



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Cavalcanti Feitosa, Ingrid; de Pinho Barbosa, José Murillo; Cuadros Orellana, Sara; Silva Lima, Álvaro; Faria Soares, Cleide Mara

Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo

Acta Scientiarum. Technology, vol. 32, núm. 1, 2010, pp. 27-31

Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226525014>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo

**Ingrid Cavalcanti Feitosa, José Murillo de Pinho Barbosa, Sara Cuadros Orellana,
Álvaro Silva Lima e Cleide Mara Faria Soares***

*Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, 49032-490, Farolândia, Aracaju, Sergipe, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: cleide.soares@pq.cnpq.br*

RESUMO. O presente trabalho tem como objetivo apresentar alternativas para a produção de enzimas lipolíticas a partir de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo da região de Sergipe, por fermentação submersa, utilizando o óleo de palma como induutor. Os experimentos foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 250 mL, em agitador do tipo shaker (170 rpm), contendo 125 mL (% w v⁻¹) de KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, extrato de levedura, peptona e amido. O pH foi de 5,0 e 7,0; a temperatura de incubação foi de 30 e 37°C; o tempo de fermentação, de 24, 48, 72, 96, 120 e 144h; e a proporção de induutor foi de 3 e 4%, adicionado após 72h de fermentação. A determinação da atividade lipolítica foi analisada a 37°C, num Shaker em banho termostático com agitação, utilizando goma arábica 7% (p v⁻¹); azeite de oliva e água. As reações foram conduzidas durante 10 min e posteriormente interrompida pela adição de uma solução acetanólica, e titulados com uma solução de KOH (0,04 N), utilizando a fenolftaleína como indicador. A máxima atividade determinada foi de 4369,75 U mL⁻¹ a pH 7,0 e temperatura de 37°C, com a porcentagem do induutor óleo de palma a 4%.

Palavras-chave: fermentação submersa, atividade lipolítica, induutor.

ABSTRACT. Lipase production by bacterial isolates from petroleum contaminated soil. This paper aims to present alternatives to the production of lipolytic enzymes from microorganisms isolated from soil with a history of contact with oil from the region of Sergipe, by submerged fermentation using palm oil as inducer. The experiments were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks in a shaker (170 rpm), containing 125 mL (% w v⁻¹) of KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, yeast extract, peptone and starch. The pH was 5.0 and 7.0; incubation temperature was 30 and 37°C, respectively; fermentation time was 24, 48, 72, 96h, 120 and 144h; and the inducer concentration was 3 and 4%, added after 72h of fermentation. The determination of lipolytic activity was examined at 37°C, in a shaker in thermostatic bath with rotation of 82 rpm, using gum arabic 7% (w v⁻¹), olive oil and water. The reactions were conducted for 10 min with agitation and later stopped by the addition of an acetone:ethanol:water solution, where released fatty acids were titrated with a solution of KOH (0.04 N), using phenolphthalein as an indicator. The maximum activity was determined as 4369.75 U mL⁻¹ pH 7.0 and a temperature of 37°C, with the percentage of the inducer oil palm to 4%.

Key words: submerged fermentation, lipolytic activities, inducer.

Introdução

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG et al., 2005). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e pela facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais,

tornando sua produção mais conveniente e segura (HASAN et al., 2006). Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas. Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro grande grupo em volume de vendas, movimentando bilhões de dólares. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, pelos elevados custos de produção (PAQUES; MACEDO, 2006).

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto à condução do processo, quanto

ao modo de cultivo, ou seja, fermentação submersa ou em estado sólido. A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual se utiliza um meio fermentativo líquido em que as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis, sendo considerado o processo mais utilizado para a produção de lipases pela facilidade dos microrganismos de crescerem em condições controladas de pH e temperatura (PINHEIRO et al., 2008b). Para obtenção de uma boa proliferação celular, o substrato líquido para o cultivo submerso deve conter uma das fontes de carbono (fonte energética), dentre elas, fontes sintéticas: glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose, avicel, carboximetilcelulose, xilano de aveia, pectina de citrus, glicerol, glicose etc. ou fontes naturais: bagaço de cana, bagaço de laranja, farelo de aveia, farelo de trigo, óleo de soja, óleo de pescado, borra de óleo de soja etc (PINHEIRO et al., 2008a) e uma fonte de nitrogênio que, segundo Becker et al. (1997), num meio de cultura, há algumas, senão todas as vitaminas necessárias para o metabolismo do microrganismo, como o extrato de levedura, a triptona e a protease peptona. Porém, existem casos em que alguma vitamina ou uma suplementação é necessária para o crescimento celular.

