

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Isolamento, Identificação e Avaliação da Atividade Lipolítica de Fungos Filamentosos Isolados da Água do Rio Doce e do Mar coletadas em Regência-Linhares/ES**

**Mábilli Mitalli Correia de Oliveira<sup>1</sup>, Barbhara Mota Marinho<sup>1</sup> e Vivian Machado Benassi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) campus Janaúba  
Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), 39440-000, Janaúba - MG  
E-mail: mabilli3m@hotmail.com

#### **RESUMO**

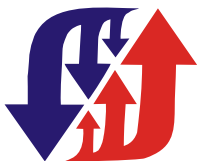
*Dentre as enzimas visadas na área biotecnológica, a lipase se destaca devido a sua grande aplicação em diferentes segmentos industriais. Objetivou-se realizar o isolamento de fungos filamentosos da água do rio doce e do mar coletadas em Regência-Linhares/ES, e analisar as características morfológicas e microscópicas, além de selecionar entre os fungos isolados e do banco de cepas do laboratório os promissores para a produção de lipase. Foram isolados 17 fungos filamentosos com coloração e características distintas, observando um halo de produção lipolítica de 1 cm em 96 h em 10 fungos, os quais foram selecionados para testes de produção de lipase. Este trabalho possui bastante relevância, uma vez que a coleta da água do Rio Doce e do mar em Regência-Linhares/ES ocorreu após o rompimento da barragem do Fundão localizada em Bento Rodrigues – Mariana/MG, que provocou um grande derramamento de rejeitos de uma mineradora sobre as águas do Rio Doce.*

Palavras-chave: Fungos filamentosos, Enzimas, Lipase.

#### **INTRODUÇÃO**

As enzimas têm sido utilizadas nas indústrias como uma das possibilidades de tornar os processos tecnológicos mais eficientes, com altos rendimentos e sem grandes danos ao meio ambiente. A indústria brasileira importa a maior parte das enzimas biocatalizadoras, o que tem despertado um grande interesse por buscar novas fontes, dentre elas, os microorganismos, que são os principais focos da era biotecnológica (SILVESTRE, 2013).

Dentre as enzimas microbianas, as lipases têm assumido um lugar de destaque no mercado de enzimas, devido às diversas aplicações industriais, entre elas, na produção de alimentos, detergentes (hidrólise de gorduras), cosméticos (remoção de lipídeos) e tratamento de efluentes (decomposição e remoção de substâncias oleosas) (CAPUTO, 2012, LIMA *et al.*, 2014). Os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, especialmente aos pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* com várias patentes de aplicação da enzima (CARDENAS *et al.*, 2001; FERRER *et al.*, 2000; SAVITHA *et al.*, 2007).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dessa forma, esse trabalho objetivou realizar coleta da água do Rio Doce e do mar em Regência-Linhares/ES e isolamento de fungos filamentosos, além de analisar as características morfológicas macroscópicas e microscópicas dos isolados, e de selecionar entre os fungos isolados e do banco de fungos do laboratório da UFVJM/IECT os promissores para a produção de lipase.

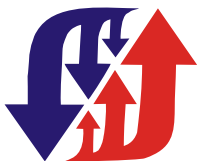
### MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios desse trabalho foram conduzidos no Laboratório de Biologia do Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia (IECT), da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) *campus* Janaúba, Janaúba, Minas Gerais. Para a realização da triagem dos fungos filamentosos produtores de lipase, 64 cepas foram analisadas, sendo 17 cepas isoladas da água do Rio Doce e do mar localizados em Regência, distrito de Linhares-ES, e 47 cepas obtidas do banco de fungos filamentosos do laboratório de Biologia do IECT.

As amostras coletadas, água do rio doce e água do mar, foram devidamente inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud ISOFAR<sup>®</sup>, que foi utilizado durante todo o processo de isolamento, e Estreptomomicina INLAB<sup>®</sup>, para inibir o crescimento de bactérias, visto que o foco do isolamento eram os fungos filamentosos. Esse procedimento foi realizado dentro da capela, juntamente ao Bico de Bunsen. Por conseguinte, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C. Conforme se observava o crescimento dos fungos filamentosos, esses eram isolados em novas placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud 2% ISOFAR<sup>®</sup>. O isolamento foi realizado de acordo com observação macroscópica quanto à textura, pigmentação, e coloração. Os fungos filamentosos isolados foram mantidos em meio sólido de Aveia (EMERSON, 1941), e em sílica gel segundo metodologia descrita por Michelin (2009).

