



X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica

“Influência da pesquisa em Engenharia Química no desenvolvimento tecnológico e industrial brasileiro”

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Universidade Severino Sombra
Vassouras – RJ – Brasil

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Bacillus megaterium*

SILVA, H. N. L.*¹; LIMA, R. C.*¹; PINOTTI, L. M.²;

¹Aluno do DETEC/CEUNES/UFES ²Professor do DETEC/CEUNES/UFES

Departamento de Engenharias e Tecnologia – Centro Universitário Norte do Espírito Santo - UFES,
BR101 Km 60 – São Mateus, ES – CEP 29932-540
e-mail: laurapinotti@ceunes.ufes.br

RESUMO - O interesse na produção de lipases está relacionado ao seu grande potencial tecnológico devido a sua ação catalítica em reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Estas enzimas são extraídas de tecido animal e de plantas ou ainda produzidas por microrganismos. As lipases microbianas, em especial, são amplamente aplicadas industrialmente devido à sua estabilidade, seletividade e especificidade. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi pesquisar o efeito da concentração de peptona bacteriológica (1, 2 e 3% m/v) e do óleo de oliva (1, 2 e 3% m/v) na produção de lipases pela cepa bacteriana *Bacillus megaterium*, utilizando um planejamento fatorial 3². As atividades extracelulares obtidas para todos os ensaios realizados foram baixas (aproximadamente 0,07 UI/mL) e apenas a peptona apresentou significância na produção de enzima, de acordo com a análise estatística, nas concentrações estudadas. Na produção intracelular verificamos que o melhor resultado (11,15 UI/g células) foi obtido quando se utilizou as concentrações intermediárias, ou seja, 2% de azeite de oliva e 2% de peptona bacteriológica. Ainda, verificou-se que o azeite de oliva foi o único que apresentou alguma significância de acordo com a análise estatística feita.

Palavras chave: catalise, enzimas, transesterificação

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores muito requisitados, devido as suas propriedades. Sua especificidade permite que façam transformações moleculares sem reações paralelas, diferenciando assim de sínteses químicas, além de serem muito ativas e versáteis, terem grande eficiência catalítica, atuam em condições suaves de reação e tem aceitabilidade ambiental, pois são completamente biodegradadas no meio ambiente (Gonçalves, 2007; Volpato, 2009).

As lipases pertencem, atualmente, a um dos mais importantes grupos de enzimas com enorme potencial em aplicações biotecnológicas. Lipases tem a capacidade de hidrolisar o triglicerol a gliceróis mais simples e ácidos graxos livres, além de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (Wolski, 2008). Essas enzimas são encontradas em tecidos animais e vegetais, além de microrganismos, sendo fundamental no metabolismo de lipídios desses organismos. Tradicionalmente essas enzimas eram adquiridas através do pâncreas

*Bolsista FAPES

de certos animais. Devido à dificuldade do acesso ao material de origem animal e a melhor capacidade no controle de produção atualmente as lipases são produzidas por microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Wolski, 2008). Essas enzimas tem grande valor devido, principalmente, às características como: estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (Hasan *et al.*, 2006, Krieger *et al.*, 2004).

As condições ótimas para a produção de lipases em meio submerso tem sido alvo de muitos estudos. Há fatores que influenciam a produção de lipases pelos microrganismos, tais como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura, pH, concentração de sais inorgânicos e concentração de oxigênio dissolvido.

Ainda, o meio de cultivo e/ou os diferentes microrganismos podem influenciar se o modo de produção das lipases é intracelular ou extracelular. As enzimas que são produzidas intracelularmente vêm despertando interesse, principalmente, devido a sua estabilidade e ao seu mais alto grau de pureza. É ainda possível imobilizar as células do microrganismo inteiras o que provoca maiores rendimentos, maior estabilidade operacional e custos mais baixos (Silva *et al.*, 2009; Wolski 2008). Dessa forma este trabalho pretende analisar se a cepa bacteriana *B. megaterium* produz enzimas lipolíticas extracelularmente e intracelularmente para diferentes condições de meio de cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção de Inóculo

A cepa bacteriana (*B. megaterium*) foi cedida pelo grupo de pesquisa da UFSCar e foi propagada em meio LBI modificado, composto por ágar bacteriológico (20g/L), NaCl (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e peptona (10g/L), por 48h na estufa a 37°C. A cepa bacteriana foi armazenada em meio sólido em geladeira. O inóculo do *B. megaterium* foi realizado em meio líquido contendo peptona (10g/L), extrato de levedura

(5g/L), cloreto de sódio (10g/L), glicose (1,5g/L).

