

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

ANNE GRAZIELE DA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS
ISOLADOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM FRENTE A
ÓLEOS VEGETAIS**

PORTO ALEGRE/RS

2010

Anne Grazielle da Silva

Estudo da atividade lipolítica de Actinomicetos isolados do processo de compostagem frente a óleos vegetais

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professora Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre/RS

2010

Anne Grazielle da Silva

Estudo da atividade lipolítica de Actinomicetos isolados do processo de compostagem frente a óleos vegetais

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Fatima Menezes Bento

UFRGS – Depto de Microbiologia

Dra. Sabrina Pinto Salamoni

UFRGS – Depto de Microbiologia

Dedico este trabalho a minha família,
em especial a minha avó Edi, por todo
apoio e dedicação nesta longa
caminhada.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a minha professora e orientadora Dra. Sueli Van Der Sand por todo apoio, dedicação, paciência e amizade durante a execução deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Ciências Biológicas e a todos do Departamento de Microbiologia.

Agradeço a minha família, em especial a minha avó Edi (*in memoriam*), por acreditar no meu potencial e fazer com que eu lutasse sempre por meus objetivos.

Aos colegas da Biologia Ana Bárbara Hahn, Bruno Tubino, Dieime Andrade, Juciana Cazarolli, Magali Stival, Raisia Billodre, Thais Nunes, pelo carinho, amizade, companheirismo e momentos de descontração que foram essenciais para a realização deste curso.

Aos colegas do Laboratório 164 do Departamento de Microbiologia, Daniele Oliveira, Evilin Giordana, Gisele Nachtigall, Karina Heck, Mariana Duarte, Paula Martins, Sabrina Salomoni, Themis Collares e aos demais, pela amizade e momentos de alegria, que foram indispensáveis durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Alan Sangali Martins por me aturar e me respeitar, pelo amor, companheirismo e conforto durante o período da Graduação.

A todos os meus amigos, em especial os de infância, que contribuíram de alguma maneira para a realização do curso, muito obrigada.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O processo de compostagem, no qual ocorre a degradação da matéria orgânica, envolve a atividade de diversos microrganismos. Entre eles destacam-se os actinomicetos que são bactérias Gram positivas filamentosas que apresentam um grande potencial em produzir enzimas extracelulares. São bactérias aeróbias amplamente distribuídas no ambiente e conhecidas pela produção de moléculas bioativas. A aplicação de enzimas, particularmente lipases, vem se apresentando como uma alternativa atrativa para hidrólise de óleos e gorduras, principalmente quando consideradas vantagens na obtenção de produtos biodegradáveis e redução de resíduos. O presente trabalho tem por objetivos avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos obtidos no processo de compostagem frente a óleos vegetais e biodiesel metílico de soja (B100) em diferentes temperaturas de incubação bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização. Foram empregados 20 actinomicetos isolados de processo de compostagem. Os isolados foram cultivados em meio agar - amido - caseína através da técnica de microcultivo e os gêneros identificados conforme a morfologia apresentada. A atividade da enzima lipase foi avaliada, pela hidrólise dos diferentes óleos em diferentes temperaturas, e observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350nm. Todos os isolados apresentaram potencial lipolítico com a melhor atividade observada à temperatura de 50°C para o óleo de girassol onde 14 isolados foram positivos. Os resultados demonstraram que a atividade da enzima lipase depende da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. Os actinomicetos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, apresentam potencial biotecnológico, podendo estes e/ou seus metabólitos serem empregados em diferentes processos industriais.

Palavras-Chave: actinomicetos; atividade lipolítica; processos industriais; compostagem.

ABSTRACT

The composting process, in which the degradation of organic matter occurs, involves activity of various microorganisms. Among them, actinomycetes, which are Gram positive filamentous bacteria that have potential to produce extracellular enzymes, stand out. They are aerobic bacteria widely distributed in the environment and known for the production of bioactive molecules. The application of enzymes, particularly lipases, has been presented as an attractive alternative for the hydrolysis of oils and fats, especially when considering advantages in the obtaining of biodegradable products and waste reduction. This study aims to evaluate the lipolytic activity of actinomycete isolates obtained in the composting process regarding vegetable oils and soybean biodiesel methyl and different incubation temperatures as well as to select potential producers of lipases for further study of the production and characterization. Twenty actinomycetes isolated from the composting process were employed. The activity of lipase enzyme was evaluated by hydrolysis of different oils at different temperatures and observed under UV light at length of 350nm. The isolates were cultured in ACA medium using the microculture technique and the genera identified according to the presented morphology. All isolates showed potential with the best lipolytic activity observed at a temperature of 50 ° C for sunflower oil where 14 isolates were positive. The results showed that the activity of the lipase enzyme depends on the incubation temperature and on the type of oil substrate employed. Actinomycetes, especially those belonging to the genus *Streptomyces* and *Nocardia* have biotechnological potential, can its metabolites are employed in different industrial processes.

