

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASES

Pabline Rafaella Mello BUENO¹; Gabriel Luis CASTIGLIONI³, Manoel Soares SOARES JÚNIOR^{2*}

*Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás
¹ pablinemello@yahoo.com.br, ² g_castigli@yahoo.com.br, ³ manoel@agro.ufg.br

Palavras-chave: tributirina, hidrólise, enzima extracelular.

1 Introdução

As lipases são enzimas definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3) que catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triacilglicerídeos insolúveis, liberando ácidos graxos livres, mono ou diacilglicerídeos na interface óleo-água (JAEGUER; REETZ, 1998; WAKELIN; FORSTER, 1997). Grande variedade de bactérias, fungos e leveduras produzem lipases. A produção em escala industrial de lipase por determinado microrganismo é interessante se a enzima possuir elevada atividade lipolítica. Lipases microbianas apresentam grande potencial para aplicações comerciais, devido sua estabilidade, seletividade e larga especificidade por substratos (GUPTA et al., 2004; CARDENAS et al., 2001; FREIRE, 1996). Tendo em vista as observações acima mencionadas, o presente trabalho teve por objetivo isolar e selecionar microrganismos produtores de lipase.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados para a avaliação do potencial de produção de lipase foram obtidos a partir de cepas cedidas pelo laboratório de tratamento de águas residuárias e processos fermentativos (LARPF) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp e do isolamento de microrganismos presentes em amostras de efluente da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da empresa Universo Micos Ltda, unidade Cicopal, situada em Senador Canedo-GO, que processa salgadinhos, entre eles as batatas fritas. Também foram isolados

microrganismos a partir da amostra do extrato de lipase (EL) e dos esporos mistos de bactérias (EB), utilizados em tratamento do efluente. A coleta de amostras na ETE da Cicopal foi realizada em três locais: na entrada do tanque de tratamento de efluente (E), no tanque equalizador (TE) e no tanque de tratamento (T). Na ETE de Goiânia foi coletada uma amostra no tanque decantador (TD). Além das cepas *Candida tropicalis* CCT 5846 (UCT); *Candida sp* (UCS); *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (UZM); *Escherichia coli* (UEC); *Kluveromyces marxianus* (UKM); *Kocuria rhizophila* (UKR); *Bacillus subtilis* NRRL 14819 (UBS14); *Corynebacterium glutamicum* (UCG); *Bacillus sp* NRRL 41094 (UBS41) e *Penicillium lanosum* NRRL 3442 (UPL), cedidas pelo LARPF, e uma cepa de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (FBC), doada pela Fundação Tropical André Tosello (Campinas, SP)

2.2 Screening

Alíquotas dos efluentes foram semeadas, em placas de Petri, contendo diferentes meios (ágar batata, ágar vermelho violeta bile lactose e ágar padrão para contagem), conforme metodologia da *American Public Health Association* (APHA, 2001). Após a incubação, as placas foram analisadas acerca do desenvolvimento de microrganismos. As colônias foram selecionadas por meio de análise visual. Para o isolamento, as colônias selecionadas foram inoculadas em placa de Petri, contendo meio ágar nutriente, segundo a técnica de esgotamento por estria e incubados a 30 °C por 48 h, em estufa B.O.D (APHA, 2001). Após esta etapa, as cepas foram mantidas em refrigerador a 4 °C, para posterior avaliação da produção de lipase.

2.3 Seleção das cepas produtoras de lipase

A seleção das cepas produtoras de lipase foi realizada pela análise da formação de halo transparente (zona opaca) ao redor da colônia, por meio da adição de tributirina ao meio de cultivo, conforme metodologia proposta por Freire (1996). As cepas que apresentaram relação raio do halo lipolítico (R) por raio da colônia (r) maior que 2,0 foram selecionadas.

