



XI-109 – DOSAGEM DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE MICRORGANISMOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS VISANDO SUA UTILIZAÇÃO NA GERAÇÃO DE BIODIESEL

Celson Rodrigues⁽¹⁾

Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal do Espírito Santo. Mestre em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa (1985). Doutorando em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo. Professor Adjunto do DPV-UFES.

Sérvio Túlio Alves Cassini

Biólogo pela Universidade Federal de Minas Gerais (1975). PhD. Microbiologia pela Universidade Estadual da Carolina do Norte (NCSSU) - EUA - 1988. Pós-Doutorado em Microbiologia Ambiental na Universidade do Tennessee - EUA - 1997. Prof. Adjunto do DHS e do PMEIA - UFES.

Ricardo Franci Gonçalves

Engenheiro Civil pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (1984). Doutor em Engenharia do Tratamento de Águas pelo Instituto Nacional de Ciências Aplicadas de Toulouse – França (1993). Prof. do DEA e do PMEIA - UFES.

Junko Tsukamoto

Engenheira Química (Universidade Presbiteriana Mackenzie). Mestre em Engenharia de Alimentos (UNICAMP). Doutora em Química (UNICAMP). Pós-Doutoranda em Engenharia Ambiental (UFES).

Tiago Gollner Perovano

Graduando em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Bolsista de Iniciação Científica do CNPq (PIBIC/UFES).

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Saneamento – LABSAN. Av. Fernando Ferrari sn. - Goiabeiras – Vitória – ES – Brasil. CEP: 29060-970. Telefax.: (027) 3335-2165. E-mail: celsonrodrigues@yahoo.com.br

RESUMO

Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos microrganismos como produtores de lipases, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em processos hidrolíticos e biocatalíticos, vinculados ao saneamento ambiental e a geração de biocombustíveis, como o biodiesel. Baseado no exposto, este trabalho teve como objetivo dosar a atividade lipolítica específica e a biomassa seca produzida por 20 isolados microbianos (15 de fungos filamentosos e 5 de fungos leveduriformes) obtidos de amostras ambientais e desenvolvidos em um processo de fermentação em estado líquido (FEL) ou submersa, com utilização dos métodos espectrofotométrico e gravimétrico, respectivamente. Os níveis de atividade lipolítica específica variaram de $0,13 \pm 0,03$ a $18,06 \pm 0,36$ U.mg⁻¹, sendo que o isolado F18 (*Rhizomucor* sp.) apresentou o menor nível e o F2 (*Penicillium* sp.) o maior nível de atividade lipolítica específica, seguido pelos isolados F96 (*Geotrichum candidum*) e F41 (*Beauveria bassiana*), com $U = 14,25 \pm 0,31$ U.mg⁻¹ e $U = 9,13 \pm 0,23$ U.mg⁻¹, respectivamente, utilizando o meio de cultura mínimo (MMOS) acrescido de óleo de soja comercial a 10% (v/v), como fonte exclusiva de carbono e indutor de atividade lipolítica. Os maiores valores de biomassa seca obtidos foram os dos isolados F107 (fungo leveduriforme), F 104 (*Botrytis* sp.) e F41 (*Beauveria bassiana*), de $12,68 \pm 0,15$, $11,89 \pm 0,10$ e $10,74 \pm 0,19$ mg/mL de meio de cultura, respectivamente. Verificou-se fraca correlação negativa entre a produção de biomassa fúngica no meio líquido utilizado e a atividade lipolítica específica, explicada em função de o método utilizado detectar a atividade enzimática extracelular principalmente, em detrimento da intracelular. Os três isolados que maior atividade lipolítica específica apresentaram neste trabalho, assim como aquele com a menor, foram selecionados para utilização em etapas subsequentes de nossa pesquisa. Este último em função do amplo potencial para atividade lipolítica intracelular detectada em trabalho anteriormente por nós relatado.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, Microrganismos, Fermentação em Estado Líquido, Lipases, Dosagem da Atividade Lipolítica, Espectrofotometria.



INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos. Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da última década que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado. Dentre as numerosas aplicações de reações enzimáticas em meio orgânico destacam-se a síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica.

Dentre as enzimas com utilização comercial apresentam particular importância as lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3), porque atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos e, em baixas concentrações de água podem ainda catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação, o que as tornam de grande interesse industrial, com um vasto histórico de aplicações.

Apesar de já amplamente utilizadas em vários segmentos industriais, como alternativa tecnológica enzimática na produção de biodiesel sua utilização ainda não se encontra devidamente consolidada, apesar das vantagens citadas por inúmeros autores, quando se cogita em utilizar resíduos oleosos do saneamento ambiental (OGR), como matéria prima na produção. Tanto a utilização deste tipo de matéria prima quanto a catálise enzimática no processo de geração do biodiesel tem sido objeto de inúmeras pesquisas em todo o mundo, com notórias vantagens relatadas sob o ponto de vista ambiental e econômico do processo, nas condições nas quais foram desenvolvidos os trabalhos, enquadrando-se perfeitamente no conceito de “tecnologia limpa” de produção. Em escala comercial, no entanto, ainda existem algumas limitações de ordem técnica e, principalmente econômica, à sua utilização, devido ao elevado custo da enzima.

As lipases produzidas por microrganismos são as mais utilizadas, por sua relativa facilidade de produção, pois são extracelulares em sua maioria, pela diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las, e com potencial para exploração comercial. São mais interessantes devido à sua maior estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enérgica seletividade, quando comparadas a lipases de outras fontes. Os microrganismos produtores podem ser isolados de resíduos industriais e domésticos oleosos e/ou gordurosos, de solos contaminados com óleos e graxas, de plantas e animais vivos ou mortos, e de sementes oleaginosas e são representados por fungos (filamentosos e leveduriformes) e por bactérias.

Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação. Os trabalhos relatados em literatura sobre lipases fúngicas são numerosos, sendo que os mais extensivamente estudados são os fungos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus delemar* e *Penicillium cyclopium*, dentre outros.

Baseado no exposto, este trabalho teve como objetivo dosar a atividade lipolítica específica e a biomassa seca produzida por 20 isolados microbianos (15 de fungos filamentosos e 5 de fungos leveduriformes) obtidos de amostras ambientais e desenvolvidos em um processo de fermentação em estado líquido (FEL) ou submersa, com utilização dos métodos espectrofotométrico e gravimétrico, respectivamente, visando sua utilização em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e, biocatalítico, em uma rota etanólica enzimática para a geração de biodiesel, tendo diferentes resíduos oleosos do saneamento como matéria-prima, em pesquisa no Departamento de Engenharia Ambiental da UFES.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN, do Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), em Vitória, ES.

PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO (FEL)

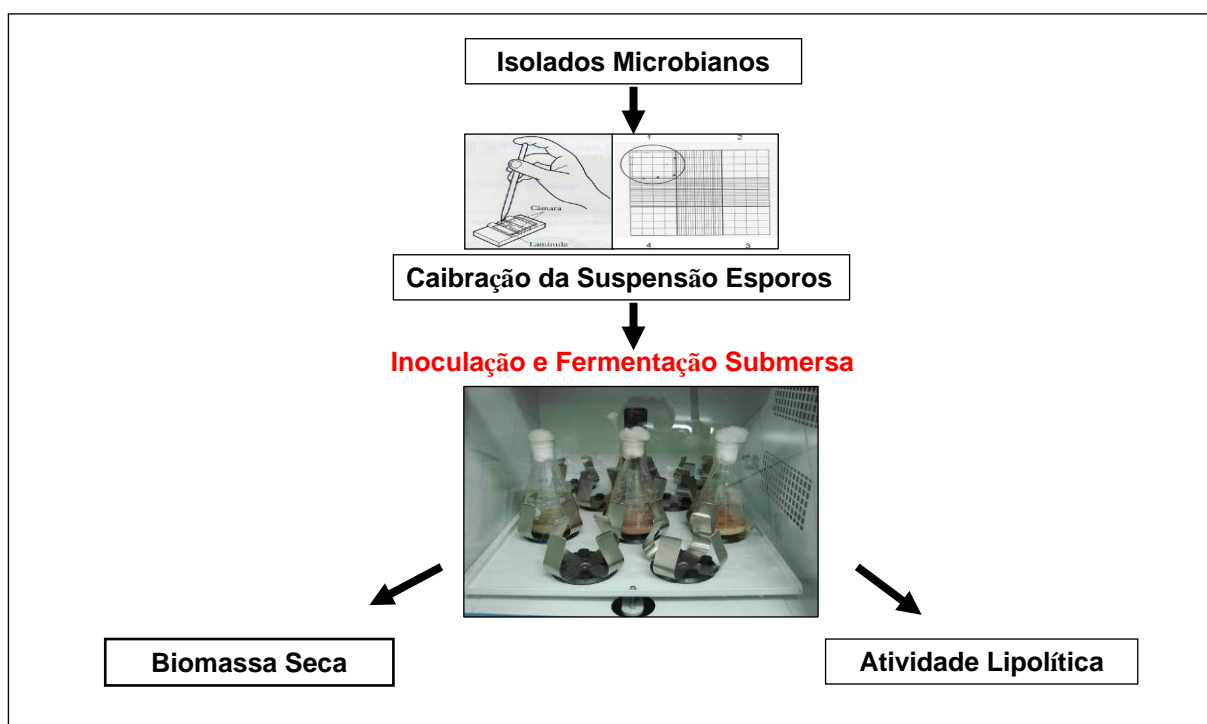
Para a produção de lipases foi utilizado o processo de fermentação submersa (FS), com a utilização do meio de cultura mínimo líquido, acrescido de óleo de soja comercial a 10% (v/v), que passou a ser denominado MMOS. O meio mínimo teve a composição por 1000 ml de água destilada, assim definida: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,0 g;



KH_2PO_4 , 0,9 g; NaCl , 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3; Na_2HPO_4 , 6,2 g; solução de micronutrientes, 1 ml. O pH inicial foi de 6,5 (tampão fosfato 0,1 M). A solução de micronutrientes utilizada teve a seguinte composição, por 1000 ml: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2000 mg; ZnCl_2 , 50 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 500 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 mg; AlCl_3 , 50 mg; $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2000 mg; e, HCl (concentrado), 1 ml. A solução foi agitada em agitador magnético por 20 minutos e transferida para frascos erlenmeyers de 1000 mL para autoclavagem por 20 minutos a 120 °C, seguindo-se o seu armazenamento a 5 °C, para posteriores utilizações.

Os isolados microbianos foram inoculados em 50 ml do meio de cultura, contidos em frasco erlenmyer de 125 ml. Para a obtenção do inoculante os isolados foram retirados do armazenamento no qual se encontravam, a 5 °C, e foram propagados a 30°C por cinco dias, em placas de Petri com o meio de cultura BDA, em estufa incubadora (DBO – Biotec BT424). Os esporos foram removidos pela adição cinco (5) ml de água destilada esterilizada sobre a colônia, seguida por uma raspagem leve com alça de Drigalski, sendo a suspensão resultante transferida para um béquer. A calibração da suspensão de esporos (inoculante) foi com a utilização de câmara de Neubauer, adequando-se a concentração para aproximadamente 10^7 esporos/ml. O volume de inoculante utilizado por frasco foi de 1 ml para todos os isolados microbianos. Cada frasco assim inoculado constituiu uma unidade experimental, sendo utilizados dois por isolado (duplicata). A incubação ocorreu em incubadora rotativa (Incubadora Shaker Orbital de Bancada, NT712, Novatécnica) a 30 ° C, por 120 horas, com 150 rpm. Decorrido este tempo, previamente determinado como o de maior intensidade de atividade lipolítica, foi interrompido o processo de fermentação submersa e procedida a obtenção do extrato bruto e biomassa, destinadas às dosagens de proteínas totais e da atividade lipolítica específica e por biomassa microbiana seca.

