

XI-107 – SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS LIPOLÍTICOS 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)

Emília Brito

Graduanda em Engenharia Ambiental na Universidade Federal do Espírito Santo. Graduada em Tecnologia de Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal de Tecnologia do Espírito Santo (IFES). Estagiária da Agência Nacional do Petróleo, Gás e Biocombustível (ANP).

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

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas produzidas por animais, plantas e microrganismos, que atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, porém, na presença de baixas concentrações de água catalisam reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação, o que as credenciam a um vasto leque de aplicações industriais. As lipases microbianas são as mais utilizadas por sua relativa facilidade de produção, pois são extracelulares em sua maioria e pela diversidade de microrganismos capazes de sintetizá-las. 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 enâncio seletividade, quando comparadas a lipases de outras fontes. Porém o custo tem sido o fator mais limitante à sua utilização em escala comercial, e novas fontes microbianas destas enzimas e sua adequação a processos industriais necessitam serem pesquisadas. Com este propósito, em pesquisa anterior, partindo de 113 isolados microbianos, obtidos de amostras ambientais, foram pré-selecionados 78, sendo 69 de fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Beauveria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Verticillium*, e 9 de leveduras. O objetivo do presente trabalho foi uma seleção a partir dos 78 isolados pré-selecionados, utilizando MB e MMOS_R, através da quantificação dos índices enzimáticos (IE) no primeiro e, do crescimento microbiano em ambos, viabilizando assim, novas pesquisas em busca da utilização de suas lipases ou biomassa lipolítica em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e ou em uma rota etanólica enzimática para a geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento. Foram selecionados 20 isolados, 16 em função dos melhores IE (atividade extracelular) apresentados no meio MB e, 4 em função do melhor crescimento e resposta positiva ao teste de rodamina-B (atividade intracelular) no meio MMOS_R. Em pesquisa subsequente estes 20 isolados foram testados quanto a atividade lipolítica específica, em meio líquido, através de espectrofotometria UV.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, Transesterificação Enzimática, Lipases, Microrganismos, Seleção em Meio Sólido Reacional.



INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são hidrolases triacilgliceróis produzidas por animais, plantas e microrganismos. Atuam na interface orgânica-aquosa catalisando as reações de hidrólise de triglicerídeos, porém, baixas concentrações de água podem ainda catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação, o que as tornaram de grande interesse industrial, com um vasto histórico de aplicações. Como alternativa tecnológica enzimática na produção de biodiesel, sua utilização ainda não se encontra devidamente consolidada, apesar das vantagens, quando se pretende utilizar resíduos oleosos e ou gordurosos (OGR) de atividades de saneamento como matéria prima.

Os mecanismos através dos quais essas enzimas mediam reações de hidrólise ainda não são completamente elucidados, mas considerando a grande disponibilidade e a alta estabilidade das lipases extracelulares provenientes de microrganismos, elas têm um significativo potencial para uso em biotecnologia. Sua produção é influenciada pelo pH, temperatura, agitação e composição do meio. O tipo de fontes de carbono e nitrogênio pode afetar a biossíntese enzimática, e a presença de compostos lipídicos e surfactantes tem mostrado o aumento da produção em alguns casos.

As lipases são encontradas na natureza em animais, vegetais e microrganismos. Recentemente, tem crescido muito o interesse pelas lipases microbianas, devido principalmente à sua maior estabilidade e diversidade quando comparadas a lipases de outras fontes. Assim, a descoberta de novas lipases, a partir da seleção de microrganismos, com características desejáveis e interessantes (estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, alta especificidade em relação a certos ácidos graxos e enâncio seletividade), pode abrir promissoras perspectivas científicas e comerciais.

Os microrganismos produtores de lipases 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. Isolados, os microrganismos devem passar por um processo de seleção que permita, a partir de um número elevado de isolados, destacar aqueles com maiores níveis de atividade enzimática para etapas subseqüentes de pesquisas visando o seu aproveitamento tecnológico e ou industrial.

Sob o ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado e, também por serem considerados microorganismos seguros, para aplicação na indústria de alimentos, de bebidas e indústria farmacêutica, além daquelas vinculadas ao saneamento ambiental e geração de biocombustíveis.

Os fungos filamentosos, dentre os microrganismos, são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas, gerando ampla produção industrial. Lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos, quando estes são cultivados em condições apropriadas, e são facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação. Apenas pequena quantidade de lipases tem sido encontrada dentro ou aderida ao micélio. Algumas espécies que vem sendo mais investigadas são citadas por Pimentel e Colen (2006): *Fusarium solani*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Gliocladium viride*, *Fusarium lateritium*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis*, sendo as melhores produtoras pertencentes aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. Quanto a fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos os relatos são ainda poucos, podendo ser citados em relação aos primeiros *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*; e aos segundos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

O objetivo do presente trabalho foi a seleção qualitativa e quantitativa de isolados microbianos (fungos filamentosos e leveduriformes) previamente obtidos a partir de amostras ambientais, em meios de cultura sólidos, reacionais para atividade lipolítica intra e extracelular, visando sua utilização em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e, biocatalítico, em uma rota etanólica enzimática para a geração de biodiesel, a partir de resíduos oleosos do saneamento, em pesquisa no Departamento de Engenharia Ambiental da UFES.



MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Laboratório de Saneamento – LABSAN, junto ao Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo (CT-UFES), localizada em Vitória, ES.

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, a água, os meios de cultura e/ou substratos, vidrarias e utensílios laboratoriais foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 min, ou estufa de esterilização a 180°C por 2 horas, após devidamente acondicionados. Os fungos filamentosos e leveduriformes isolados foram mantidos armazenados à temperatura de 5 °C, em tubos de cultura com o meio BDA (batata-dextrose-ágar) conforme Menezes@Assis (2004). A recuperação se deu, sempre que necessária, repicando uma porção da colônia para o centro de placa de Petri com o meio de cultura BDA, seguindo-se incubação a 28 °C, por 5 dias, em estufa incubadora (DBO – Biotec BT424).

