

## Efeito do pH sobre a produção de lipase e biomassa de *Acinetobacter calcoaceticus*

**Agnes Magri<sup>1</sup>, Tamires Minucelli<sup>1</sup>, Cristiani Baldo da Rocha<sup>1</sup>, Nicole Caldas Pan<sup>1</sup>,  
Maria Antonia Colabone Celligoi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia  
Caixa Postal 10011 – CEP 86057-970 Londrina – Paraná - E-mail: agnesmagri92@gmail.com

### RESUMO

*As lipases microbianas constituem um grupo de enzimas largamente utilizado industrialmente e de grande interesse biotecnológico devido à versatilidade de suas propriedades e fácil produção de biomassa. Por sua especificidade, são muito atrativas para aplicações industriais na obtenção de produtos de alto valor agregado. Nesse contexto, o seguinte trabalho avaliou a influência do pH sobre a produção enzimática e crescimento celular de *Acinetobacter calcoaceticus*, isolado de efluente lipídico na região de Londrina. Foram testados cinco diferentes pHs, variando de 6,0 a 10,0. A maior produção enzimática (115,9 U/mL) e a melhor biomassa (9,17 g/L) foram observadas no pH 7,0. O microrganismo mostrou bom crescimento nos diferentes pHs, o que colabora com a utilização desse microrganismo em diferentes condições de cultivo e em aplicações industriais.*

**Palavras-chave:** lipase, biomassa, *Acinetobacter calcoaceticus*.

### INTRODUÇÃO

A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases um grande potencial biotecnológico<sup>1</sup>. Possuem aplicação na indústria farmacêutica, química, alimentícia, médica, oleoquímica, na produção de polímeros biodegradáveis, biodegradação de petróleo, produção de biodiesel, biorremediação e no tratamento de resíduos e esgotos<sup>2</sup>.

As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente por serem a maioria extracelular, facilmente isoladas, e geralmente mais estáveis e diversificadas que as de outras fontes<sup>3</sup>. Além disso, possuem disponibilidade comercial, versatilidade catalítica, baixo custo, não requerem cofatores, atuam em faixa de pH e temperatura bastante amplas<sup>4</sup>.

Podem ser produzidas por processos fermentativos submersos, e sua produção é influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos, como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, presença de indutores lipídicos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido<sup>5</sup>. Sendo assim, esse trabalho objetivou avaliar a influência do pH sobre a produção enzimática e crescimento celular de *Acinetobacter calcoaceticus*, isolado de efluente lipídico na região de Londrina.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Meio de preservação e pré-cultivo:** o microrganismo foi preservado em meio de cultura Dyg's<sup>6</sup> sólido a 4°C, e para o pré-cultivo foi utilizado o mesmo meio, porém líquido.

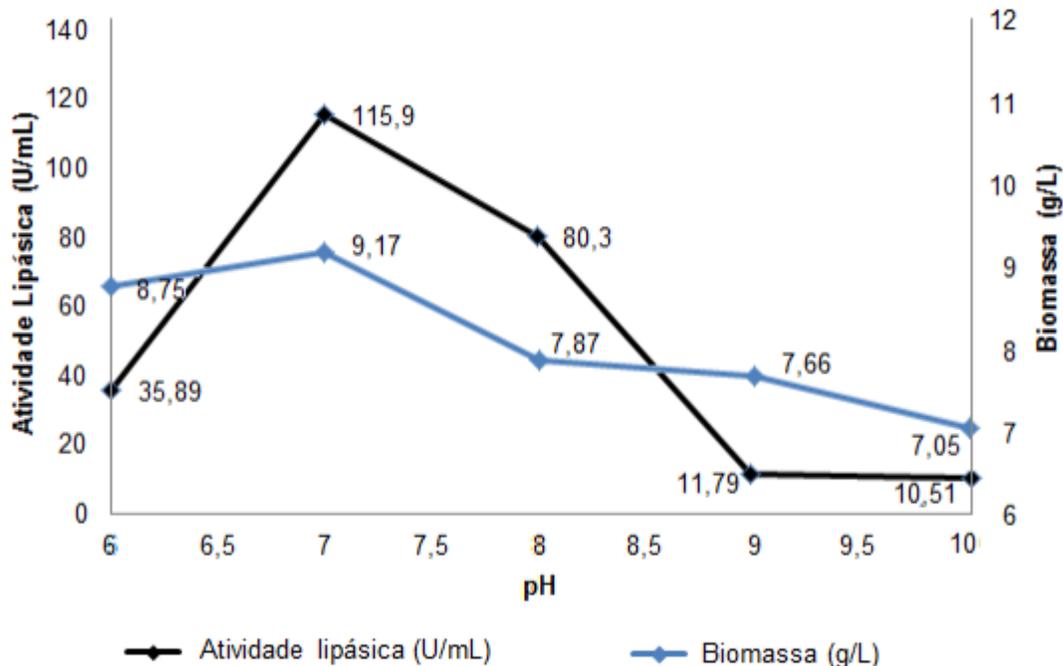
**Meio de fermentação:** para as fermentações utilizou-se Meio Mínimo modificado ( $\text{NaNO}_3$  4,0 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5g/L;  $\text{FeCl}_3$  0,05g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,2g/L;  $\text{CaCl}_2$  0,01g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5g/L; extrato de levedura 5g/L; óleo de milho 1% (v/v) e Tween 80 2,5 mL/L).