Assim, estudos sobre a utilização de diferentes microrganismos, suplementos e substratos para a produção de lipase em meio líquido e sólido podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos, utilizando substratos e condições operacionais que possibilitem a redução dos custos do processo de produção em escala industrial (VARGAS et al., 2007).

Portanto, o uso de metodologias para desenvolver processos de produção mais limpos, além de reconhecido como processo que reflete em uma perspectiva ambientalmente integrada, envolve preocupações de sua condução para melhoria ambiental. Além de focalizar o desempenho econômico do processo, há incorporação da preocupação com o meio ambiente, minimizando o impacto causado (JIA et al., 2006).

Estudos preliminares realizados anteriormente pelo nosso grupo identificaram a produção de lipases extracelulares produzidas por microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo da região de Sergipe, denominado Biopetro IV (CARVALHO et al., 2008). Neste estudo, avaliou-se a capacidade de produção de enzimas lipolíticas produzidas por microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo (CARVALHO et al., 2008). Dentre os óleos vegetais utilizados como indutores para a produção de enzimas lipase, determinou-se o óleo de palma como melhor indutor, o que permitiu eficiente produção de enzimas lipolíticas no meio de cultura

quando comparada à literatura. Dessa forma, pode-se afirmar que essa estratégia permitiu produzir condições prévias do processo fermentativo de enzimas com atividade lipolítica com vistas na aplicação nos mais variados campos biotecnológicos. Esses estudos preliminares direcionam para a otimização de um processo biotecnológico de produção de lipases extracelulares pelo Biopetro IV.

E a partir do enfoque de estudos de tecnologias mais limpas, a proposta deste trabalho foi estudar as variações de pH, temperatura e a proporção de indutor no processo de fermentação submersa para a produção de enzimas lipolíticas a partir de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo da região de Sergipe.

Material e métodos

Fermentação submersa

A fermentação foi conduzida em frascos erlenmeyer de 250 mL, em agitador do tipo shaker, com velocidade de 170 rpm; a 30 e 37°C, durante 144h, com 125 mL (%), p v⁻¹ de: KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, NaNO₃, extrato de levedura, peptona e amido. As condições da fermentação foram: pH 5,0 e 7,0; temperatura de 30 e 37°C de incubação; e velocidade de agitação (170 rpm). As análises do substrato fermentado foram conduzidas, retirando-se 8 mL de amostra, centrifugada a 3.000 rpm por 15 min., sendo o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática. A suspensão foi usada para a determinação de pH, da dosagem de amido, da dosagem de proteína e da dosagem da atividade lipolítica. O peso seco foi determinado a partir das mesmas suspensões, realizando-se centrifugação e secagem das amostras em estufa a 110°C, até peso constante (LIMA; ANGNES, 1997).

Adaptação dos microrganismos

Foram utilizados microrganismos isolados de solos contaminados por petróleo (Biopetro IV) e pertencentes ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes, Farolândia, Estado de Sergipe. Na adaptação dos microrganismos ao indutor, uma tensão das bactérias foi cultivada em tubos de ensaio com a seguinte composição (%), p v⁻¹: KH₂PO₄ (0,5 g), MgSO₄.7H₂O (0,25 g), NaNO₃ (1,5 g), extrato de levedura (3,0 g), peptona (0,65 g), amido (10 g) e indutor óleo de palma (3 e 4%) como a fonte do carbono.

Dosagem da atividade lipolítica

Foi determinada, no sobrenadante do meio de cultura, a enzima lipase pelo método descrito por Soares et al. (1999). O substrato composto de óleo de

oliva foi emulsionado com goma arábica (7%) na proporção de 50:50. A reação enzimática foi formada por 5 mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL de solução enzimática. A temperatura da reação foi mantida a 30°C em banho termostático, por 5 min., em agitação constante (82 rpm). A reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução de acetona, etanol e água (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução padronizada de KOH 0,04 N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera em 1 μmol de ácido graxo por min de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (1 U mL⁻¹ = 1 μmoles (mL min)⁻¹).