Figura 1: Processo de fermentação em estado líquido (FEL), utilizado para a produção de lipases por 20 isolados fúngicos, em incubadora tipo shaker, a 30°C, e 150 rpm, por 96 horas.



DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA SECA

O conteúdo protéico dos extratos obtidos dos cultivos microbianos no processo de fermentação submersa foi determinado por espectrofotometria, tendo como base uma curva protéica padrão, definida segundo o método de Bradford (1976), com utilização de albumina bovina como substrato.

O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg de Coomassie Blue G250 (Merck, Alemanha) em 50 mL de etanol a 95% (QM, Brasil). Essa solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% (Vetec, Brasil)

e diluída com 1 L de água destilada. O reagente foi então filtrado com papel de filtro Whatman nº. 1. Para elaborar a curva-padrão foi utilizada a solução estoque de soro de albumina bovina (BSA, Sigma, EUA) numa concentração de 1 mg/mL em água destilada esterilizada.

Para a elaboração da curva padrão foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100 µL da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100 µL. O ensaio foi realizado em triplicata. Em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Bradford a cada tubo de ensaio e agitados no vórtex mixer (Vision Scientific co., LTD, VS-1300V, Korea). As amostras e o branco (5 mL de reagente de Bradford e 100 µL de água destilada esterilizada) foram medidas a uma absorbância de 595nm entre 2 minutos e 1 h após a agitação.

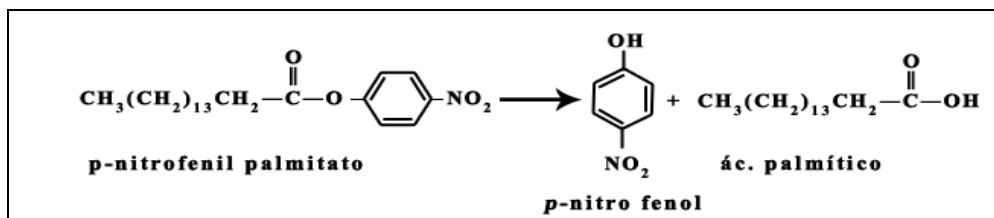
A dosagem de proteínas totais ocorreu, decorridas 120 horas da fermentação submersa. Para isto o conteúdo de cada frasco de cultivo microbiano foi filtrado a vácuo, em gaze e papel de filtro Watman nº 4. Do conteúdo líquido resultante foram retiradas tres amostras (triplicata) de um (1) mL e cada uma foi colocada em um frasco eppendorf estéril. Estes frascos foram centrifugados a 15000 g (Centrífuga MIKRO 22R, HETTINGER ZENTRIFUGEN, Germany), por 20 minutos a 4 °C, do que resultou um sobrenadante, denominado de extrato protéico, que foi utilizado para dosagem de proteínas, de maneira idêntica à descrita para obtenção da curva padrão, porém substituindo a BSA pelo extrato proteico e, para a dosagem da atividade lipolítica.

Do processo de filtração acima descrito, resultaram os papeis de filtro contendo a biomassa microbiana residual que, após lavados com acetona e água destilada, foram colocados em estufa de secagem com circulação de ar e temperatura de 100°C, até a obtenção do peso constante, o que aconteceu com aproximadamente 48 horas. Antes da utilização no processo de filtração, os papeis filtro haviam sido colocados em placas de Petri e secos durante 12 horas a 100°C, e suas massas determinadas, permitindo assim a obtenção dos pesos secos da biomassa microbiana através da diferença dos pesos, gravimetricamente.

DOSAGEM DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA ESPECÍFICA

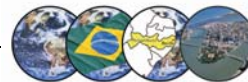
Os extratos protéicos ou enzimáticos obtidos na etapa anterior foram utilizados para a dosagem da atividade lipolítica. Para tal foi utilizado o substrato lipídico sintético à base de p-NPP (p-nitrofenil palmitato), preparado conforme Winkler & Stuckmann (1979), qual seja: 30 mg de p-NPP foram diluídos em 10 mL de isopropanol, seguido por mistura com 90 mL de solução tampão fosfato (0,05M, pH 8,0), contendo 207 mg de deoxicolato de sódio (Sigma) e 100 mg de goma arábica. O substrato foi acondicionado em tubos de ensaio, colocando-se 2,4 ml por tubo. Os tubos, na avaliação da atividade lipolítica, foram pré-incubados em banho termostatzado a 37°C (Banho Termostatzado Y28, GRANT Instruments Ltd, Cambridge, England, e Thermo Haake B3 IP30, Typ 003-5007, Germany). A reação enzimática foi iniciada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático e durou 15 minutos. Nesta reação, conforme observado na Figura 1, o p-nitrofenil palmitato foi hidrolisado pela ação da lipase, liberando p-nitrofenol e ácido palmítico, e a atividade lipolítica foi determinada através da estimativa p-nitrofenol liberado, que formou um cromógeno amarelo (ion fenolato) sob condições alcalinas, apresentando λ máximo a 410 nm, detectado por espectrofotometria (Espectrofotometer ULTROSPEC 1000, UV/Visible – Pharma Biotec), decorrido o tempo reacional.