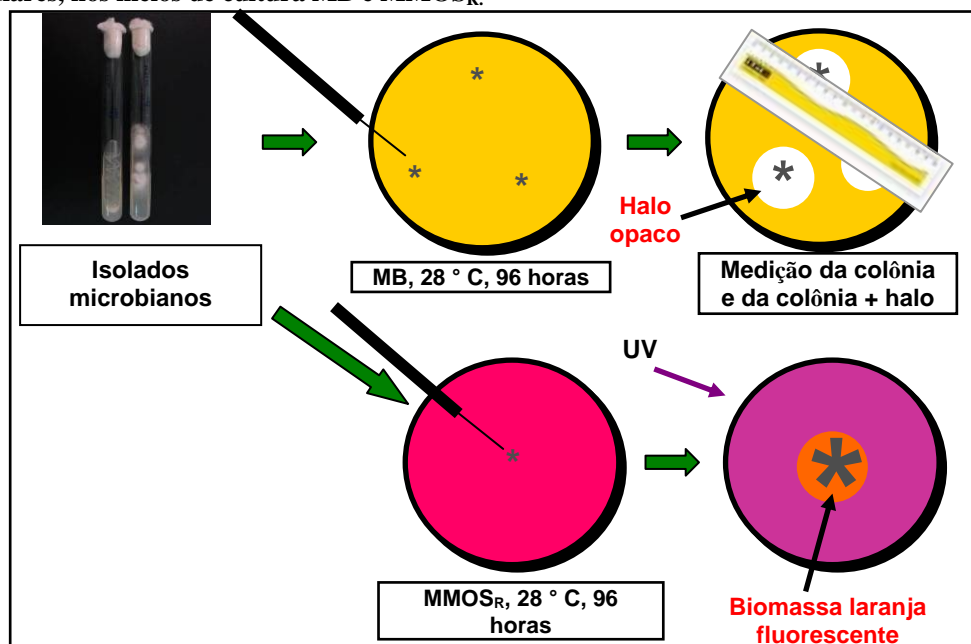
Os isolados microbianos foram obtidos a partir de amostras ambientais, representadas por tecidos vegetais necrosados e insetos-pragas de plantas, solo e resíduos oleosos oriundos de atividades do saneamento (escumas de caixas de gordura residencial e de restaurante e, espuma de caixa de gordura e lodo de esgoto sanitário de um sistema UASB-BF). No total foram avaliados 113 isolados, sendo 100 de fungos filamentosos e 13 de fungos leveduriformes, conforme metodologias utilizadas por Hankin & Anagnostakis (1975) e por Semionato (2006), para verificação das atividades lipolíticas extra e intracelulares de microrganismos, com modificações na composição dos meios de cultura e na forma de avaliação.

Foram utilizados para os testes os meios de cultura reacionais MB (Meio Basal) e MMOS_R (Meio Mínimo + Óleo de Soja + Rhodamina-B), de acordo com Hankin & Anagnostakis (1975) e Semionato (2006), com modificações na composição e nos procedimentos. O meio MB foi assim constituído (g/L): peptona – 10, NaCl – 5, CaCl₂ – 0,1, Agar – 15, e 1000 ml de água destilada, tendo o pH sido corrigido para 6,0, com NaOH 0,1 M. Como substrato lipídico foi utilizado o sorbitol monolaurato (Tween 80), autoclavado em separado, e acrescentado na proporção de 1%. Também acrescentados ao MB foram 50 mg de sulfato de streptomicina e 50 mg de cloranfenicol, após resfriamento do meio para 45 °C, antes de ser vertido nas placas de Petri. O MMOS_R teve, por sua vez, a composição por 1000 ml de água destilada, assim definida: (NH₄)₂SO₄, 5,0 g; KH₂PO₄, 0,9 g; NaCl, 1,0 g; MgSO₄. 7H₂O, 0,3; Na₂HPO₄, 6,2 g; solução de micronutrientes, 1 ml; e, ágar, 15 g. A solução de micronutrientes apresentou a seguinte composição, por 1000 ml: FeCl₃. 6H₂O, 2000 mg; ZnCl₂, 50 mg; CuCl₂. 2H₂O, 30 mg; MnCl₂. 2H₂O, 500 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄. 4H₂O, 50 mg; AlCl₃, 50 mg; CoCl₃. 6H₂O, 2000 mg; e, HCl (concentrado), 1 ml. A solução foi agitada em agitador magnético por 20 minutos e transferida para erlenmeyers de 1000 para autoclavagem por 20 minutos a 120 °C, seguindo-se o seu armazenamento a 5 °C, para posteriores utilizações. De forma equivalente ao MB foram acrescentados os mesmos antibióticos. Além destes, a este meio de cultura foi acrescentado o corante indicador Rodamina B (C.I. 45170 – Synth, Brasil) na concentração a 10mg/mL do meio de cultura.

Na sequência dos procedimentos, em câmara de fluxo laminar, o meio MB foi distribuído em placas de Petri (100 mm x 10 mm), cerca de 20 ml por placa. Após a solidificação do meio, por placa, foram transferidos três discos de cultura do fungo (5 mm de diâmetro), distribuídos de forma triangular e distanciados cerca de 2 cm do bordo da placa. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com triplicatas para cada isolado analisado, representada por três colônias desenvolvidas na placa de Petri. A incubação foi por 96 horas à temperatura de 28 °C, em condições de escuro, e as medições do “halo opaco” e das colônias ocorreram decorridas 96 horas, utilizando régua, conforme mostrado na Figura 1. Para a quantificação padronizada da atividade lipolítica foi utilizada a equação descrita por Hankin & Anagnostakis (1975), determinando-se o índice enzimático (IE), pela seguinte relação: $IE = (\text{diâmetro da colônia} / \text{diâmetro da colônia} + \text{halo}) \times 100$, modificado para $IE = [(\text{diâmetro da colônia} + \text{halo}) / \text{diâmetro da colônia} - 1] \times 10$, para facilitar a análise e exposição gráfica dos resultados.