Keywords: actinomycetes; lipolytic activity; industrial processes; composting.

INTRODUÇÃO

A produção de resíduos sólidos em grandes cidades por ação de atividades relacionadas à indústria, ao comércio e à agricultura causa diversos problemas no ambiente (Rodrigues, 2006). Formas de conscientização da população relacionadas com o descarte correto ou o reaproveitamento de resíduos reduzem a quantidade de resíduos sólidos e podem solucionar um problema de interesse público.

Uma forma alternativa para o tratamento de resíduo orgânico é o processo de compostagem, que proporciona uma utilidade aos compostos orgânicos, que são transformados pelos microrganismos em um produto semelhante ao húmus podendo ser usado como fertilizante nos solos (Kahlil *et al.*, 2001). Os compostos orgânicos mais simples como monossacarídeos, amido e lipídeos são os primeiros a serem metabolizados pelos microrganismos, posteriormente ocorrendo a degradação de moléculas mais complexas. Para tanto, há necessidade de utilização de uma diversidade de enzimas produzidas pelos microrganismos no processo (Tuomela *et al.*, 2000).

Os actinomicetos são bactérias aeróbias Gram positivas filamentosas que apresentam alto conteúdo de guanina e citosina em seu genoma (Hirsch & Christensen, 1983; McCarthy & Willians, 1992). Sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, porém seus filamentos são mais delgados e não apresentam as mesmas características das hifas dos fungos.

Os actinomicetos podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, como na água, plantas em decomposição, nódulos de raízes de plantas, sedimentos, fezes de animais e também no lodo ativado e em produtos alimentícios, mas são encontrados principalmente no solo (McCarthy & Willians, 1992). Segundo Kennedy (1999), 30% da população total de microrganismos no solo é correspondente a actinomicetos. Uma característica marcante destes microrganismos é a produção de enzimas extracelulares, que degradam macromoléculas complexas encontradas no solo, além de sintetizar e excretar metabólitos, como antibióticos, geosmina - que dá o odor característico à terra molhada - entre outros (Moreira & Siqueira, 2006). Dentre as enzimas podemos encontrar lipases, proteases, celulasas, xilanases, amilases, quitinases e pectinases, que

apresentam potencial para aplicação em diferentes processos na indústria sendo ela têxtil, de alimentos, de detergentes, de papel e polpa, farmacêutica, entre outras. As enzimas produzidas por estas bactérias apresentam uma grande estabilidade em diferentes faixas de pH e temperatura, tornando-as importantes em diferentes processos industriais. O gênero *Streptomyces* destaca-se entre os actinomicetos pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial (Padilha, 1998).

Para que uma enzima possa ser utilizada comercialmente ela deve oferecer várias vantagens como: qualidade superior aos produtos utilizados, melhoria do processo, tornando possível assim um menor custo nos laboratórios e maquinarias utilizadas (Lima *et al.*, 2001). A aplicação de enzimas, particularmente lipases (triacilglicerolacil - hidrolases, E.C. 3.1.1.3), vem se apresentando como uma alternativa atrativa para hidrólise de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas vantagens como obter produtos biodegradáveis e reduzir a quantidade de resíduos (Castro *et al.*, 2004).

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos e glicerol na interface entre a fase aquosa e lipídica. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas com variações em suas propriedades catalíticas (Mukherjee & Hills, 1994).

Microrganismos produtores de lipases têm sido isolados de diversos habitats como solos (El-Shafei & Rezkallah, 1997; Fang *et al.*, 2006), solos contaminados por óleos (Lima *et al.*, 2004), efluentes industriais (Kumar *et al.*, 2005), ambientes quentes (Sharma *et al.*, 2002), pilhas de compostagem, diques de carvão e fontes termais (Wang *et al.*, 1995). Entre eles destacam-se as bactérias (Jaeger *et al.*, 1999), os fungos filamentosos (Elibol & Ozer, 2002), as leveduras (Muralidhar *et al.*, 2001) e os actinomicetos (Sztajer *et al.*, 1988).

Segundo Gupta *et al.* (2004) a produção de lipase é influenciada pelo tipo e fonte de carbono disponível, pela fonte de nitrogênio, pelo pH do meio e pela temperatura de crescimento dos microrganismos.

Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bastante elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado lipases

microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível (Castro *et al.*, 2004).

É visível que as lipases vêm conquistando uma faixa crescente no mercado de enzimas industriais (Castro *et al.*, 2004). Este grupo de enzimas possui aplicações no processamento químico orgânico, na formulação de detergentes, na síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica, agroquímica e de laticínios, na manufatura do papel, na nutrição, em cosméticos e na indústria farmacêutica (Liese *et al.*, 2000). Elas aceleram a degradação de resíduos gordurosos (Masse *et al.*, 2001) além de apresentarem importância no processo de biorremediação (Hasan *et al.*, 2006). Devido aos inúmeros acidentes de derramamento de óleo causados durante o seu transporte em 2010 - segundo registros da FEPAM - o estudo de microrganismos capazes de degradar o biodiesel, é importante, pois torna viável o emprego destes na biorremediação do solo evitando danos mais graves ao ambiente.

