

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Avaliação da Atividade Lipásica de Fungos Endofíticos Associados a Espécies Vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba-RJ

Karla S. C. da Rocha<sup>1</sup>, Maria Sandra R. Queiroz<sup>1</sup>, Brenner de S. Gomes<sup>1, 4</sup>, Denise de O. Guimarães,<sup>3</sup> Rodrigo O. M. A. de Souza,IVALDO I. JUNIOR<sup>2</sup> e Ivana C. R. Leal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos (LaProNEB) - CEP: 21941-902- Cidade Universitária- Rio de Janeiro- RJ.

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia Bioquímica – Escola de Química, CEP: 21941-909 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>Grupo de Biocatálise e Síntese Orgânica (BOSS Group) - Instituto de Química- CEP: 21941-909 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Produtos Naturais (LaProN) -UFRJ – Polo Macaé Universidade Federal do Rio de Janeiro.

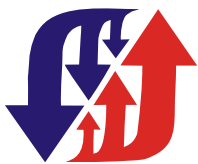
#### RESUMO

*Lipases microbianas apresentam grande interesse industrial, por catalisarem diversas reações como hidrólise e esterificação. O uso de processos enzimáticos, catalisados por lipases, podem conduzir a uma abordagem mais ecológica e a ampla diversidade de fauna e flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba favorece a produção de espécies diversificadas de fungos endofíticos como *Stemphylium lycopersici*, associado a espécie vegetal *Humiria balsamifera* e TB1 associado a espécie *Tocoyena bullata*. Esses fungos foram isolados e avaliados quanto à atividade lipásica, para aplicação como biocatalisadores em reações de hidrólise mostrando-se promissores. Através do método de hidrólise do p-nitrofenil butirato, o fungo *Stemphylium lycopersici* apresentou atividade de 29,60 U/mL em 48h e 30,20 U/mL em 72 h de incubação. A cepa TB1 apresentou 23,20 U/mL em 48h e 25 U/m<sup>1</sup> em 72 h, mostrando-se promissores como biocatalizadores em processos biotecnológicos.*

Palavras-chave: fungos endofíticos, lipase, hidrólise, esterificação, biocatálise.

#### INTRODUÇÃO

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, localizado na região Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil possui uma rica diversidade de fauna e flora. Esta característica favorece elevada especificidade do ambiente e pode contribuir para a identificação de diversas espécies vegetais e microrganismos associados às mesmas (Pereira; Cordeiro; Araújo, 2004), como os fungos endofíticos, microrganismos que habitam os tecidos de plantas sem causar prejuízos a seu hospedeiro (Tan; Zou, 2001; Hyde; Soyong, 2008). Dentre esses, nosso grupo tem estudado fungos filamentosos associados à espécie vegetal *Tocoyena bullata*, de onde isolou-se a cepa TB1, identificada como do gênero *Sordaria*, e da espécie vegetal *Humiria balsamifera*, de onde foi isolado e identificado o fungo *Stemphylium lycopersici* (Queiroz, 2015). Este microrganismo foi identificado pela primeira vez por Enjoji em 1931 na espécie *Solanaceae* relatado como patogênico e causador da mancha foliar em diversas espécies (Nasehi et al, 2014). Porém, em *H. Balsamifera*, não causa danos aparentes e em trabalho de



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Queiroz (2015), foi verificada sua capacidade como produtor de transaminases, demonstrando seu potencial em processos biotecnológicos, uma vez que fungos são bem descritos e conhecidos produtores de enzimas extracelulares.

Dentre as enzimas produzidas por fungos, estão as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3), que possuem estabilidade em solventes orgânicos, são enatio e regio seletivas e não necessitam de co-fatores (Bhagobaty; Josh, 2012). Por essas características, tem sido aplicadas em processos industriais, em catálise enzimática, que possui vantagens econômicas, ecológicas e sociais frente à catálise química convencional, tais como a utilização de condições amenas de temperatura e pressão, além da baixa produção de resíduos, em detrimento da especificidade e a seletividade da enzima (Robles-Medina et al, 2009; Junior et al, 2012). Deste modo, o conhecimento do potencial de enzimas oriundas de fungos endofíticos tende a tornar o processo mais favorável, tanto do ponto de vista ecológico, por ser um processo limpo e seguro, quanto do ponto de vista econômico, pois aumenta-se a oferta de fontes enzimáticas além de favorecer o conhecimento destes microrganismos, que ainda são pouco estudados.