Influência da concentração dos indutores

Para se avaliar a influência da concentração dos indutores na produção das enzimas lipase pelo microrganismo selecionado, as fermentações foram conduzidas com as seguintes concentrações: 3 e 4%, realizadas em triplicata.

Influência do pH e da temperatura

Para se avaliar a influência do pH e da temperatura na produção das enzimas lipase pelo microrganismo selecionado, os experimentos foram realizados com as temperaturas de 30 e 37°C e pH de 5,0 e 7,0.

Resultados e discussão

Na primeira etapa deste trabalho, estudaram-se as fases do crescimento microbiano na fermentação submersa. Nas Figuras 1 a 4, observou-se, na curva de crescimento microbiano, o fenômeno chamado diauxia, e este fato promoveu uma segunda fase lag e log com outro tempo de geração que caracterizou a metabolização do segundo substrato, isto é, o indutor, nesse caso, o óleo de palma.

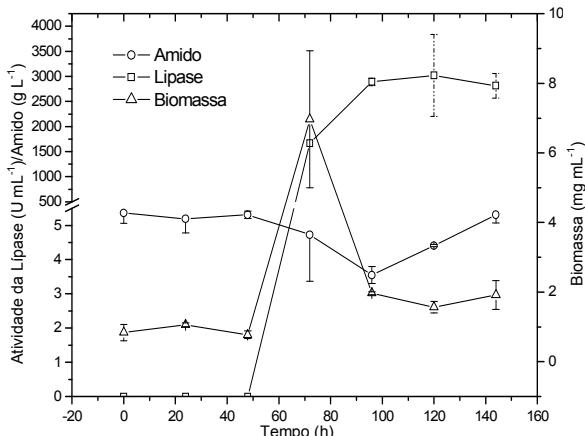


Figura 1. Perfil da biomassa e da atividade enzimática, utilizando-se óleo de palma como indutor a 3%, com pH = 5,0 e T = 30°C.

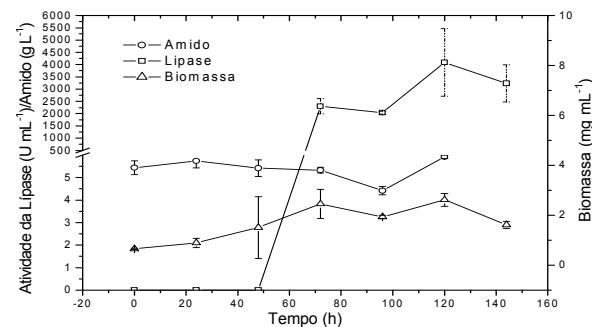


Figura 2. Perfil da biomassa e da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 4%, com pH = 5,0 e T = 30°C.

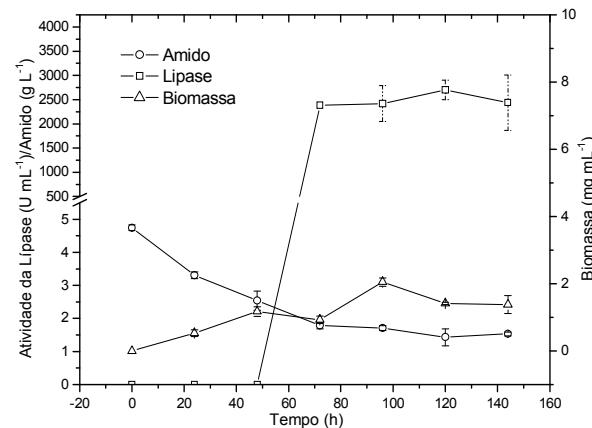


Figura 3. Perfil da biomassa e da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 3%, com pH = 7,0 e T = 37°C.