Figura 2: Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato e a formação do cromogênico fenolato.



A atividade lipolítica foi quantificada de acordo com a seguinte equação: $U (\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{\text{Abs} \cdot \text{vol}}{\varepsilon \cdot T \cdot p}$

onde: Abs = Absorbância a 410 nm; Vol = Volume do ensaio em mL; ε = Coeficiente de extinção molar (18,5 mL µmol⁻¹ cm⁻¹, para o p-nitrofenol produzido); T = Tempo em minutos; p = miligrama de proteína. A utilização desta equação foi de acordo com publicação de Rowe & Howard (2002) que a utilizaram para



quantificar a atividade enzimática de uma esterase e, na qual a unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação. No presente trabalho os resultados foram apresentados como unidade de atividade lipolítica (U) por miligrama de proteína e por miligrama de biomassa microbiana seca, para todos os tratamentos.

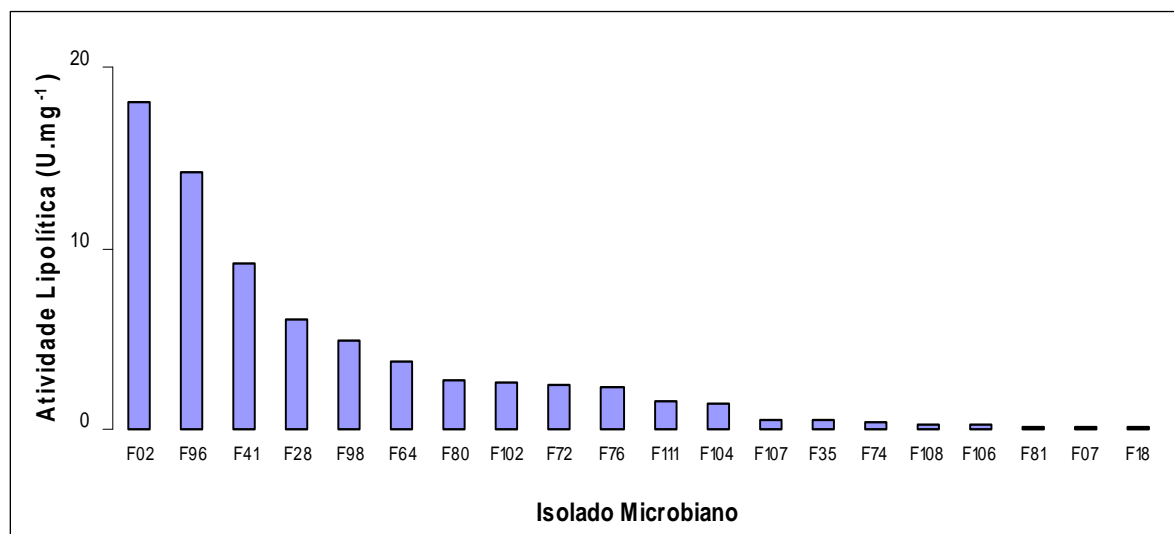
A análise e os gráficos estatísticos dos dados obtidos neste trabalho, foram efetuadas com a utilização do software “SPSS for Windows” versão 11.5.0, pertencente ao Departamento de Estatística da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES.

RESULTADOS

Em trabalhos anteriores foi relatada a obtenção de 113 isolados de microrganismos de amostras ambientais, a caracterização, identificação e seleção de 20 isolados em meios de cultura sólidos e reacionais. Em continuidade, a produção de lipases por estes isolados selecionados foi novamente realizada, neste trabalho, e os dados referentes à biomassa seca após a fermentação em meio mínimo + óleo de soja (MMOS), assim como os valores referentes às unidades de atividade lipolítica específica são apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 3 e 4, deste artigo.

Os valores de biomassa e, em especial, de atividade da enzima na hidrólise de óleos vegetais, tem sido amplamente utilizados para efeito de comparação e seleção de novos isolados produtores de lipase. Estes valores podem variar significativamente dependendo do tipo de fermentação, da composição do meio de cultivo e também de outras variáveis do processo fermentativo, tais como pH, temperatura de incubação e presença de indutores da síntese de lipase, como os óleos vegetais (Carvalho *et.al.*, 2005). Neste trabalho são variáveis apenas os isolados, a atividade lipolítica específica e a biomassa microbiana seca, produzida no processo de fermentação em estado líquido.

Figura 3: Atividade lipolítica específica de 20 isolados microbianos, em processo de fermentação em estado líquido, após 96 horas de incubação, a 30°C, com 150 rpm.



Os níveis de atividade lipolítica específica variaram de $0,13 \pm 0,03$ a $18,06 \pm 0,36 \text{ U.mg}^{-1}$, sendo que o isolado F18 (*Rhizomucor* sp.) apresentou o menor nível e o F2 (*Penicillium* sp.) o maior nível de atividade lipolítica específica, seguido pelos isolados F96 (*Geotrichum candidum*) e F41 (*Beauveria bassiana*), com $U = 14,25 \pm 0,31 \text{ U.mg}^{-1}$ e $U = 9,13 \pm 0,23 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente.

Em trabalhos anteriores relatamos a não ocorrência de atividade lipolítica extracelular (IE) detectável por parte do isolado F18 (IE= 0,00) pelo método e meio de cultura utilizados (MB) e, ao contrário, elevada atividade por parte de F2 (IE=17,63), F96 (IE=18,87) e F41 (IE=10,57), resultados que corroboram com o observado neste trabalho, em que a atividade enzimática foi avaliada em processo de fermentação em estado líquido (FEL), utilizando o óleo de soja como fonte exclusiva de carbono e indutor da atividade lipolítica. Os



três isolados que maior atividade lipolítica específica apresentaram neste trabalho, assim como aquele com a menor, foram selecionados para utilização em etapas subsequentes de nossa pesquisa.

