

BIOPROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS E FUNGOS PRODUTORES DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS

Matheus Gustavo Lima da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Eduardo Shoiti Maeda (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Karina Lima dos Reis (PBQ/UEM), Ione Parra Barbosa-Tessmann (Orientador). E-mail: ipbtessmann@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento - CNPq. Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica de microrganismos.

Palavras-chave: Microrganismos, DNA *barcoding*, Enzimas lipolíticas.

RESUMO

Enzimas lipolíticas (esterases e lipases) hidrolisam ligações éster em triacilgliceróis com diferentes especificidades de substrato. Estas enzimas possuem várias aplicações industriais e as enzimas microbianas são preferidas. Este trabalho teve como objetivo encontrar novos microrganismos produtores de enzimas lipolíticas em resíduos de caixas de gordura residenciais. Bactérias e fungos foram selecionados em meios específicos e identificados por DNA *barcoding*. Análises de fermentação submersa mostrou produção de esterase pelas bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus safensis* e *Burkholderia multivorans* e produção de lipase apenas por *B. multivorans*. Da mesma forma, esta análise mostrou a produção de esterase e lipase por isolados fúngicos de *Geotrichum* spp. e de *Fusarium solani*.

INTRODUÇÃO

Esterases e lipases hidrolisam ligações éster nos triacilgliceróis entre glicerol e ácidos graxos de cadeia curta e longa, respectivamente. Estas enzimas são produzidas por plantas, animais e microrganismos. Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* e fungos dos gêneros *Geotrichum* e *Candida* são os principais produtores. As enzimas microbianas são preferidas industrialmente, devido à ausência de flutuações sazonais, maior estabilidade e baixo custo de produção.

O mercado global de lipases microbianas está previsto para USD 428,6 milhões em 2025. As lipases são principalmente aplicadas na indústria de detergentes, mas também são utilizadas em outras indústrias e na fabricação de biodiesel. As carboxilesterases são utilizadas na degradação de pesticidas e da parafina, na despolimerização de plásticos e em biossensores.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de selecionar bactérias e fungos produtores de enzimas lipolíticas a partir de resíduos de caixas de gordura residenciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de bactérias e fungos produtores de lipase

Resíduos de caixas de gordura foram obtidos de três residências localizadas no município de Maringá, PR. Bactérias foram selecionadas em meio seletivo de Rodamina B (KOUKER & JAEGER, 1987). Fungos foram selecionados no mesmo meio de Rodamina B acrescido de antibióticos (320 UI/mL de penicilina e 125 µg/mL de estreptomicina) e também nos meios de Tween 80 e de vermelho de fenol. A fonte de carbono em todos os meios foi o óleo de oliva. A metodologia utilizada foi a descrita em SANTOS et al. (2019) e CASTRO et al. (2017).

Extração de DNA e identificação molecular dos isolados

As bactérias foram cultivadas em meio Luria Bertani líquido e o DNA genômico foi extraído como descrito em SANTOS et al. (2019). Os fungos foram cultivados de forma estacionária em meio batata dextrose líquido e o DNA genômico foi extraído com um kit comercial (PureLink™ Genomic Plant DNA Purification, ThermoFisher Scientific, EUA).

Para bactérias, foi feita a amplificação de um fragmento do gene rDNA 16S com os iniciadores 91E e 13B, como descrito em SANTOS et al. (2019). Para fungos, foi feita a amplificação de um fragmento do gene rDNA 5,8S-ITS com os iniciadores ITS4/5, como descrito em CASTRO et al. (2017).

Os produtos de PCR foram purificados com um kit comercial e enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. A determinação dos gêneros e espécies foi feita por comparação com sequências depositadas em bancos de dados em pesquisa BLAST.

Cultura em meio líquido e análise da atividade enzimática

As bactérias foram cultivadas por 24 h a 37 °C (100 rpm) em 25 mL do meio líquido (extrato de levedura 0,2 g/%, peptona 0,2 g/%, triptona 0,5 g/%, NaCl 0,5 g/%, NH₄Cl 0,1 g/%, goma arábica 0,5 g/% e óleo de oliva 2%). Os fungos foram cultivados como descrito em CASTRO et al. (2017). Após os cultivos, uma alíquota de 1,4 mL foi centrifugada (12.000g, 5 min) ou filtrada (0,22 µm) e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios de atividade enzimática. As atividades de lipase e esterase foram determinadas pelo método da hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato ou *p*-nitrofenilbutirato, respectivamente (WINKLER & STUCKMANN, 1979). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade requerida para liberar um µmol de *p*-nitrofenol/mL·min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas culturas puras de nove isolados bacterianos e nove isolados fúngicos. A maioria destes isolados produzia pigmento fluorescente no meio Rodamina B (Tabela 1). Exemplos de pigmentação no meio seletivo são mostrados na Figura 1). Todos estes isolados, com exceção de um, foram identificados por DNA *barcoding* (Tabela 1).

Todos os isolados bacterianos testados produziram esterase em meio líquido, mas apenas o isolado de *B. multivorans* UEM 7 produziu lipase (Figura 2A). Enzimas lipolíticas já foram extraídas e caracterizadas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. multivorans*, mas não de *B. safensis* (Figura 2B). Três isolados de *Geotrichum* sp. e um de *F. solani* produziram esterase e lipase. A produção de enzimas lipolíticas por estas espécies é relatada na literatura.

