halo de 1,1 mm.

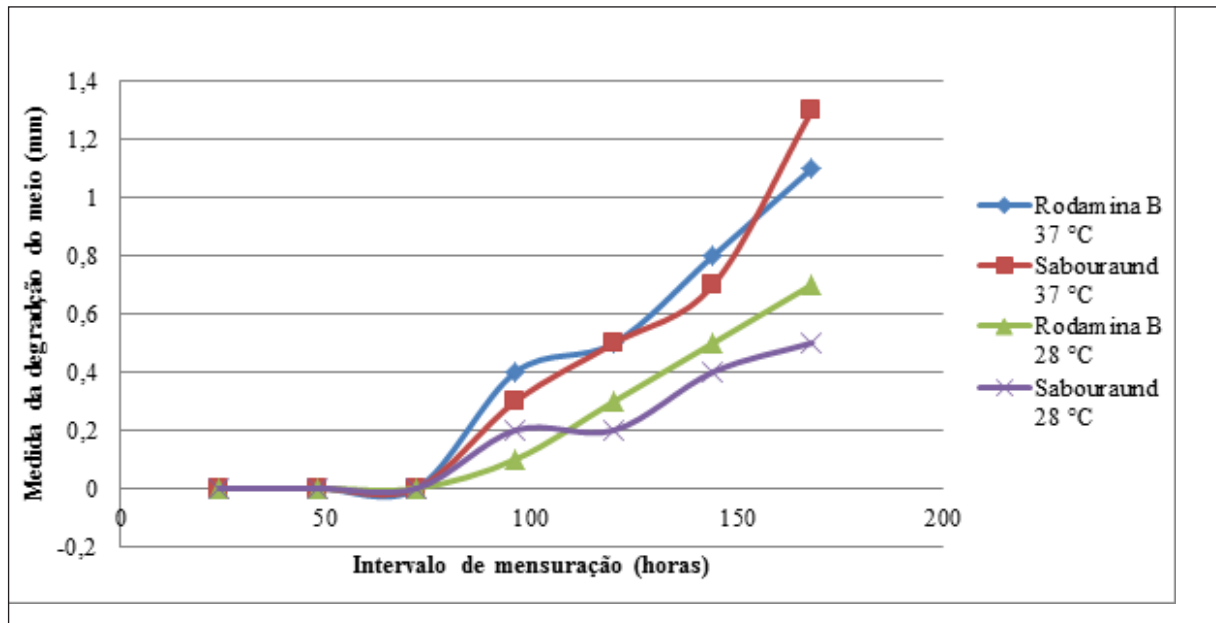
A Fotografia 1 mostra o halo de degradação ocasionado pela ação enzimática por lipases de *T. harzianum* em meio YMG acrescido com rodamina:

Fotografia 1 – Teste de produção de fosfolipase com rodamina B, por *T. harzianum*. 1: Início do crescimento; 2: degradação fosfolipídica com a visualização do halo



Fonte: os autores.

No período do terceiro ao sétimo dia de leitura, os halos obtiveram um aumento de em média de 0,7 mm para os testes a 37 °C, e os testes a 28 °C alcançaram crescimento médio de 0,6 mm (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Medidas das degradações dos meios por *T. harzianum* em relação ao tempo e temperatura

Fonte: os autores.

Os resultados observados no Gráfico 1 mostram o melhor desenvolvimento e produção de lipases no ensaio com temperatura de 37 °C, obtendo o pico máximo do raio do halo de 1,4 para as cepas incubadas no meio sabouraud. Esse fato ocorre pelo motivo da adição de lecitina de ovo.

Observando os ensaios submetidos a temperaturas de 37 a 28 °C, foi possível verificar que o meio contendo rodamina interferiu no desenvolvimento do *T. harzianum* e na ação das lipases. Contudo, os ensaios em que a rodamina não foi adicionada ao meio, os resultados obtiveram aumento de 0,2 mm nos halos de degradação correspondente à quantidade de lipases. Em outras palavras, a rodamina interferiu no desenvolvimento do fungo, conseqüentemente, na ação das lipases em ambas as temperaturas testadas (Gráfico 1). No final do período avaliado, obteve-se um halo de atividade de fosfolipases produzidas por *T. harzianum* de aproximadamente 3 mm para temperaturas a 37 °C e 2,6 mm a 28 °C. Os resultados evidenciam o potencial de produção de enzimas lipolíticas por *T. harzianum*.