O objetivo deste trabalho foi rastrear a atividade lipolítica dos fungos endofíticos TB1 e *Stemphylium lycopersici*, para aplicação como biocatalizadores em reações de hidrólise de interesse industrial e farmacêutico.

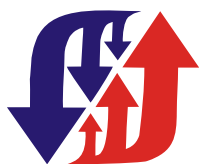
### MATERIAL E MÉTODOS

Para o rastreamento inicial da atividade enzimática, 6 fragmentos, de 0,5 cm de diâmetro dos fungos supracitados foram inoculados em um meio pré-fermentativo e incubados por 48 horas, a 30°C e 180 rpm. Este meio é composto de 15 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de sacarose (Oliveira et al., 2012) e tem como objetivo o aumento da massa micelial. Após o período de incubação, a totalidade da massa micelial foi inoculada em um meio fermentativo, para estimular a produção de lipase, constituído de tween 80 (5,0 g/L<sup>-1</sup>), óleo de soja (9,0g/L<sup>-1</sup>), sulfato de amônio (1,0g/L<sup>-1</sup>), glicerol (3,0g/L<sup>-1</sup>) sulfato de manganês (0,02g/L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (3,0 g/L<sup>-1</sup>) solubilizados em tampão fosfato (pH 6,5) em 25 mmol<sup>-1</sup> (Oliveira et al., 2012). Este meio foi incubado em *shaker* (SOLAB) por 48 horas a 30° C e 180 rpm.

Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas dos meios fermentativos nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas e centrifugadas por 10000 rpm por 20 minutos. Com o meio fermentativo foi realizado o método de hidrólise do *p*-nitrofenil butirato em *p*-nitro fenol, adaptado de Lin et al. (1995). A atividade enzimática foi definida pela concentração de *p*-nitro fenol em mol/L, baseando-se no coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitro fenol, obtido a partir de uma curva de calibração ( $R^2 = 0,99$ ) a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de *p*-nitro fenol por minuto.

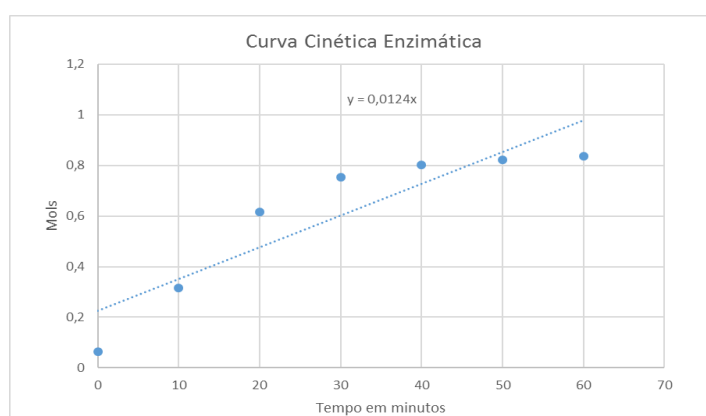
### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos ensaios de atividade enzimática observou-se para o fungo *Stemphylium lycopersici* que os tempos de 48 e 72 horas de incubação apresentaram as maiores concentrações em *p*-nitro fenol com 29,60 U/mL e 30,20 U/mL, respectivamente e para a cepa TB1, as atividades ficaram em 23,20 U/mL em 48 h e 25 U/mL em 72h. Resultados

