



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Basidiomicetos amazônicos: potenciais fontes de lipases para síntese em solventes orgânicos

Israel Paes Romano^{1,4}, Vanderlei Sabóia dos Santos², Edson Junior do Carmo¹, Raimundo Carlos Pereira Junior,⁵ Hiléia dos Santos Barroso², Ceci Sales-Campos³, José Odair Pereira¹, Spartaco Astolfi Filho¹, Sandra Patrícia Zanotto³

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM) – Rede Bionorte de Biodiversidade e Biotecnologia - Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69077-000;

²Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA), Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Av. Carvalho Leal, 1777 - Cachoeirinha, Manaus - AM, 69065-001;

³Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Laboratório de Fungos Comestíveis - Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis, Manaus - AM, 69067-375;

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Parintins - Estrada Odovaldo Novo, S/N - Aninga/Parananema, Parintins - AM, 69152-470

⁵Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Centro de Estudos Superiores de Tefé, Estrada do Bexiga, nº 1085, bairro Jerusalém, Centro, - Tefé / AM

RESUMO

Basidiomicetos têm sido estudados como fontes de enzimas para degradação lignocelulósica e de compostos xenobióticos, mas recebido pouca atenção como potenciais fornecedores de lipases – um grupo de enzimas de grande interesse para a biotecnologia. Este trabalho comparou a atividade de síntese em solvente orgânico de lipases ligadas ao micélio de seis linhagens de basidiomicetos, coletados no estado do Amazonas, com a de uma enzima comercial. O ensaio de Teng e Xu (2007) - transesterificação do palmitato de p-nitrofenila com etanol em heptano – foi utilizado na comparação. A liberação de p-nitrofenol foi detectada pela absorvância a 410 nm. Três linhagens catalisaram liberação de p-nitrofenol, sendo o melhor resultado obtido com Picnoporus sanguineus (27,52% do rendimento da enzima comercial). Análises por CG/MS confirmaram a formação do palmitato de etila nas reações catalisadas pelas três linhagens. Este estudo indicou que basidiomicetos amazônicos podem ser potenciais fontes de lipases para síntese em meio orgânico.

Palavras-chave: basidiomicetos, lipase, *Picnoporus sanguineus*, biocatálise, síntese em meio orgânico.

INTRODUÇÃO

Lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise, esterificação, transesterificação e alcoólise de triacilgliceróis ou outros ésteres insolúveis em água. Nas últimas décadas, reações catalisadas por lipases em meios não aquosos têm encontrado cada vez mais aplicações em diversas atividades industriais, como a produção de medicamentos ou química fina (Zheng e cols, 2014). Em todo o mundo, vários grupos de pesquisa realizam programas de triagem de microrganismos para atender a demanda de novas lipases com características especialmente úteis para processos tecnológicos. Os basidiomicetos (Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*) têm sido estudados como fontes de várias enzimas para degradação da biomassa lignocelulósica e de compostos aromáticos nocivos ao ambiente; no entanto, tem recebido relativamente pouca atenção até o presente como potencial fonte de lipases (Singh e cols, 2014). Visando avaliar o potencial de basidiomicetos amazônicos como fontes de lipases de interesse biotecnológico, neste trabalho foi comparada a atividade de síntese em heptano de lipases ligadas ao micélio de seis linhagens de basidiomicetos coletados no estado do Amazonas com a atividade de uma lipase comercial (Amano Lipase obtida de *Burkholderia cepacia*). O ensaio de comparação foi adaptado do ensaio proposto por Teng e Xu (2007).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção, coleta e isolamento dos basidiomicetos: Foi utilizada a linhagem UEA_208, identificada por taxonomia morfológica como a espécie *Picnoporus sanguineus*, da coleção de trabalho do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (UEA). As outras cinco linhagens de basidiomicetos utilizadas neste trabalho foram coletadas em uma área florestal situada no km 23 da estrada AM-352, município de Manacapuru-AM, localização geográfica: 3° 7'35.32"S - 60°44'26.78"O. Para coleta e isolamento dos fungos foi utilizada a metodologia de Teixeira (1995). Após o isolamento, as culturas foram conservadas em meio Castellani para utilização nos ensaios, identificação taxonômica e o depósito em coleção fiel depositária.

Cultivo, crescimento e preparação da massa micelial dos fungos isolados: inóculos das culturas em Castellani foram reativados em placas de Petri com meio Sabouraud e incubados em BOD a 28 °C por 4 a 6 dias. Em seguida, foram cultivados em meio líquido preparado conforme metodologia adaptada de Sun e cols, 2008: frascos de 250 mL com 20 mL de meio (% p/v): maltose 0.5, peptona 4.0, K₂HPO₄ 0.3, MgSO₄ 0.05, azeite de oliva extra virgem 2.4; o pH foi ajustado para 5.5 e discos de 10 mm de diâmetro do micélio crescido em placa foram inoculados e cultivados em agitador orbital (200 rpm, 30 °C) por 10 dias. Cada micélio crescido nos frascos foi então filtrado à vácuo e lavado com 60 mL de água e 60 mL de acetona, respectivamente, durante a filtração. Os micélios lavados foram ressuspensos em 5 mL de água deionizada estéril, mantidas em ultrafreezer para congelamento a -80 °C durante a noite e liofilizadas num equipamento E-C MycroModulyo Freeze Drye (EC Apparatus, New York, EUA) acoplado à bomba de vácuo valuPump VLP80 Savant, por 3- 4 horas. O micélio liofilizado foi então triturado a pó, resultando numa preparação bruta de lipases ligadas ao micélio a ser utilizada como biocatalisador nas reações.

