

SELEÇÃO DE FUNGOS BASIDIOMICETOS ISOLADOS DO SEMI-ÁRIDO BAIANO SECRETORES DE ENZIMAS LIPOLITICAS

Wesle Silva Gama¹; Tássia Caires Ramos²; Heiddy Marquez Alvarez³; Angélica Maria Lucchese⁴.

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: wes_gama@hotmail.com
2. Participante do projeto, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cairesramos@hotmail.com
3. Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: marquezheddy@gmail.com
4. Co-Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angélica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Lipases, Fungos, Hidrólise.

INTRODUÇÃO

A hidrólise tradicional de óleos vegetais é feita com o uso de catalisadores químicos em condições de alta temperatura e pressão. A hidrólise destes compostos pode ser total, fornecendo ácidos graxos livres e glicerol, ou parcial, produzindo diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG) (MICHAELIS; MENTEN, 1913). A hidrólise enzimática é uma abordagem vantajosa porque pode ser realizada em condições mais brandas (temperaturas mais baixas) e com alta seletividade levando a produtos com elevado grau de pureza. As lipases são catalisadores biológicos (enzimas) que podem ser isoladas a partir fungos, bactérias ou leveduras (WOODWARD *et al*, 1984). 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 (VULFSON, 1994). Novas fontes de lipases vêm sendo pesquisadas com o objetivo de identificar enzimas com maior estabilidade térmica e eficazes em uma faixa mais ampla de pH. As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel. Uma aplicação que tem merecido destaque é sua utilização na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica (FABER, 2000).

Justifica-se este estudo pelo fato da região do semi-árido baiano possuir uma diversidade biológica pouco explorada no Brasil e possuir as características para apresentar organismos resistentes a condições extremas, além de enorme potencial para aplicação industrial. O departamento de Biologia da UEFS possui uma coleção de fungos filamentosos (CCMB) isolados de diversas regiões do semi-árido Baiano, além de diversos projetos em andamento com o objetivo de levantar e classificar a micro-biota local que pode ser fonte apreciável de enzimas de interesse.

O presente trabalho tem com objetivo principal avaliar e quantificar a produção de lipases extracelulares de fungos basidiomicetos isolados do semi-árido Baiano pertencentes a

Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) pela metodologia do *Cup Plate* e avaliação das metodologias de obtenção do extrato bruto enzimático.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção de microrganismos secretores de enzimas pelo método “*Cup Plate*”

Os fungos estudados (17 fungos) foram cultivados em meio PDA (Potato Dextrose Agar) numa temperatura de 28 °C por um período de 7 dias. Para a produção de enzimas, os fungos foram transferidos para reatores de 250 mL contendo 25 mL do meio líquido de indução, composto de 0,7% de fosfato de amônio, 0,15% fosfato dibásico de potássio, 0,05% de sulfato de magnésio, 0,03% de cloreto de cálcio, 0,25% de soluções de traços de sais (preparado a partir de 0,1% de cloreto manganoso, 0,1% de sulfato de zinco e 0,1% de água destilada), tampão fosfato pH= 7 e substrato (os substratos para reação de hidrólise foi o óleo de soja) e foram mantidos em estufa bacteriológica B.O.D. na temperatura de 28°C por 72 horas.

A caracterização da secreção de lipases hidrolíticas foi realizada em meio sólido composto de 1,0% de óleo de soja, 2,0% de ágar, água destilada e revelador Rodamina B. Em seguida foram realizadas 3 (três) perfurações (“cups”) para favorecer o crescimento do microrganismo, com diâmetro de 6mm, na superfície do ágar e adicionou-se 150µL do filtrado. As placas foram incubadas a 28°C e verificou-se a formação de halos após 24, 48 e 72h. O tamanho do halo formado foi medido com uma régua graduada em milímetros. O fungo com maior tamanho de halo foi selecionado para quantificação de enzimas.