A Fotografia 2 mostra o halo de degradação realizado pela ação enzimática por fosfolipases de *T. harzianum* em meio *sabouraud* suplementado com 0,005M de cloreto de cálcio, 0,005M de cloreto de sódio com adição de 8% de lecitina de ovo.



Fotografia 2 – Meio de cultura Ágar Sabouraud acrescido de cloreto de sódio (0,005M), cloreto de cálcio (0,005M) e 8% de lecitina de ovo, com a atividade visível de lipases na região esbranquiçadas



Fonte: os autores.

A partir da visualização de degradação do meio, composto de lecitina de ovo, pôde-se chegar a um resultado visual de descoloramento do meio com aparecimento de áreas de características peculiares à degradação por lipases. Segundo Melo (1998), os fungos do gênero *Trichoderma* têm habilidade significativa de biossíntese e facilidade de crescer em meio simples, contendo basicamente glicose como fonte de carbono e alguns tipos de compostos orgânicos essenciais. Essa capacidade é de suma importância, pois facilita a produção de enzimas de interesse industrial.

As enzimas compreendem a uma série de reações catalíticas importantíssimas à indústria de alimentos, pois estão envolvidas no processo de modificações de odores e sabores característicos dos alimentos. As lipases preferencialmente degradam cadeias de ácidos graxos de tamanhos diferentes, alterando o produto de modo considerável. A produção de aromas em produtos lácteos é acelerada quando há a formação de ácidos graxos livres, peptídeos solúveis e aminoácidos durante a maturação do produto. As lipases têm sido utilizadas para a produção desses aromas (SAID; PIETRO, 2004).

Os ácidos graxos livres (AGLs) gerados pela ação das lipases sobre a gordura do leite, permitem o incremento de inúmeros novos produtos como, por exemplo, os queijos leves, que apresentam características próprias de aroma (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A utilização de enzimas não se delimita somente na modificação de produtos na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas como fortes detergentes, atuando na degradação de gorduras que ocasionam transtornos nos laticínios e frigoríficos.

O gênero *Trichoderma* é caracteristicamente aeróbico, produzindo dióxido de carbono pelo seu metabolismo, sendo possível a sua inibição parcial ou total de crescimento. O trabalho aqui desenvolvido foi conduzido em sistema aeróbico, entretanto uma maior produção de enzimas extracelulares, no caso as lipases, pode ter sido suprimida pelo seu crescimento e produção de CO<sub>2</sub>.

Os ensaios 3 e 4 de rodamina B e sabouraud incubados A 28 °C, após as 144 horas do início das observações, apresentaram leve diminuição do seu crescimento. Esse fato se deve às condições que ofereciam o meio, já bem modificadas no que diz respeito ao pH e ao microambiente saturado

com uma certa quantidade de CO<sub>2</sub>. Outro motivo é a faixa de temperatura ótima de crescimento, temperaturas acima de 28 °C influenciam um maior halo de degradação e descoloração do meio. Isso é comprovado pelos outros dois ensaios, 1 e 2, ao contrário do que foi visto nos ensaios 3 e 4, nos quais não foi observada a estagnação de forma relevante. Após as mesmas 144 horas de incubação, o crescimento de seu halo ainda era observado (Tabela 2). A termoestabilidade das enzimas varia consideravelmente em relação à sua origem, as enzimas fúngicas possuem maior estabilidade térmica (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

Segundo Castro, Mendes e Santos (2004), o fungo *Rhizomucormiehei* é utilizado como produtor de lipases para a aceleração da maturação no processo de fermentação de salsichas, desse modo, o *Tichodermaharzianum*, que tem características semelhantes na produção de lipase, poderia realizar de forma análoga o papel do *R.miehei*.

