

# XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

## Produção de Lipases por Fungos Filamentosos Isolados da Restinga da Marambaia e seu Potencial Biotecnológico

Pedro F. Franco<sup>1</sup>, Melissa L. E. Gutarra<sup>2</sup>, Selma G. F. Leite<sup>1</sup>, Rodrigo P. do Nascimento<sup>1</sup>, 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.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Xerém, Duque de Caxias, RJ CEP 25245-390.

### RESUMO

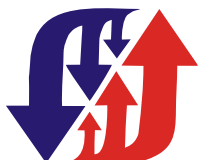
*O bioma da Mata Atlântica é extremamente diverso e pouco se sabe sobre a diversidade fúngica dessa região, bem como seu potencial biotecnológico. Fungos filamentosos são conhecidos pela grande capacidade de expressão e produção de diversas enzimas de interesse industrial. No presente estudo, foi rastreada a atividade lipásica de fungos filamentosos isolados de sedimentos da restinga da Marambaia, Rio de Janeiro, que abrange parte da Mata Atlântica preservada. Ensaios preliminares foram realizados através do método da Rodamina B, no qual, de 154 fungos identificados, 20 se mostraram promissores e foram selecionados para ensaios de fermentação submersa para a quantificação da atividade hidrolítica. Os valores encontrados atingiram o valor máximo de 6,0U/mL ao fim de 72h. As espécies mais lipolíticas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*. Ensaios de otimização da produção lipásica para futuras aplicações biotecnológicas e estudos estruturais das mesmas estão sendo realizados.*

Palavras-chave: fungos, lipase, fermentação submersa, restinga.

### INTRODUÇÃO

A diversidade de micro-organismos presente nos diversos biomas da Terra é muito alta. Diante de grande diversidade de habitats nos ambientes costeiros, a restinga é um dos mais complexos ecossistemas brasileiros. Pouco se conhece sobre a variedade microbiana nessas regiões, principalmente no Brasil, reforçando a necessidade de estudos mais aprofundados nestes biomas (Clipson et al., 2006). Micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e actinomicetos são conhecidos pela versatilidade de produção de enzimas, tais como lipases. Os autores do presente estudo vêm trabalhando na identificação e isolamento de micro-organismos da restinga da Marambaia, visando o melhor conhecimento deste ambiente, visto que nenhum estudo biotecnológico fora realizado anteriormente com estes micro-organismos, sendo potenciais fontes de enzimas e representando um reservatório biotecnológico promissor.

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas classificadas como triacilglicerol éster hidrolases e possuem diversas aplicações industriais. Além de serem versáteis em reações de hidrólise e esterificação (Junior et al, 2014), biotransformações e resoluções cinéticas e dinâmicas, dentre outras, são também de baixo custo, estáveis em solventes orgânicos e apresentam alta atividade catalítica em condições brandas de reação, o que as torna extremamente atrativas em processos biocatalíticos em geral (Freire e Castilho, 2008). Processos utilizando enzimas e



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

micro-organismos como biocatalisadores vêm sendo estimulados pela atual conjuntura ética da ciência e da indústria, visto que se adequam aos princípios da química verde e do desenvolvimento sustentável. Em virtude de tais vantagens, e aliado ao fato de serem abundantemente encontradas na natureza, as lipases vêm ganhando espaço na pesquisa científica e na indústria (Illanes, 1994).

Considerando a expressiva experiência em biocatálise, mais precisamente, na utilização de lipases na síntese de ésteres e resoluções cinéticas (Silva et al, 2015, Leão et al, 2016), este trabalho visa o rastreamento do potencial biotecnológico de micro-organismos oriundos de amostras da Restinga da Marambaia, além do estudo da produção de lipases e sua posterior aplicação biotecnológica.

### MATERIAL E MÉTODOS SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE LIPASE

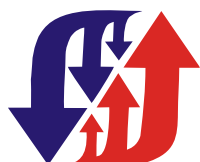
Amostras de diferentes áreas da Restinga da Marambaia (Rio de Janeiro) foram coletadas, e os fungos foram isolados e armazenados na Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos (LEPM, UFRJ). O armazenamento foi feito em frascos com água destilada estéril à 4°C (Método Castellani). Para a propagação das hifas, os fungos foram inoculados em placas de Petri com meio ágar-malte (pH 5,5), e incubados a 28°C por 7 dias.

