

Estudo da Produção de Lipase por Bactérias Isoladas de Efluente de Abatedouro Avícola

Cristiani Baldo¹, Lillian Maria Baggio¹; Thaisa Galetti Moreno¹; Agnes Magri¹, Marcelo Rodrigues de Melo¹; Fabiana Guillen Moreira Gasparin¹, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10.011 – CEP 86057-970 Londrina – Paraná - E-mail: cristianibaldo@uel.br

RESUMO

Lipases de origem microbiana apresentam diversas aplicações biotecnológicas e podem ser usadas na biorremediação de ambientes poluídos com resíduos lipídicos. Neste trabalho foi avaliada a produção de lipase por três microrganismos isolados de efluente de matadouro avícola. Os resultados demonstraram que apenas as cepas do isolado BF06, classificadas como bactérias pertencentes ao gênero pseudomonas, apresentaram produção de lipase no meio de cultivo. A maior produção foi observada após 24 h de cultivo com uma atividade catalítica de 35 U.mL⁻¹, em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono. Estes resultados sugerem que BF06 tem grande potencial para o tratamento de resíduos industriais e novos ensaios estão em andamento visando a otimização da produção de lipase por esta bactéria.

Palavras-chave: lipase, *Pseudomonas*, biorremediação.

INTRODUÇÃO

As lipases microbianas constituem um importante grupo de enzimas, devido à versatilidade de suas propriedades e à fácil produção em massa. São amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial¹. As lipases (EC 3.1.1.3) são carboxilesterases que catalisam a hidrólise e a síntese de triacilgliceróis, e são amplamente utilizadas na indústria química, farmacêutica, alimentícia, dentre outras².

O uso das lipases no tratamento de resíduos industriais tem se destacado, uma vez que, em comparação com os métodos físico-químicos tradicionais, é um tratamento de baixo custo e menos prejudicial ao meio ambiente. Esta ferramenta biotecnológica utiliza microrganismos inteiros, ou enzimas isoladas para degradar contaminantes em compostos não tóxicos ou com toxicidade reduzida³. Desta forma, isolar e selecionar novas linhagens produtoras de lipase é de grande importância com o objetivo de minimizar os impactos ambientais causados pelos tratamentos convencionais. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipase por micro-organismos isolados de efluente de matadouro avícola visando sua utilização no tratamento de resíduos industriais.

MATERIAL E MÉTODOS

-Microrganismo: Os microrganismos denominados BF06, BF09 e BF10 foram isolados a partir de efluente de abatedouro avícola. Para o isolamento utilizou-se o Meio Mínimo sólido (NaNO₃

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; ágar 15g/L) acrescido de 0,001% (p/v) de Tween 80 e 1% (v/v) de óleo de oliva. Após o isolamento, os microrganismos foram mantidos em meio Dyg's⁴ adicionado de 40% de glicerol (v/v) a -20°C.

-Seleção de microrganismos produtores de lipase: Os microrganismos produtores de lipase foram selecionados utilizando-se o Meio Mínimo sólido, adicionado de 1% (v/v) de óleo de oliva, 0,001g/L de Tween 80 e 0,001g/L de rodamina B. Os isolados foram cultivados por 48 horas a 28°C e a detecção da produção de lipase baseou-se na interação de rodamina B com os ácidos graxos liberados na hidrólise enzimática do óleo de oliva. Após a incubação, as placas foram irradiadas com luz UV e o resultado positivo foi verificado pela formação de halo fluorescente alaranjado.

-Processo fermentativo: Os isolados foram cultivados em frascos de 125 mL contendo 25 mL de Meio Mínimo acrescido de 1% (v/v) de óleo de oliva. O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L de células por frasco. Os frascos foram incubados a 28°C, a 200 rpm, por 72 horas. Amostras (2mL) foram removidas em intervalos de 24 horas para avaliação da atividade lipásica e biomassa. O cultivo foi interrompido por centrifugação (10 minutos, a 4°C, 9000 rpm), o sobrenadante foi usado para dosagens de lipase e o precipitado usado para determinação da biomassa.

-Atividade lipásica: A atividade lipolítica dos extratos foi avaliada pela reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofelina (p-NPP), após incubação por 10 min, a 37°C. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar 1µL de palmitofenol nas condições do ensaio.

-Determinação da biomassa: A biomassa foi determinada por espectrofotometria a λ 620 nm, de acordo com curva de calibração previamente determinada.

-Identificação dos produtores de lipase: O microrganismo produtor de lipase selecionado foi identificado pelo sequenciamento do gene para o rRNA 16S em colaboração com a EMBRAPA SOJA – LONDRINA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa deste trabalho consistiu em selecionar as cepas produtoras de lipase. Os resultados mostraram que somente o isolado BF06, identificado como uma bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas*, apresentou capacidade de produzir lipase pelo teste da rodamina B (Tabela 01).