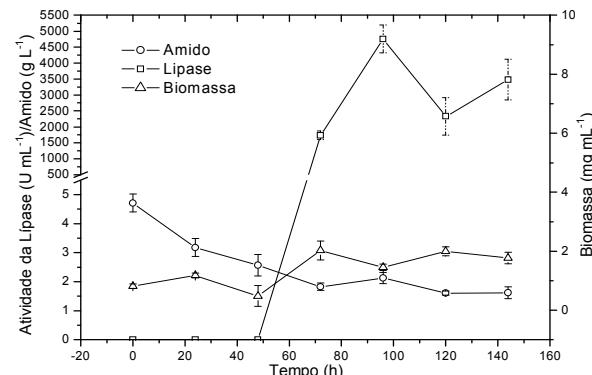


Figura 4. Perfil da biomassa e da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 4%, com pH = 7,0 e T = 37°C.

A obtenção da atividade enzimática com características lipolíticas possivelmente está relacionada com a natureza oleaginosa da bactéria. Após o estudo do perfil microbiano, verificou-se a influência da concentração do indutor (óleo de palma) que variava entre 3 e 4%, e também a melhor condição de pH e temperatura (Figuras 5 e 6).

A capacidade de produção máxima de enzimas lipolíticas foi observada nos resultados obtidos das curvas de crescimento (Figuras 1 a 4). Durante os experimentos com as concentrações de indutores a 3

e 4%, que variam a temperatura e o pH, observou-se que, em meio com concentração de indutor a 4%, apresentaram-se máxima atividade lipolítica em 96h de fermentação e um declínio da produção após esse período (Figura 4).

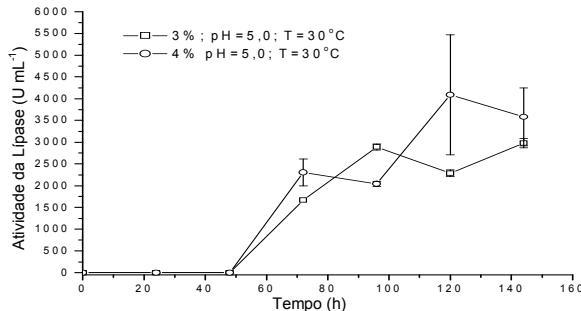


Figura 5. Perfil da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 3 e 4%, com pH = 5,0 e T = 30°C.

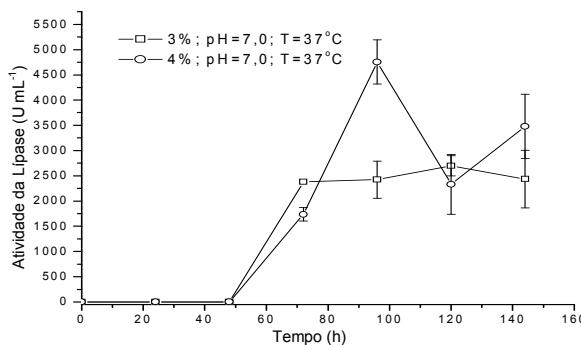


Figura 6. Perfil da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 3 e 4%, com pH = 7,0 e T = 37°C.

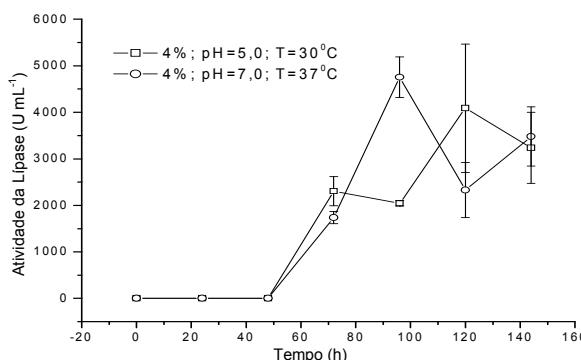


Figura 7. Estudo comparativo da atividade enzimática, utilizando-se o óleo de palma como indutor a 4%, com pH = 5,0 e 7,0 e T = 30 e 37°C.

A maior produção de biomassa deste estudo foi de 5,73 mg mL⁻¹ em 72h de fermentação, como pode ser observado na Figura 1, apresentando valores próximos aos encontrados na literatura, os quais, em estudo da produção da enzima por *Candida rugosa*, obtiveram 5,87 mg mL⁻¹ em 72h de fermentação, utilizando óleo de oliva como indutor.

Com relação ao pH (Tabela 1), a literatura reporta que pH neutro é geralmente definido como ótimo para atividade lipolítica como pode ser verificado nos trabalhos de Fadiloglu e Soylemez (1997) e Benjamin e Pandey (2000).