De modo geral, as lipases de origem microbiana apresentam uma série de vantagens em relação às lipases procedentes de vegetais e de animais, que são obtidas de tecidos pré-gástricos e glândulas de animais. Lipases de origem microbiana são mais fáceis de serem separadas, pois em sua maioria são enzimas extracelulares. Atualmente, são utilizados vários preparados microbianos de lipases, desenvolvidos especialmente para a manufatura de queijos, como *Aspergillusniger*, *A. oryzae* e *Mucormiehei* (SAID; PIETRO, 2004; MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Segundo Lima (2002), os micro-organismos produtores de enzimas mais comumente utilizados são, na maior parte das vezes, por fungos, em especial os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Para Oliveira et al. (2006), o desenvolvimento e a identificação de novos métodos e, principalmente, novas fontes microbianas produtoras de enzimas de interesse que não possuam características ofensivas ao organismo humano são importantíssimos, pois garantem o suprimento de enzimas aos processos industriais, otimizando e reduzindo custos.

As lipases degradam de forma específica as cadeias lipídicas quase por completo; na maioria das vezes, essas enzimas podem ser aliadas à indústria de alimentos na transformação e na conservação de uma gama de alimentos, como, por exemplo, no controle de rancificação de carnes, peixes e aceleração do processo de cura de queijos e derivados (OLIVEIRA et al., 2006).

O fungo *T. harzianum* estudado neste trabalho foi capaz de produzir lipases e fosfolipases em experimento *in vitro*, avaliando a degradação e a formação de halo em placas contendo meio composto por lipídeos e incubadas a diferentes temperaturas.

Em estudo desenvolvido por Guimarães e Ulhoa (2006), foi evidenciada a produção de complexos enzimáticos por *T. harzianum* em que foi confirmada a presença de lipases.

O fungo *T. harzianum* já é empregado ao combate de pragas em áreas de cultivos, o que remete ao uso deste também para a utilização em processos agroindustriais visando ao seu potencial enzimático, na produção de biocombustíveis, na remoção de manchas de gorduras e como agentes flavorizantes em alimentos. Outras pesquisas devem ser realizadas a fim de se obterem métodos de separação desses bioprodutos.



## 4 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, foi possível evidenciar a produção de lipases decorrente da mensuração do halo de cepas cultivadas de *T. harzianum*, sob condições diferentes de temperatura e tempo.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2.103, de 11 de maio de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 maio 2012.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderiacepacea LTEB11**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- FONSECA, T. R. B. et al. Avaliação da atividade proteolítica e coagulante de fungos filamentosos. **Enzitec**, Blumenau, 2012.
- GANDA, I. S. et al. Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas do tipo celulolíticas por diferentes isolados de *Trichodermastronmaticum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2005.
- GONÇALVES, G. A. F. **Produção de lipases extracelular por levedura em cultivo submerso**. 2007. 64 p. Monografia (Especialização em Microbiologia)–Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- GUIMARÃES, S. M.; ULHOA, C. J. Estudos bioquímicos de lipases produzidas por trichoderma harzianum. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 3., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2006.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, p. 190-194, 2006.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- JAEGER, K. E. et al. Microbiol. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.
- KOUKER, G.; JAEGER, K.-H. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **American Society for Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211-213, 1987.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichodermassp* isolados de solo do cerrado brasileiro**. 2002. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2002.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.

MELO, I. S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogenéticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998.

NASCIMENTO, A. E.; CAMPOS TAKAKI, G. M. Effects of sodium dodecyl sulfate on lipase of *Candidalipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, p. 93-99, 1993.

OLIVEIRA, A. N. et al. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 7. ed. São Paulo: Legis Summa, 2004.

SALUM, T. F. C. et al. Ester synthesis by immobilized Burkholderiacepacia lipase. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2007.

SAXENA, R. K. et al. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, p. 101-115, 1999.

STEINDORFF A. S.; ULHOA C. J. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Thichodermaharzianum* e sua aplicação biotecnológica em ração animal. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 7., 2006, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul, 2006.

VITERBO, A. D. A.; CHET, I. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichodermaasperellum*, is involved in plant root colonization. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 4, p. 249-258, 2006.

Recebido em 24 de fevereiro de 2014

Aceito em 05 de junho de 2014