Tabela 01: Seleção de microrganismos produtores de lipase.

Isolado	Produção de lipase
---------	--------------------

BF06	Positivo
BF09	Negativo
BF10	Negativo

O isolado BF06 foi então submetido a fermentação submersa em meio contendo óleo de oliva onde observou-se maior produção de lipase após 24 h de cultivo (35 U.mL^{-1}), quando comparado ao tempo de 48 horas ($15,4 \text{ U.mL}^{-1}$). Após 72 horas, observou-se queda drástica da produção enzimática ($6,1 \text{ U.mL}^{-1}$). No entanto, os maiores valores de biomassa foram detectados no tempo de 48 horas ($11,6 \text{ mg/mL}$). Tal fato pode ser explicado pela produção de outras enzimas tais como proteases que promoveriam a degradação de lipases no tempo de 48 horas, ou outros fatores relativos ao metabolismo bacteriano, tais como estresse nutricional, entre outros.

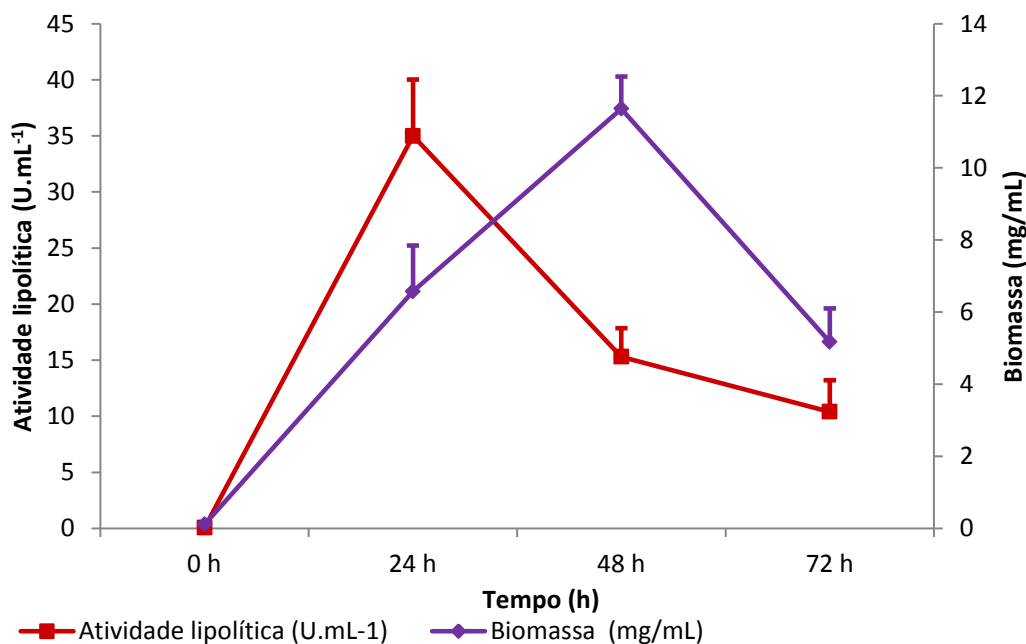


Figura 1: Atividade lipolítica e biomassa do isolado BF06 cultivado por 24h, 48h e 72 horas em Meio Mínimo contendo azeite de oliva (10g/L), a 28°C , 200 rpm. Os cultivos foram realizados em triplicata e os ensaios enzimáticos em duplicata para cada cultivo. A atividade lipásica foi avaliada pela reação de hidrólise do pnPP. A biomassa foi determinada por espectrofotometria a λ 620 nm, de acordo com curva de calibração previamente determinada.

De acordo com a literatura, bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* produzem diferentes tipos de lipases, em substratos sólidos e em cultivos submersos⁵. Além disso, alguns autores descreveram a produção simultânea de lipases e proteases pelo gênero *Pseudomonas*^{6,7}. No entanto, novos ensaios deverão ser realizados para investigar a produção de proteases pela cepa BF06.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que a cepa BF06 tem grande potencial para o tratamento de efluentes contaminados com alto teor de resíduos lipídicos e novos experimentos estão em andamento visando a otimização da produção de lipase por esta bactéria.

REFERÊNCIAS

- (1) HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- (2) TREICHE, H.; OLIVEIRA D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production, **Food Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2 p. 182-196, 2010.
- (3) ALCADE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel Green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281-287, 2006.
- (4) RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**. v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986. (Resumo).
- (5) RUCHI, G.; ANSHU, G.; KHARE, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, n 11. p. 4796-4802, 2008.
- (6) BISHT, D.; YADAV, S. K.; GAUTAM P.; DARMWAL, N. S. Simultaneous production of alkaline lipase and protease by antibiotic and heavy metal tolerant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 1-8, 2012
- (7) RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal Applied Microbiology*, v. 93, n.2 p. 205-213, 2002.