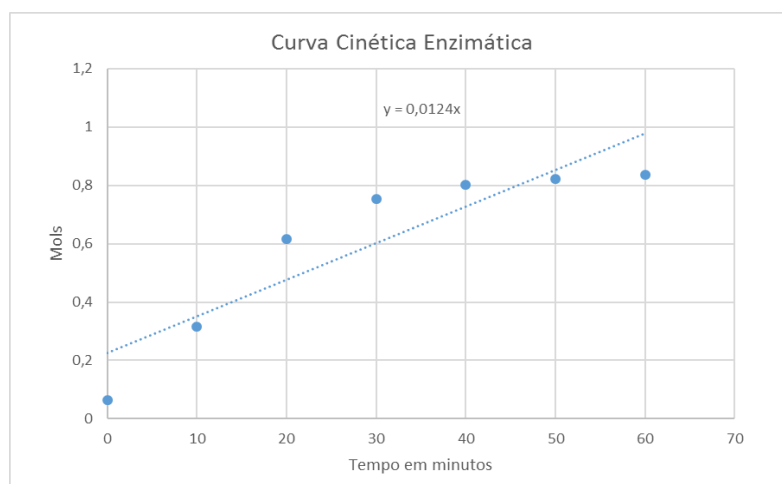


## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

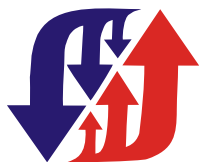
semelhantes foram encontrados por Oliveira et al, (2012) com a espécie *Candida guilliermond*, que obteve 25 U/mL de atividade enzimática e maiores que os obtidos por Menoncin (2007), 4,37 U/mL com o fungo *Penicillium verrucosum* e com o obtido por Nascimento; Santos; Andrade et al (2014) com os morfotipos M62 (2,684 U/mL) e M233 (1,386 U/mL) após 144 horas de incubação. Notou-se que com o aumento na concentração do *p*-nitro fenol formado, há um aumento na velocidade da reação para ambos os microrganismos (gráficos 1 e 2). Demonstrando que a atividade enzimática é proporcional à sua concentração no meio reacional. Estes resultados demonstram que ambos os fungos, *Stemphylium lycopersici* e TB1, mostraram-se promissores biocatalisadores em reações de hidrólise. Estudos para a atividade de esterificação para possíveis aplicações biotecnológicas estão sendo realizados.



**Gráfico 1.** Concentração de *p*-nitro fenol em mols por minuto após 72 horas de incubação para *Stemphylium lycopersici*.



**Gráfico 2.** Concentração de *p*-nitro fenol em mols por minuto após 48 horas de incubação para TB1.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### CONCLUSÕES

A cepa do gênero *Sordaria*, TB1 e o fungo *Stemphylium lycopersici* apresentaram bons resultados para atividade cinética e enzimática. Pela primeira vez foi determinada esta atividade para o fungo endofítico *Stemphylium lycopersici* demonstrando-se promissor para aplicações industriais e biotecnológicas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bhagobaty RK, Joshi SR. 2012. Enzymatic Activity of Fungi Endophytic on Five Medicinal Plant Species of the Pristine Sacred Forests of Meghalaya, India. *Biotechnol Bioproc E*, 17, p. 33-40.
- Hyde KD, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, pp. 163–173
- Junior II, Flores MC, Sutili FK, Leite SGF, Miranda LS, Leal ICR, De Souza, R.O.M.A. 2012. Doe Oriented Reaction Optimization on the Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis. *Journal of Mol Cat. B, Enz.* 77 p.53-58.
- Lin SF, Chiou CM, Tsai YC. 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.* 17, p. 959-962.
- Menocin S. 2007. Concentração, Imobilização e Caracterização Parcial de Lipase produzida por *Penicillium verrucosum* utilizando Fermentação em Estado Sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS.
- Nascimento CS, Santos VL, Andrade MHC. 2014. Análise da produção de protease e lipase por fungos Filamentosos isolados do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (jacq) lood. Ex mart). In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ).
- Nasehi A, Kadir JB, Nasr-Esfahani M, Abed-Ashtiani F, Wong MY, Rambe SK, Golkhandan E. 2014. Analysis of genetic and virulence variability of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of vegetable crops. *Eur J Plant Pathol*. [Online] Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10658-014-0460-3#page-1>
- Oliveira ACD, Watanabe FMF, Vargas JVC, Rodrigues MLF, Mariano AB. 2012. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves. *Biocatal Agric Biotechnol.* v.1, p. 295–300.
- Pereira MCA, Cordeiro SZ, Araujo DSD. 2004. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. *Acta bot. bras.* 18(3): 677-687.
- Queiroz MSR. 2015. Fungos endofíticos da espécie vegetal *Humiria balsamifera* da Restinga de Jurubatiba em estudos de biotransformação enantiosseletiva da rac-1-feniletilamina e de atividade antimicobacteriana Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E. 2009. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.* 27, 398–408.
- Tan RX, Zou WX. 2001. Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites, *Nat. Prod. Rep.* 18: 448–459.