

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Bioprospecção de Enzimas de Actinobactérias da Restinga de Marambaia por Fermentação em Estado Sólido e Submersa em Torta de Sorgo**

**Aldo A. T. Junior<sup>1</sup>, Melissa L. E. Gutarra<sup>1</sup>, Selma G. F. Leite<sup>1</sup>, Nei Pereira Jr.<sup>2</sup>, Rodrigo P. do Nascimento<sup>1</sup> e Ivaldo I. Junior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Bioquímica - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909. Email: aldoaraujot@gmail.com

<sup>2</sup> LADEBIO - Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909.

#### **RESUMO**

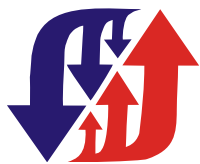
*O objetivo deste trabalho foi rastrear a produção de lipases e amilases de actinobactérias isoladas da Restinga de Marambaia, RJ. A cepa mais lipolítica foi escolhida através dos ensaios qualitativos da Rodamina B e Tributirina. Em seguida, esta foi submetida a ensaios de fermentação submersa (FS) e em estado sólido (FES) com bagaço de sorgo, onde foram quantificadas concomitantemente as atividades de lipases e amilases. As maiores atividades obtidas foram de 1,78U/mL para lipase, e de 0,6U/mL para amilase, para FS suplementada com 0,3% de óleo de oliva, em 24h e 72h de fermentação, respectivamente. Na FES, a maior atividade lipásica foi de 59,1U/g, na extração em 24h de fermentação, enquanto a de amilase foi de 27,3U/g em 72h, ambas suplementadas com 6,25% (m/m).*

Palavras-chave: Actinobactérias, fermentação em estado sólido, fermentação submersa, lipase, amilase.

#### **INTRODUÇÃO**

O Brasil possui uma elevada diversidade de micro-organismos presentes em seus diversos biomas. Diante de tamanha quantidade de habitats nos ambientes costeiros, a restinga é um dos mais complexos ecossistemas do país. Entretanto, essa é de extrema sensibilidade a perturbações humanas, podendo se considerar que todas as existentes no litoral do Brasil encontram-se de alguma forma alterada. Em função dessa degradação, a comunidade científica passou a se preocupar, desenvolvendo estudos no ecossistema de Restinga, para conhecer melhor este ambiente (Kemenes, 2003). Dentre estes biomas, destaca-se a Restinga da Marambaia (RJ), onde o grupo deste trabalho realiza pesquisas de modo a conhecer melhor este ambiente, principalmente quanto à riqueza microbiana, que pode representar uma fonte de novas enzimas, tais como lipases e amilases, conhecidas por suas diversas aplicações industriais e em bioprocessos em razão de suas elevadas regio-, quimio- e estereoseletividade (Bornscheuer, 2002). Micro-organismos vem sendo empregados em processos catalíticos pois conseguem catalisar uma enorme variedade de reações. Todavia, actinobactérias têm sido pouco estudadas quanto ao seu potencial de produção de enzimas, o que nos incentivou a realizar este trabalho.

O sorgo (*Shorgum bicolor* (L.) Moench) é um dos cereais mais cultivados no mundo, predominantemente em regiões áridas, como África e Ásia. No Brasil o sorgo ainda é pouco



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

plantado e é praticamente destinada à alimentação animal (Pires, 2007). Todavia, questões ambientais têm alavancado o interesse por fontes renováveis e o beneficiamento de resíduos agroindustriais tornou-se uma fonte importante para a produção de novos materiais, produtos químicos, energia (Rosa *et al.*, 2011) e até mesmo enzimas. Desta forma, objetivou-se neste trabalho um estudo acerca da produção de lipases e amilases a partir das actinobactérias isoladas pelo Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos (LEPM - UFRJ), utilizando resíduo de sorgo como substrato, através da fermentação em estado sólido (FES), além de fermentação submersa (FS), visando um estudo comparativo.

### MATERIAL E MÉTODOS

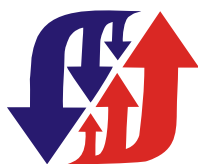
#### SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Foram isoladas 123 cepas de actinobactérias da Restinga de Marambaia, as quais foram ativadas em meio de cultivo ISP-2 (Shirling & Gottlieb, 1966). Estas foram submetidas ao ensaio de produção lipases por Rodamina B, em meio contendo: 15g/L ágar base, 0,1% (v/v); Tween 80, 1% (v/v) azeite de oliva, 0,001% Rodamina B, 1L de água destilada. Os micro-organismos foram inoculados na forma de *slots* e as leituras foram feitas a cada 24h por 3 dias. Os resultados foram considerados positivos quando detectada a presença de um halo de fluorescência sob irradiação U.V. As mesmas cepas também foram submetidas a ensaio de hidrólise em Meio ágar-Tributirina (pH 7,0), contendo: 15g/L ágar base, 0,05% (v/v) Tween 80, 1% (v/v) tributirina e 1L água destilada, sendo observada a formação de halo transparente gerado pela hidrólise da tributirina e calculado o índice de hidrólise (IH), dado pela razão entre o comprimento do halo, e o comprimento da colônia.