No meio de cultura MMOS_R, a inoculação ocorreu no ponto central da placa de Petri, e a verificação da presença da coloração “laranja fluorescente”, indicando atividade lipolítica intracelular, foi efetuada sob radiação UV, com comprimento de onda de 354 nm (Spectroline model EA – 160, EUA). Foram utilizadas triplicatas para cada isolado analisado, representadas por três placas de Petri. As condições e o tempo de incubação, bem como as medições do diâmetro das colônias ocorreram da mesma forma que para o meio MB.

Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de seleção de microrganismos produtores de lipases extra e intracelulares, nos meios de cultura MB e MMOS_R.

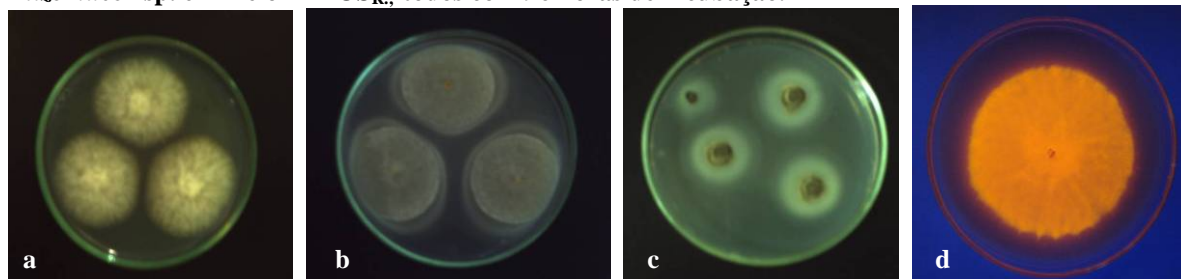


A análise e os gráficos estatísticos dos dados obtidos neste trabalho, foram efetuadas com a utilização do software “SPSS for Windows” versão 11.5.0, pertencente ao Departamento de Estatística da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES.

RESULTADOS

Dos 78 isolados de microrganismos (69 de fungos filamentosos e 9 de leveduras), 52 apresentaram atividade lipolítica extracelular, detectada pela reação positiva em meio de cultura MB, correspondente à presença de um halo opaco em torno da colônia, confirmando o que já havia sido verificado no processo de isolamento pré-seleção efetuado em pesquisa anterior, a partir das amostras ambientais. No meio MMOS_R, pôde ser detectada a atividade lipolítica intracelular, por parte de 61 isolados, que exibiram coloração “laranja fluorescente” diretamente na biomassa produzida, encontrando-se 35 deles entre os que também apresentaram atividade lipolítica extracelular (Tabela 1). Tais características reacionais podem ser observadas na Figura 2, e os resultados apresentaram-se também de acordo com o observado previamente na etapa de isolamento dos microrganismos a partir de amostras ambientais.

Figura 2: a) Ausência de atividade lipolítica extracelular apresentada por *Fusarium* sp em meio MB; b e c) presença de atividade lipolítica extracelular (halo opaco) apresentada por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium* sp. em meio MB e; d) Presença de atividade lipolítica apresentada por *Rhizomucor* sp. em meio MMOS_R; todos com 96 horas de incubação.



O halo opaco apresentado, que indica atividade lipolítica extracelular, é decorrente da formação de cristais de cálcio do ácido láurico, liberado pela ação da enzima e pela completa degradação dos sais de lipídio, e a fluorescência alaranjada decorre da presença de cadeias longas de glicerídios não solúveis, produzidos pela hidrólise enzimática (Hankin & Anagnostakis, 1975; Haba *et al.* 2000).



Tabela 1: Classificação e características dos isolados fúngicos quanto à procedência, ao crescimento de colônias e a atividade lipolítica apresentada nos meios de cultura reacionais: meio básico (MB) e meio mínimo + óleo de soja + rodamina-B (MMOS_R).

