10º FEPEG FÓRUM ENSINO · PESQUISA EXTENSÃO · GESTÃO
RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA
Realização: Unimontes, Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Minas Gerais
Apoio: FAPEMIG, FADENOR
ISSN 1806-549 X

Autor(es): MARCELLY THAÍS DE CASTRO, RENATO MARTINS ALVES, JOÃO PAULO DE SOUZA SILVA, ADELICA APARECIDA XAVIER, CLÁUDIA MARIA DA SILVA, REGINA CÁSSIA FERREIRA RIBEIRO, GLEIKA LARISSE OLIVEIRA DORASIO DE SOUZA

Seleção de Bactérias Endofíticas Produtoras de Lipase

Introdução

As enzimas lipolíticas possuem significante potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica utilizando processos simplificados.

As lipases microbianas não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas e possuem propriedades altamente aplicáveis em processos industriais (Villeneuveet al., 2000; Hasan, Shah, Hameed, 2006). Além de tais aplicações, as lipases são extremamente importantes no controle biológico de nematoides, visto que atuam na degradação da camada de lipídeos de juvenis (J2) e de ovos de *Meloidogyne* spp. o J2 traz consigo 30% do seu peso corporal em lipídios, que constituem a principal fonte energética até obter alimento quando parasitar seu hospedeiro (Lee & Atkinson, 1977; Van Gundy, 1985). . As espécies de *Meloidogynne* são parasitas importantes de raízes de bananeira e de várias culturas e são geralmente controlados por meio da aplicação de nematicidas que são produtos altamente tóxicos. O objetivo do trabalho foi selecionar isolados endofíticos produtores de lipase a fim de que possam ser utilizados no controle de *Meloidogyne* em trabalhos futuros.

Material e métodos

A avaliação da produção de lipase foi feita em isolados endofíticos obtidos de amostras de raízes de bananeira 'Prata-Anã' da Região Norte de Minas Gerais e Sudoeste da Bahia. As bactérias isoladas foram cultivadas em 50ml de meio liquido TSB (Triptic Soy Broth), por um período de 48 horas, em temperatura de 28ºC, para obtenção das suspensões bacterianas. As suspensões foram preparadas em solução salina a 0,85% de Cloreto de sódio (NaCl) a partir das culturas do meio TSB. A concentração de células bacterianas foi ajustada a densidade ótica de 1,0 de absorbância no comprimento de onda a 540 nm. Posteriormente uma alíquota de 10 microlitros foi distribuída no centro da placa contendo o meio com tributirina 1,0% p/v, NaCl 0,5% p/v e Agar 2,0% p/v. As placas foram incubadas por 48 horas á 28° no escuro em câmera tipo BOD A testemunha positiva foi representada pela Rizo 37(*Bacillus* sp). Os Isolados que apresentaram um halo transparente ao redor da colônia foram consideradas positivas, para a produção de lipase. Para medida dos raios dos halos e das colônias utilizou-se um paquímetro. O índice enzimático (IE) expressa à relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato pelo diâmetro de crescimento da colônia de microrganismo. O experimento foi realizado em triplicata. (RUAS, 2013)

Resultados e discussão

Para se obter isolados com alto potencial de produção de lipase é necessário que o índice lipolítico alcance 1,7 no mínimo. Tal valor foi encontrado na testemunha e nos isolados EB-63 e EB-64. Para os demais isolados o índice variou de 1,9 a 2,7 o que demonstra a capacidade dos isolados em degradar tributirina presente no meio. (Tabela: 1 e Figura: 1)

A relação R/r maior que 1,7, utilizada para a análise da atividade enzimática, pela observação da degradação da tributirina, se mostrou eficiente para este trabalho. Colen et al, (2005) utilizaram a relação R/r maior que 1,2 por considerarem que as cepas que apresentam essa relação seriam as mais promissoras.

Pesquisadores dedicaram a estudar genes superexpressos em bactérias Gram positivas, como em *B. subtilis* que expressão lipase extracelular (enzimas lipolíticas LipA e LipB) (Pouderoyen et al.,2001; Eggert et al., 2001; Brockmeier et al., 2006). Conforme Brockmeier et al (2006), o gênero *Bacillus* apresentam resultados promissores como produtore de lipases,as éspecies *Bacillus licheniformis e Bacillus subtilis* vem se destacando, na capacidade de expressar e secretar enzimas em quantidades elevadas, em meio de cultura.

A identificação de novas fontes microbianas é de interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser realizados a partir de enzimas vegetais ou animais.