#### ENSAIOS FERMENTATIVOS

A cepa AM9-1, mais promissora nos ensaios anteriores, foi submetida a dois ensaios de FS: (i) com 2,5% (m/v) de torta de sorgo com tamanho de partícula entre 212 e 425  $\mu\text{m}$ , suspensa em água destilada e (ii) 2,5% (m/v) de torta de sorgo com mesmos tamanhos de partículas suspensas em água destilada, suplementada com 0,3% (m/v) de óleo de oliva. A fermentação foi feita em *shaker* a 170 rpm e 30°C.

A fim de se comparar a produção de lipase e amilase, foi realizada também a FES, em que, primeiramente, foi realizado um pré-inóculo no qual a cepa foi retirada do ISP-2 e inoculada em meio fermentativo contendo: 1g glicose, 0,5g extrato de levedura, 100mL de água destilada e incubadas em *shaker* por 3 dias, a 30°C e 200 rpm. Para os ensaios fermentativos, foram empregados erlenmeyers contendo 1g de torta de sorgo com tamanho de partículas entre 212 e 425  $\mu\text{m}$ . Esta foi utilizada (i) sem suplementação, e (ii) suplementada com 6,25% (m/m) de óleo de oliva. Cada erlenmeyer recebeu 2mL de pré-inóculo (proporção de sólido : pré-inóculo 1:2). A fermentação foi conduzida a 30°C com teor de umidade de 70% em estufas com injeção de ar úmido com 95% de saturação. Extrações foram realizadas a cada 24h, com 20mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) por g de torta, sob agitação por 20min. Posteriormente, o material foi centrifugado por 2 minutos para remoção de sólidos mais finos (Gombert *et al.*, 1999, adaptado), e filtrado. A quantificação proteica no sobrenadante foi realizada pelo método estabelecido por Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

A atividade lipásica foi medida pelo método espectrofotométrico descrito por Gutarra, 2009. Uma unidade de atividade lipásica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenil laurato por minuto nas condições de ensaio. A atividade lipásica foi expressa em U/mL em FS e U/g de massa seca inicial em FES. A atividade amilásica foi medida também por espectrofotômetro, utilizando amido 1% (m/v) em tampão fosfato de sódio 20mM pH 6,9 como substrato; foi preparado  $T_f$ , que contém 0,5mL de extrato enzimático e 0,5mL de substrato e um  $T_0$ , com 1,5mL de DNS (deve ser colocado primeiro nos tubos de ensaio), junto com a mesma composição do  $T_f$ . Após reagir por 10min a 55°C em banho-maria, os tubos foram postos em banho de gelo, adicionando-se 1,5mL de DNS no  $T_f$  e levando à fervura também em banho-maria por 5min; depois disto, acrescentou-se 8mL de água destilada e a leitura foi feita em espectrofotômetro, com absorvância em 540nm. O cálculo das atividades foi dado pelas equações 1 e 2, expressos em U/mL, para FS, e U/g, para FES, respectivamente.

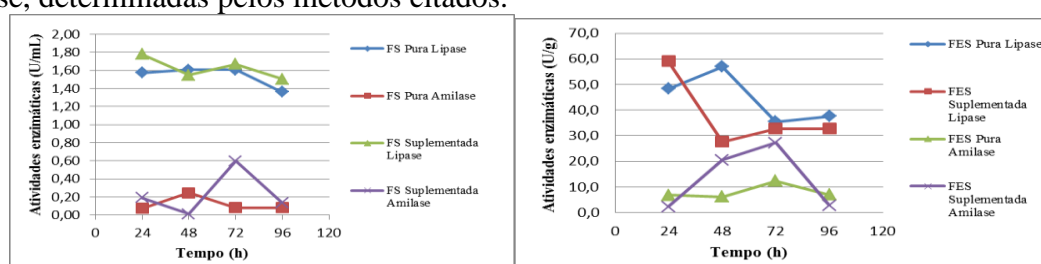
$A = \frac{3 \cdot (T_f - T_0) \cdot \alpha}{10}$  (1), em que A = atividade amilásica (U/mL),  $T_f$  e  $T_0$  = absorvância dessas amostras e  $\alpha$  = coeficiente angular da curva padrão (Concentração X Abs)

$A' = \frac{A \cdot V_{ext}}{M_i}$  (2), em que A' = atividade amilásica (U/g), A = atividade amilásica (U/mL),  $V_{ext}$  = volume de extração (mL) e  $M_i$  = massa inicial seca em FES (g).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

No rastreamento inicial de atividade lipásica, das 123 cepas testadas, apenas oito apresentaram resultados satisfatórios no ensaio da Rodamina B. Estas então foram testadas em meio ágar tributirina, gerando razoáveis índices de hidrólise, destacando-se a cepa AM9-1, com valor de 1,75.