Classificação genérica/ (Nº de isolados)	Isolado	Procedência	Colônia (mm) *		Reação em MB	Reação em MMOS _R
			MB	MMOS _R		
<i>Aspergillus</i> (5)	F92	Caixa de gordura do RU-UFES	26,0	**	+	-
	F31	Caixa de gordura do RU-UFES	22,0	**	+	-
	F68	Caixa de gordura do RU-UFES	31,0	32,3	-	+
	F79	Fruto de mamoeiro	31,3	**	+	-
	F81	Caixa de gordura do RU-UFES	35,3	44,0	+	+
<i>Beauveria</i> (25)	F9	Formiga saúva	14,8	4,5	+	+
	F35	Lagarta do cartucho do milho	30,2	6,5	+	+
	F36	Broca do cafeeiro	18,3	7,8	+	+
	F37	Broca do cafeeiro	18,3	7,8	+	+
	F38	Broca do cafeeiro	13,7	5,0	+	+
	F39	Broca do cafeeiro	16,7	6,7	+	+
	F40	Broca do cafeeiro	18,7	9,3	+	+
	F41	Broca do cafeeiro	13,8	5,8	+	+
	F42	Broca do cafeeiro	14,8	7,3	+	+
	F43	Broca do cafeeiro	15,5	5,8	+	+
	F44	Broca do cafeeiro	13,0	5,2	+	+
	F45	Broca do cafeeiro	9,3	3,8	+	+
	F46	Broca do cafeeiro	14,7	5,8	+	+
	F47	Broca do cafeeiro	14,3	5,8	+	+
	F48	Broca do cafeeiro	12,2	4,8	+	+
	F49	Broca do cafeeiro	14,7	5,5	+	+
	F50	Broca do cafeeiro	14,5	5,8	+	+
	F51	Broca do cafeeiro	14,8	5,5	+	+
	F52	Broca do cafeeiro	16,3	7,5	+	+
	F53	Broca do cafeeiro	15,8	7,2	+	+
	F54	Broca do cafeeiro	12,5	5,5	-	+
	F55	Broca do cafeeiro	16,2	5,3	-	+
	F56	Broca do cafeeiro	16,7	6,7	-	+
	F59	Moleque da bananeira	16,5	7,0	-	+
	F60	Cigarrinha de pastagem	17,8	8,7	-	+
	F61	Cigarrinha da cana de açúcar	18,0	7,8	-	+
<i>Botrytis</i> (2)	F104	Caixa de gordura residencial	13,3	8,0	+	+
	F105	Caixa de gordura residencial	39,5	14,0	-	+
<i>Cladosporium</i> (4)	F27	Fruto de bananeira	10,7	**	+	-
	F28	Fruto de bananeira	9,7	**	+	-
	F76	Fruto de mamoeiro	11,3	6,7	+	+
	F98	Fruto de mamoeiro	10,7	6,0	+	+
<i>Colletotrichum</i> (6)	F64	Fruto de mangueira	20,7	**	+	-
	F65	Fruto de mangueira	24,5	10,7	+	+
	F66	Fruto de mamoeiro	31,7	**	+	-
	F71	Fruto de mamoeiro	28,7	**	+	-
	F26	Fruto de bananeira	38,7	**	+	-
	F72	Folhas de oití	30,2	13,2	+	+
<i>Fusarium</i> (6)	F10	Caule de bananeira	44,7	18,8	-	+
	F67	Fruto de mamoeiro	40,3	36,8	-	+
	F74	Fruto de mamoeiro	35,0	42,2	-	+



Tabela 1: continuação.

Classificação genérica	Isolado	Procedência	Colônia (mm)		Reação em MB	Reação em MMOS _R
			MB	MMOS _r		
<i>Geotrichum</i> (3)	F75	Fruto de mamoeiro	50,0	**	+	-
	F84	Solo de pomar de mangueira	16,7	7,3	-	+
	F103	Caixa de gordura residencial	45,0	27,0	-	+
	F96	Caixa de gordura do RU-UFES	31,8	19,5	+	+
	F97	Caixa de gordura do RU-UFES	27,3	16,3	-	+
<i>Penicillium</i> (10)	F99	Caixa de gordura do RU-UFES	25,2	13,8	-	+
	F15	Caixa de gordura do RU-UFES	26,2	**	+	-
	F2	Caixa de gordura do RU-UFES	9,7	**	+	-
	F6	Caixa de gordura do RU-UFES	9,0	**	+	-
	F22	Caixa de gordura do RU-UFES	21,7	**	+	-
<i>Rhizomucor</i> (5)	F29	Fruto de bananeira	14,7	7,3	-	+
	F62	Fruto de bananeira	18,7	9,3	-	+
	F69	Caixa de gordura do RU-UFES	13,3	7,0	-	+
	F83	Solo de pomar de mangueira	22,7	10,5	-	+
	F102	Caixa de gordura residencial	7,3	6,0	+	+
<i>Verticillium</i> (1)	F110	Caixa de gordura residencial	32,5	**	+	-
	F12	Escuma de esgoto sanitário	> 90,0	38,7	-	+
	F18	Caixa de gordura do RU-UFES	> 90,0	59,5	-	+
	F19	Caixa de gordura do RU-UFES	> 90,0	34,3	-	+
	F106	Caixa de gordura residencial	> 90,0	56,0	-	+
Levedura (9)	F113	Caixa de gordura do RU-UFES	> 90,0	35,7	-	+
	F7	Escuma de esgoto sanitário	8,3	3,0	+	+
	F23	Lodo de esgoto sanitário	6,8	4,2	-	+
	F34	Fruto de bananeira	3,0	3,7	+	+
	F57	Fruto de bananeira	12,0	10,7	+	+
	F77	Fruto de bananeira	14,7	6,0	+	+
	F80	Fruto de mamoeiro	4,0	3,0	+	+
	F107	Caixa de gordura residencial	9,9	7,5	+	+
	F108	Caixa de gordura residencial	6,2	**	+	-
	F111	Caixa de gordura residencial	4,2	5,5	+	+

* Média de 3 repetições e leitura com 96 horas de incubação a 28 °C e escuro.

