

Produção de Lipase e Biossurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio Production of Lipase and Biosurfactant by Isolated from Wastewater Dairy

Abreviaturas:

Production of Lipase and Biosurfactant

Produção de Lipase e Biossurfactante

Fabiana Guillen Moreira Gasparin¹, Agnes Magri¹, Amanda Fouto Neves¹ e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹

ABSTRACT

Lipases and biosurfactants are useful tools in the decontamination of polluted environments with lipid residues can be obtained from microbiological sources. The objective of this study was to evaluate the production of lipase and biosurfactant of isolated from wastewater of a dairy called ISO 6. Different vegetable oil 1% were tested as carbon source for production of lipase and biosurfactant. The lipolytic activity was quantified by measuring *p*-nitrophenol released after 10 minutes of incubation of the enzyme with *p*-nitrophenyl palmitate at 37 ° C and pH 8, 5. To determine emulsification index 2 mL of crude extract was mixed with 2 mL of kerosene and after shaking on vortex for 2 minutes was calculated the ratio between the height of the emulsified layer divided by the total height of the liquid column. The best carbon source for the production of lipase was corn oil (75.81 IU / mL) but it was not a good substrate for production of the biosurfactant, for the lowest rate of emulsification was obtained with this vegetable oil. In all experiments the isolated ISO 6 was able to produce biosurfactant and lipase showing potential for use in bioremediation of polluted environments with lipid residues.

Key-words: lipase, biosurfactant, bioremediation

RESUMO

As lipases e biossurfactantes são ferramentas úteis na descontaminação de ambientes poluídos com resíduos lipídicos podendo ser obtidos de fontes microbiológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de lipase e de biossurfactante de um isolado de efluente de laticínio denominado de ISO 6. Diferentes óleos vegetais a 1% foram testados como fonte de carbono para produção de lipase e biossurfactante. A atividade lipolítica foi quantificada pela dosagem de *p*-nitrofenol liberado após 10 minutos de incubação da enzima com palmitato de *p*-nitrofenila a 37°C e pH8,5. Para determinar o índice de emulsificação foi misturado 2 mL do extrato bruto com 2 mL de querosene e após agitação em vórtex por 2 minutos foi calculado a razão entre a altura da camada de emulsificação pela altura total do volume. A melhor fonte de carbono para a produção de lipase foi o óleo de milho (75,81UI/mL), mas este substrato não foi bom para a produção de biossurfactante, pois o menor índice de emulsificação foi obtido com este óleo vegetal. Em todos os experimentos o isolado ISO 6 foi capaz de produzir lipase e biossurfactante demonstrando potencial para ser utilizado em biorremediação de ambientes poluídos com resíduos lipídicos.

Palavras-chave: lipase, biossurfactante, biorremediação

¹ (faguimoreira@hotmail.com), (agnes.magri@hotmail.com), (a_f_n_14@hotmail.com), (macelligoi@uel.br) Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia. Caixa Postal 6001 – 95070-560 Londrina – Pr - E-mail: macelligoi@uel.br

Os lipídios são componentes importantes nos efluentes, pois causam poluição ambiental severa podendo formar filmes na superfície da água prevenindo a difusão de oxigênio e conseqüentemente causando a morte de muitas formas de vida aquática (MENDES; CASTRO, 2005). Estratégias para a remoção deste tipo de resíduo têm sido propostas como a utilização de enzimas e de biossurfactantes.

O interesse por enzimas e por tecnologia enzimática vem aumentando gradativamente e as áreas de engenharia de proteínas e de enzimologia em meios não convencionais estão contribuindo para a ampliação do uso de enzimas nos processos industriais. As enzimas que hidrolisam os lipídios são denominadas de lipases e podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos. As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para aplicação industrial (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010). A produção de lipases nos microrganismos pode ser influenciada por diferentes fatores como, por exemplo, a fonte de carbono, a concentração de oxigênio dissolvido, a temperatura e o pH do meio, as condições de aeração, entre outros (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Os biossurfactantes ou surfactantes de origem microbiana são agentes tensoativos com capacidade de detergência, emulsificação, dispersão de fases, que podem ser aplicados em processos de descontaminação de ambientes poluídos com lipídios. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A maioria dos surfactantes em uso é derivada de petróleo, porém o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado devido a sua diversidade, características ambientais favoráveis, possibilidade de produção através de fermentação e potencial aplicação em diversas áreas do setor industrial (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de lipase e de biossurfactante de um isolado de efluente de laticínio denominado de ISO 6 visando a aplicação destes produtos na biorremediação. A bactéria, gram positiva, foi isolada pela técnica pour-plate. O meio de isolamento era composto de NaNO_3 4,0 g/L; KH_2PO_4 1,5g/L; FeCl_3 0,05g/L; MgSO_4 0,2g/L; CaCl_2 0,01g/L; Na_2HPO_4 0,5g/L; extrato de levedura 0,05g/L; óleo de oliva 1% (v/v); Tween 80 0,001% (p/v); agar 15g/L. Este