Para o rastreamento de lipases, as amostras foram submetidas inicialmente ao ensaio qualitativo da Rodamina B (Kouker & Jaeger, 1987), no qual 1 *plug* contendo crescimento micelial da borda das colônias de cada isolado de fungos foi plaqueada em meio contendo MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, ágar 15 g/L, rodamina B 0,001% (m/v), óleo de oliva 1,0% (v/v) e tween 80 a 0,01% (v/v), pH 6,5. As placas foram incubadas a 28°C e analisadas a cada 24 h por 3 dias. Os resultados foram considerados positivos quando detectada a presença de um halo de fluorescência sob irradiação U.V.

### PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os fungos mais promissores foram submetidos a ensaios de fermentação submersa. Neste, inicialmente, foi realizado um pré-inóculo, contendo 50 mL de água destilada, extrato de levedura 15 g/L, sacarose 10 g/L (pH 6,0) em *Erlenmeyer* (250 mL). Individualmente, 2 *plugs* do crescimento micelial de cada fungo, obtido em Meio Ágar-Malte, foram inoculados e o sistema incubado em *shaker* a 30°C, 170 rpm por 48 h. Após esse período, 1,0 mL do crescimento do pré-inóculo foi transferido para frascos de 250 mL contendo 50mL de meio de fermentação, contido por (*p/v*): glicose 1,0%, peptona 1,0%, extrato de levedura 0,5%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001%, suplementado com óleo de oliva 0,3% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6. O sistema foi incubado a 30°C, 170 rpm por 72 h. Ao fim desse período, uma alíquota foi coletada e sua atividade lipolítica determinada pelo método titulométrico, utilizando como substrato óleo de oliva (5% *p/v*) emulsionado em goma arábica (5% *p/v*) e tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) (Freire et al., 1997).

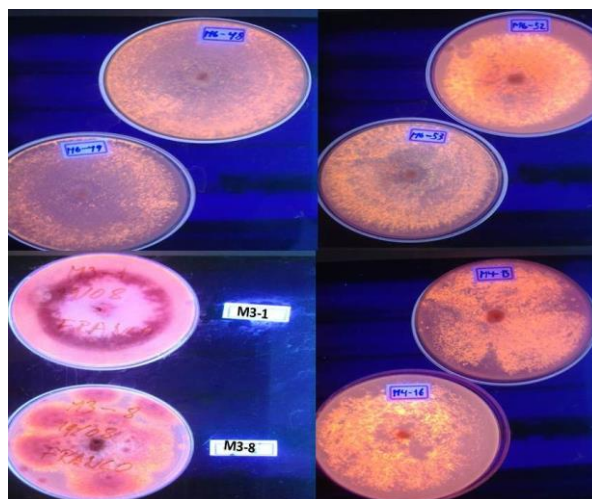
Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo livre por min de reação nas condições do ensaio.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo 154 fungos filamentosos provenientes da Restinga da Marambaia foram investigados quanto ao potencial lipolítico. No ensaio da Rodamina B, 20 cepas foram promissoras. A figura 1 demonstra alguns halos obtidos neste ensaio.



**Figura 1:** Halos de fluorescência em algumas cepas no ensaio da Rodamina B.

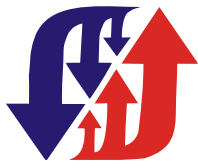
Estes foram então submetidos à quantificação de atividade lipolítica por fermentação submersa utilizando óleo de oliva 0,3% (p/v). A maior atividade de lipase (6,00 U/mL) foi detectada pelo fungo *Aspergillus* sp. M3-4 (Tabela 1), seguido pelo fungo *Trichoderma* sp. M6-41 (5,12 U/mL). Roveda et al (2010) observou a máxima produção de lipases (2,25 U/mL) pelo fungo *Aspergillus* sp. E21 na presença de azeite de Oliva, enquanto que Gutarra (2007) detectou uma máxima atividade de lipase (3,28 U/mL) pelo fungo *Penicillium simplicissimum*, sendo então demonstrado um alto potencial lipolítico das cepas em questão.