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos. Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos, com odores desagradáveis, que prejudicam intrínseca e extrinsecamente as unidades industriais (Vieira *et al.*, 2004). As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos, em não requererem a presença de co-fatores e em possuírem uma ampla especificidade pelo substrato (Castro *et al.*, 2004).

Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et al.*, 2004).

Considerando o potencial biotecnológico dos actinomicetos e as aplicações das lipases em diferentes processos, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos provenientes de processo de compostagem sob diferentes temperaturas de incubação e óleos vegetais; identificar os isolados em nível de gênero, bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta dos Microorganismos

Os actinomicetos foram isolados de uma leira de compostagem (temperatura média da leira de 60°C) na Unidade de Triagem e Compostagem (UTC) de Resíduos sólidos do Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU), no Município de Porto Alegre, RS (2009).

Isolamento e armazenamento

Aliquotas de 100µL dos actinomicetos armazenados em glicerol foram semeadas em placas contendo o meio de cultivo agar amido caseína (ACA - amido 1%, caseína 0,03%, KNO₃ 0,2%, NaCl 0,2%, K₂HPO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,001%, CaCO₃ 0,002% e agar 1,5%) através da técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A incubação ocorreu a uma temperatura de 30°C por no mínimo sete dias, e posteriormente os isolados (Fig. 1) foram esgotados em placa para verificação da pureza das colônias e então mantidos em ACA inclinado. Os isolados foram mantidos sob refrigeração para posterior utilização em estudos de atividade enzimática.



Fonte: Mariana Duarte

Figura 1. Isolamento dos actinomicetos em meio ACA.

Avaliação da atividade lipolítica

Dos 35 actinomicetos testados, 20 apresentaram crescimento significativo, ou seja, livre de contaminação no período de 14 dias a 30°C em ACA, sendo assim escolhidos para o estudo de produção enzimática.

A atividade lipolítica foi observada após o crescimento dos microrganismos em meio de cultura contendo peptona 0,5%, extrato de levedura 0,1%, NaCl 0,4%, agar 1% e solução de rodamina B 0,1% modificado de Kouker & Jaeger (1987). O meio para análise da atividade enzimática foi previamente autoclavado e resfriado a uma temperatura de 60°C para adição dos óleos vegetais (oliva, gergelim, girassol) e biodiesel metílico de soja - B100. Os óleos foram esterilizados individualmente, por filtração, em um sistema de membrana de 0,22µm com bomba de vácuo e posteriormente adicionados no meio de cultura, a uma concentração de 2,5%. Os isolados foram inoculados em placas de Petri na forma de picada, sendo as placas incubadas nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C com os tempos de incubação variando entre 5 e 21 dias conforme o substrato, sendo que todas as placas ocorreram na forma de duplicata.

A hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob luz UV com comprimento de onda de 350nm. Foram visualizados halos de cor alaranjada ao redor e/ou sobre os actinomicetos que foram capazes de produzir a enzima devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos resultantes da hidrólise.

Identificação dos actinomicetos isolados

A diferenciação em nível de gênero foi realizada através da análise morfológica microscópica das colônias, que possibilita a visualização de micélio sob o substrato, micélio aéreo, arranjo e cadeia de esporos, assim como, a presença ou não de esporângio através da técnica de microcultivo conforme Holt *et al.* (1989). Para realização do microcultivo foram utilizadas placas de Petri previamente esterilizadas já contendo uma lâmina, 2 palitos de madeira para sustentação da lâmina e um pedaço de algodão na extremidade da placa. Após a esterilização e secagem do material, foi

adicionado 1 mL de ACA por lâmina e 2 isolados foram inoculados, em extremidades diferentes, com uma agulha estéril traçando uma linha transversal sobre o meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa de 30°C por no mínimo 5 dias e a análise do desenvolvimento de micélio aéreo realizada de 2 em 2 dias com adição de água estéril para manutenção da umidade do ambiente (Fig. 2). A observação das características foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400X.



Figura 2. Técnica do microcultivo (Holt *et al.*, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de actinomicetos empregados neste estudo apresentaram atividade lipolítica, variando conforme o substrato e a temperatura de incubação. Para as três temperaturas analisadas, perante os diferentes substratos, a melhor atividade enzimática observada foi a 50°C sendo o óleo de girassol o substrato mais degradado (70% dos isolados com atividade). À medida que a temperatura de incubação aumentou, a atividade enzimática dos isolados, em média, também aumentou.