meio foi denominado de MMO (meio mínimo + óleo de oliva). Após isolamento o microrganismo foi mantido em meio Dyg's (2,0g/L de glucose; 1,5g/L de peptona; 2,0g/L de extrato de levedura; 0,5g/L de K_2HPO_4 e 0,5g/L de MgSO_4) a 4°C. Para o pré-cultivo 1alçada de cultura de ISO 6 em meio Dyg's foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25mL de meio mínimo (NaNO_3 4,0 g/L; KH_2PO_4 1,5g/L; FeCl_3 0,05g/L; MgSO_4 0,2g/L; CaCl_2 0,01g/L; Na_2HPO_4 0,5g/L; extrato de levedura 0,05g/L) e 1% de glucose. O frasco foi incubado a 28°C e 200rpm por 24 horas. Posteriormente, o microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25 mL de meio mínimo e 1% de um dos diferentes óleos vegetais (óleo de oliva; óleo de soja; óleo de milho; óleo de girassol e óleo de canola). Em cada frasco foi usado 1mL do pré-cultivo como inóculo. Os frascos foram incubados nas mesmas condições de temperatura e agitação do pré-cultivo e após 48 horas a fermentação foi interrompida por centrifugação (9000rpm; 15 min; 4°C). O extrato bruto livre de células foi usado para análise. Cada óleo foi testado em duplicata.

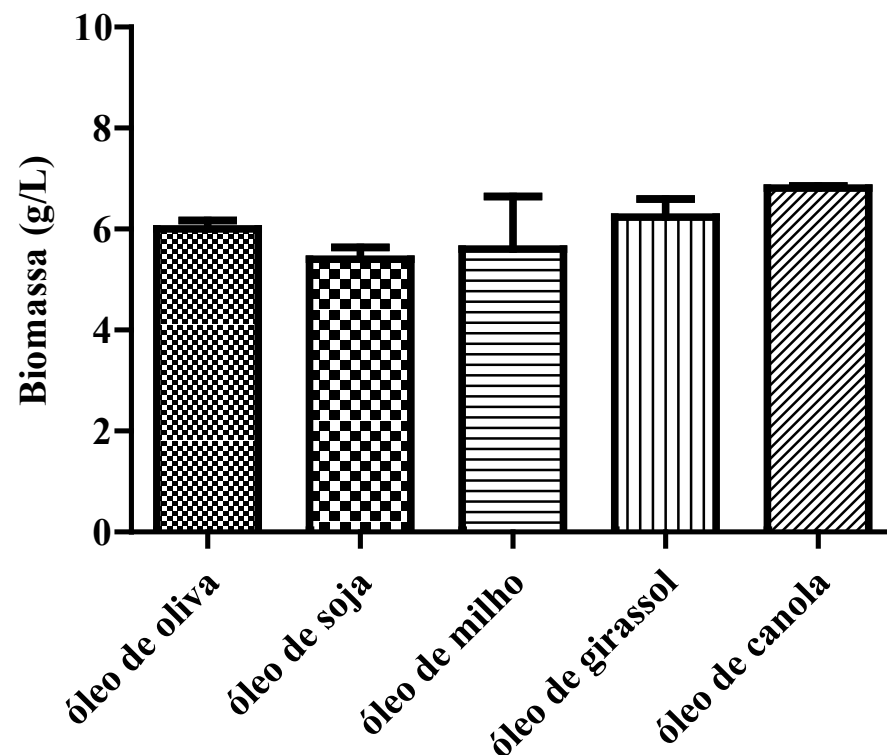
A atividade lipase foi quantificada pela dosagem de *p*-nitrofenol liberado após 10 minutos de incubação da enzima com palmitato de *p*-nitrofenila a 37°C e pH8,5. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol nas condições do ensaio.

A produção de biossurfactante foi avaliada pelo índice de emulsificação que foi determinado quando 2 mL do extrato bruto foi misturado com 2 mL de querosene. Esta mistura foi agitada vigorosamente em agitador vórtex por 2 minutos, deixando-se em repouso por 24 horas. Em seguida foi calculado o índice de emulsificação que é a razão entre a altura da camada emulsificada e a altura total do líquido. Os resultados foram apresentados como porcentagem de emulsificação multiplicando-se o índice por 100. O teste foi conduzido em triplicata.