**Tabela 1:** Relação dos Isolados de Fungos Promissores quando a Produção de Lipases por Fermentação Submersa.

Fungo	Gênero	Atividade Hidrolítica(U/mL)*	Fungo	Gênero	Atividade Hidrolítica (U/mL)*
M3-4	<i>Aspergillus</i>	6,00	M6-9	<i>Trichoderma</i>	1,22
M3-8	<i>Aspergillus</i>	1,00	M6-14	<i>Trichoderma</i>	0,00
M3-13	<i>Rhizopus</i>	0,26	M6-41	<i>Trichoderma</i>	5,12
M3-17	<i>Penicillium</i>	0,01	M6-42	<i>Trichoderma</i>	2,30
M4-6	-	0,95	M6-45	<i>Trichoderma</i>	1,96
M4-15	-	0,04	M6-48	<i>Trichoderma</i>	2,62
M4-16	<i>Trichoderma</i>	2,92	M6-49	<i>Trichoderma</i>	0,48
M5-1	<i>Trichoderma</i>	0,34	M6-50	<i>Trichoderma</i>	0,31
M5-6	<i>Trichoderma</i>	3,64	M6-52	<i>Penicillium</i>	2,61
M6-7	-	0,00	M6-53	<i>Trichoderma</i>	1,83

\*Valores obtidos após 72h de incubação

Alguns autores descreveram o uso do azeite de oliva como indutor na produção de lipases por microrganismos (Mahadik et al., 2002; Baron et al., 2005). Entretanto, seu custo pode tornar-se elevado se for considerada uma produção em escala piloto. Desta maneira,



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

novos estudos utilizando substratos indutores de baixo custo, como o óleo de soja proveniente de frituras, e outras fontes de fácil acesso podem ser desenvolvidos, visando melhorar a relação custo x benefício na produção em nível industrial (Roveda et al., 2010), e serão parte das perspectivas futuras deste trabalho.

### CONCLUSÕES

Os valores de atividade de lipase detectados nos fungos isolados da Restinga de Marambaia foram superiores em até 166% em comparação com dados apresentados na literatura. Assim, os resultados aqui obtidos apontam o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos isolados da Restinga de Marambaia.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baron AM, Turra V, Krieger N. 2005. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211. In: Simpósio Nacional de Fermentações, 15, Recife;
- Clipson N, Otte M, Landy E. 2006. Biogeochemical roles of fungi in marine and estuarine habitats. Cambridge, UK: Cambridge University Press. In: Gadd GM. Fungi biogeochemical cycles. pp. 437-461;
- Freire DMG, Castilho, LR, 2008. “Lipases em biocatálise”. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado, cap. 16, pp.369-385;
- Freire DMG, Teles EMF, Bon EPS, Sant’Anna Jr. GL. 1997. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration. Appl. Biochem. Biotechnol. 63, pp. 421-429;
- Gutarra ML. 2007. 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 IQ – UFRJ. pp 93;
- Illanes A. 1994. Biotecnología de enzimas. Ediciones universitarias de valparaíso, Chile. pp. 95-115
- Junior, I I.; Calcio Gaudino, E ; Martina, K ; Cravotto, G ; Luque, R ; De Souza, ROMA, 2014. Improving the esterification activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia cepacia* lipases via cross-linked cyclodextrin immobilization. RSC Adv. 4: 45772-45777;
- Leão, RAC; Souza, SP; Nogueira, DO; Silva, GMA; Silva, MV; Gutarra, MLE; Miranda, LSM; Castro, AM; Junior, I I; de Souza, ROMA. 2016. Consecutive Lipase Immobilization and Glycerol Carbonate Production under Continuous-Flow Condition. Catal. Sci. Techn. Accepted manuscript DOI: 10.1039/C6CY00295A;
- Kouker G, Jaeger K. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. App. Envir. Mic. 53: 211-213
- Mahadik ND et al. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry, v. 38, n. 5, p. 715-721;
- Roveda M, Hemkemeier M, Colla LM. 2010. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios;
- Silva, MV; Bassut, J ; Junior, I; de Souza, ROMA; Souza, SP; Estrada, MLG; Miranda, LSM. 2015. Lipase Immobilization Towards Improved Productivity on Kinetic Resolutions by Continuous-Flow Process. RSC Adv. 124: 102409-102415.