A determinação da atividade enzimática da lipase seguiu a metodologia descrita por Sierra (1957), a qual utiliza o meio de triagem composto por peptona 1%, cloreto de sódio 0,5%, cloreto de cálcio 0,01%, ágar bacteriológico 2% e Tween 20 1% como substrato, sendo este esterilizado separadamente por 15 minutos, a 1 atm, e adicionado, posteriormente, ao meio estéril e resfriado. Todos os 63 fungos filamentosos foram repicados e incubados em estufa bacteriológica a 30°C, por 96 h. Em seguida, mediu-se o raio de crescimento (cm) e o halo enzimático (cm) para os fungos que apresentaram algum crescimento e atividade lipolítica. A reação enzimática positiva para lipase foi determinada pela formação de zonas claras em volta da colônia, não sendo necessária a adição de solução reveladora.

Além da triagem, realizou-se o microcultivo dos micro-organismos isolados segundo a técnica de Ridell (LACAZ, 1991) para análise das características microscópicas e posterior, identificação dos mesmos. Para isso, montaram-se câmaras de microcultivo, que constituiu em uma placa de Petri pequena contendo um papel filtro, uma lâmina posta sobre o papel. Após a montagem das câmaras, elas foram submetidas ao processo de autoclavagem, a 120°C, 1 atm, por 20 min., a fim de esterilizá-las. Posteriormente, foi introduzido sobre a lâmina da câmara de microcultivo um pedaço de meio de cultivo Sabouraud 2% ISOFAR<sup>®</sup>, com aproximadamente 10 mm de espessura. O micro-organismo foi inoculado sobre o meio e este recoberto com a lamínula previamente autoclavada. O papel filtro foi embebido com água destilada estéril, a fim de manter a umidade evitando o ressecamento do meio e proporcionando um ambiente úmido, favorável para o crescimento do fungo filamentosos. A



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

câmara foi incubada em estufa bacteriológica à 30°C, durante três dias. Após o crescimento dos organismos, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico para observação.

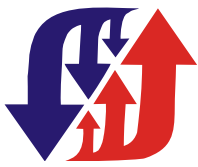
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

O isolamento foi feito em meio de cultivo sólido Sauboraud ISO FAR<sup>®</sup> incubados em estufa bacteriológica a 30°C, sendo analisado o crescimento de fungos filamentosos a cada 24 h. Através destes resultados, pode-se observar que a partir da água do Rio Doce e do mar localizados em Regência-Linhares/MG foram isolados 17 fungos filamentosos sendo eles: MB 1.1, MB 1.2, MB 1.4, MB 2.1, MB 2.2, MB 2.4, MB 2.5, MB 2.6, MB 2.7, MB 2.8, MB 2.9, MB 2.11, MB 2.12, MB 2.13A, MB 2.13 B, MB 2.14.

Após o isolamento dos 17 micro-organismos, objetivou-se analisar as características morfológicas dos isolados em relação à cor, fundo, textura e pigmentação, para um maior conhecimento das colônias. Para isso, os fungos foram inoculados pontualmente ao centro da placa de Petri, contendo meio de cultivo sólido Sauboraud ISO FAR<sup>®</sup>, sendo mantidos a 30°C, em estufa bacteriológica, durante 72 h. Após o crescimento, foram analisadas as características de interesse. Em relação à cor a maioria apresentou coloração Branca (MB 1.2, MB 1.3, Mb 1.4, MB 2.4, MB 2.7, MB 2.11, MB 2.12 e MB 13.A), os demais apresentaram as seguintes cores: cinza (MB 1.1), amarelo (MB 2.2 e MB 2.2), alaranjado (MB 2.8), marrom (MB 2.1 e MB 2.6), bege (MB 2.5) e rosé (MB 2.14). Os fungos MB 1.1 e MB 2.14 foram os únicos que produziram pigmentação, sendo observado um pigmento de cor preta e amarelo respectivamente. A respeito da textura foi possível observar fungos filamentosos com textura algodoadosa (MB 1.1, MB 1.2, MB 1.3, MB 1.4, MB 2.8, MB 2.11, MB 2.13A), aveludada (MB 2.1, MB 2.2, MB 2.4, MB 2.6, MB 2.7, MB 2.9 e MB 2.13B), pulverulenta (MB 2.5 e MB 2.12) e camurça (MB 2.14).