Ensaio de atividade sintética: Os ensaios colorimétricos foram realizados seguindo a metodologia de Teng e Xu (2007), com adaptações. Em tubos Eppendorf de 2 mL foram adicionados 20 mg do micélio liofilizado ou da lipase comercial com 0,5 ml de uma solução de 10 mM de palmitato de p-nitrofenila (pNPP) em n-heptano. Para início da reação, 30 µL de etanol (1M) foi adicionado e o meio reacional foi incubado a 40 °C com agitação de 200 rpm durante 30 min. Depois de se deixar a mistura reacional em repouso durante 30 s, 25 µL do sobrenadante límpido foram retirados e misturados com 1 mL de uma solução de NaOH 0,1 M. O p-nitrofenol (pNP) liberado foi extraído para a fase aquosa alcalina e 200 µL foram retirados e adicionados numa microplaca de 96 poços. O pNP foi detectado a 410 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-visível com leitor de microplacas da SpectraMax 384 Molecular Devices. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. Para quantificação do pNP foi utilizada uma equação da reta ($r= 0,9997$) calculada para uma curva de calibração de (concentração x absorbância), a partir de soluções de concentrações conhecidas de pNP em n-heptano.

Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC/MS) – foram realizadas no equipamento GCMS QP2010 Plus da Shimadzu. A coluna utilizada foi a Rtx5MS da Restek (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), Crossbond, 5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano. A temperatura da coluna foi programada em 100 °C durante 0,5 min, depois aumentada para 200 °C a 12°C/min e depois para a 280 °C a 10 °C/min; injeção split usando hélio como gás de arraste. A temperatura da fonte de ionização foi de 280 °C, a faixa de íons monitorada foi de 50-400 *m/z* (adaptado de Politi e cols, 2011).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As lipases ligadas ao micélio do *Picnoporus sanguineus* e as das linhagens F08 e F04 catalisaram, respectivamente, a liberação de 0,57 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 0,44 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 0,15 $\mu\text{M}/\text{mL}$ do pNP. A lipase comercial de *Burkholderia cepacia* catalisou a liberação de 2,05 $\mu\text{M}/\text{mL}$ deste composto. Utilizando a enzima comercial como padrão de referência (100%), as atividades das preparações miceliais de *P. Sanguineus*, F08 e F04 corresponderam a 27,63 %, 21,27 % e a 7,46 % da atividade da Amano Lipase. As demais linhagens testadas não catalisaram liberação detectável de pNP. Segundo Teng e Xu (2007), a liberação de pNP é um forte indicativo da ocorrência da reação de transesterificação e da formação do palmitato de etila – o que, por sua vez, indica a presença de lipases com atividade de síntese em meio orgânico.

Nos cromatogramas das reações catalisadas pela lipase comercial e pelas preparações miceliais do *P. sanguineus* e dos isolados F08 e F04, foi detectado no tempo de retenção 11 min um pico que apresentou 94 % de similaridade com o palmitato de etila (biblioteca do software CG/MS Post Run). Este pico não foi observado nas demais reações catalisadas pelas outras preparações miceliais, nem na reação do “branco” (reação sem enzima/micélio).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Tanto a análise colorimétrica quanto a por CG-MS indicaram que *P. sanguineus* e os isolados F08 e F04 apresentam lipases ligadas ao micélio com atividade sintética em meio orgânico capazes de catalisar a reação de transesterificação proposta por Teng e Xu como ensaio de triagem. Embora a atividade encontrada tenha sido menor quando comparada a da enzima comercial, é preciso ter em consideração que foram utilizadas nestes ensaios preparações miceliais brutas, não-purificadas, dos basidiomicetos. Os resultados sugerem assim que este grupo de fungos, além de fornecer enzimas lignocelulolíticas e degradadoras de xenobióticos, pode também ser um potencial fornecedor de lipases com atividade sintética em meio orgânico.

A fim de melhorar a prospecção destas lipases e realizar comparações mais acuradas entre os diferentes isolados de basidiomicetos, serão futuramente realizados ensaios em CG-FID com a utilização de padrão analítico de palmitato de etila, para quantificação da atividade sintética das lipases dos isolados a serem testados.

AGRADECIMENTO

À Fapeam - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. O primeiro autor deste trabalho é bolsista do programa RH Interiorização, Edital 003/2015, desta agência de fomento.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Journal

- Reetz, M. T. (2013). Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *Journal of the American Chemical Society*, 135(34), 12480-12496.
- Politi, L., Mari, F., Furlanetto, S., Del Bravo, E., & Bertol, E. (2011). Determination of fatty acid ethyl esters in hair by GC-MS and application in a population of cocaine users. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 54(5), 1192-1195.
- Singh, M. K., Singh, J., Kumar, M., & Thakur, I. S. (2014). Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110, 92-99.
- Sun, S. Y., & Xu, Y. (2008). Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, 43(2), 219-224.
- Teixeira, A. R. (1995). Método para estudo das hifas do basidiocarpo de fungos poliporáceos. Manual nº 6. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Teng, Y., & Xu, Y. (2007). A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry*, 363(2), 297-299.
- Yousefi, M., Mohammadi, M., & Habibi, Z. (2014). Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 104, 87-94.
- Zanotto, S. P., Romano, I. P., Lisboa, L. U., Duvoisin Jr, S., Martins, M. K., Lima, F. A., & Albuquerque, P. M. (2009). Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1046-1059.
- Zheng, J., Fu, X., Ying, X., Zhang, Y., & Wang, Z. (2014). A sensitive colorimetric high-throughput screening method for lipase synthetic activity assay. *Analytical biochemistry*, 452, 13-15.