**Atividade enzimática e crescimento celular em diferentes pHs, por *Acinetobacter calcoaceticus*.** Para avaliar a influência do pH na produção de lipase e biomassa, foram realizados cultivos variando o pH em 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0. O pré-cultivo foi incubado a 28°C durante 24 horas, a 200 rpm em pH 6,0. O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L de células e inoculado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados a 28°C, a 200 rpm, variando o pH nos pontos descritos anteriormente. O experimento foi feito em triplicata. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9000 rpm 10 minutos, a 4°C) e alíquotas de 1mL do sobrenadante de cada experimento foi utilizado para as quantificações. A atividade de lipase foi pelo método do  $p\text{NPP}^7$  e a biomassa foi ressuspensa em 1mL de solução salina 0,9% (m/v) e determinada a  $\lambda=620$  nm, correlacionando a uma curva de calibração.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A influência do pH na produção da lipase e crescimento celular de *A. calcoaceticus* foi avaliada e está representada na Figura 1. A maior produção enzimática (115,9 U/mL) foi observada no pH 7,0. O mesmo pH foi encontrado nos estudos de Barbaro<sup>8</sup>, e muito próximos de Mahler<sup>9</sup>, que encontrou 6,8. Geralmente, bactérias preferem pH por volta de 7,0 para seu crescimento e produção de lipase, como comprovado no gênero *Bacillus sp.*<sup>10</sup> e no gênero *Acinetobacter sp.*<sup>8</sup>. No entanto, em muitos casos o máximo da atividade é observada em pHs mais elevados, maiores que 7,0<sup>10</sup>. Nesse trabalho foi no pH 8,0 foi a maior atividade atingindo 80,3 U/mL, aumentando e diminuindo os pHs as atividade caíram sendo em pH 6,0 de 35,89 U/mL, e em 9,0 a atividade caiu para 11,79 U/mL. Isso mostra que em valores abaixo de 7,0 ou acima de 8,0 a atividade é reduzida drasticamente (Figura 1).

Figura 1. Efeito do pH sobre a produção de lipase e crescimento celular de *Acinetobacter calcoaceticus*.



O efeito do pH no crescimento celular de *A. calcoaceticus* foi avaliado, e a melhor biomassa observada foi de 9,17 g/L no pH 7,0, acompanhando o mesmo resultado encontrado com a atividade. Porém a redução e o aumento do pH não reduzem drasticamente o crescimento celular, concluindo que este micro-organismo tem um bom crescimento em diferentes pHs.

### CONCLUSÕES

Apesar de ter apresentado maior crescimento em pH 7,0, *A. calcoaceticus* apresentou bom crescimento celular em todos pHs avaliados, o que colabora com a produção desse microrganismo em diferentes condições de cultivo, em ampla faixa de pH. São necessários estudos para otimização da produção, mas a lipase já mostra grande potencial para aplicações industriais.

### REFERÊNCIAS

- (1) ALBERTON, Dayane. **Produção de lipase por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. 2009. 173 f. Tese (Doutor em Bioquímica) – Universidade Estadual do Paraná, Curitiba, 2009.
- (2) HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali, HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology** vol.39, issue 2.p.235-251. Islamabad, Pakistan.2006.
- (3) CARVALHO, Patrícia de Oliveira; CAMPOS, Paula Renata Bueno Campos; NOFFS, Maximiliano D'Addio; OLIVEIRA, Joaquim Gilberto de; SHIMIZU, Mário Tsunezi; SILVA, Daniela Martins. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**. Vol.26. n.1, 75-80, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n1/14304.pdf>>. Acesso em 10 set. 2012.

- (4) JOAO, J.J; ZANELLA, C. R. Utilização de enzimas em meio orgânico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. [S. l.].2004. Disponível em:  
<[http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16\\_enzima.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio16/16_enzima.pdf)>. Acesso em: 20 ago. 2011.
- (5) GUPTA, R; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**. vol.64, n.6. 763–781. 2004.
- (6) GUPTA, Namita; RATHI, Pooja; GUPTA, Rani. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**. 311 (2002). 98-99.
- (7) MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA E. B.; JUNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevado teores de lipídeos. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.2, Marco/Abril, 2005.
- (8) BARBARO, S.E. **Effects of low temperature, cold shock and various carbon sources on the physiology of a psychrotrophic *Acinetobacter sp.*** 1999. 199f. Tese (Doutor em Biologia) – Universidade de Waterloo, Waterloo, Ontario, Canadá. 1999.
- (9) MAHLER, GF; KOK, RG; CORDENONS, A; HELLINGWERF, KJ; NUDEL, BC. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** (2000) 24, 25–30.
- (10) SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam Chand. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. N.19 (2001) 627–662. ELSEVIER.