Tabela 1: Produção de biomassa e atividade lipolítica específica de 20 isolados microbianos, em processo de fermentação em estado líquido, após 96 horas de incubação, a 30°C, com 150 rpm.

Isolado Microbiano	Identificação	Biomassa seca (mg.mL ⁻¹)	Atividade lipolítica específica (U. mg ⁻¹)
F80	Levedura	10,12 ± 0,16	2,74 ± 0,17
F76	<i>Cladosporium</i> sp.	9,02 ± 0,13	2,36 ± 0,39
F74	<i>Fusarium</i> sp.	10,27 ± 0,12	0,39 ± 0,04
F72	<i>Colletotrichum</i> sp.	9,05 ± 0,18	2,49 ± 0,25
F81	<i>Aspergillus</i> sp.	9,87 ± 0,21	0,18 ± 0,05
F35	<i>Beauveria bassiana</i>	10,74 ± 0,19	0,47 ± 0,01
F28	<i>Cladosporium</i> sp.	7,61 ± 0,15	6,10 ± 0,22
F18	<i>Rhizomucor</i> sp.	10,25 ± 0,8	0,13 ± 0,03
F07	<i>Verticillium</i> sp.	10,50 ± 0,15	0,18 ± 0,01
F02	<i>Penicillium</i> sp.	10,19 ± 0,13	18,06 ± 0,36
F41	<i>Beauveria bassiana</i>	9,62 ± 0,14	9,13 ± 0,23
F64	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	9,71 ± 0,16	3,79 ± 0,07
F96	<i>Geotrichum candidum</i>	9,23 ± 0,18	14,25 ± 0,31
F98	<i>Cladosporium</i> sp.	7,82 ± 0,13	4,85 ± 0,16
F102	<i>Penicillium</i> sp.	8,77 ± 0,12	2,56 ± 0,05
F104	<i>Botrytis</i> sp.	11,89 ± 0,10	1,44 ± 0,11
F106	<i>Rhizomucor</i> sp.	9,91 ± 0,12	0,25 ± 0,01
F107	Levedura	12,68 ± 0,15	0,51 ± 0,10
F108	Levedura	9,07 ± 0,15	0,28 ± 0,08
F111	Levedura	10,45 ± 0,11	1,53 ± 0,25

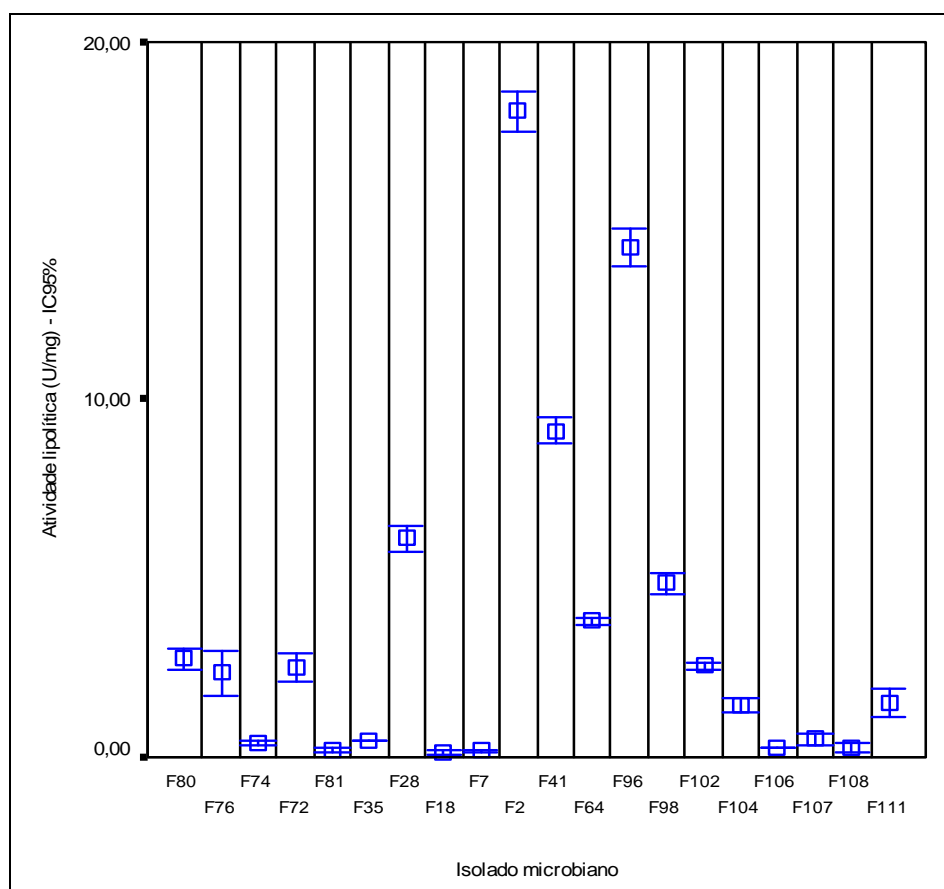
Os maiores valores de biomassa seca obtidos foram os dos isolados F107 (fungo leveduriforme), F104 (*Botrytis* sp.) e F41 (*Beauveria bassiana*), de 12,68 ± 0,15, 11,89 ± 0,10 e 10,74 ± 0,19 mg/mL de meio de cultura, respectivamente.

