

# Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*

*Evaluation of different ions in the activity lipase from Pseudomonas cepacia*

Giovana Silva Padilha

Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática – Unicamp. Campinas – SP [Brasil]

Gabriel Luis Castiglioni

Depto. de Engenharia de Alimentos. Químicos e Informática – Unicamp. Campinas – SP [Brasil]

Ranulfo Monte Alegre

Depto. de Engenharia de Alimentos. Químicos e Informática – Unicamp. Campinas – SP [Brasil]

Elias Basile Tambourgi

Depto. de Engenharia de Sistemas Químicos e Informática – Unicamp. Campinas – SP [Brasil] eliaстам@feq.unicamp.br

Este trabalho apresentou as propriedades da lipase produzida pela cepa de *Pseudomonas cepacia*, sua atividade e estabilidade na presença de diferentes íons a fim de auxiliar nos processos de produção de biodiesel. Após 96 horas de fermentação a enzima bruta foi analisada usando azeite de oliva como substrato. Íons como  $I^-$  estimularam a atividade enzimática em 40% em relação à enzima controle, o  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , e  $Ca^{2+}$  mantiveram a atividade da enzima, no entanto na presença dos íons  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  e  $Al^{3+}$  houve um efeito inibitório sobre a atividade da lipase o que pode ser devido à complexismo desses íons com a enzima.

**Palavras-chave:** Enzima. Íons. Lipase. *Pseudomonas cepacia*.

This work showed the properties of lipase produced by strain from *Pseudomonas cepacia*, its activity and stability in the presence of different ions due to assist in process of biodiesel. After 96 hours of fermentation the crude enzyme was analyzed using olive oil as substrate. Ions as  $I^-$  stimulated enzyme activity by 40% compared to the control, the  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and maintained the activity of the enzyme, however the presence of ions  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Al^{3+}$  had an inhibitory effect on the activity of lipase. This may be due to complexation of these ions with the enzyme.

**Key words:** Enzyme. Ions. Lipase. *Pseudomonas cepacia*.



## 1 Introdução

As lípases (triglicerol acil-hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. Essas enzimas são encontradas em diferentes organismos incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Do ponto de vista econômico e industrial, as lípases de fontes microbianas, obtidas de meios fermentativos são preferíveis em relação às fontes animais e vegetais, por sua relativa facilidade de produção e maior fonte de micro-organismos capazes de sintetizá-las (BORGSTRÖM e BROCKMAN, 1984; HASAN et al., 2006). Dentre os micro-organismos produtores de lípase, destacam-se as os fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus Penicillium* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Cândida* (KORDEL et al., 1991).

Em geral, as lípases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH entre 4 a 9, são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lípases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (VULFSON, 1994).

Em virtude da versatilidade de suas propriedades como atuação enzimática, especificidade pelo substrato e produção em escalas maiores (HASAN et al., 2006), as lípases obtidas de micro-organismos vêm sendo aplicadas nos diferentes segmentos industriais e biotecnológicos. Embora ainda hoje a maior aplicação industrial destas enzimas é na formulação de detergentes (KIRK et al., 2002), indústria de laticínios, setores têxteis, áreas farmacêuticas e médicas também utilizam a lípase de forma promissora (HASAN et al., 2006; JAEGER et al., 1999).

Nos dias de hoje existe um interesse mundial crescente pela conservação dos recursos energéticos naturais não renováveis, pelo desenvolvimento de recursos energéticos alternativos e pela reciclagem de rejeitos. Os rejeitos de óleos comestíveis usados em fritura representam sério problema ambiental em virtude de seu descarte ser diretamente no esgoto doméstico, causando grandes problemas de poluição. Uma maneira efetiva de reciclar os rejeitos de óleos usados em residências, restaurantes e indústrias é a sua utilização para produção de biodiesel sintetizado pela transesterificação direta de óleos vegetais e gordura animal, quando os triglicerídeos reagem com metanol na presença de um catalisador químico ou biológico. A utilização de lípase como catalisador biológico para produção do biodiesel apresenta um grande potencial em relação aos métodos químicos, uma vez que nenhuma operação complexa é necessária para recuperação do glicerol ou para eliminação de catalisador e sal. A partir disso, tem-se um crescente avanço nos meios científico, econômico e industrial em relação à aplicação de lípases em processos biotecnológicos para a modificação de óleos e gorduras. Oliveira e colaboradores (2004) ao utilizarem lípases imobilizadas como catalisadores obtiveram conversões de 100% em ésteres, mostrando potencialidade de utilização do óleo de mamona na produção do biodiesel. Em outro trabalho, Du e colaboradores (2007), a partir de óleo renovável usando lípase com catalisador, obtiveram 94% de rendimento em biodiesel. E Faccio (2004) estudou a produção de biodiesel a partir da modificação dos óleos de mamona, usando a lípase como catalisador biológico.