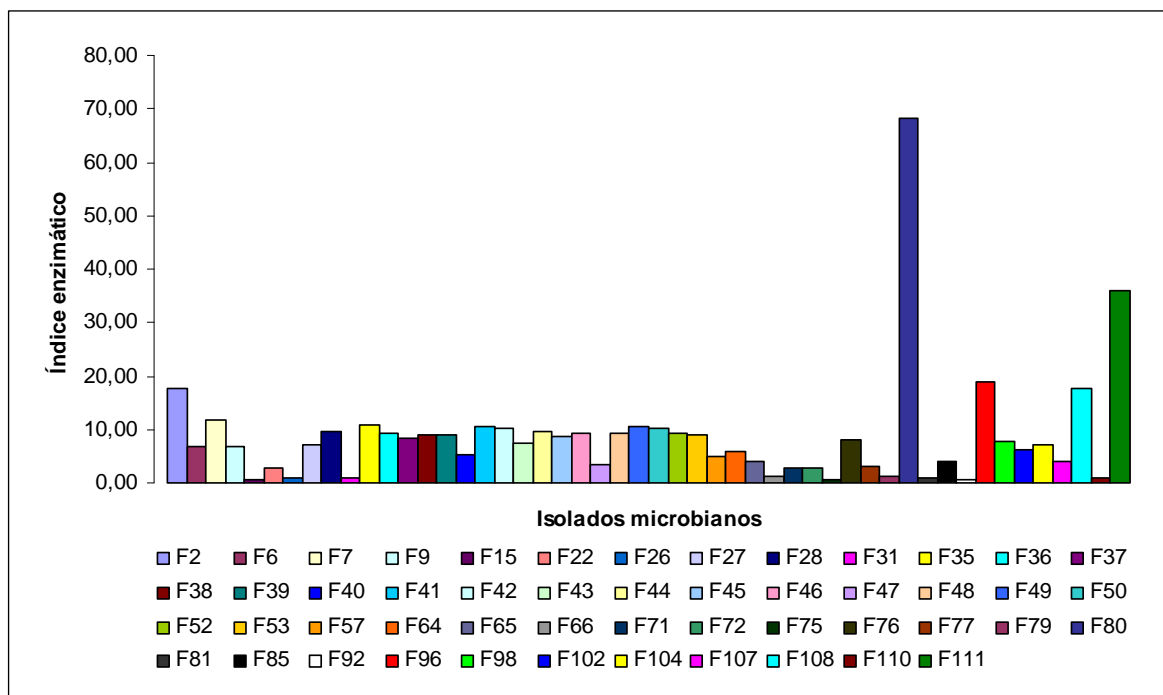
** Inexistência de crescimento e ou biomassa rala e pouco perceptível, dificultando a medição da colônia.

Os índices enzimáticos (IE) apresentados pelos isolados que apresentaram atividade enzimática extracelular em meio de cultura MB, com 96 horas de incubação, a 28°C, podem ser vistos através da Figura 3. Observou-se que os dois maiores IE foram apresentados por dois isolados de leveduras: F80 (IE = 68,330) e F111 (IE = 35,99), o primeiro obtido de fruto de mamoeiro e o segundo de uma caixa de gordura residencial. Na sequência dos cinco primeiros, apresentaram-se os isolados: F96 (IE = 18,87) correspondente à espécie *Geotrichum candidum*, obtido de uma caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES (RU-UFES), fungo classificado como filamentosos, porém com biomassa semelhante a de fungos leveduriformes; F2 (IE = 17,63) correspondente à espécie *Penicillium* sp.e, F108 (IE = 17,58) correspondente a uma levedura, obtidos de uma caixa de gordura do RU-UFES e de outra, residencial, respectivamente.

Apesar da facilidade e necessidade de utilização de meios de cultura sólidos, capazes de encamparem reações lipolíticas detectáveis de forma direta, principalmente quando se parte de um grande número de isolados, com o propósito de seleção dos melhores, como no caso dos meios utilizados para os testes neste trabalho, deve-se sempre lembrar que a produção de lipases pelos fungos filamentosos é influenciada por uma variedade de fatores ambientais. Além disso, as respostas aos fatores ambientais são, também, diferentes entre os isolados, sendo que para um determinado isolado o mesmo fator pode estimular a sua produção, mas para outro pode não afetar ou até mesmo inibi-la. Isso pode ser constatado com os dados obtidos por alguns pesquisadores quando estudaram a produção de lipases por alguns fungos filamentosos, importantes decompositores, como *Geotrichum candidum*, *Aspergillus* spp. , *Mucor* e *Rhizopus* (Colen, 2006, Cárdenas *et.al.*, 2001).



Figura 3: Índice enzimático (IE)* indicando a atividade lipolítica extracelular de 50 isolados microbianos, detectada por reação positiva em meio de cultura MB, com 96 horas de incubação a 28° C.



A utilização da legenda deve ser efetuada com auxílio de consulta à Tabela 1, deste trabalho.

* $IE = [(diâmetro\ da\ colônia + halo) / diâmetro\ da\ colônia] - 1 \times 10$

Em relação aos fungos filamentosos lipolíticos, os gêneros aos quais pertencem os isolados que apresentaram atividade lipolítica detectada e quantificada neste trabalho, são compatíveis com os citados na literatura como maiores produtores de lipases, inclusive já produzidas e comercializadas, com inúmeras aplicações industriais (Andretta *et. al.*, 2007; Colen, 2006; Semionato, 2006; Dartora *et. al.*, 2005; 2007, Pimentel, 1996). Exceção, no entanto, fazemos em relação à *Cladosporium*, *Botrytis* e *Verticillium*, com raras ou nenhuma citação na literatura, como no caso deste último.

Dentre os fungos filamentosos podem-se citar algumas espécies que vem sendo mais investigadas por vários pesquisadores, citados por Pimentel (1996) e Colen (2006): *Fusarium solani*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Gliocladium viride*, *Fusarium lateritium*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis*. Algumas das espécies melhores produtoras pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor*. Sobre a produção de lipases por fungos fitopatogênicos e entomopatogênicos, embora existam relatos, ainda são poucos. Podem ser citados em relação aos primeiros *Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Quanto aos segundos, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Silva *et al.*, 2005).

