

Quantificação da atividade lipolítica de *Aureobasidium pullulans* isolados a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Gilberto de Aguiar Pereira¹; Elisete Pains Rodrigues¹; Fernando Gomes Barcellos¹

1-Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral
Caixa Postal: 10.011 - CEP: 86057-970 - Londrina-PR. E-mail: gilbertopperera@gmail.com

RESUMO

A bioprospecção de enzimas lipolíticas possui importância biotecnológica e comercial devido a possibilidade de aplicação destas em diferentes processos industriais. Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi quantificar a atividade lipolítica de três linhagens de fungos leveduriformes identificados como Aureobasidium pullulans isolados a partir da planta medicinal alecrim-do-campo (Baccharis dracunculifolia DC - Asteraceae). Para isso o sobrenadante obtido a partir da centrifugação do meio para a produção da lipase foi submetido ao ensaio colorimétrico que quantifica a hidrólise do palmitato de p-nitrofenil (pNPP). A atividade enzimática específica em 72 horas foi avaliada e variou entre 38,4 e 42,6 U/mg entre os isolados Bd 15, 26 e 39 do fungo leveduriforme A. pullulans. Desta forma, estes isolados podem ser considerados candidatos promissores para a produção comercial desta enzima e ainda como possíveis fontes de enzimas lipolíticas alternativas às atualmente utilizadas nos processos industriais.

Palavras-chave: Lipase; Fungos Leveduriformes; Biotecnologia

INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar reações como hidrólise, inter-esterificação, alcólise, acidólise, esterificação e aminólise. (VAKHLU; KOUR, 2006). Amplamente encontradas na natureza as lipases, podem ser obtidas a partir de fontes de origem animal, vegetal e microbiana, esta última merece destaque, pois, possui maior estabilidade e especificidade quando comparadas às demais. Dentre as enzimas microbianas, as produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação a partir do meio de cultivo (CARVALHO et al., 2003).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade que as tornam altamente aplicáveis em processos industriais tais como nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Desta forma, a descoberta de novas lipases, a

partir da bioprospecção microbiana proporciona promissoras perspectivas científicas e comerciais.

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi quantificar a atividade lipolítica de três fungos leveduriformes identificados como *Aureobasidium pullulans* isolados a partir da planta medicinal alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC - Asteraceae).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os fungos leveduriformes *A. pullulans* Bd 15, 26 e 39 isolados e identificamos por Pereira et al. 2014, foram selecionados para participar dos ensaios de quantificação da atividade lipolítica, pois, num estudo anterior (dados não mostrados) apresentaram índices enzimáticos expressivos para a produção da enzima lipase. Para tanto, inicialmente estes isolados foram pré-cultivados em 3 mL de meio YPD líquido (12 h, 150 rpm a 25 °C); em seguida a concentração do inóculo foi padronizada com o auxílio do espectrofotômetro ($DO_{600nm} = 2$), 500 µL desta preparação foi adicionada a erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio para a produção de lipase (4 g/L de glicose; 6 g/L de sulfato de amônio; 1 g/L de fosfato de potássio dibásico e 0.5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado). 30 g de Tween 80 foram adicionados após 6 horas de cultivo (LIU et al., 2008 com modificações). Todos os frascos foram incubados por 120 h, 150 rpm e 25 °C. Amostras de 1 mL foram removidas em intervalos de 24 h, sendo o cultivo interrompido por centrifugação (9000 RCF, 15 min a 4°C), o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificar as proteínas e para avaliar a atividade lipolítica.