Tabela 1. Perfil do pH com as concentrações de 3 e 4% de óleo de palma como indutor, com diferentes temperaturas e pH.

Tempo (h)	pH			
	3% (pH = 5,0 e T = 30°C)	4% (pH = 5,0 e T = 30°C)	3% (pH = 7,0 e T = 37°C)	4% (pH = 7,0 e T = 37°C)
0	5,08	5,00	6,75	6,77
24	5,88	4,99	5,48	5,48
48	5,91	5,03	5,55	5,57
72	6,00	4,96	5,57	5,59
96	6,00	5,03	5,59	5,60
120	5,91	5,10	5,66	5,68
144	5,87	5,05	5,70	5,70

As maiores atividades lipolíticas foram obtidas sob as seguintes condições: concentração de indutor a 4%, pH 7,0 e temperatura de 37°C (Tabela 2; Figuras 5 e 6). Entretanto, podemos observar o declínio do pH durante as fermentações para as diferentes condições (Tabela 1). De acordo com Pinheiro et al. (2008a), temperaturas na faixa de 29 e 45°C e valores de pH entre 7,0 e 8,5 representam as condições ótimas de atividade lipolítica.

Tabela 2. Perfil da Atividade Enzimática com as concentrações de 3 e 4% de óleo de palma como indutor, com diferentes temperaturas e pH.

Tempo (h)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)			
	3% (pH = 5,0 e T = 30°C)	4% (pH = 5,0 e T = 30°C)	3% (pH = 7,0 e T = 37°C)	4% (pH = 7,0 e T = 37°C)
0	0	0	0	0
24	0	0	0	0
48	0	0	0	0
72	857,14	2916,67	2433,15	1488,18
96	268,91	253,97	2139,04	4369,75
120	1667,95	1921,92	3538,08	4369,75
144	564,74	1372,55	3662,34	4001,78

Neste trabalho, foram avaliadas as temperaturas de 30 e 37°C por ensaios realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, e observou-se maior produção de biomassa do Biopetro IV a 30°C. Contudo, pode-se notar que, na presença de indutor, a maior atividade lipolítica foi observada nas mesmas condições pré-estabelecidas por outros pesquisadores. Na literatura, a temperatura de 37°C e pH de 7,0 foram definidos como ótimos para as lipases por Fadiloglu e Soylemez (1997), que utilizaram *Candida rugosa* como microrganismo produtor de enzima, e para a lipase de *Penicillium restrictum*, pesquisada por Freire et al. (1997).

O valor máximo da atividade lipolítica obtido neste estudo foi de 4369,75 U mL⁻¹ em 96h (Tabela 2),

sendo este maior que o valor obtido por Pinheiro et al. (2008b), que avaliou a produção de lipase por *Penicillium verrucosum*, obtendo um máximo de atividade de 3,15 U mL⁻¹ em 96h de fermentação, utilizando, como indutor, o óleo de oliva.

Conclusão

A partir das condições avaliadas, verificou-se que a melhor condição foi 4% de concentração de indutor, pH 7,0 e temperatura de 37°C, chegando a uma atividade lipolítica máxima de 4369,75 U mL⁻¹. Assim, pode-se concluir que, neste estudo, a avaliação das condições do processo fermentativo para produção de enzimas, tais como as lipases, permite direcionar novos estudos para a otimização do processo, utilizando o Biopetro IV.

Referências

- BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G. E.; MARKE, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 184-190, 1997.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 5, p. 453-460, 2000.
- CARVALHO, N. B.; SOUZA, R. L.; LIMA, A. S.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by *bacterium* strain isolated from petroleum contaminated soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 25-32, 2008.
- FADILOGLU, S.; SOYLEMEZ, Z. Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil. **Food Research International**, v. 30, n. 3-4, p. 171-175, 1997.
- FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 6, 1997.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- JIA, X.; ZHANGA, T.; WANGB, F.; HAN, F. Multi-objective modeling and optimization for cleaner production processes. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 2, p. 146-151, 2006.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meio aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 254-263, 1997.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PINHEIRO, T. L. F.; LIPKE, N. R.; KEMPKA, A. P.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008a.
- PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444-450, 2008b.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-758, 1999.
- VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2007.
- YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

Received on June 30, 2009.

Accepted on July 8, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.