

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES
DE LIPASES HIDROLÍTICAS**

NARA ELISANDRE GRIEBELER

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL.

JUNHO DE 2008

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES HIDROLÍTICAS

Nara Elisandre Griebeler

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc
Orientador

Prof. Débora de Oliveira, D.Sc
Orientador

Gerson Scheuermann, Ph.D

Prof. Rogério Cansian, D.Sc

Prof. Geciane Toniazzo, D.Sc

Erechim, 18 de Junho de 2008

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico esse trabalho para aquelas pessoas que fazem meu coração sorrir... Para a galera que sempre esteve junto, até mesmo quando eu não estava disposta... Para a pessoa que eu esperava que me chutasse quando caí, e que foi uma das primeiras que me ajudou a levantar... Para as pessoas que fizeram a diferença em minha vida... Para as pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades... Para as pessoas que me aconselharam quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, pois o mundo não irá parar para que eu o conserte... Para as pessoas que me deram força quando eu não estava muito animada... O que importa não é O QUE eu tenho na vida, mas QUEM eu tenho na vida... Guardo todas as pessoas importantes da minha vida em uma caixinha dentro do meu coração...

AGRADECIMENTOS

Estas primeiras páginas, e últimas palavras que escrevo neste trabalho, são para dedicar a todas as pessoas que me aconselharam, motivaram, orientaram, reforçaram, cuidaram, ouviram, protegeram e colaboraram ao longo desta época especial de vida. Além destas palavras escritas, espero encontrar melhor forma e melhor momento para dizer o quanto estou agradecida e o quanto sinto que, a todos, devo um bocadinho deste trabalho.

Não, não é simplesmente agradecer que quero. Quero trazer para dentro do meu texto aqueles que já o percorrem nas entrelinhas. E não só aos que me ajudaram efetivamente na construção dessa Dissertação, mas aos amigos e colegas que partilharam comigo idéias. O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Se devo ser seletiva, então é melhor começar do início.

A Deus, pela luz, pela força, coragem e perseverança ao longo de todo este período;

Aos Professores Débora Oliveira e Marco Di Luccio, orientadores científicos desta dissertação, agradeço o compromisso assumido, o empenho que colocaram neste trabalho, foi muito importante para mim, a análise rigorosa e afetuosa de cada capítulo, as sugestões, os esclarecimentos e os comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar. Para agradecer a aliança, a confiança e a amizade as palavras serão sempre poucas.

Aos colegas do Mestrado pela excelente relação pessoal que criamos e que espero não se perca.

Aos colegas, estagiários, bolsistas e funcionários dos Laboratórios, amigos construídos e descobertos durante este percurso.

Aos professores da URI pelo valioso conhecimento que me forneceram e especialmente ao Professor Rogério Cansian, pelas dicas, apoio e aconselhamentos ao longo desta etapa;

A meus pais e familiares, pelo apoio em todos os sentidos... Este trabalho é dedicado a vocês!;

A meu esposo José, pela compreensão e confiança, por toda a força e apoio ao longo deste período, e pelos importantíssimos "Boa Sorte!";

A meu filho Gabriel pela compreensão e ternura sempre manifestadas apesar do 'débito' de atenção;

À amiga Elisandra Rigo, pelo seu calor humano e incansável apoio que tivera ao me receber e ouvir ao longo deste trabalho, pois sem ela não teria conseguido ter sucesso com esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos estagiários André, Jéferson, Rodolfo, Francieli e Daniela pelas amizades, eternamente imprescindíveis. Amizades essas que vão além do que as palavras podem expressar e que não conhecem tempo, nem distância.

Das Utopias

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa
que fez a tua rosa tão importante.”

Antoine Saint Exupéry

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES HIDROLÍTICAS

Nara Elisandre Griebeler
Junho/2008

Orientadores: Marco Di Luccio e Débora de Oliveira.