Considerando todos os valores de biomassa obtidos neste trabalho, verificou-se que para alguns isolados, tais valores aproximam-se daqueles obtidos por Carvalho et.al. (2005), em relação à *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium solitum*, utilizando um meio com a seguinte composição (p/v): glicose 1,0%, peptona 2,0%, extrato de levedura 0,5%, óleo de oliva 1,0%, NaNO₃ 0,1%, KH₂PO₄ 0,1% MgSO₄. 7H₂O 0,05%, após 72 horas de fermentação, a 35°C, com 130 rpm. Porém, a atividade lipolítica específica, neste trabalho, mostra-se muito superior à obtida por aqueles autores, que foi respectivamente de somente 0,56, 0,42 e 0,33 U.mg⁻¹, provavelmente pela utilização de um meio muito mais rico em nutrientes, principalmente o nitrogênio e concentração bem menor de óleo vegetal (óleo de oliva, 1%) do que a que utilizamos (10 % de óleo de soja), além de diferenças nas condições de condução do processo de fermentação. Em contrapartida aos nossos resultados, em relação específica a *Geotrichum candidum*, uma lipase comercializada pela Amano Pharmaceutical Co (GC-4), Japão, apresenta atividade específica de 80 e de 1.054 U/mg quando bruta e após purificada em fenil-sepharose (CL-4B), respectivamente, conforme Hedrich et al. (1991), citados por Carvalho et. al. (2005).

Diversos níveis de atividade enzimática são descritos para isolados fúngicos pertencentes aos mesmos gêneros daqueles que foram avaliados neste trabalho, sob inúmeras condições teste, diferentes daquelas que utilizamos, permitindo algumas comparações. Maia et.al. (1999), obtiveram um valor máximo de atividade lipolítica de 10,5 U.L⁻¹ para o isolado FS1 de *Fusarium solani*, após 72 horas de cultivo a 25°C em frasco agitado a 120 rpm em um meio contendo peptona a 3% (w/v), glucose a 1% (w/v) e óleo de oliva a 0,5% (v/v). A presença da glucose foi considerada pelos autores como inibidora da atividade lipolítica.



Figura 4: Intervalo ao nível de 95% de confiança (SPSSW) para médias de atividade lipolítica específica de 20 isolados microbianos, em um processo de fermentação em estado líquido (FEL), após 96 horas de incubação, a 30°C, com 150 rpm.



Em relação a isolados de *Penicillium*, fungo no qual constatamos a melhor atividade lipolítica específica, vários trabalhos foram encontrados envolvendo produção, caracterização e purificação de lipases de diferentes espécies, como *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. simplicissimum*, *P. caseicolum*, *P. restrictum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. camembertii*, *P. abeanum*, entre outras espécies (Reetz, 2002; Costa Neto, 2002; Freire *et al.*, 1997).

Comparados aos dados de crescimento e de atividade da lipase relatados para um isolado brasileiro de *Penicillium restrictum* (14,2 mg de biomassa/mL de meio e 13,0 U/mL, respectivamente) após fermentação em meio líquido composto de (p/v) óleo de oliva 1,0%, peptona de carne 2,0%, extrato de levedura 0,1% e NaCl 0,5%, Carvalho *et al.* (2005) verificaram que *Penicillium solitum* mesmo apresentando um crescimento menor (656 mg de biomassa/100mL de meio de cultivo), a atividade de hidrólise da lipase produzida foi próxima (10,5 U/mL) à relatada para a lipase daquele fungo. Concentrações de peptona abaixo de 3% (w/v) reduziram a produção de lipase enquanto que o aumento na concentração de óleo de oliva acima de 0,5% (v/v) não estimulou a produção da enzima. Em trabalhos com o fungo *Penicillium corylophilum* (IOC 4211) visando utilização de lipases em biocatálise de solventes orgânicos foi observada atividade lipolítica específica de $11,82 \pm 1,35$ U/mg de proteína, após 144 horas, a 29°C e 120 rpm (BARON *et al.* 2005).

Roveda (2007) avaliou a produção de lipases por fungos isolados a partir de efluentes de laticínios por fermentação submersa, a partir de uma seleção prévia feita em meio de cultura BDA contendo azeite de oliva como fonte de carbono. Foram pré-selecionados 21 isolados pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*. A etapa de seleção selecionou os fungos E6, E7, E8, E9, E10, E12, E17, E20 e E21 devido à capacidade de crescimento em meio contendo azeite de oliva. Na fermentação submersa, os fungos E9 (*Aspergillus*), E21 (*Aspergillus*) e E20 (*Penicillium*) foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de 1,250 a 2,250 $\mu\text{molAG/mL.min}$, utilizando-se como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador. A fermentação em estado líquido, tem como característica principal



a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, é o processo mais utilizado para produção de lipases, sendo ainda muito utilizada em pesquisas para avaliar o potencial lipolítico de isolados microbianos.

O teste de Tukey, efetuado com o objetivo de comparar os valores de atividade lipolítica obtidos para os 20 isolados analisados, permitiu agrupá-los em 9 grupos, mostrados na Tabela 2. Verificou-se diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade entre os grupos, o mesmo não se verificando dentro dos grupos ($p > 0,05$ em cada grupo).

Tabela 2: Grupos de isolados microbianos definidos conforme os valores de atividade lipolítica específica (U.mg^{-1}), apresentada em processo de fermentação em estado líquido, após 120 horas de incubação a 30°C , com 150 rpm.

Isolado	Grupos de Isolados/Atividade lipolítica específica (U.mg^{-1})								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
F18	0,13								
F7	0,18								
F81	0,18								
F106	0,25								
F108	0,13								
F74	0,39								
F35	0,47								
F107	0,51								
F104		1,44							
F111		1,53							
F76			2,36						
F72			2,49						
F102			2,55						
F80			2,74						
F64				3,79					
F98					4,85				
F28						6,11			
F41							9,13		
F96								14,25	
F2									18,06

Dentro dos grupos não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey (0,05).