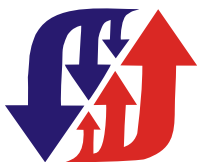
A fim de determinar o perfil de produção das lipases e das amilases, foram estudados os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS) utilizando torta de sorgo como substrato e esta suplementada com óleo de oliva. A figura mostra os valores para a FS e para FES, respectivamente, das atividades lipásicas e da amilase, determinadas pelos métodos citados.



**Figura 1:** Atividades enzimáticas demonstradas pela cepa AM9-1. À esquerda – perfil de produção por FS e à direita – perfis de produção demonstrado por FES

No tempo de 24h, na FS suplementada com 0,3% (m/v) de óleo de oliva, é possível observar uma atividade lipásica de 1,78U/mL, maior do que o pico da FS não suplementada, 1,61U/mL, em 48h de fermentação, o que evidencia o efeito de indução do óleo. Já para a amilase, na FS suplementada, o pico foi em 72h, com 0,6U/mL de atividade, e, para a FS pura, de 0,24U/mL, em 48h de fermentação.

O micro-organismo cresceu nos dois meios de fermentação em estado sólido. Na FES sem suplementação, o tempo ótimo foi de 48h para lipase, com atividade de 57,0U/g, e



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

12,33U/g, em 72h, para amilase; na FES suplementada com 6,25% (m/m), o tempo ótimo foi, assim como em FS, de 24h para lipase, apresentando 59,1U/g de atividade, e de 72h para amilase, 27,3U/g. Embora em algumas alíquotas a atividade lipásica tenha sido maior na FES sem suplementação, a suplementada apresentou o pico de atividade total. Além disso, nos dois meios fermentativos suplementados a atividade da amilase foi maior do que os da pura.

No pico da atividade amilásica da FES suplementada, em 72h, que ainda possui uma boa atividade lipásica (32,8U/g), foi realizada a quantificação de proteínas totais para ver a possibilidade de imobilização. O resultado foi de 0,21mg/mL. Ensaios de imobilização do extrato em Accurel MP1000 estão sendo realizados de modo a separar ambas as enzimas.

### CONCLUSÕES

A cepa AM9-1 demonstrou promissoras atividades lipásica e amilásica nos ensaios de FS e FES, utilizando torta de sorgo como meio de cultivo, com e sem suplementação de óleo de oliva. Na FS, o melhor resultado obtido foi com suplementação de 0,3% (m/v), resultando numa atividade de 1,78U/mL para lipase, e 0,6U/mL para amilase, nos tempos de 24 e 72h de fermentação, respectivamente. Na FES, a maior atividade lipásica foi de 59,1U/g, suplementada com 6,25% (m/m), em 24h, enquanto a de amilase foi de 27,3U/g, em 72h, também suplementada. Nesta última, foi determinado a quantidade de proteínas totais de 0,21mg/mL. Estudos de otimização destes processos, assim como de novas fontes de indutores enzimáticos estão sendo em andamento. A referida cepa foi submetida a processo de identificação, e as enzimas estão em processos de purificação para estudos estruturais.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bornscheuer U. T. "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis". FEMS microbiology reviews, v. 26, p.73-81, 2002.
- 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, v. 72, pp. 248-554, 1976.
- Gombert, A. K., Lopes, A. P., Castilho, L. R., Freire, D. M. G. 1999. Lipase, amylase and protease production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake. Process Biochem. 35(1-2):85-90.
- Gutarra, M. L. E. Produção de lipase pelo fungo *penicillium simplicissimum*: caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido. Tese de doutorado. Rio de Janeiro: 2007. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 64.
- Kemenes, A. Distribuição espacial da flora terrestre fanerogâmica do Parque Nacional Marinho de Abrolhos, BA. Revista Brasileira de Botânica, 26(2): 141-150. 2003.
- Pires, D. A. Avaliação de quatro genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.)) com e sem taninos nos grãos para produção de silagens. Dissertação de doutorado. Minas Gerais: 2007. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Rosa, M. F.; Souza Filho, M S. M.; Figueiredo, M. C. B. ; Morais, J. P. S.; Santaella, S.T. , Leitão, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, Volume I – Palestras.
- Shirling E.B. & Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16, 313-340.