Produção enzimática

O meio de cultivo do *B. megaterium* continha peptona bacteriológica, extrato de levedura (0,5% m/v), cloreto de sódio (0,5% m/v) e óleo de oliva. Os ensaios foram realizados em câmara rotativa a 37 °C e 200rpm. A quantidade de inóculo bacteriano adicionado foi de 10% do volume do meio fermentativo. O tempo de cultivo foi estudado para obter os melhores resultados. Para a realização dos experimentos foi utilizado um planejamento experimental do tipo fatorial (3²), com dois fatores em três níveis de variação e pontos centrais, totalizando 11 experimentos. As variáveis estudadas foram a concentração de peptona bacteriológica (1, 2 e 3% m/v) e do óleo de oliva (1, 2 e 3% m/v). Amostras foram coletadas durante o período de fermentação e centrifugadas a 6000 rpm por 60 minutos a 0°C. A partir do sobrenadante e do sedimentado realizou-se o procedimento descrito abaixo.

Extração das Enzimas

Sobrenadante: Os sobrenadantes foram analisados quanto as suas atividades enzimáticas. (Enzima Extracelular).

Sedimentado: Com os microrganismos foram feitas rupturas celulares em disruptor de células. Para tal, foi necessário colocar as células em um volume de tampão fosfato 10mM pH 8, para então realizar o processo de sonicação. Ao final da sonicação, os fragmentos celulares foram removidas por centrifugação a 6000 rpm, 60 minutos e 0°C, sendo analisado a atividade enzimática no sobrenadante (Enzima Intracelular).

Determinação da atividade enzimática

A atividade lipásica foi determinada pelo método descrito por Silva (2007). A atividade pode ser quantificada pela hidrólise de p-nitrofenilbutirato (pNPB) em 2-propanol (15mM). Essa reação foi realizada em um reator encamisado mantido a 25°C, onde foi adicionada 29 mL de tampão fosfato 0,1M pH 8,0, 1 mL da pNPB em 2-propanol e os diferentes extratos enzimáticos (1mL ou 0,5mL). Em diferentes tempos foram retiradas

amostras e acompanhadas a absorbância em comprimento de onda de 410nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo do Tempo de Cultivo

Com o intuito de estabelecer o tempo de fermentação que maximizasse a produção enzimática, foram realizados ensaios com um meio padrão (composição dos pontos centrais do planejamento fatorial) e amostras foram retiradas de 24 em 24 horas para análise da concentração celular e atividade lipolítica. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos no estudo do tempo de produção lipolítica para *B. megaterium*.

t (h)	Massa seca (g massa seca/L)	Atividade (UI/mL)	Prod.* (UI/g.h)
0	1,53	-	-
24h	3,47	0,035	0,42
48h	3,13	0,035	0,23
72h	1,14	0,032	0,39
96h	5,06	0,025	0,05

*Produtividade

O *B. megaterium* apresentou melhor produtividade para o tempo de 24 horas, dessa forma foi selecionado esse tempo para a realização das demais fermentações.

Produção enzimática

Os ensaios com a cepa bacteriana foram realizados de acordo com o planejamento de experimentos e os resultados obtidos se encontram na Tabela 2.

As atividades extracelulares obtidas para todos os ensaios realizados foram baixas (aproximadamente 0,07 UI/mL) e não houve variações consideráveis para as diferentes variáveis estudadas.

Após a realização dos ensaios de fermentação com diferentes concentrações de peptona bacteriológica e óleo de oliva, o microrganismo foi coletado e ressuspenso em solução tampão para a realização da ruptura celular e da extração das enzimas intracelulares. Os resultados da atividade do sobrenadante do sonificado e a massa de microrganismos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 - Produção de enzima extracelular por *B. megaterium* em fermentação submersa por 24h.

Ensaio	Peptona Bacteriológica (% m/V)	Óleo de Oliva (% m/V)	Atividade (UI/mL)	Massa Seca (g/L)	Atividade específica (UI /g células)
1	1	1	0,055 ±0,006	3,98	13,82
2	1	2	0,052 ±0,006	4,19	12,41
3	1	3	0,061 ±0,006	8,02	7,61
4	2	1	0,075 ±0,006	5,80	12,93
5	2	2	0,060 ±0,006	5,00	12,00
6	2	3	0,058 ±0,006	5,80	10,00
7	3	1	0,070 ±0,006	8,54	8,20
8	3	2	0,069 ±0,006	5,97	11,56
9	3	3	0,066 ±0,006	7,97	8,28
10	2	2	0,054 ±0,006	6,99	7,73
11	2	2	0,057 ±0,006	6,34	8,99

Tabela 3 - Produção de enzima intracelular por *B. megaterium* em fermentação submersa por 24h.