Dez (10) grupos de isolados foram obtidos neste trabalho por comparação de médias pelo teste de Tukey (0,05), quanto à produção de biomassa seca em processo de fermentação em estado líquido (FEL), após 120 horas de incubação a 30°C , com 150 rpm, e podem ser observados na Tabela 3. Verificou-se maiores valores de biomassa compatíveis com alguns dos isolados que apresentaram maiores atividade lipolíticas específicas. Porém esta relação não pode ser confirmada neste trabalho, considerando todos os isolados, dado que verificamos fraca correlação (negativa) entre a produção de biomassa fúngica no meio líquido utilizado e a atividade lipolítica específica (Figura 6), explicada em função de o método utilizado detectar a atividade enzimática extracelular principalmente, em detrimento da intracelular. Este resultado está de acordo com o observado na seleção de isoladas que efetuamos em meio sólido, em que vários deles caracterizaram por colônias pequenos ou moderados em meio MB, se comparados a outros, porém com elevados índices enzimáticos constatados. Estes isolados correspondem à maioria dos testados neste trabalho.

É importante mencionar o bom desenvolvimento de biomassa fúngica que obtivemos no meio MMOS, cuja fonte exclusiva de carbono foi 10 % de óleo de soja, para a mais da metade dos isolados testados. Não encontramos relatos da utilização deste meio, com a composição que utilizamos, com os mesmos objetivos. Deve-se considerar, no entanto, que apesar dos efeitos da composição de meios para a produção de lipases ter sido extensivamente investigada, os mecanismos fisiológicos que governam o processo não são claros e devem continuar sendo investigados, conforme afirmam Azeredo *et. al.* (2007).



Figura 5: Produção de biomassa seca por 20 isolados microbianos, em processo de fermentação em estado líquido (FEL), em MMOS, após 96 horas de incubação, a 30°C, com 150 rpm.

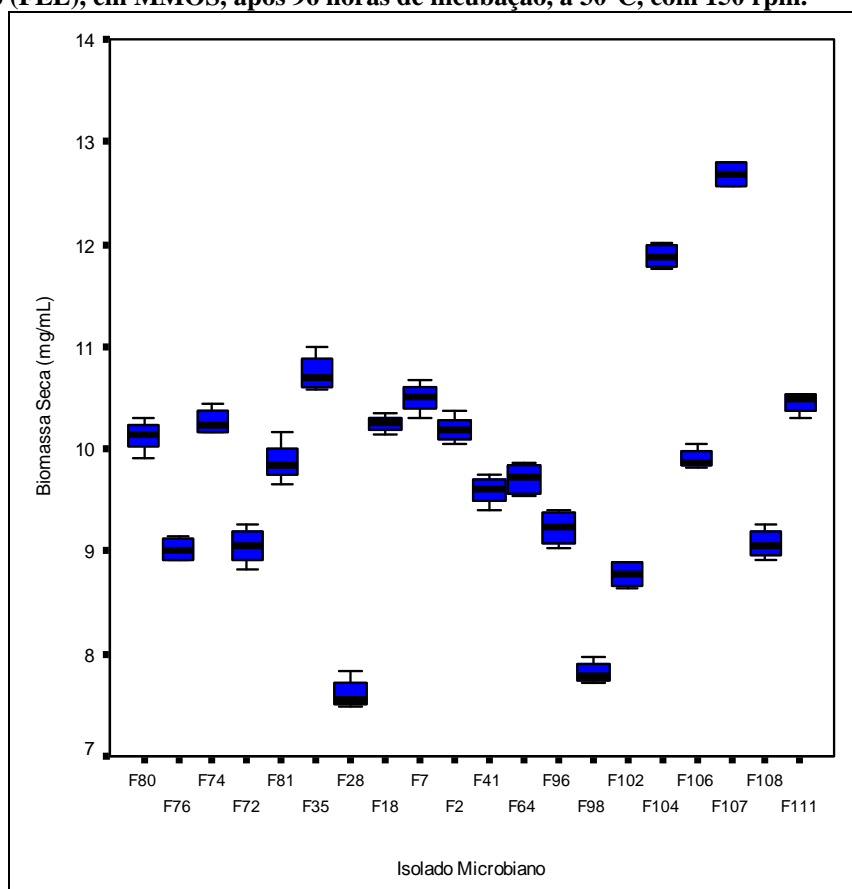
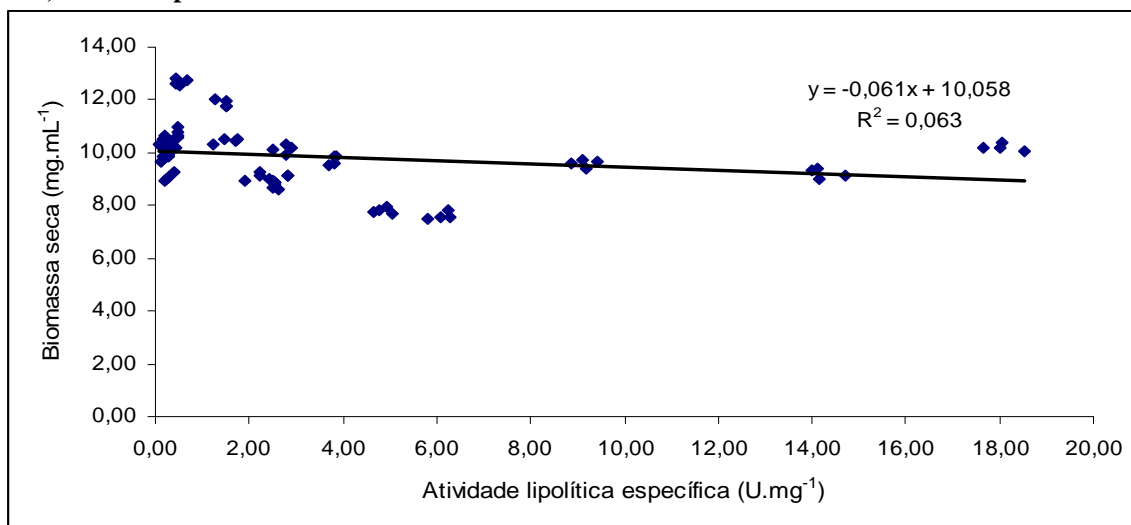