A identificação através das observações das características morfológicas dos actinomicetos pela técnica do microcultivo possibilitou a classificação em nível de gênero. Ocorreu o predomínio do gênero *Nocardia* (Fig. 3), com 55% (n=11) dos isolados. Os demais foram identificados como *Streptomyces* (Fig. 3) com 40% (n=8) e *Streptosporangium* (Fig. 4) com 5% (n=1) dos representantes. Segundo Tuomela *et al.*

(2000), os gêneros de actinomicetos predominantemente em compostagem de resíduos sólidos urbanos incluem *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Micromonospora*. Deve-se levar em consideração que a prevalência do gênero *Nocardia* nas amostras de compostagem avaliadas pode ser resultado da escolha randômica das colônias na placa. No entanto, *Nocardia* é um microrganismo comumente encontrado em processo de compostagem. Além disso, a composteira de onde as coletas foram realizadas continha lodo ativado de uma estação de esgoto outro fator que pode alterar a composição predominante de microrganismos na leira.

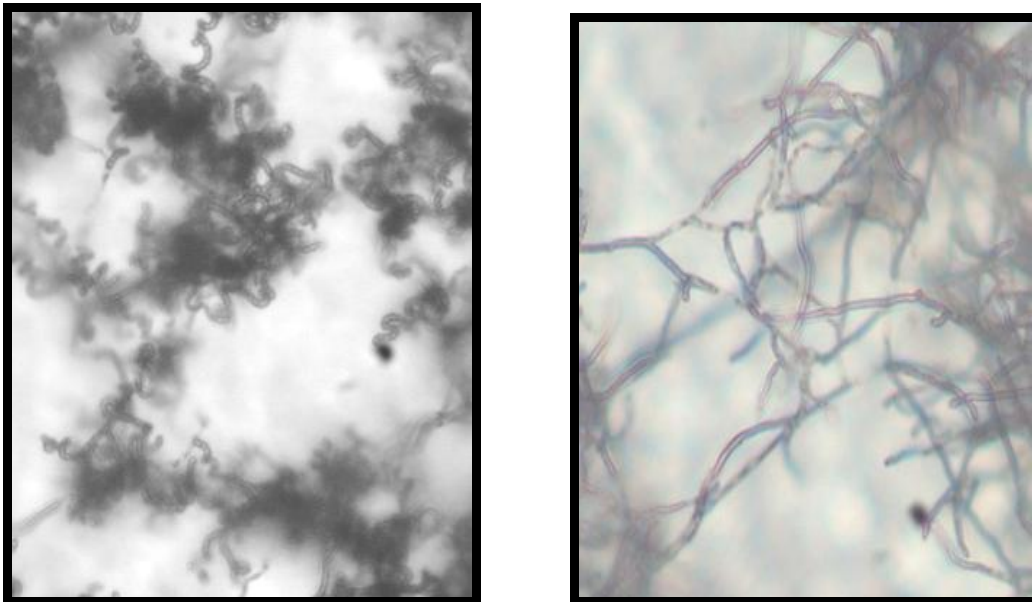


Figura 3. Micélio aéreo dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia* respectivamente (aumento de 400X).

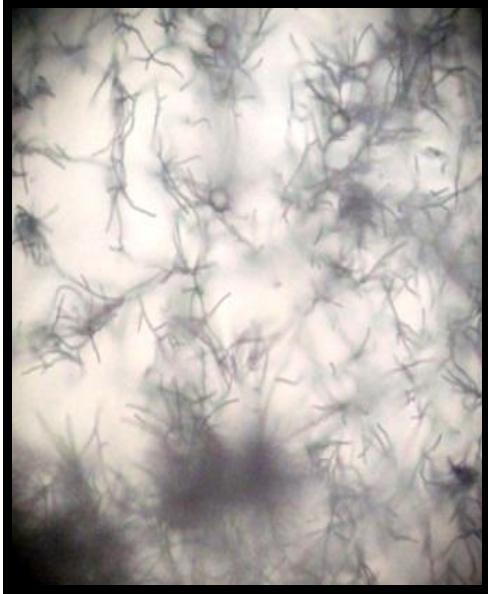


Figura 4. Gênero *Streptosporangium* (aumento de 400X).

Dos substratos testados, o biodiesel (B100) foi hidrolisado por 65% dos isolados nos ensaios à temperatura de 40°C, por 45% a 30°C e por somente 20% a 50°C. Para o substrato óleo de gergelim (Fig. 6), não ocorreu diferença significativa quanto às temperaturas de 30 e 50°C, onde 50% dos isolados foram positivos para a atividade lipolítica. Por sua vez, foi observado que, nos ensaios com óleo de girassol (Fig. 5), os melhores resultados foram observados à temperatura de 50°C, assim como para o óleo de oliva.