Colen (2006) avaliou a capacidade de produção de lipase por 73 cepas fúngicas, 14 obtidas de coleções de cultura e 59 isoladas de amostras do solo do cerrado de Minas Gerais, com o emprego de técnicas de enriquecimento seletivo. O isolamento e seleção primária foram realizados em meio de cultura contendo ágar, emulsão de óleo de oliva, sais biliares e nutrientes. As colônias lipolíticas foram detectadas pela presença no meio opaco de uma zona clara ao redor delas. Vinte e uma cepas foram avaliadas como produtoras em potencial e a capacidade de produção determinada em condições de cultivo submerso e cultivo em estado sólido (seleção secundária). Apenas 7 delas foram selecionadas como boas produtoras. A cepa melhor produtora, foi identificada como *Colletotrichum gloeosporioides*. Isolados deste fungo também foram por nós testados neste trabalho e confirmaram o seu potencial lipolítico, porém em etapas subsequentes mostraram-se inferiores a alguns isolados fúngicos de outras espécies, embora com boa atividade lipolítica comprovada inclusive em meio líquido.



Haba *et al.* (1999) trabalhando com 47 cepas de bactérias, verificaram que 40 apresentaram atividade lipolítica, utilizando o teste de rodamina B. Cepas de *Pseudomonas* sp.; *Bacillus* sp.; *Candida* sp.; *Rhodococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. degradaram óleos de oliva e de girassol. Isolados de *Pseudomonas* sp. foram as melhores produtoras da lipase, especialmente *P. aeruginosa*.

Semionato (2006), no Laboratório de Saneamento da UFES (LABSAN), isolou 27 cepas de bactérias provenientes de amostras retiradas da espuma dos dispositivos de remoção de gordura (ETE - UFES), as quais resultaram numa seleção de 19 cepas de bactérias lipolíticas, quando submetidas ao teste de Rodamina B. Estes isolados, acrescidos por outros, obtidos posteriormente por outros pesquisadores foram, e continuam sendo testados, visando utilização em processos hidrolíticos de saneamento ambiental e para a geração de biodiesel, a partir de resíduos oleosos do saneamento.

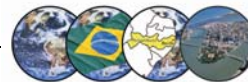
O teste de rodamina B detecta a presença de lipase extracelular de microrganismo lipolítico com sensibilidade mínima de atividade lipolítica de 0,002 U/mg por proteína (Jette&Ziomek, 1994). A elevada sensibilidade do teste detecta atividade lipolítica mesmo em microrganismos que apresentam baixa produção de lipase extracelular (Haba *et al.*, 2000; Kouker & Jaeger, 1986, Sandoval&Marty, 2007, Lock, 2007). Em seu relato, estes pesquisadores observaram que a variação do tempo de incubação do teste é decorrente do tempo de crescimento de cada espécie de bactéria. No caso de vários gêneros de bactérias (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Serratia*), o teste de rodamina B variou entre 24 e 72 horas a 30°C.

Em nosso trabalho, cujos isolados testados foram fúngicos, o meio mínimo mais 10 % de óleo de soja, acrescido de rodamina-B (que denominamos MMOS_R) propiciou ótima detecção de atividade lipolítica intracelular após 48 e, principalmente, 96 horas de incubação a 30°C, com o a típica coloração “laranja fluorescente”, visualizada sob radiação ultravioleta, ocorrendo diretamente na biomassa, sem que, no entanto, pudesse ser visualizado, com nitidez, halo com estas características, em torno da colônia. Já o meio MB, proposto por Hankin& Anagnostakis (1975), propiciou ótima detecção e quantificação da atividade lipolítica extracelular, confirmando vários relatos em que os autores obtiveram bons resultados com a utilização deste método (Andretta *et al.*, 2008; Dartora *et al.*, 2005).

Neste trabalho este meio de cultura MB foi preparado com o Tween 80, em substituição ao Tween 20, originalmente utilizado. A concentração em ágar também foi modificada deixando de ser utilizada 20 g.L⁻¹ e sim 17 g. L⁻¹, o que parece ter facilitado a difusão das lipases produzidas e, conseqüentemente, a reação que leva a formação de cristais de cálcio do ácido láurico, visível como um halo opaco, que confirma a atividade lipolítica extracelular do microrganismo. Também foram utilizados antibióticos (sulfato de estreptomicina e cloranfenicol), aumentando a eficiência do processo, por evitar contaminações bacterianas e por actinomicetos, sem nenhum comprometimento detectável da expressão da atividade lipolítica dos isolados fúngicos obtidos.

Foram confirmadas neste trabalho a atividade lipolítica dos 52 isolados com atividade extracelular e 61 com atividade intracelular e, os dois tipos de atividade em 35 deles, conforme pode ser visto na Tabela 1, e que foi observado em pesquisa anterior que permitiu a pré-seleção dos 78 isolado testados nesta pesquisa. O índice enzimático (IE) quantificado no meio MB, para atividade extracelular, permitiu que 16 deles (10 de fungos filamentosos e 6 de leveduras) e outros 4 (fungos filamentosos), selecionados a partir do crescimento da biomassa e atividade intracelular exibida no meio MMOS_R, passassem aos testes da etapa subseqüente da pesquisa visando avaliar a atividade lipolítica específica, em um processo de fermentação em estado líquido, quantificada por espectrofotometria UV, relatados em outro artigo.

Na figura 4, são mostrados os intervalos de confiança ao nível de 95 % de probabilidade, para as médias de triplicatas do índice enzimático, obtidas no meio de cultura MB, com 96 hora de incubação, a 28°C. É possível através do gráfico visualizar a proximidade de valores observados para um grande número de isolados e a superioridade de outros conforme já mencionado. Maiores desvios padrões foram verificados para alguns isolados, porém a maioria apresentou valores mais uniformes, permitindo a seleção pretendida, com significância das diferenças (p=0,05) comprovada pelos testes de F através da análise de variância univariada (ANOVA), complementado pela comparação de médias com o teste de Tukey (p = 0,05), conforme pode ser observado na Figura 5. Foram obtidos 18 grupos de isolados, de acordo com a diferença estatística apresentada.