As lipases são enzimas capazes de hidrolisar ésteres insolúveis em água, como triacilgliceróis de cadeia longa, sendo que atuam na interface óleo-água onde através do mecanismo de ativação interfacial ocorre um aumento da atividade da enzima. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso. As lipases encontram diversas aplicações nas áreas de alimentos, farmacêutica, detergentes, têxtil, cosméticos, química fina e na produção de biodiesel. Do grande número de lipases já descobertas apenas algumas já demonstraram possuir estabilidade e especificidade adequada para aplicações industriais. A busca por novos microrganismos produtores de lipases vem a contribuir para a obtenção de enzimas com alto rendimento, estabilidade, especificidade e de baixo custo de produção e recuperação. Muitos subprodutos agroindustriais podem apresentar grande potencial para a produção de enzimas, através da sua utilização como substrato no cultivo dos microrganismos por fermentação no estado sólido. A fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado como uma alternativa interessante na produção de enzimas microbianas, devido à possibilidade de utilização de resíduos e subprodutos da agroindústria como fonte de nutrientes e suporte para o desenvolvimento do microrganismo. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo geral a realização de um screening de cepas produtoras de lipases, por método de plaqueamento em meio sólido e por fermentação em estado sólido. As cepas isoladas e selecionadas foram caracterizadas por técnicas de biologia molecular e microbiológicas. Para a avaliação da variabilidade genética entre as cepas isoladas foi utilizada a técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), para determinar o índice de similaridade bem como o grau de polimorfismo entre as cepas estudadas. Foram isolados e selecionados 203 microrganismos potencialmente produtores de lipases extracelulares, a partir de diversas fontes. A capacidade destes de produzir lipases foi avaliada em placas com ágar tributirina e por fermentação em estado sólido em meio à base de farelo de soja. A técnica de microcultivo foi utilizada para melhor visualizar a morfologia microscópica dos microrganismos. Através dessa técnica foi possível verificar a predominância dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Os marcadores RAPD foram eficientes para agrupar os organismos isolados, podendo associar os resultados de atividade de hidrólise com a análise genética, selecionando-se três fungos que são similarmente produtivos e geneticamente diferentes. Os maiores produtores apresentaram atividades que variaram de 3 a 21,89 U mL⁻¹.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

ISOLATION AND SELECTION OF HYDROLYTIC LIPASES PRODUCING MICROORGANISMS

Nara Elisandre Griebeler
Junho/2008

Advisors: Marco Di Luccio e Débora de Oliveira.

Lipases are enzymes able to hydrolyze long chain triacylglycerols, acting at the oil-water interface, through the mechanism of interface activation. These enzymes also catalyze esterification and transesterification reactions, when present in non-aqueous medium. Potential applications of lipases are found in food industry, as well as detergents, textile, cosmetics, chemistry and biodiesel industry. From many kinds of lipases already reported, only a few have shown the stability and specificity that are required for industrial applications. The quest for new lipase producing microorganisms can contribute for finding new enzymes, with high yield, stability, specificity and low production and recovery costs. Many agro-industrial byproducts may present a high potential for enzyme production using solid state fermentation (SSF), which is an attractive alternative technique for production of microbial enzymes, due to the possibility of using residues and byproducts of agro-industry as source of nutrients and support for microorganism growth. Thus, the present work aimed at screening new strains able to produce lipases, using agar plate technique and solid state fermentation. The strains that were isolated and selected by these methods were then characterized by molecular biology and microbiology techniques. The genetic variability of the selected microorganism was carried out using RAPD (random amplified polymorphic DNA) to determine the similarity index and the degree of polymorphism between the strains. A total of 203 were isolated and selected from different sources. The strains were characterized as potential producers of extracellular lipases. The ability to produce lipases was assessed by growth in agar plates with tributyrin and by solid state fermentation using soybean bran as substrate. Microcultivation technique was used to characterize microscopic morphology of the microorganisms. *Penicillium* and *Aspergillus* were the predominant genera of the isolated strains. RAPD markers were effective to group the isolated strains. The results of hydrolytic activity could be correlated with the genetic data, and it was possible to select three potential fungi, genetically different, that produced similar amounts of lipases. The highest production of lipases of such microorganisms varied from 3 to 21.89 U mL⁻¹.