Lee *et al.*(1999), encontraram a bactéria termofílica *Bacillus thermoleovorans*, isolada de fontes de água quente na Indonésia, com atividade de lipase extracelular e altas taxas de crescimento sobre substratos de lipídeos em temperaturas elevadas e melhor atividade à 50°C. Resultados similares foram encontrados por Sidhu *et al.* (1998), que extraíram a enzima extracelular de *Bacillus sp* com melhor atividade a 50°C. Conforme relatado por Abramic *et al.* (1999), a lipase extracelular isolada de *Streptomyces rimosus* é mais ativa em temperaturas em torno de 50 e 60°C.

Os resultados demonstram que a atividade lipolítica é dependente da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. As enzimas apresentam especificidade quanto ao substrato e, por isso, há diferença nas atividades conforme o óleo empregado, já que cada um tem composição própria de triacilgliceróis (Gao *et al.*,1995; Nthangeni, 2001; Edem, 2002) e no caso do biodiesel de ésteres de ácidos graxos. Entre todos os óleos testados, apenas o óleo de oliva contém elevada porcentagem em ácido oléico (63%), substrato preferencial das lipases (Vieira *et al.*, 2005; Gordilho *et al.*, 1998).

Este estudo mostrou que a influência da composição da cadeia carbônica rica em ácido oléico não foi a mais significativa, já que a melhor atividade lipolítica, em um geral, foi observada para o óleo de girassol (70%) a 50°C, sendo este rico em ácido linoléico (Edem, 2002), assim como o biodiesel, que teve uma significativa degradação. A composição destes óleos pode ter influenciado a produção da enzima, já que suas cadeias carbônicas são longas e, segundo Nthangeni *et al.* (2001), o melhor substrato para a atividade de lipases. Em um estudo conduzido por Haba *et al.* (2000), a maior atividade lipolítica, em relação as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter calcoaceticus* foi encontrada quando estas foram incubadas no substrato óleo de girassol comparando-as com a incubação em óleo de oliva.. O biodiesel de soja (B100), rico em ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico (C18: 2) (53%), por apresentar cadeia carbônica longa, é mais facilmente degradado (Domingos *et al.*,2007) por microrganismos produtores de lipase.

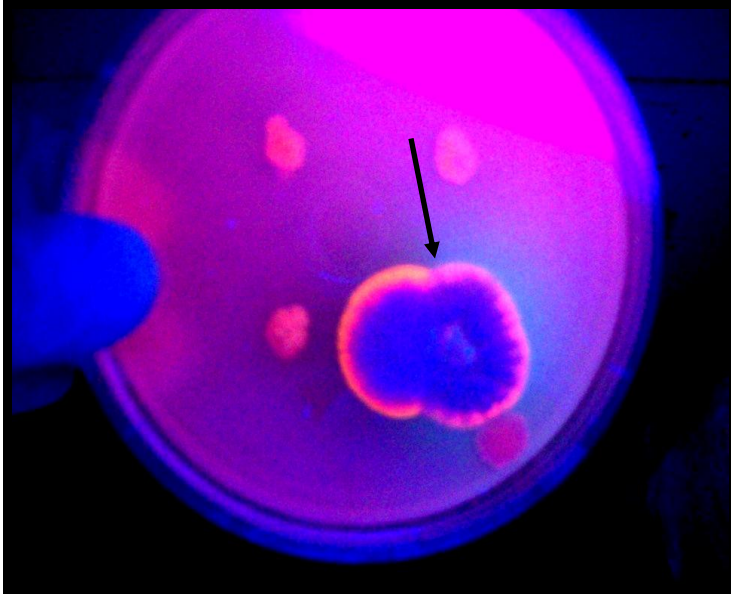


Figura 5. Hidrólise do óleo de girassol a 30°C. Isolado 393 apresentou atividade lipolítica no 6° dia de incubação. Atividade lipolítica representada pelo halo fluorescente em torno da colônia (apontado pela seta).

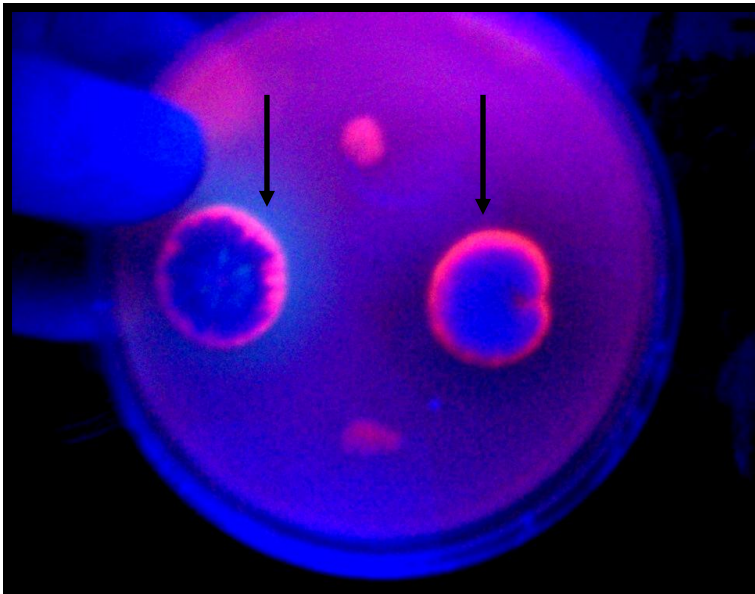


Figura 6. Hidrólise do óleo de gergelim a 40°C. Isolados 314 e 393, respectivamente, apresentaram atividade lipolítica no 5° dia de incubação representada pelo halo fluorescente em torno das colônias (apontado pelas setas).