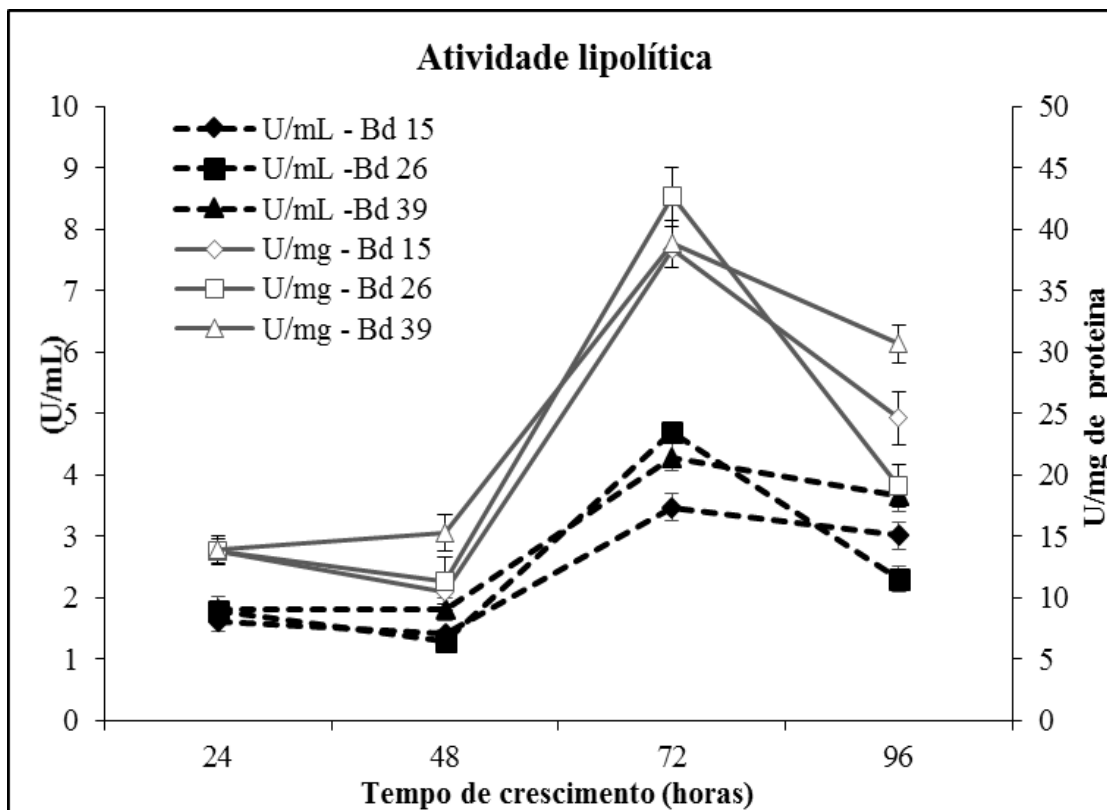
A dosagem de proteínas do sobrenadante foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) de forma que a absorbância foi relacionada à concentração de proteínas a partir da curva de calibração construída com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

Para quantificar a atividade lipolítica, de acordo com Winkler e Stuckmann (1979) uma emulsão do substrato palmitato de *p*-nitrofenil (pNPP) foi preparada pela adição, gota a gota, de 1mL da solução A (30 mg de pNPP dissolvidos em 10 mL de isopropanol) em 9 mL da solução B (0,4 g Triton X-100; 0,1 g de goma arábica e 90 mL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0) sob intensa agitação. A emulsão obtida, assim como as amostras, foram estabilizadas durante 5 min à 37 °C. 0,2 mL do sobrenadante foram acrescentados a 1,8 mL da emulsão de substrato e a mistura foi incubada por 30 min. à 37 °C. Em triplicata, a absorbância das misturas foram mensuradas em 410 nm com auxílio de um espectrofotômetro Biospectro SP-220. Uma unidade (U) de atividade enzimática, foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1,0 µmol *p*-nitrofenol por minuto sob estas condições (O *p*-nitrofenol foi quantificado por referência a uma curva padrão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Figura 1, após 72 horas de cultivo os três isolados apresentaram níveis de atividade específica desta enzima que variaram entre 38,4 e 42,6 U/mg, resultados muito superiores ao encontrado por Leathers et al. (2013) em 12 diferentes clados filogenéticos de *A. pullulans* cujo maior resultado não chegou a metade do conseguido por esta investigação. No entanto os nossos resultados foram inferiores aos encontrados por Liu et al. (2008), mas cujos ensaios enzimáticos foram realizados com uma enzima purificada.

FIGURA 1: Produção de lipase em meio líquido



CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem observar que os isolados Bd15, 26 e 39 de *A. pullulans* possuem uma elevada atividade lipolítica, o que os tornam candidatos promissores como fontes de enzimas lipolíticas alternativas as que já são utilizadas atualmente pelos processos industriais. No entanto, estudos enzimáticos adicionais com estes isolados são recomendáveis para verificar a potencial aplicação biotecnológica destes em diferentes processos industriais.

Agências de fomento: Capes, CNPq e Fundação Araucária

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, P.O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.
- LEATHERS, T. D. et al. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 10, p. 1701-1706, 2013.



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**. v. 40, n. 3, p. 445-451, 2008.
- PEREIRA, G. A. et al. Isolation, identification and screening of hydrolytic enzymes producing phylloplane yeasts. **BMC Proceedings**. v. 4 (suppl 8), p. 261, 2014.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69-85, 2006.
- WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n.3, p. 663-670, 1979.