3 Resultados e discussão

3.1 Microrganismos isolados

A partir dos meios estudados para seleção dos microrganismos, por análise visual, foi possível isolar 29 microrganismos, sendo que 24 deles isolados do efluente proveniente da empresa Universo Micos Ltda. e 5 da ETE de Goiânia. A codificação usada para os microrganismos isolados foi: EA1 e EA2 (Tanque de entrada, meio PCA, microrganismo 1 e 2); EB1 a EB4 (Esporos misto de bactérias e lipases, meio PCA, microrganismo 1 a 4); EV1 e EV2 (Esporos misto de bactérias e lipases, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); TEA1 e TEA2 (Tanque de equalização, meio PCA, microrganismo 1 e 2); TEB1 a TEB4 (Tanque de equalização, meio AB, microrganismo 1 a 4); TEV1 e TEV2 (Tanque de equalização, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); TA1 e TA2 (Tanque de tratamento, meio PCA, microrganismo 1 e 2); TB1 a TB4 (Tanque de tratamento, meio AB, microrganismo 1 a 4); TV1 e TV2 (Tanque de tratamento, meio VRBA, microrganismo 1 e 2); TDB1 a TDB5 (Tanque de decantação, meio AB, microrganismo 1 a 5).

3.2 Cultivo em meio sólido

Foram avaliados um total de 40 microrganismos, acerca da atividade lipolítica no cultivo em meio sólido, destes, 39 apresentaram halo ao redor das colônias, evidenciando a reação de degradação da tributirina por enzimas extracelulares. A tributirina presente no meio sólido, provavelmente induziu a produção de lipase, atuando como substrato para a reação enzimática. Freire (1996), estudando a capacidade de microrganismos lipolíticos, também pré selecionou microrganismos em meio sólido, escolhendo apenas as cepas que apresentaram maiores halos para posteriores estudos.

Conforme pode ser observado na tabela 1, dos 39 microrganismos que evidenciaram reação lipolítica em meio sólido, 4 foram pré-selecionados por apresentarem relação R/r maior que 2,0. O parâmetro de escolha $R/r > 2,0$ é bastante variável, não havendo padronização. Colen et al. (2005), analisando o potencial lipolítico de fungos do solo brasileiro, empregaram a relação $R/r > 1,2$, considerando as cepas que apresentaram essa relação as mais promissoras. Observou-se também que os melhores resultados foram de microrganismos adquiridos em institutos de pesquisa, pois nenhum dos microrganismos isolados dos efluentes apresentou relação $R/r > 2,0$, o que sugere que os mesmos tiveram baixa produção de enzimas lipolíticas extracelulares.

Tabela 1. Avaliação dos microrganismos pré-selecionados em relação ao potencial da produção de lipase, a partir da medida do halo de lipólise em meio de cultura em placa.

Código	Raio (mm)		
	Colônia (r)	Halo lipolítico (R)	R/r
UCG	3,3	7,0	2,10
UPL	3,3	7,2	2,15
UBS41	3,3	7,6	2,30
FBC	2,4	9,1	3,76

A bactéria IBC, a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, foi o microrganismo que apresentou a maior relação R/r, de 3,76, sendo bastante significativa quando comparada aos demais resultados. A diferença de intensidade entre os halos e consequentemente entre R/r se deve à quantidade de lipase extracelular excretada pelo microrganismo (CARDENAS et al., 2001). Griebeler et al. (2011), estudando a capacidade de produção de enzimas lipolíticas de diferentes microrganismos em meio sólido contendo a tributirina como indutor, obtiveram para a cepa *Penicillium* sp. o maior halo de hidrólise (raio), de 9,35 mm, após 3 dias de incubação, mostrando um bom potencial para produção de lipase. Resultado bastante semelhante ao encontrado para a *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, de 9,1 mm, evidenciando provável potencial lipolítico desta bactéria.

4 Conclusão

Foi possível o isolamento de microrganismos de efluentes, contudo os mesmos apresentaram baixo potencial lipolítico quando comparado aos microrganismos *Corynebacterium glutamicum*; *Bacillus* sp NRRL 41094; *Penicillium lanosum* NRRL 3442, cedidos pelo LARPF, e *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, doado pela Fundação Tropical André Tosello. A cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 apresentou o maior halo lipolítico, sendo considerada promissora para produção de enzimas lipolíticas extracelulares.

5 Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**. Washington, APHA, 2001. 676 p.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, n. 4-6, p. 111-123, 2001.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 881-885, 2005.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996. 174p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 1996.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A.; REMONATTO D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; RIGO, E.; NINOW, J. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578–586, 2011.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends and Biotechnology**, Amsterdã, v. 16, n.9, p. 396-403, 1998.

WAKELIN N. G.; FORSTER C. F. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**, Amsterdã, v. 59, n.1, p. 37-43, 1997.