Tabela 3: Grupos de isolados microbianos definidos em função valores de biomassa seca, obtidos em processo de fermentação em estado líquido(FEL), após 120 horas de incubação a 30°C, com 150 rpm.

Isolado	Grupos de Isolados/Peso de Biomassa Seca (mg.mL ⁻¹)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
F28	7,61									
F98	7,82									
F102		8,77								
F76		9,02	9,02							
F72		9,05	9,05							
F108		9,07	9,07							
F96			9,23							
F41				9,60						
F64				9,71						
F81				9,87	9,87					
F106				9,91	9,91					
F80					10,12	10,12				
F2					10,19	10,19	10,19			
F18						10,25	10,25			
F74						10,27	10,27			
F111						10,45	10,45	10,45		
F7							10,50	10,50		
F35								10,74		
F104									11,88	
F107										12,68

Dentro dos grupos não há diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey (0,05).

Figura 6: Correlação entre a produção de biomassa seca e a atividade lipolítica específica de 20 isolados microbianos, em um processo de fermentação em estado líquido (FEL), após 120 horas de incubação a 30 °C, com 150 rpm.



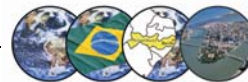
Selecionou-se, em função dos resultados obtidos neste trabalho, quatro isolados microbianos (fungos filamentosos) para avaliação em etapas subseqüentes da pesquisa: os isolados F2 (*Penicillium* sp.), F41 (*Beauveria bassiana*), F96 (*Geotrichum candidum* sp.) que apresentaram a melhor atividade lipolítica específica (extracelular), e, o isolado F18 (*Rhizomucor* sp.), com a menor atividade, porém com potencial evidenciado anteriormente de atividade lipolítica intracelular, corroborando os resultados obtidos e relatados, com o uso de meios de cultura sólidos.

CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos, comparados aos dados da literatura, relacionados ao crescimento e à atividade de hidrólise a partir da atividade microbiana, vários dos isolados fúngicos por nós testados podem ser consideradas bons produtores de lipase, portanto com potencial para utilização e novas pesquisas objetivando seu aproveitamento para processos hidrolíticos aplicados a atividades de saneamento ambiental e, catalíticos, visando a geração de biodiesel, tendo os resíduos oleosos do saneamento ambiental como matéria prima. Considerando que o extrato lipolítico empregado nestes ensaios preliminares possui uma atividade enzimática menor em relação às enzimas comerciais, e que as variáveis do sistema não foram completamente estudadas, os resultados obtidos podem ser considerados bons, porque abrem uma perspectiva de novas pesquisas, analisando, de forma pormenorizada, as variáveis que influenciam a atividade lipolítica em meio líquido. Por tratarem-se de fungos, abre-se também a perspectiva de que a produção de lipases e a atividade lipolítica possam também serem avaliadas em processo de fermentação em estado sólido (FES), submetendo as biomassas microbianas produzidas a processos de ultrassonicação, com o objetivo de provocar sua ruptura e com isto obter-se melhores níveis de atividade, principalmente em relação àqueles isolados que apresentam atividade lipolítica tipicamente intracelular. Selecionou-se, em função dos resultados obtidos, quatro isolados para avaliação em etapas subseqüentes da pesquisa: os isolados F2 (*Penicillium* sp.), F41 (*Beauveria bassiana*), F96 (*Geotrichum candidum* sp.) que apresentaram a melhor atividade lipolítica específica, qualificada como extracelular, e, o isolado F18 (*Rhizomucor* sp.), com a menor atividade, porém com potencial evidenciado anteriormente de atividade lipolítica intracelular em meio de cultura sólido.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustível (ANP), através de sua representação junto à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), com relação à concessão de uma bolsa de estágio e a liberação dos recursos de taxa de bancada correspondente, e outros afins a esta pesquisa, contribuindo de forma importante com sua realização. Também ao PIBIC-UFES/CNPQ pela concessão de bolsa de iniciação científica que permitiu a participação de acadêmicos do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, colaborando com a sua formação profissional.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEREDO, L.A.I., GOMES, P.M.; SANT'ANNA JR., G.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology* 54, 361-365. 2007.
2. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254. 1976.
3. CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim. Nova*, vol.28, nº4, 614-621. 2005.
4. COSTA NETO, P.R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. Florianópolis: Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC, 2002, 118 p. Tese de Doutorado em Química.
5. MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiologia* 30:304-309. 1999.
6. FREIRE, D.M.G.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA JR.; G.L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Revista de Microbiologia* 28, nº1, 6-12. 1997.
7. ROVEDA, M. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, 2007. Dissertação de Mestrado em Engenharia.
8. ROWE, L.; HOWARD, G.T. ; Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme; *International Biodeterioration & Biodegradation* 50,p.33 – 40 2002.
9. WINKLER, U. K., STUCKMANN, M., Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138, p. 663 - 670, 1979.
10. REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 6, n. 2, p. 145-150. 2002.