Espera-se que microrganismos termotolerantes produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento, ou seja, acima de 45°C. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento destas novas linhagens, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termoestabilidade (Gomes *et al.*, 2006) .

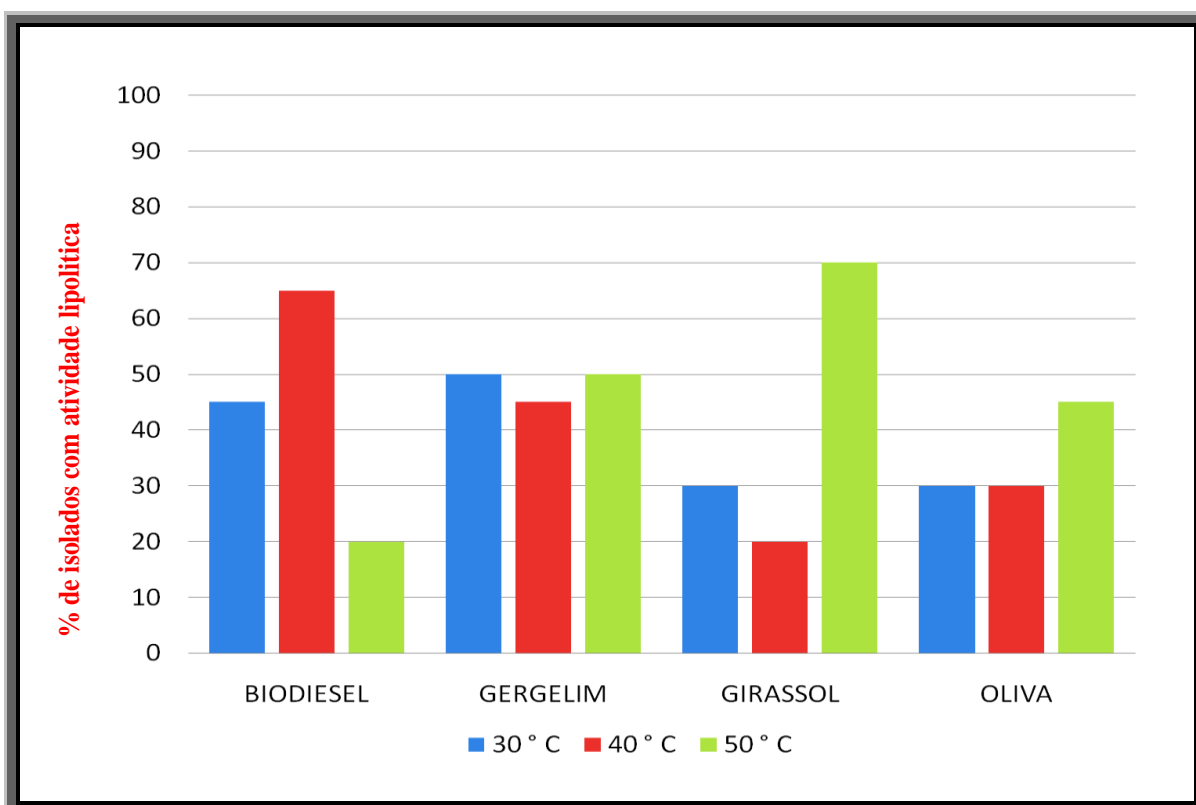


Figura 7. Porcentagem de isolados positivos para atividade lipolítica em diferentes substratos e diferentes temperaturas.

A estabilidade térmica é uma característica desejável das lipases (Janssen *et al.*, 1994). Sagioglu & Arabaci (2005) estudaram as propriedades físico-químicas de lipases purificadas a partir do óleo de sementes de girassol e observaram que a estabilidade da enzima e a atividade lipolítica ocorreram nas temperaturas entre 35 e 50°C.