Ensaio	Peptona Bacteriológica (% m/V)	Óleo de Oliva (% m/V)	Atividade (UI/g _{célula})	Massa Seca (g/L)
1	1	1	9,81 ±0,71	3,98
2	1	2	8,74 ±0,71	2,19
3	1	3	4,04 ±0,71	8,02
4	2	1	6,90 ±0,71	5,80
5	2	2	10,11 ±0,71	5,00
6	2	3	5,47 ±0,71	5,80
7	3	1	3,42 ±0,71	8,54
8	3	2	8,37 ±0,71	5,97
9	3	3	6,74 ±0,71	7,97
10	2	2	11,72 ±0,71	6,99
11	2	2	13,32 ±0,71	6,34

Nota-se que os ensaios que apresentaram melhores resultados de atividade intracelular (11,72 UI/g_{células}) foram obtidos quando se utilizou meios com concentrações intermediária, ou seja, 2% de azeite de oliva e 2% de peptona bacteriológica. Esse valor foi obtido da média dos ensaios 5, 10 e 11, que são os pontos centrais do planejamento.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste trabalho, foram calculados alguns

parâmetros estatísticos, como o p-valor e os limites de confiança, associados aos efeitos principais e de interação entre os fatores estudados (concentração de peptona e de óleo de oliva) em relação a produção de lipase

A análise de variância do estudo da produção de enzima extracelular do microrganismo *B. megaterium* nas diferentes condições estudadas (concentração de peptona e óleo de oliva) pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4 - Tabela ANOVA para a atividade extracelular da cepa bacteriana *Bacillus megaterium*.

Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Peptona(L)	0,0002	1	0,0002	6,9044	0,0392
Peptona(Q)	0,0000	1	0,0000	0,0026	0,9610
Óleo de oliva(L)	0,0000	1	0,0000	1,1348	0,3277
Óleo de oliva(Q)	0,0001	1	0,0001	2,5929	0,1585
Error	0,0002	6	0,0000		
Soma Quadrática Total	0,0006	10			

Para esses ensaios pode ser observado que apenas para a peptona (L) o p-valor foi menor que 5%, o que significa que essa variável é estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%. Os novos parâmetros foram obtidos levando em consideração somente este efeito. A partir desses parâmetros é possível obter o modelo de regressão para a produção extracelular de

lipase para esse microrganismo, como a Equação 1,

$$A = 0,061545 + 0,006167P \quad (1)$$

em que P é a variável de concentração de peptona na forma codificada.

O gráfico de superfície de resposta da produção lipolítica extracelular em função da concentração de peptona e de óleo de oliva

esta apresentado na Figura 1. Para a atividade intracelular a Tabela 5 apresenta o estudo da

análise de variância do *B. megaterium*.

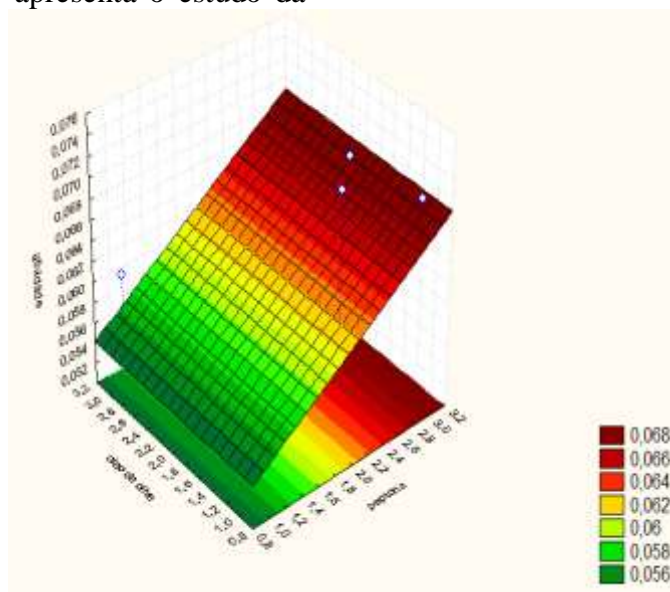


Figura 1 - Superfície de resposta para produção de lipase extracelular em função das concentrações de peptona e óleo de oliva.

