

Ensaaios enzimáticos em placas de Petri para seleção de microrganismos produtores de lipases e epóxido hidrolases

Cíntia Duarte de Freitas Milagre (PQ) e Anita Jocelyne Marsaioli (PQ)*.

anita@iqm.unicamp.br

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, CP 6154, 13083-970 – Campinas –SP.

Palavras Chave: ensaio enzimático de alta eficiência, hidrolases,

Introdução

A análise funcional de uma enzima é tão ou mais importante que sua análise estrutural. Os ensaios enzimáticos são uma ferramenta que permitem estabelecer a função da enzima sem o conhecimento prévio de sua estrutura, evidenciando de maneira prática a relação entre a enzima e a atividade enzimática.¹ Neste trabalho apresentamos um ensaio de triagem enzimática de alto desempenho realizado em placas de Petri. Este ensaio é bastante útil, pois permite triar consórcios de microrganismos, obtendo-se informações preliminares ao isolamento dos mesmos.

Resultados e Discussão

Para a implementação desta metodologia, utilizamos uma coleção de microrganismos do solo amazônico, cujas colônias foram previamente isoladas e classificadas como AMA-1 a AMA-37.

Os microrganismos produtores de lipase foram selecionados a partir de ensaio com rodamina B em placas de Petri enriquecidas com azeite de oliva. A rodamina B é um composto fluorescente que na presença de ácidos graxos sofre incremento de sua fluorescência sob luz UV. A produção de lipase é monitorada através de irradiação das placas com luz UV. As cepas produtoras de lipase formam colônias rosa pink e emitem fluorescência amarelo-alaranjado enquanto que as cepas não produtoras de lipase formaram colônias rosa mas que não apresentaram fluorescência sob irradiação UV.

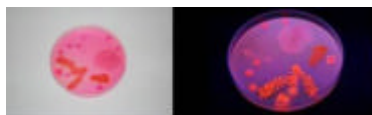
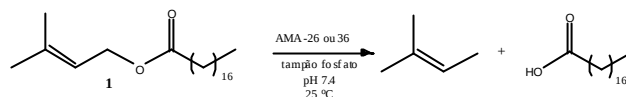


Figura 1. Ensaio mostrando a atividade lipase: esquerda, colônias sob luz branca, direita, colônias sob luz UV. Halos fluorescentes sob luz UV indicam a presença de lipase.

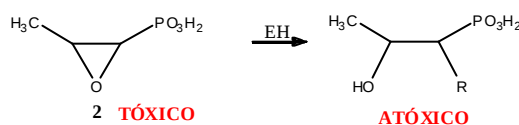
Dentre os microrganismos avaliados apenas as cepas AMA-26 e AMA-36 deram resultados positivos frente à produção de lipase. Estes resultados foram validados utilizando células íntegras de AMA-26 e AMA-36 para a hidrólise de **1**, em escala de miligramas, conforme apresentado no Esquema 1.

31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química



Esquema 1. Hidrólise de **1** por AMA-26 ou AMA-36

Os microrganismos produtores de epóxido hidrolases foram selecionados a partir de ensaio com fosfomicina (**1**) que é um antibiótico produzido por streptomicetos e tem sido utilizado clinicamente. Este ensaio é baseado em um mecanismo de seleção por toxicidade, ou seja, os microrganismos que produzem epóxido hidrolase são capazes de hidrolisar **2** e crescer nas placas de Petri enquanto os não produtores não crescem nas placas devido à toxicidade de **2**.



Esquema 2. Hidrólise de **2** por epóxido hidrolase.

As cepas AMA10-12, 19-23, 26 e 29 apresentaram resultados positivos para epóxido hidrolases em concentrações de 5 mM de **2**. Estes resultados foram confirmados através de reações com células íntegras dos mesmos em escala de miligramas.

Conclusões

Estes ensaios enzimáticos em placas de Petri são interessantes, pois fornecem informações preliminares aos ensaios em placas de 96 poços, reduzindo consideravelmente o tempo gasto nas triagens. O ensaio com **2** mostrou-se simples e eficiente requerendo apenas a inspeção visual das placas de Petri. Uma das vantagens do ensaio com rodamina B consiste na possibilidade do isolamento seletivo dos microrganismos após o ensaio já que não ocorre inibição do crescimento dos mesmos e nem alterações de suas propriedades fisiológicas.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP pelo apoio financeiro.

¹ Reymond, J. L. *Enzyme Assays: high throughput screening, genetic selection and fingerprinting*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2006**.