A partir desse contexto, estudos de caracterização enzimática da lípase de *Pseudomonas cepacia* para posterior aplicação na transformação de óleos e gordura foram realizados (PADILHA et al., 2007). Embora essas enzimas vêm sendo estudadas há alguns anos, pouco ou quase nenhum

trabalho em relação às propriedades físico-químicas desse micro-organismo produtor da lipase são encontradas na literatura. Como se sabe, existem diversos fatores que influem na atividade enzimática, tais como pH, temperatura, concentração do substrato, presença e concentração de íons. Existem diversos íons que podem atuar como ativador das enzimas e outros como inibidor. O efeito inibitório dos íons na  $\beta$ -frutofuranosidade foi estudado por Oliveira (1997), íons como  $I^{-1}$  inativaram quase que totalmente a enzima, enquanto o  $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Co^{2+}$ , e  $Al^{3+}$  estimularam a atividade enzimática. Em 2003, Pastore verificou o efeito dos íons nas lipases de *Rhizopus sp* onde íons  $Ca^{2+}$  aumentaram significativamente a atividade hidrolítica do extrato enzimático, a partir disso, neste trabalho, foram avaliadas a atividade e estabilidade da lipase de *Pseudomonas cepacia* na presença de íons como parte dos estudos de caracterização.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

**Micro-organismo:** foi utilizada a cepa de *Pseudomonas cepacia*, obtida da Fundação André Tosello, mantido em tubos de ensaio a 4°C, no ágar nutriente.

**Equipamentos:** para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, dos meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, utilizou-se a autoclave a 121°C durante 15min. O agitador orbital utilizado para a análise lipolítica e caracterização enzimática foi o TE-421 da Tecnal e para produção enzimática usou-se o reator BIOFLO III da New Brunswick Scientific.

**Reagentes:** todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico. Foram adquiridos da Synth (Diadema-SP) a acetona, álcool etílico, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, hidróxido de sódio, assim como todos

os sais usados na fermentação e determinação dos íons. A goma arábica, ágar-ágar, extrato de levedura e peptona bacteriológica foram obtidos da Oxoid (Londres, UK). Os óleos de soja (Liza) e azeite de oliva (Gallo) foram obtidos do comércio local com acidez máxima declarada pelos fabricantes de 0,3% e 0,5%, respectivamente.

### 2.2 Métodos

**Preparo do inóculo e sistema fermentativo:** o inóculo foi transferido dos tubos de ensaio para Erlenmeyers de 125mL contendo extrato de levedura (3g/L), peptona (3g/L),  $K_2PO_4$  (4g/L) e  $MgSO_4$  (0,2g/L) e 3% (v/v) de óleo de soja. A adaptação do micro-organismo foi realizada durante 48h a 30°C e 150 rpm. Após adaptação do micro-organismo, o inóculo foi transferido para biorreator tipo Bioflo III (com volume útil de 5000mL contendo 3000mL de meio). O ar foi fornecido por compressor, esterilizado por filtro de lã de vidro e a vazão foi controlada por meio de rotâmetros. O meio de cultivo estudado por Castiglioni e Monte Alegre (2007) apresentou as mesmas concentrações preparadas para o inóculo, porém com 6% (v/v) de óleo de soja para induzir a produção da lipase. A fermentação foi conduzida a 30°C, pH 7,0, aeração de 1,5vvm e agitação de 150rpm durante 96h.

**Obtenção do extrato enzimático:** após as 96h de fermentação, o meio foi coletado e centrifugado em temperatura ambiente durante 10min a 2683g. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático, uma vez que a *Pseudomonas cepacia* produz lipase extracelular (KORDEL et al., 1991).