Tabela 1: Atividade lipolítica por diferentes isolados oriundos de processo de compostagem frente a diferentes temperaturas e óleos vegetais.

| N° isolado | BIODIESEL | | | GERGELIM | | | GIRASSOL | | | OLIVA | | |
|---------------|-----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|-------|------|------|
| | 30°C | 40°C | 50°C | 30°C | 40°C | 50°C | 30°C | 40°C | 50°C | 30°C | 40°C | 50°C |
| 113 (S) | + | | | + | + | + | | | + | | | + |
| 186 (S) | | | | + | + | | | | + | + | | |
| 192 (S) | + | | + | + | + | | + | | | | | |
| 243 (N) | + | | | + | | + | | | + | | | + |
| 244 (N) | | + | | | | + | | | + | + | | + |
| 249 (S) | + | + | + | + | | | + | + | + | | | + |
| 251 (S) | | + | | | + | | | | | | | |
| 255 (N) | | | | + | | | | | | | + | |
| 314 (S) | | + | + | + | + | | | | | | + | |
| 315 (N) | | + | | | | + | + | + | + | + | + | |
| 319 (N) | | + | | + | | + | | | | | | |
| 321 (N) | | + | | | + | + | | | + | | | |
| 322 (S) | + | | | | + | | | | + | + | | + |
| 324 (N) | | + | | | | + | | | + | | | + |
| 332(SG) | | + | | | + | + | | | + | | + | |
| 390 (N) | + | + | | | | | + | | + | + | + | + |
| 393 (N) | + | + | | + | + | | + | | | + | | |
| 396 (S) | + | + | | + | | | + | + | + | | | + |
| 399 (N) | + | | | | | + | | | + | | + | |
| 400 (N) | | + | + | | | + | + | + | + | | | + |

Gêneros: **N:** *Nocardia*; **S:** *Streptomyces*; **SG:** *Streptosporangium*

Dentre os 20 isolados positivos para atividade lipolítica, nenhum apresentou 100% de eficácia, ou seja, foi positivo ao mesmo tempo para todas as temperaturas e óleos. O isolado 249, identificado como *Streptomyces*, foi o que apresentou a melhor atividade por degradar todos os óleos (alguns deles em mais de uma temperatura) (Tabela 1). Já o isolado 400, identificado como pertencente ao gênero *Nocardia* destacou-se por degradar os 4 óleos na temperatura de 50°C. Os isolados 251 e 255, identificados como *Streptomyces* e *Nocardia* respectivamente, foram os que apresentaram menor atividade, conforme apresenta a Tabela 1. A versatilidade das lipases em catalisar diferentes tipos de reações, associadas com suas especificidades, confere a elas um grande potencial, possibilitando uma vasta aplicação (Gandhi, 1997; Sharma *et al.*, 2001; Enujiugha *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006; Parques *et al.*, 2006; Freire & Castilho, 2008; Yesiloglu & Baskurt, 2008)

CONCLUSÕES

Todos os isolados de actinomicetos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*, apresentaram atividade lipolítica e degradaram diversos substratos em diferentes temperaturas apresentando assim um potencial biotecnológico, podendo estes e/ou seus metabólitos serem empregados em diferentes processos industriais.

PERSPECTIVA

Como perspectiva, será realizada uma análise qualitativa da atividade da enzima e, por conseguinte, a seleção dos actinomicetos com melhor potencial lipolítico. Além disso, pretende-se otimizar o cultivo e a produção de lipase e proceder a sua caracterização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMIĆ, M.; LESCIC, I.; KORICA, T.; VITALE, L.; SANGER, W.; PIGAC, J. **Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus***. *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 522-529, 1999.

BORGSTON, B. E BROCKMAN, H.L. **Lipases**. *Elsevier Amsterdam*, 1984.

CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. *Biotechnol. Prog.*, 17, 1061, 2001.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Quimica Nova*, 27, 146-156, 2004.

DUARTE, M.W.; DAMASCENO, R.G.; SALAMONI, S.P.; OLIVEIRA, M.F.; VAN DER SAND, S.T. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. Trabalho de Conclusão em Ciências Biológicas – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

EDEM, D.O. **Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review**. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 57, 319-341, 2002.

ELIBOL, M.; OZER, D. **Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus***. *Proc. Biochem.*, v.38, p.367-372, 2002.

EL-SHAFEI, H.A.; REZKALLAH, L.A. **Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase**. *Microbiol. Res.*, 52:199–208, 1997.

ENUJIUGHA, V. N.; THANI, F. A.; SANNI, T. M.; ABIGOR, R. D. **Lipase Activity in Dormant Seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla*)**. *Food Chemistry*, 88, No. 3, 405, 2004.

FANG, Y.; LU, Z.; LV, F.; BIE, X.; LIU, S.; DING, Z.; XU, W. **Isolated Organic Solvent Tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 Produced Organic Solvent Stable Lipase**. *College of Food Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing, China*, 2006.

FREIRE, G. D. M.; CASTILHO, F. L. **Lipases em Biocatálise**. In: **Bon et al. (org).** *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro, Interciência. 2008

GANDHI, N. N. **Applications of Lipase**. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.74, 621-634, 1997.

GAO, Y.; BREUIL, C. **Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiostoma piceae***. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11:638-42, 1995.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. *Quimica Nova*, 29, 710, 2006.

