

# ESTUDO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Anne Grazielle da Silva<sup>1</sup>; Sueli T. Van Der Sand<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; e-mail: [annegrazielle@gmail.com](mailto:annegrazielle@gmail.com) <mailto:themiscollares@yahoo.com.br>; <sup>2</sup> Professora do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; e-mail: [svands@ufrgs.br](mailto:svands@ufrgs.br).

**Resumo** - Os actinomicetos são bactérias Gram positivas que apresentam potencial de produção de enzimas extracelulares e a formação de micélios aéreos. São amplamente distribuídos no ambiente e conhecidos 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 objetivo avaliar a atividade lipolítica de isolados de actinomicetos obtidos no processo de compostagem frente a óleos vegetais e diferentes temperaturas de incubação bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização. A atividade da enzima lipase foi avaliada pela hidrólise dos diferentes óleos a diferentes temperaturas e observada sob luz ultravioleta com 350nm de comprimento. A presença de rodamina B no meio e a emissão de fluorescência laranja indicam a produção da enzima e conseqüente degradação dos óleos. Os isolados que apresentaram atividade positiva foram cultivados em meio amido caseína agar (ACA) pela técnica de microcultivo e os gêneros identificados conforme a morfologia apresentada. Os resultados demonstram que a atividade da enzima lipase depende da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. O gênero mais freqüente de actinomiceto na degradação dos óleos estudados foi *Nocardia sp* podendo seus metabolitos serem empregados em diferentes processos industriais.

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

## Introdução

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas filamentosas que apresentam alto conteúdo de G+C em seu genoma. Sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, porém seus filamentos são bem menores. Podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, como a água, planta em decomposição, nódulos de raízes de plantas, sedimentos, fezes de animais, lodo ativado e produtos alimentícios, mas são encontrados principalmente no solo (McCarthy & Willians, 1992).

Uma característica marcante destes indivíduos é a produção de enzimas extracelulares que degradam macromoléculas complexas encontradas no solo além de sintetizar e excretar milhares de metabolitos, como antibióticos e geosmina, que dá o odor característico à terra molhada (Moreira & Siqueira, 2006). Este grupo de microrganismos produz diferentes enzimas como lipases, proteases, celulasas, xilanasas, amilases, quitinasas e pectinasas que apresentam potencial para aplicação em diferentes processos na indústria 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, o que as torna 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).

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.

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). As lipases aceleram a degradação de resíduos gordurosos (Masse *et al.*, 2001) além de apresentarem importância no processo de biorremediação (Hasan *et al.*, 2006).

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 diferentes óleos vegetais (óleo de oliva, biodiesel, etc.); identificar os isolados em nível de gênero, bem como selecionar potenciais produtores de lipases para posterior estudo de produção e caracterização.

## **Materiais e Métodos**

Para a realização deste trabalho foram empregados 20 isolados de actinomicetos previamente isolados e conservados em glicerol originários de amostras de processo de compostagem. Alíquotas de 100µL dos isolados armazenados em glicerol foram semeadas em placas contendo o meio de cultivo ágar amido caseína (ACA) através da técnica de espalhamento de superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A incubação foi a 30° C por no mínimo sete dias, e posteriormente os as colônias foram isoladas pelo método de esgotamento, em placas contendo meio ACA. Os isolados foram mantidos em meio ACA inclinado à temperatura de 4°C para realização de estudos posteriores.

A atividade lipolítica foi observada após o crescimento dos isolados em meio de cultura contendo 0,5% de peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,4% de NaCl, 1% de agar, 2,5% óleo e solução de rodamina B 0,001% esterilizado em autoclave a 120°C. Os óleos foram esterilizados por filtração, com auxílios de uma bomba de vácuo, utilizando membranas de 0,22µm de diâmetro e conservados a temperatura ambiente para posterior distribuição no meio de cultura servindo como fonte de carbono. Os isolados foram inoculados na forma de picada, sendo as placas incubadas nas temperaturas de 30 e 40°C e com os tempos de incubação variando entre cinco e 21 dias conforme o substrato. A hidrólise dos diferentes óleos foi observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 350nm. Foram observados halos de cor laranja ao redor dos actinomicetos que apresentam a enzima, devido à presença de rodamina B no meio de cultura, que emite fluorescência laranja na presença de ácidos graxos degradados.

A diferenciação dos gêneros foi realizada através da análise morfológica das colônias, a presença de micélio sob o substrato, micélio aéreo, arranjo e cadeia de esporos, superfície dos esporos, assim como presença de esporângio foram observados através do microcultivo conforme 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. Dos substratos testados, o biodiesel foi hidrolisado por 65% dos isolados nos ensaios a temperatura de 40 °C e por 45% no ensaio a 30 °C. Para o substrato óleo de gergelim, melhor atividade foi observada a temperatura de 40°C, onde 45% dos isolados apresentaram resultado positivo. Por sua vez, foi observado que nos ensaios com óleo de girassol os melhores resultados foram observados a temperatura de 30°C. Quando empregado o óleo de oliva, não foi observada diferença significativa em relação às temperaturas de incubação. Os resultados preliminares demonstram que a atividade lipolítica é dependente da temperatura de incubação e do tipo de substrato empregado. O gênero mais freqüente de actinomiceto na degradação dos óleos estudados até o presente momento foi *Nocardia sp* identificado pela técnica de microcultivo.

## Conclusões

Os actinomicetos, especialmente pertencentes ao gênero *Nocardia* apresentam potencial biotecnológico podendo estes e/ou seus metabolitos serem empregados em diferentes processos industriais.

## Referências

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L.; **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova, v. 27, p. 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.
- HASAN, F., SHAH, A. A. & HAMEED, A.; **Industrial applications of microbial lipases**. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235-251. 2006.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G.; **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Volume 1: Gram-negatives of general, medical, or industrial importance. Baltimore: Williams & Wilkins, Co.1984
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (editors). **Industrial biotransformation Weinheim: Wiley-VCH**, 2000.
- MASSE, L., KENNEDY, K. J. & CHOU, S. P.; **The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater**. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 629-635. 2001.
- McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T.; **Actinomycetes as agents of biodegradation in environment - a review**. Gene, Amsterdam, v. 115, p 189-192, 1990.
- PADILHA, G.; **Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais**. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa CNPMA. 327-343. 1998.
- 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, 2005.