O crescimento de biomassa (colônia fúngica) no meio de cultura MMOS_R, foi medida com régua milimetrada. Inúmeros isolados testados, não apresentaram crescimento e ou o fizeram precariamente, com biomassa micelial ou leveduriforme insignificante ou muito rala, dificultando a visualização e medição a olho nu, e, por isso foram desconsiderados, não aparecendo seus valores na Tabela 1.

Figura 4: Intervalos de Confiança (95%) para as médias de triplicatas do índice enzimático, obtidas em meio de cultura MB, com 96 hora de incubação, a 28°C.

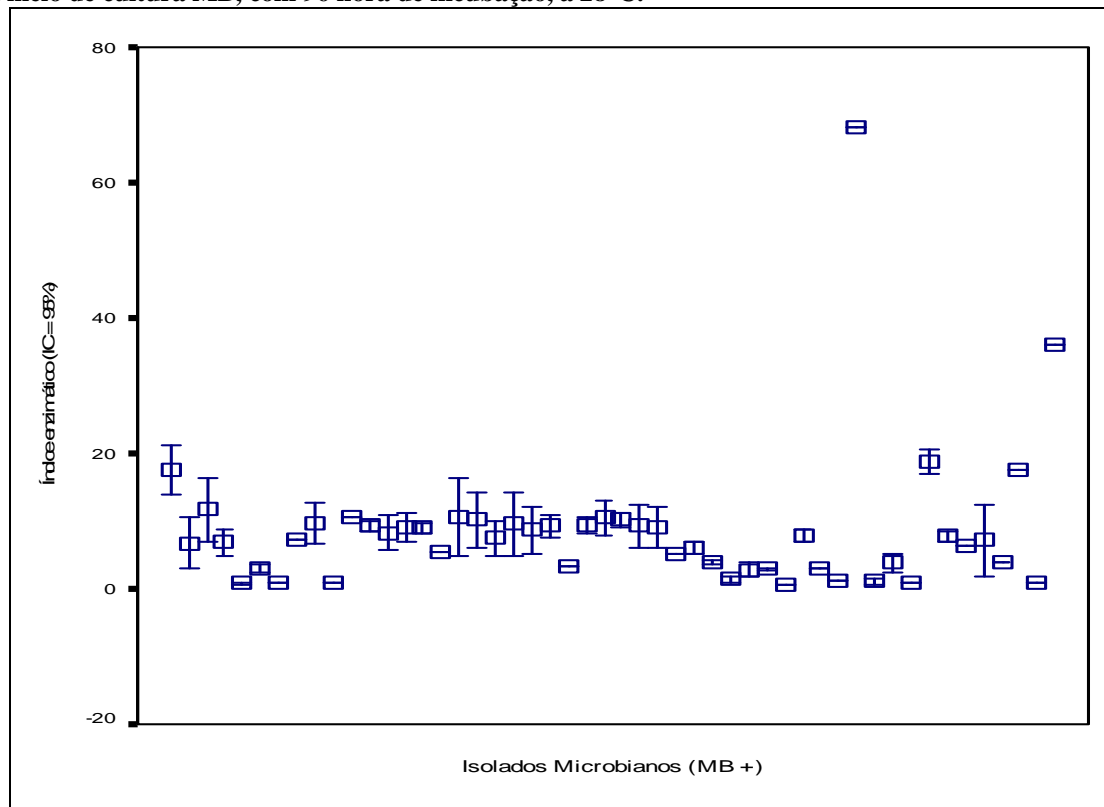
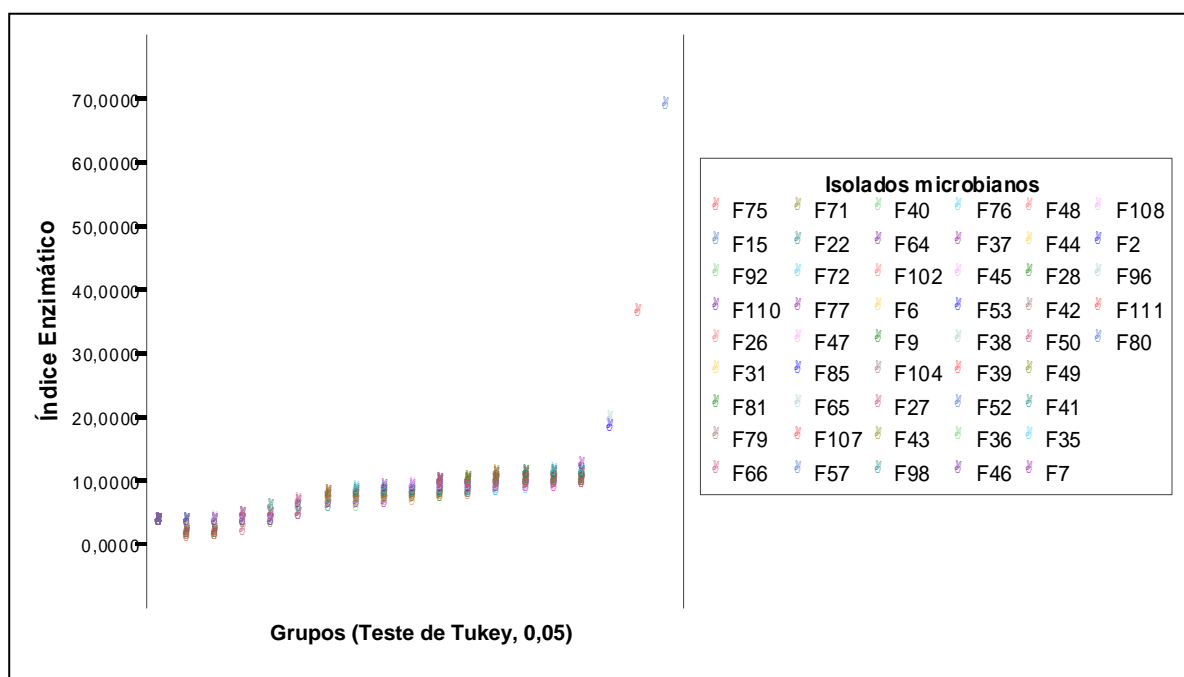


Figura 5: Comparação de médias de triplicatas do índice enzimático (IE), obtidas em meio de cultura MB, com 96 hora de incubação, a 28°C, utilizando o teste de Tukey (p=0,05).