2.2. Obtenção de Extrato Bruto Enzimático

Para obtenção do extrato bruto enzimático, os fungos com as maiores secreções enzimáticas foram incubados em PDA por 72h e 10 discos de 6 mm dos mesmos foram transferidos para o meio de indução onde permaneceram por 24h. Filtrou-se a amostra para separação da massa celular.

2.3. Determinação de Atividade Hidrolítica das lipases

Para avaliação quantitativa da atividade hidrolítica de lípases os extratos brutos foram submetidos ao método titulométrico no qual uma alíquota de 3 mL do filtrado contendo a enzima foi adicionado de emulsão (solução tampão fosfato pH=7, óleo de soja e goma arábica). Em seguida, o meio reacional foi submetido a banho de agitação a 40°C por 5 minutos e titulado com solução KOH alcoólico na presença de fenolftaleína. A reação foi paralisada com a adição de 3mL de solução acetona: etanol:água.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 17 fungos basidiomicetos estudados foram os seguintes: 401, 292, 368, 394, 404, 413, 318, 379, 364, 314, 50,27, 347, 371, 327, 393, 309.

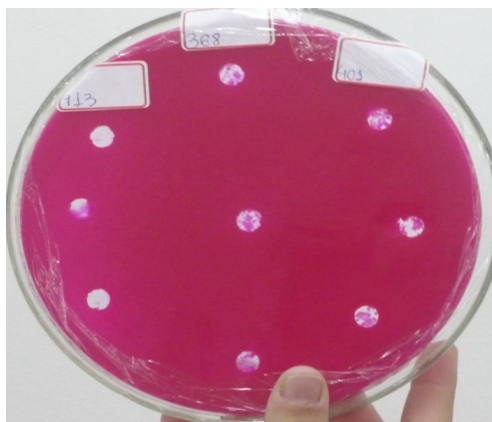


Figura 1. Visualização dos halos das enzimas secretadas pelos fungos basidiomicetos 413, 368 e 401.

Dos 17 fungos basidiomicetos estudados apenas o 404 e 413 apresentaram halo visível, como demonstrado na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Halos obtidos pela ação das enzimas secretadas pelos fungos Basidiomicetos 404 e 413.

<i>Fungos</i>	<i>Halo (cm)</i>		
	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>72h</i>
404	0	0	1,3
413	0	0	1,5

No método titulométrico, verificou-se ação das enzimas na hidrólise do óleo vegetal de soja em ácidos graxos pelos fungos 404 e 413. Contudo o fungo 413 apresentou maior quantidade de ácidos graxos liberados, ou seja, maior volume de hidróxido consumido (4,13mL) enquanto que o fungo 404 apresentou apenas 2,9mL. Novos testes serão realizados aumentando o tempo de obtenção dos extratos brutos enzimáticos para 48 e 72h.

CONCLUSÕES

Os fungos 404 e 413 apresentaram grande expressão para lipases no método qualitativo do *Cup Plate*. Contudo, o fungo 413 apresentou melhor eficiência na quantificação da secreção enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L.1913. *Biochem. Z.*,40, p. 386-387.

WOODWARD, J.; ALLEN, B.F. & SCOTT, M. 1984. *Sixth Symp. on Biotechnol. for Fuels and Chemicals*, 16, p. 435-438.

DIXON, M.; WEBB, E. C. 1979. *Enzymes*, 3rd ed., Longman Group, Ltd., p. 7.

WILLINGEN, de A. H. A. In: RADLEY, J. A. ed. 1976. *Examination and analysis of starch and starch products*, London, Applied Sciences Publishers, p. 83.

VULFSON, E. N. 1994. *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; Wooley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain.

FABER, K. 2000. *Biotransformation in Organic Chemistry*; 4^a ed.; Springer-Verlag: Berlin.

LENZ, P. & SÜSSMUTH, R. 1987. *Toxicology*, 45 (2), p. 185.

DANTAS, E. M & DE AQUINO, L. C. L. 2010. *Química Nova*, 12(1), p. 81.

AGUIAR, R. O.; MONDARDO, R. M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B. 2010. *Acta Scientiarum. Technolog*, 32(1), p. 15.