Os resultados deste trabalho foram analisados pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

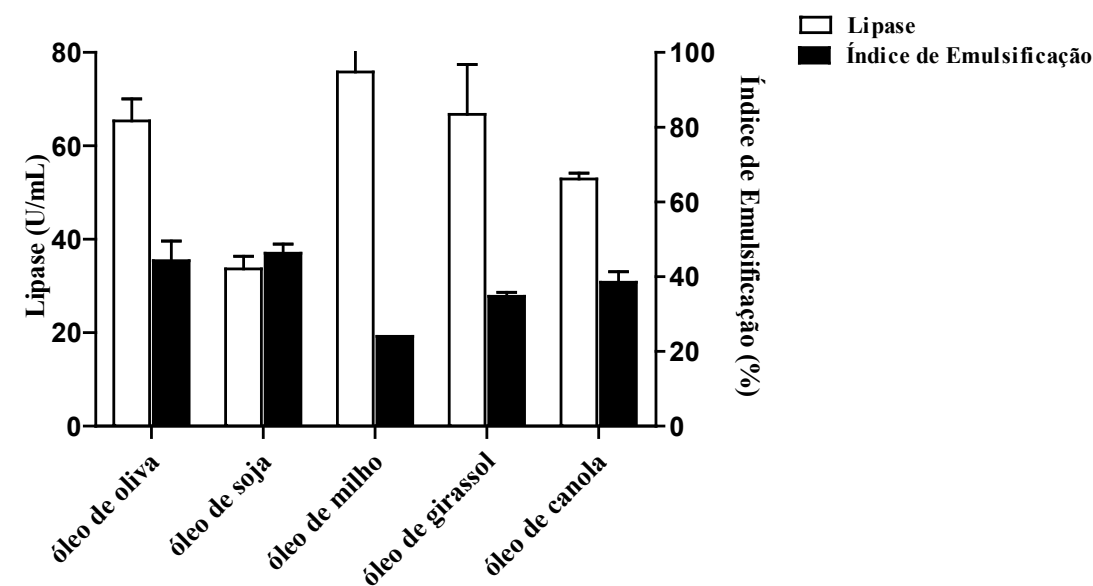
De acordo com os resultados apresentados na Figura 1 não houve diferença significativa de crescimento quando o microrganismo foi cultivado com os diferentes óleos vegetais. No entanto, para a produção de lipase (Figura 2) a melhor fonte de carbono foi o óleo de milho (75,81UI/mL). Muitos estudos têm sido conduzidos para definir os requerimentos nutricionais necessários para a produção de lipase e as fontes de carbono lipídicas geralmente parecem ser essenciais para uma alta produção (CONTESINI *et al.*, 2010).

Figura 1 – Biomassa produzida após 48 horas de fermentação submersa em meio mínimo contendo 1% de óleo vegetal. Média dos resultados \pm desvio padrão: Oliva ($6,0 \pm 0,16^a$); Soja ($5,4 \pm 0,24^a$); Milho ($5,6 \pm 1,05^a$); Girassol ($6,2 \pm 0,35^a$); Canola ($6,8 \pm 0,04^a$).



Em comparação aos outros óleos testados, o óleo de milho não foi uma boa fonte de carbono para a produção de biossurfactante, pois o menor índice de emulsificação foi obtido com este óleo vegetal (Figura 2). Já foi relatado que os microrganismos podem produzir surfactantes crescendo em substratos solúveis como os carboidratos (CARRILLO *et al.*, 1996) ou em substratos insolúveis como os óleos (RATLEDGE, 1988). Ainda não foi estudado em nosso laboratório se o isolado é capaz de produzir biossurfactante com substratos solúveis. Em todos os cultivos foi observada uma produção concomitante de lipase e de biossurfactante com os substratos oleosos a 1%. Este resultado é interessante uma vez que a presença dos 2 produtos microbianos tornaria o processo de biorremediação mais rápido.

Figura 2 – Atividade lipase (U/mL) e índice de emulsificação (%) após 48 horas de fermentação. Lipase: Oliva ($68,7 \pm 0,00^{a,b}$); Soja ($33,7 \pm 2,70^c$); Milho ($75,8 \pm 5,10^a$); Girassol ($66,8 \pm 10,60^{a,b}$); Canola ($53,8 \pm 0,00^{b,c}$). Índice de Emulsificação: Oliva ($44,3 \pm 5,30^a$); Soja ($46,3 \pm 2,47^a$); Milho ($24,0 \pm 0,00^b$); Girassol ($34,8 \pm 1,06^{a,b}$); Canola ($38,5 \pm 2,83^a$). Média dos resultados \pm desvio padrão.



Considerando a capacidade de produção de lipase e biossurfactante, pode-se concluir que o isolado ISO 6 apresenta potencialidade para ser utilizado em biorremediação de ambientes poluídos com resíduos lipídicos sendo necessário experimentos futuros para otimizar a produção destes produtos microbianos.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I., GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.12, p.82-84, 1996
- CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. Lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 163-167, 2010.

MARTINS, V.G; KALIL, S.J; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v.31, n.8, p. 1942-1947, 2008.

MENDES, A. A.; CASTRO, H.F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 135-142, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PINTO, M. H.; MARTINS, R.G; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p. 2104-2108, 2009.

RATLEDGE, C. Hydrocarbons – Products of hydrocarbon-microorganism. **Biodeterioration**, v.7, p. 219-236, 1988.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Avaliação da produção de lipases por cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.