A função biológica destas enzimas é primordialmente catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol. Entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras. Assim, devido às diferentes reações que são capazes de catalisar e às suas características de regio e enâncio seletividade, as lipases, além de sua utilização em áreas tradicionais, como a indústria de detergentes e alimentícia, vêm sendo intensamente empregadas nos mais diversos campos: indústria farmacêutica, de química fina, óleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais (Gutarra et.al.,).

Foram selecionados, a partir deste trabalho, para avaliação posterior da atividade lipolítica específica em meio líquido, os seguintes isolados a partir dos resultados de atividade lipolítica extracelular: F2, F7, F18, F28, F35, F41, F64, F72, F76, F80, F98, F102, F104, F107, F108 e F111. A partir dos resultados de atividade lipolítica intracelular foram os seguintes os isolados selecionados: F18, F74, F81 e F106.

Desconhecemos relatos anteriores de trabalhos que tenham utilizado metodologia igual à que utilizamos e, com os mesmos propósitos. São, no entanto, abundantes os relatos de pesquisas visando processos hidrolíticos e ou biocatalíticos aplicados a vários outros propósitos tecnológicos e ou industriais, com muitas lipases já produzidas industrialmente e comercializadas em todo o mundo, conforme já mencionamos anteriormente, inclusive voltados para o saneamento ambiental.

CONCLUSÕES

Os materiais e métodos utilizados nesta pesquisa mostraram-se satisfatórios para o processo de seleção de microrganismos a partir da atividade lipolítica em meio de cultura sólido, partindo de um número considerável de isolados obtidos de amostras ambientais e pré-selecionados, contribuindo para se chegar a etapas subsequentes da pesquisa com um menor número deles, e, portanto, tornando-as viáveis e exequíveis sob o ponto de vista técnico-científico e econômico.

O meio de cultura MB, isoladamente, permitiu detectar e quantificar de forma satisfatória a atividade lipolítica extracelular, através do índice enzimático (IE) e o meio MMOS_R, isoladamente, a atividade lipolítica intracelular, através da resposta positiva ao teste de rodamina-B e do crescimento e características da biomassa microbiana, ambos de forma simples, rápida e eficiente. O contrário não se verificou. Portanto, a utilização dos métodos e meios reacionais em conjunto, evitou que isolados microbianos fossem desconsiderados, quanto à atividade lipolítica extra e ou intracelular, quando dela eram dotados, no processo de seleção conduzido neste trabalho.

Foram selecionados 20 isolados, 16 em função dos melhores IE (atividade extracelular) apresentados no meio MB e, 4 em função do melhor crescimento e resposta positiva ao teste de rodamina-B (atividade intracelular) no meio MMOS_R. Foram selecionados os seguintes isolados a partir dos resultados de atividade lipolítica extracelular: F2, F7, F18, F28, F35, F41, F64, F72, F76, F80, F98, F102, F104, F107, F108 e F111. A partir dos resultados de atividade lipolítica intracelular foram os seguintes os isolados selecionados: F18, F74, F81 e F106. Em pesquisa subsequente estes 20 isolados foram testados quanto a atividade lipolítica específica, em meio líquido, através de espectrofotometria UV.

O trabalho, considerado no seu conjunto, e em função das metodologias propostas e com êxito utilizadas, bem como por sua finalidade específica, caracteriza-se por não apresentar precedentes na literatura, constituindo-se, ao nosso entender em uma contribuição importante à área de saneamento ambiental e biocombustíveis.

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. ANDRETTA, L.I.; DAMSCHI JUNIOR; ONOFRE, S.B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases de águas residuárias de laticínios. *Biology & Health Journal*, v.1,n.1, 2. 2007.
2. CARDENAS, F.; ALVARES, E.; CASTRO-ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 14, 111–123. 2001.
3. COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Belo Horizonte: UFMG, 2006. (Tese de Doutorado).
4. DARTORA, D.F.; HENDGESI, D.H.; SANAGALETI, N.; CADORIN, T.L.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S.B. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Lipases a partir do Soro de Queijo. www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t165.doc
5. GUTARRA, M.L.E.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Seleção de fungos produtores de lipase por fermentação em estado sólido. 2003. www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t063.doc
6. HABA, E., BRESKO, O., FERRER, C., MARQUES, A., BUSQUETS, M., MANRESA, A. Isolation of lipase-screening bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and microbial technology*, 26, p. 40 - 44, 2000.
7. HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycol.*,v.67, p.597-607. 1975.
8. KOUKER, G.; JAEGER, K-H. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *American Society for Microbiology*, vol. 53, n.1: 211-213. 1987.
9. LOCK, L.L. Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* B181. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, 2007. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na Área de Microbiologia Industrial.
10. MENEZES, M.&ASSIS, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004.
11. PIMENTEL, M.C.B. Produção de lipases por fungos filamentosos: estudos cinéticos e síntese de ésteres. Campinas: UNICAMP, Instituto de Química, 1996. Tese de Doutorado em Química.
12. SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screenig methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 390–393. 2007.
13. SEMIONATO, S; 2006. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura; Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental; Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental; Universidade Federal do Espírito Santo.
14. SILVA, W.O.B.; MIDIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* 40, 321–326. 2005.