Foram analisadas quanto à produção qualitativa de lipase, os fungos isolados da água do Rio Doce e do mar localizados em Regência-Linhares/MG e as cepas pertencentes ao banco de fungos filamentosos do Laboratório. Para isso, foram cultivados em meio de triagem para lipase à 30°C por 96 h. Posteriormente, foi observado o aparecimento de uma zona clara ao redor da colônia devido à degradação dos lipídeos em ácidos graxos, o que torna o meio de triagem mais translúcido. Tanto o raio de crescimento da colônia como o raio enzimático foram determinados em cm. Os fungos filamentosos considerados como promissores para a produção de lipase foram: MB 2.1, MB 2.6, MB 2.13B, MB 2.14 e MB 2.7, que obtiveram halo de produção lipolítica de 1,0 cm em 96 h, os quais foram isolados da água do rio Doce e do mar em Resende-Linhares/ES. Entre as cepas do banco de fungos apenas os fungos filamentosos BA 1 (1,0 cm), MT 2.1B (1,5 cm), MT 2.4 (1,3 cm), MT 2.5 (0,8 cm) e TA 3.7 (0,7 cm) foram consideradas promissoras com o halo de produção enzimática acima de 0,8 cm.

A partir da análise do microcultivo os fungos foram observados microscopicamente e caracterizados em nível de gênero. Dentre os melhores produtores, observaram-se fungos dos gêneros *Aspergillus* (MB 2.1, MB 2.6, MB 2.13B, MT 2.1B, MT 2.4, TA 3.7 e BA1), *Paecilomyces* (MB 2.14), *Rhizopus* (MB 2.7) e *Penicillium* MT 2.5. Segundo a literatura várias espécies de micro-organismos possuem a capacidade de produzir a enzima lipase, os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

*Thermomyces* consideradas maiores produtoras de lipase (CARDENAS *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2000).

### CONCLUSÕES

Um total de 17 fungos filamentosos foi isolado da água do Rio Doce e do mar localizados em Regência-Linhares/MG com uma ampla diversidade de características morfológicas macroscópicas. Os isolados MB 2.1, MB 2.6, MB 2.13B, MB 2.14 e MB 2.7 e as cepas BA 1, MT 2.1B, MT 2.4, MT 2.5 e TA 3.7 exibem potencial como produtores de lipase de interesse biotecnológico, os quais serão estudados mais profundamente, uma vez que há um especial interesse de emprego de lipases microbianas para o processamento de óleos de gorduras na indústria farmacêutica, alimentícia e de papel, para biorremediação, síntese de biodiesel e na síntese de compostos opticamente puros (BARBOSA *et al.*, 2015).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, E. C.; CARRIM, A. J. I.; OLIVEIRA, B. F. R.; RIBEIRO, I. D. A.; VIEIRA, J. D. G. Isolamento, identificação e avaliação das atividades enzimática e antibacteriana de micro-organismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015
- CAPUTO, C. Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Candida rugosa*. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.
- CARDENAS, F.; DE CASTRO, F.C; SANCHEZ-MONTERO, J. V.; SINISTERRA, M.; VALMASEDA, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p. 145-154, 2001.
- EMERSON, R., 1941. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia*, 4, 77-144.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *Journal Chemistry Technology and Biotechnology*. v. 75, p.569-576, 2000.
- LACAZ, C.L. 1991. *Micologia Médica*. 8.ed. São Paulo: Sarvier. 840 p.
- LIMA, B. F.; AMORIM, H. S.; NASCIMENTO, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Seleção de meios de produção de lipase por Amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco. *E-xacta*, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 147-157. (2014). Editora UniBH. Disponível em: [www.unibh.br/revistas/exacta/](http://www.unibh.br/revistas/exacta/)
- MICHELIN, M. Potencial dos fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas. Ribeirão Preto. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP, 2009.p.212 (Tese, Doutorado em Ciências).
- OLIVEIRA, D. T. M. Lipase extracelular de fungo filamentosos: isolamento e caracterização parciais. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000, p. 152 (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- SAVITHA, J., SRIVIDYA, S., JAGAT, R., PAYAL, P., PRIYANKI, S., RASHMI, G.W., ROSHINI, K.T., AND SHANTALA, Y.M. (2007). Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *Afric. J. of Biotech.* 6, 564 -568.
- SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. *Antoni van Leewenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23: 15 – 22. *Mycologia*, 71 (5): 908-917.
- SILVESTRE, M. A. Bioprospecção de fungos com potencial para produção de  $\beta$ - glicosidase: Avaliação dos parâmetros de cultivo e caracterização das enzimas produzidas. Dourados: Faculdades de Ciências exatas e tecnológicas, Universidade Federal da Grande Dourados, 2013, p. 26 (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental).