

Fernanda R. Bresciani¹, Walter O. Beys da Silva¹, Lucélia Santi¹, Alexandre J. Macedo^{1,3}, Wolf-Rainer Abraham⁴, Augusto Schrank^{1,2}, Marilene H. Vainstein^{1,2}.

¹Centro de Biotecnologia; ²Departamento de Biotecnologia e Biologia Molecular; ³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul; ⁴Helmoltz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany. fernandabresciani@gmail.com

Introdução

Lipases produzidas por microrganismos são amplamente utilizadas na indústria por sua versatilidade, facilidade de manipulação genética e cultivo [1, 2]. A caracterização de novos microrganismos produtores de lipase pode prover fontes de enzima com diferentes especificidades e potencialidades. Contudo, estima-se que apenas 2% da microbiota tem sido testada [2]. Nesse contexto, foi realizada a otimização da produção da atividade lipolítica por *Luteibacter* sp., uma bactéria Gram-negativa isolada e descrita em 2005 [3]. Além disso, foi realizada a caracterização da atividade produzida relacionada ao seu potencial biotecnológico.

Materiais e Métodos

Produção inicial de lipase: Erlenmeyers de 125 ml, 30 ml LB 10%, 2% de fonte lipídica, 30 °C e 150 rpm, por 72 h (cultivos em triplicata em agitador orbital).

Inóculo: 100 µL (OD₆₀₀ = 0.3) de *Luteibacter* sp. **Fontes lipídicas testadas:** óleo de babaçu, canola, milho, algodão, linhaça, oliva, arroz, soja, gordura suína e bovina. **Condições de cultivo:** após a seleção da melhor fonte lipídica, foram testadas melhor concentração da fonte (1, 2, 3 ou 4%), melhor pH inicial de cultivo (pH 6, 7, 8 ou 9), temperatura (25, 30 ou 37 °C). A atividade lipásica foi mensurada em sobrenadante de cultura centrifugado a 14 000 rpm por 10 min (LCS – lipase em sobrenadante de cultura). Também foi testada a adição de 0,25% de surfactantes (Tween 20, Tween 80, SDS ou Triton X-100) antes da centrifugação.

Ensaio de atividade lipásica: foram realizados de acordo com Silva *et. al* [4], utilizando p-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, incubação de 30 min e leitura a 410 nm.

Caracterização enzimática: ensaio de especificidade por substrato (diferentes p-nitrofenil ésteres); efeito da temperatura, pH, cátions e diferentes reagentes sobre a atividade lipásica.

Atividade de transesterificação: método descrito por Teng and Xu [5], utilizando p-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato diluído em hexano, com adição de etanol, amostras de sobrenadante liofilizadas, incubação por 30 min e leitura a 410 nm.

Atividade de hidrólise de substratos naturais: titulação de ácidos graxos de acordo com Colen *et. al* [6].

Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1.0 µmol de ácido graxo nas condições dos ensaios realizados.

Controles: água destilada ao invés de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. **Análise estatística:** análise de variância (ANOVA), seguida por teste Tukey (P < 0.05) - *software* ANOVABrown.

Resultados

• Condições de cultivo

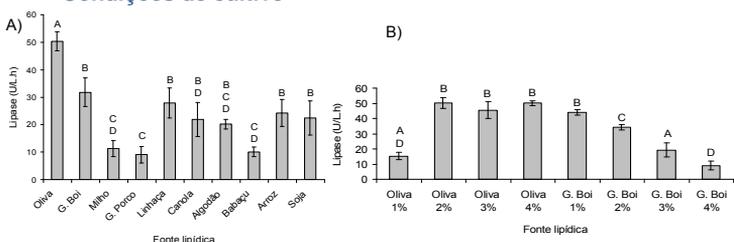


Fig. 1: Efeito da fonte lipídica sobre a produção de lipase em meio basal por *Luteibacter* sp: (A) Produção de lipase utilizando diferentes fontes lipídicas na concentração de 2%; (B) produção de lipase utilizando óleo de oliva ou gordura bovina em diferentes concentrações. As barras representam o desvio padrão e as médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença de acordo com o teste Tukey ($\alpha=0.05$).

Utilizando óleo de oliva 2% como fonte lipídica, houve maior atividade lipásica no sobrenadante (LCS) quando o pH inicial do meio basal foi 6, e o cultivo foi realizado a 37 °C. A atividade lipásica aumentou em 80 % com a adição de Tween 80 antes da centrifugação, e este sobrenadante foi chamado LCST80. Prosseguimos os ensaios de caracterização da atividade em sobrenadante com LCS e LCST80.

• Caracterização de LCS e LCST80

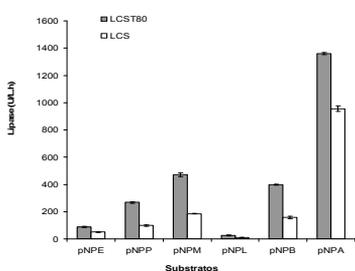


Fig. 2: Efeito do comprimento da cadeia acil sobre a atividade lipásica de LCS e LCST80. Substratos pNP ésteres utilizados: pNPA (2C), pNPB (4C), pNPM (14C), pNPP (16C) e pNPS (18C).

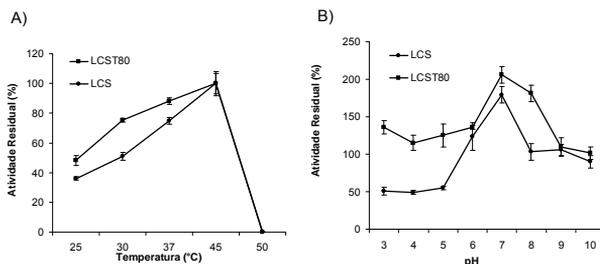


Fig. 3: Temperatura ótima e estabilidade em diferentes pHs da atividade lipásica de LCS e LCST80: (A) atividade hidrolítica sobre pNPP determinada nas temperaturas indicadas utilizando tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0; (B) efeito do pH sobre a estabilidade lipásica de LCS e LCST80, os extratos foram pré-incubados a 45 °C por 30 min em tampões com diferentes pHs.

Tab. 1: Efeito de cátions e diferentes reagentes sobre a atividade lipásica de LCS e LCST80.

Cátion ou reagente*	Atividade lipásica residual (%)	
	LCST80	LCS
Controle	100 ± 7.44	100 ± 0
Ca ²⁺ 5mM	110.53 ± 10.53	198.2 ± 12.21
Zn ²⁺ 5mM	315.79 ± 7.44	505.15 ± 10.33
Co ²⁺ 5mM	60.53 ± 18.61	78.3 ± 2.08
Mg ²⁺ 5mM	113.16 ± 3.72	135.71 ± 10.10
EDTA 5mM	110.53 ± 7.44	155.4 ± 4.3
EGTA 5mM	163.16 ± 9.12	170.33 ± 5.25
Triton X-100 0.5%	114.03 ± 3.04	228.57 ± 57.14
SDS 0.5%	282.46 ± 12.15	521.43 ± 10.10
Metanol 0.5%	165.79 ± 3.72	264.29 ± 30.30

± Desvio padrão (baseado em três replicatas).

*LCS e LCST80 foram pré-incubados a 45 °C durante 30 min com diferentes reagentes. A atividade residual é expressa relativamente a um controle feito com LCS ou LCST80 adicionado de água destilada ao invés dos reagentes testados.

Tab. 2: Atividade de transesterificação de LCS e LCST80.

Substrato	Atividade lipásica (U/L.h)	
	LCST80	LCS
pNPP	2.078 ± 0.714	2.270 ± 0.110
pNPM	2.511 ± 0.306	3.124 ± 0.459

± Desvio padrão (baseado em três replicatas).

Tab. 3: Atividade lipásica de LCS e LCST80 sobre diferentes substratos naturais.

Substrato	Atividade lipásica (U/ml.h)					
	30 °C		37 °C		45 °C	
	LCST80 ^{a,b}	LCS ^a	LCST80 ^a	LCS ^a	LCST80 ^a	LCS ^a
Canola	10.0 ± 0.0	15.0 ± 7.1	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	16.7 ± 5.8
Milho	14.0 ± 5.5	33.3 ± 5.8	10.0 ± 0.0	15.0 ± 7.1	16.7 ± 5.8	20.0 ± 0.0
Oliva	16.7 ± 5.8	35.0 ± 7.1	23.3 ± 5.8	23.3 ± 5.8	20.0 ± 10.0	25.0 ± 7.1
Soja	10.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	20.0 ± 0.0	16.7 ± 5.8	16.7 ± 5.8
Gordura bovina	26.7 ± 5.8	50.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Mistura de óleos	13.3 ± 5.8	150.0 ± 0.0	15.0 ± 7.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0

Titulação de ácidos graxos utilizando óleos vegetais e gordura bovina, incubado a diferentes temperaturas, durante 30 min a 150 rpm na presença de LCS ou LCST80. ± Desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Conclusões

A caracterização da atividade lipásica produzida por *Luteibacter* sp. introduz esse gênero como uma nova fonte de lipases com grande potencial biotecnológico em diferentes segmentos industriais.

Referências

- Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS. J Microbiol Methods 2003;52:1-18.
- Hasan F, Ali Shah A, Hameed A. Enzyme Microb Technol 2006;39:235-51.
- Johansen JE, Binnerup SJ, Kroer N, Melbak L. Int J Syst Evol Microbiol 2005;55:2285-91.
- Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH. Proc Biochem 2005;40:321-6.
- Teng Y, Xu Y. Anal Biochem 2007;363:297-9.
- Colen G, Junqueira RG, Morais-Santos T. World J Microbiol Biotechnol 2006;22:881-5.