Tabela 5 - Tabela ANOVA para a atividade intracelular da cepa bacteriana *Bacillus megaterium*.

Fator	Soma quadrática (SQ)	GL (df)	Média Quadrática (MQ)	F	p-valor
Peptona(L)	2,7473	1	2,7473	0,5126	0,5009
Peptona(Q)	6,4342	1	6,4342	1,2006	0,3152
Óleo de oliva(L)	2,5091	1	2,5091	0,4682	0,5194
Óleo de oliva(Q)	39,8007	1	39,8007	7,4269	0,0344
Error	32,1538	6	5,3590		
Soma Quadrática Total	96,3728	10			

Apenas a variável Óleo de Oliva(Q) se mostrou uma variável significativa na produção intracelular num intervalo de confiança de 95%. Foi feito a regressão para a produção intracelular de lipase para esse microrganismo, levando-se em consideração apenas essa variável, como mostra a Equação 2,

$$A = 7,526222 + 2,194333\varnothing^2 \quad (2)$$

onde \varnothing é a concentração de óleo de oliva na forma codificada.

O gráfico de superfície de resposta da produção lipolítica intracelular em função da concentração de peptona e de óleo de oliva esta apresentado na Figura 2.

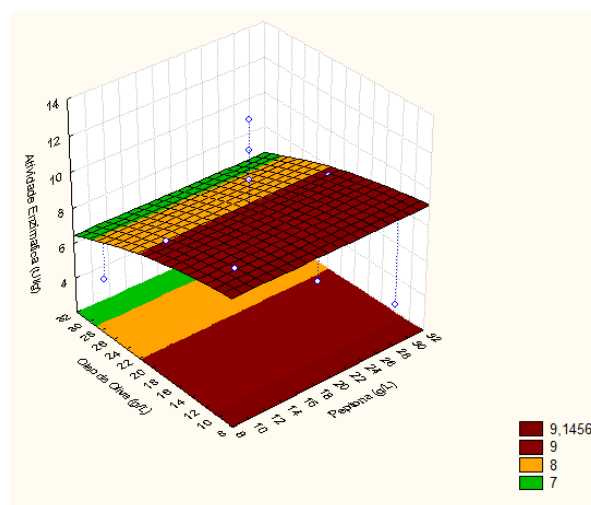


Figura 2 - Superfície de resposta para produção de lipase intracelular em função

das concentrações de peptona e óleo de oliva.

CONCLUSÃO

Após a realização deste estudo pode-se concluir que o microrganismo produz lipases extracelularmente e intracelularmente. Obtivemos uma produção lipolítica intracelular de 11,72 UI/g_{celula} em 24 horas de fermentação a 37°C com 2% (m/v) de peptona e 2% de óleo de oliva. Verificamos que o *B. megaterium* praticamente não produz enzimas lipolíticas extracelular nas condições testadas.

De acordo com a análise estatística apenas a concentração de peptona interfere nos resultados das atividades extracelulares, obtendo melhores resultados para concentrações maiores da peptona. Por outro lado, para as atividades intracelulares apenas a concentração de óleo apresentou significância, onde menores concentrações de óleo de oliva apresentam melhores resultados na produção da enzima intracelular.

REFERÊNCIAS

- GONÇALVES, F. A. G.; Produção de Lipase Extracelular por Leveduras em Cultivo Submerso, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, UFMG, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. "Industrial applications of microbial lipases". Enzyme Microbiol. Technol., v. 39, n. 1-2, p. 235-251, 2006.
- KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. "Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems." Food Technology and Biotechnology, v. 42 (4), p.279–286, 2004.
- SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F., Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipases Intracelulares. Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Engenharia Química – Lorena – SP, 2009.
- SILVA, J.A. Preparação de Biocatalisadores Utilizando Lipase de *Candida antractica*

Tipo B Imobilizada para Síntese de Ésteres de Vitamina A. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, UFC, Ceará, 2007.

VOLPATO G.; Produção, Purificação e Imobilização de Lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em Glicerol. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRGS, 2009.

WOLSKI, E.; Estudo Comparativo Da Produção De Lipase Por Fermentação Submersa Utilizando *Penicillium* sp. Livre e Imobilizado. Dissertação de Mestrado, URI-Erechim, 2008.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPES, o auxílio financeiro para realização deste trabalho.