**Determinação da atividade lipolítica:** a atividade lipolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por Macedo e colaboradores (1997). Fez parte do meio reacional 5mL de uma emulsão de óleo de oliva e goma arábica a 7%, 2mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 (10mM) e 1mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada por



30 minutos, 37°C e 150rpm em agitador orbital. A reação foi interrompida pela adição de 15 ml de solução acetona/etanol (1:1 em volume). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados com NaOH 0,05N, usando fenolftaleína como indicador. Um branco contendo o mesmo meio reacional que os ensaios com a enzima inativa em autoclave foi utilizado. Calculou-se a atividade enzimática segundo a equação:

$$A \text{ (}\mu\text{mol / g.min)} = \frac{(V_a - V_b)M.D.10^6}{t.v} \quad (1)$$

onde: A é a atividade lipolítica das enzimas;  $V_a$  é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);  $V_b$  é o volume do NaOH gasto na titulação do branco; D é a diluição da amostra; M é a concentração da solução de NaOH,  $v$  é o volume do extrato bruto (mL) e  $t$  é o tempo de reação (min). Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 $\mu$ mol de ácido graxo por minuto.

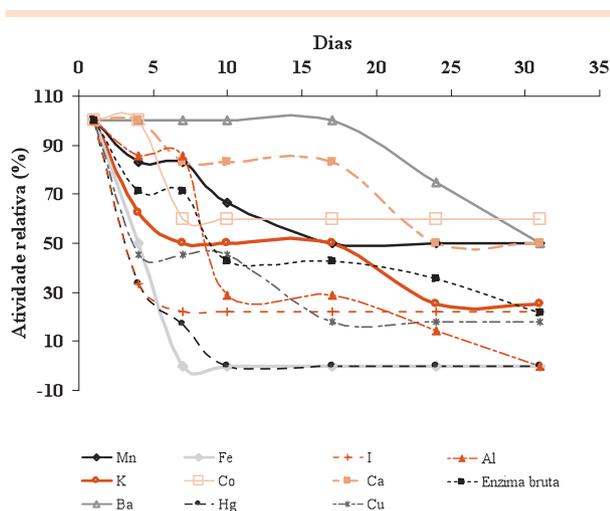
Para estudar o efeito dos íons ( $Mn^{2+}$ ,  $K^{1+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $I^{-}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ) na atividade da enzima, adicionou-se 0,3 mL de solução salina 10mM aos tubos de ensaio que continha certa quantidade de extrato bruto. Os tubos foram armazenados a 4°C. Em um dos tubos foi mantido somente o extrato bruto e usado como controle considerando 100% de atividade. A estabilidade e a atividade enzimática residual (%), após os 30 dias de armazenagem, foram determinadas com o mesmo método título métrico descrito por Macedo e colaboradores (1997).

### 3 Resultados e discussões

Um estudo para verificar quantos dias o extrato bruto enzimático manteria sua atividade em frente da adição de diferentes íons foi reali-

zado e os resultados são apresentados na Figura 1. Esse estudo demonstrou que íons como  $Fe^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  diminuíram significativamente a atividade lipolítica, causando inativação em menos de 10 dias de armazenagem. Por outro lado, a adição dos íons  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  conseguiu manter uma boa atividade enzimática durante os 30 dias, observando uma queda de atividade mais significativa a partir do 15º dia para os íons  $Ba^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  e 7º dia para o  $Mn^{2+}$ . Esses íons mantiveram ainda grande porcentagem de atividade enzimática no 30º dia em relação ao 1º dia. O íon  $I^{-}$  reduziu rapidamente sua atividade hidrolítica nos primeiros dias de armazenagem, embora após esse período tenha mantido 23% de atividade enzimática até o 30º dia. Íons como  $Al^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $K^{1+}$  fizeram com que a atividade lipolítica diminuísse em 75%, 40%, 45% e 50% até o 10º dia, respectivamente. Na enzima bruta também foi feito o estudo, onde se verificou queda de atividade gradativa no decorrer dos dias de armazenagem e no final do 30º dia houve queda de atividade de aproximadamente 80% em relação à armazenagem inicial. Estudos semelhantes com lípases de *Pseudomonas fluorescens* 2D foram realizados por Makhzoum e colaboradores (1995), os íons  $Co^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  mostraram ser fortes inibidores dessa enzima, enquanto  $Cu^{2+}$  e  $Ba^{2+}$  causaram inibição moderada e o  $Fe^{2+}$  não causou nenhum efeito sobre as lípases, o que pode ser atribuído ao complexismo desses íons com a enzima.

A Tabela 1 mostra a atividade residual da lipase de *Pseudomonas cepacia* ao final de 30 dias de armazenagem. A atividade lipolítica teve considerável ativação (40% de aumento na atividade) do ânion  $I^{-}$ . Os íons  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  mantiveram a estabilidade da enzima durante esse período e os íons  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  e  $Al^{3+}$  atuaram como inibidores, causando considerável inativação enzimática. A adição de íons às lípases de



**Figura 1: Efeito dos íons na atividade hidrolítica da lipase de *Pseudomonas cepacia* (5,0 mL de emulsão de óleo de oliva 7,5% e goma arábica 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0 a 37°C)**

Fonte: Os autores.