GORDILLO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. **Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa***. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:38–41, 1995.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. **Simplified *para*-nitrophenyl palmitase assay for lipases and esterases**. *Anal. Biochem.*, 311, 98-99, 2002.

HABA, E. et al. **Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate**. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 26, p. 40-44, 2000.

HASAN, F., SHAH, A.A. & HAMEED, A.; **Industrial applications of microbial lipases**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251, 2006.

HIRSCH, C.F.; CHRISTENSEN, D.L.; **Novel method for selective isolation of actinomycetes**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4): 925-929, 1983

HOLT, J.G.; WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. *Baltimore: Williams & Wilkins*, v. 4, p. 2300-2648, 1989.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases**. *Annual Review of Microbiology, Palo Alto*, v. 53, p. 315-351, 1999.

JANSSEN, P.H.; MONK, C.R.; MORGAN, H.W. **A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity**. *FEMS Microbiol Lett* 120:195–200, 1994.

KENNEDY, A.C. **Bacterial diversity in agroecosystems**. *Agriculture ecosystems & environment*, Amsterdam, v.74, p.65-76, 1999.

KHALIL, A.I.; BEHEARY, M.S.; SALEM, E.M. **Monitoring of microbial populations and their cellulolytic activities during the a composting of municipal solid wastes**. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, p. 155-161, 2001.

KOUKER, G.; JAEGER, K.E.; **Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases**. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 211-213, 1987.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S.S.; GUPTA, R. **Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3**. *Protein Expr. Purif.*, 41: 38-44, 2005.

LEE, D.W.; KOH, Y.S.; KIM, K.J.; KIM, B.C.; CHOI, H.J.; KIM, D.S.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y.R. **Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans***. *FEMS Microbiology Letters* 393-400, 1999.

LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (editors); **Industrial biotransformation** *Weinheim: Wiley-VCH*, 2000.

LIMA, U. A.; AGUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

LIMA, H. V.; SILVA, A. P.; JACOMINE, P. T. K.; ROMERO, R. E.; LIBARD, P. L. **Identificação e Caracterização de solos coesos no estado do ceará.** *Revista Brasileira de Ciências do solo*, Ceará, n. 28, p. 467-476, 2004.

LOTRAKUL P, DHARMSTHITI S. **Lipase production by *Aeromonas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13, p.163-6, 1997.

MASSE, L., KENNEDY, K.J. & CHOU, S.P.; **The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughter house waste water.** *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 629-635, 2001.

McCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T.; **Actinomycetes as agents of biodegradation in environmental - a review.** *Gene*, Viena, v. 115, p 189-192, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2. Ed. atual e ampliada. Minas Gerais: UFLA, 2006.

MUKHERJEE, K. D.; HILLS, M. J. **In Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application.** Cambridge University Press, Cambridge p 49-75, 1994.

MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILA, R.R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. **A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources.** *Biochem. Eng. J.*, v.9, p.17-23, 2001.

NTHANGENI, M.B.; PATTERTON, H.G.; TANDER, A.V.; VERGEER, W.P.; LITTHAUER, D. **Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases.** *Enzyme. Microb. Technol.*, v.28 p. 705-712, 2001.

OLIVEIRA, M.F.; **Identificação de actinomicetos isolados de processo de compostagem.** Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 2002.

PADILHA, G.; **Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais.** In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa CNPMA. 327-343, 1998.

PASTORE, M. G.; COSTA, V. S.; KOBLITZ, M. G. B. **Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus* sp.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, No. 2, 135, 2003.

PARQUES, F.W.; MACEDO, G.A. **Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review.** *Química Nova*, 29, No. 1, 93, 2006.

RODRIGUES, K.; **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos.** 119 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SAGIROGLU, A.; ARABACI, N. **Sunflower seed lipase: extraction, purification and characterization.** *Prep Biochem Technol.* 35 (1):37-51, 2005.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S.; **Purification strategies for lipases microbial – a review.** *Journal of Microbiological Methods*, 52:1-18, 2003.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; **Production, purification, characterization, and applications of lipases,** *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J.K. **Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1.** *Process Biochem.*, 37: 1075-1084, 2002.

SIDHU, P.; SHARMA, R.; SONI, S.K.; GUPTA, J.K. **Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization.** *Indian J. Microbiol.*, 38:9–12, 1998.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. **Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes.** *Enzyme Microb. Technol.*, v.10, p.492–497,1988.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 6. Ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2006.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. **Biodegradation of lignin in a compost environment: a review.** *Bioresour. Technol.*, 72, 169-183, 2000.

VIEIRA, F.C.V.; PIERRE, C.T.; CASTRO, H.F. **Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática.** VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, São Paulo, 2004.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K. C. ; SHEN, G. J.; Wang, H. Y. **Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841),** 1995.

YESILOGLU, Y.; BASKURT, L. **Partial Purification and Characterization of Almond Seed Lipase.** *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38, No. 4, 397, 2008.