Apoio financeiro: FAPEMIG e CAPES

ISSN 1806-549 X

Conclusão

Dos 29 isolados testados 24 foram positivos para a produção de lipase com destaque para os isolados EB-44 (*Bacillus amyloliquefaciens*), EB-53 (*Lysinibacillus* sp.), e EB-58 (*Bacillus pumilus*) que apresentaram índices de 2,7 e 2,9 respectivamente.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, à FAPEMIG pela concessão da bolsa de iniciação científica (PIBIC) e da bolsa de incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico (BIPDT).

Referências bibliográficas

BROCKMEIER ULF, CASPERS, M, FREUDL R, JOCKWER A, NOLL T, EGGERT T. SYSTEMATIC SCREENING OF ALL SIGNAL PEPTIDES FROM *BACILLUS SUBTILIS*: A POWERFUL STRATEGY IN OPTIMIZING HETEROLOGOUS PROTEIN SECRETION IN GRAM-POSITIVE BACTERIA. JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 362: 393-402. 2006.

COLEN G, JUNQUEIRA RG, MORAES-SANTOS T. ISOLATION AND SCREENING OF ALKALINE LÍPASE-PRODUCTION FUNGI FROM BRAZIL SAVANNA SOIL. WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY 22: 881-885. 2005.

Eggert T, Pouderoyen GV Pencreac'h G, Verger R, Dijkstra BW, Jaeger KE. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis*dier in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. FEBS Letters 502 : 89-92. 2001.

HasanF, ShahAA,Hamee A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology 39: p. 235-251. 2006.

LEE, D.L. & ATKINSON, H.J. Physiology of nematodes. New York. Columbia University. 1977.

RUAS, France Anne Dias, Msc., Caracterização e avaliação de atividade enzimática de bactérias selvagens nativas de solo brasileiro com potencial lipolítico em bioprocessos fermentativos. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) Universidade Estadual de Montes Claros, 50 p. 2013.Pouderoyen GV, Eggert T, Jaeger KE, Dijkstra BW. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold EnzymeJ. Mol. Biol. 309:215-226. 2001.

VAN GUNDY, S.D. Ecology of Meloidogyne spp.- emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. An advanced treatise on Meloidogyne. Raleigh North Carolina. 1:177-182.1985

VILLENEUVE P,MUDERHWA JM,GRAILLE J, HAAS MM. CUSTOMIZING LIPASES FOR BIOCATALYSIS: A SURVEY OF CHEMICAL, PHYSICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES.JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC 9: P.113-148. 2000.

Tabela 1: Relação de isolados e índice lipolítico

Isolado	Índice lipolítico
EB-04 *Bacillus subtilis*	2,7
EB-30 *Bacillus axarquienses*	2,1
EB-44 *Bacillus amyloliquefaciens*	2,7
EB-46 *Bacillus pumilus*	2,5
EB-49 *Bacillus licheniformis*	2,3
EB-53 *Lysinibacillus* sp.	2,7
EB-56 *Bacillus* sp.	1,9
EB-57 *Bacillus safensis*	1,9
EB-58 *Bacillus pumilus*	2,9
EB-60 *Lysinibacillus* sp.	2,0
EB-63 *Bacillus pumilus*	1,7
EB-64 *Bacillus pumilus*	1,7
EB-71 *Bacillus* sp.	2,2
EB-127 *Sporolactobacillus* sp.	1,8
EB-133 *Bacillus amyloliquefaciens*	2,0
EB-136 *Bacillus subtilis*	2,3
EB-194 *Bacillus* sp.	2,0

ISSN 1806-549 X

EB-07 *A. tumefaciens*	2,0
EB-12 *Bacillus pumilus*	2,2
EB-80 *Bacillus* sp	2,2
EB-108 *Rhizobium* sp	2,0
EB-139 *Acetobacter* sp	2,0
EB-141 *Lysinibacillus* sp.	2,0
EB-148 *Aneurinebacillus* sp	2,2
EB-40 *Bacillus* sp.	Negativo
EB-88 *Bacillus flexus*	Negativo
EB-169 *Bacillus pumilus*	Negativo
EB-26 *B. methylotrophicus*	Negativo
EB-14 *Bacillus pumilus*	Negativo
Rizo 37- *Bacillus* sp	1,7

Figura 1. Isolados positivos índice lipolítico 2,7 (EB-53 *Lysinibacillus* sp.) e 2,9 (EB-58 *Bacillus pumilus*).