**Tabela 1: Efeito dos íons a 0,10M sobre a atividade das lípases de *Pseudomonas cepacia* após 30 dias de armazenagem**

Soluções 0,10 M	Atividade residual (%)
MnSO <sub>4</sub>	100
KCl	60
BaCl <sub>2</sub>	60
FeSO <sub>4</sub>	0
CoCl <sub>2</sub>	100
HgCl <sub>2</sub>	0
KI	140
CaCl <sub>2</sub>	100
CuSO <sub>4</sub>	60
AlCl <sub>3</sub>	0
Controle	100

Fonte: Os autores.

*Bacillus sp* RSJ-1, estudados por Sharma e colaboradores (2002), mostrou que na presença de Ba<sup>2+</sup> a enzima manteve-se estável, por outro lado, íons como K<sup>1+</sup> e Co<sup>2+</sup> foram grandes inibidores da enzima lipolítica, no entanto Ca<sup>2+</sup> manteve a enzima bastante ativa (125% de aumento na atividade em relação ao controle). Nos estudos realizados por Makhzoum e colaboradores (1995), em lípases de *Pseudomonas fluorescens*,

os íons Co<sup>2+</sup> e Ba<sup>2+</sup> corroboraram com esses resultados e Lima e colaboradores (2004) para a lipase de *Penicillium aurantiogriseum* encontraram alguns resultados semelhantes aos deste trabalho, onde íons Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup> mantiveram 70%, 79%, 105%, 69% e 0% da atividade residual, respectivamente.

## 4 Conclusões

A atividade enzimática foi mantida nos 30 dias de armazenagem quando o extrato bruto foi incubado junto aos íons Ba<sup>2+</sup>, I<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>, a enzima manteve 100% ou mais de atividade enzimática, enquanto os íons Fe<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup> inativaram a enzima em menos de 10 dias.

Quanto à influência dos íons na atividade da lipase, observou-se uma ativação desta na presença do íon I<sup>-</sup>, os íons Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> mantiveram a atividade, enquanto o Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> atuaram como inibidores, prejudicando a atividade catalítica da enzima.

## Referências

- BORGSTRÖM, B.; BROCKMAN, H. *Lipases*. New York: Elsevier, 1984.
- CASTIGLIONI, G. L.; MONTE ALEGRE, R. Produção simultânea de lipase e bioemulsificante por *Pseudomonas cepacia*. In: 6º Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, 2007.
- DU, W.; LIU, D.; LI, L.; XU, Y.; LI, W. Processo para a produção de biodiesel a partir de óleo renovável na presença de catálise por lipase em um sistema de reação em meio orgânico. Patente nº PI0418062-3, 2007.
- FACCIO, C. Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da produção da alcoólise de óleos vegetais. 2004. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, URI, Erechim, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.



JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications lipases. *Annual Review of Microbiology*, v.53, p. 315-351, 1999.

KIRK, O; BORCHERT T.V.; FUGLSANG C.C. Industrial Enzymes applications. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 345-351, 2002.

KORDEL, M., HOFMANN, B., SCHOMBURG, D., SCHMID, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp* Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 4836-4841, 1991.

LIMA, V. M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* ins aqueous media and organic solvents. *Biochemical and Engineering Journal*, v. 18, p. 65-71, 2004.

MACEDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp*. *Journal of the Brazilian Society for Microbiology*, v. 28, p. 90-95, 1997.

MAKHZOOM, A.; APENTEN, R.K.O.; KNAPP, J.S. Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *Elsevier*, v. 95, p. 459-472, 1995.

OLIVEIRA, D; OLIVEIRA, J. V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n.2, p.178-182, 2004.

OLIVEIRA, I. M. A. Produção e caracterização da  $\beta$ -frutofuranosidase de *Aureobasidium sp* e sua aplicação na produção de frutooligossacarídeos. 1997. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, São Paulo, 1997.

PADILHA, G. S.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE R. M.; TAMBOURGI, E. B. Recuperação e caracterização bioquímica de uma lipase alcalina extracelular de *Pseudomonas cepacia*. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Recife, 2007.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*. *Ciência. e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 135-140, 2003.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a thermophilic *Bacillus sp*. RSJ-1. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.

VULFSON, E. N. *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, p. 271, 1994.

Recebido em 30 mar. 2009 / aprovado em 7 out. 2009

**Para referenciar este texto**

PADILHA, G. S.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. *Exacta*, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 181-186, 2009.