Tabela 1. Isolados selecionados.

Isolado	Gênero e espécie	GenBank de sequências similares (porcentagem de identidade)	Pigmento fluorescente em meio Rodamina
Bactérias			
1 A	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
1 B	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
2 C	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
3 C1	<i>Bacillus licheniformis</i>	KU922528.1 (100%), MZ895797.1 (100%)	Sim
4 C	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
5	<i>Bacillus safensis</i>	OR389156.1 (100%), CP126090.1 (100%)	Sim
7	<i>Burkholderia multivorans</i>	OP986544.1 (100%), CP090669.1 (100%)	Sim
8	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
9	<i>Bacillus subtilis</i>	MF983542.1 (100%), KM822599.1 (100%)	Sim
Fungos			
Rho 1	<i>Geotrichum</i> sp.	MK263184.1 (100%), OP758549.1 (100%)	Sim
Rho 2	<i>Geotrichum candidum</i>	OQ694472.1 (100%), OR198716.1 (99,1%)	Não
Rho 3	<i>Geotrichum candidum</i>	OQ694472.1 (100%), OR198716.1 (99,1%)	Não
TW 1	<i>Geotrichum</i> sp.	MK263184.1 (100%), OP758549.1 (100%)	Sim
TW 2	Sem similar		Não
VF 1	<i>Saprochaete ingens</i>	OQ586271.1 (100%)	Não
VF 2	<i>Epicoccum nigrum</i>	MN089646.1 (100%), KT588464.1 (100%)	Não
A 3	<i>Geotrichum</i> sp.	MK263184.1 (100%), OP758549.1 (100%)	Sim
E 3	<i>Fusarium solani</i>	MN826682.1 (100%), MH865999.1 (100%)	Sim

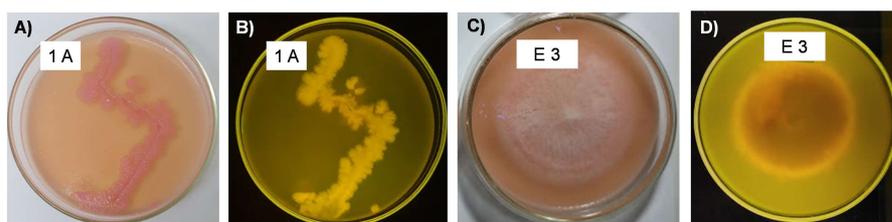


Figura 1 – Produção de enzimas lipolíticas em meio sólido. Placas de meio Rodamina B com a bactéria *B. subtilis* UEM 1A (A) e o fungo *F. solani* (C). O verso das mesmas placas fotografadas sob luz UV (B e D).

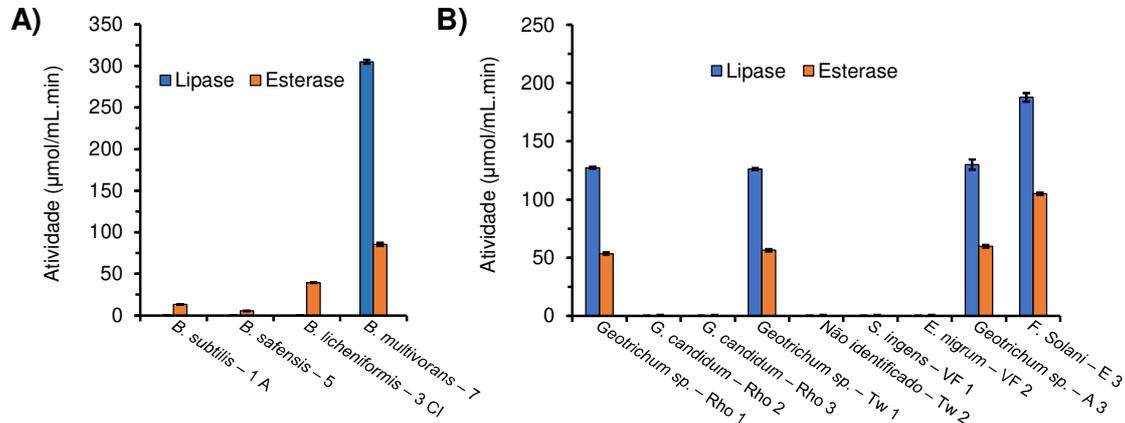


Figura 2. Produção das enzimas lipolíticas em meio líquido pelas bactérias (A) e fungos (B).

CONCLUSÕES

Isolados de bactérias e de fungos produtores de enzimas lipolíticas foram obtidos. As enzimas produzidas poderão ser posteriormente estudadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC.

REFERÊNCIAS

CASTRO, F.F.; PINHEIRO, A.B.P.; NASSUR, C.B. BARBOSA-TESSMANN, I.P. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 10, p. 321–328, 2017.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53 (1), p. 211–213, 1987.

SANTOS, F.C.; CASTRO, F.F.; APOLONIO, T.M.; YOSHIDA, L.; MARTIM, D.B.; TESSMANN, D.J.; BARBOSA-TESSMANN, I.P. Isolation, diversity, and biotechnological potential of maize (*Zea mays*) grains bacteria. **Genet Mol Res**, v. 18, n. 3, gmr18320, 2019.



WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 663–670, 1979.