

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Comissão de Graduação
Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas

Fernanda Regina Bresciani

**Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. e
caracterização do potencial biotecnológico**

Porto Alegre

2011

Fernanda Regina Bresciani

**Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. e
caracterização do potencial biotecnológico**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Marilene Henning Vainstein.

Co-orientador:

Dr. Walter Orlando Beys Silva

Porto Alegre,

2011.

Nota:

Este trabalho está apresentado na forma de artigo, seguindo as normas da revista "*Process Biochemistry*", a qual já foi submetido. A revista pediu a reavaliação de alguns aspectos do trabalho para que ele seja aceito. Para a re-submissão do trabalho, as correções sugeridas pela banca avaliadora do Trabalho de Conclusão de Curso serão levadas em consideração.

Agradecimentos

Agradeço a prof^a. Dra. Marilene Vainstein pela confiança e pelas oportunidades que me deu.

Ao Dr. Walter Beys, pelos ensinamentos e amizade.

Ao prof. Dr. Alexandre Macedo, por ceder o microrganismo para o estudo, e por toda a colaboração ao longo do trabalho.

Aos membros da banca, Dra. Livia K. Rosa e Silva e Dra. Lucélia Santi, por aceitarem o convite, pelas contribuições valiosas e pela amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, e aos colegas do laboratório 220 e 214.

Aos meus pais pelo apoio, e a minha irmã pelos conselhos.

Ao Marc pela compreensão e carinho.

1 **Otimização da produção de lipase por *Luteibacter* sp. e caracterização do**
2 **potencial biotecnológico**

3 Fernanda R. Bresciani^a, Alexandre J. Macedo^{a,b}, Wolf-Rainer Abraham^c, Augusto

4 Schrank^{a,d}, Marilene H. Vainstein^{a,d}, Walter O. Beys-da-Silva^{a*}.

5 ^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

6 ^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

7 ^c Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Alemanha

8 ^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio

9 Grande do Sul, Brasil

* Autor para correspondência: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone +55 (051) 3308-6060 e Fax +55 (051) 3308-7309. walterbeys@cbiot.ufrgs.br

10 **Resumo**

11 Lipases produzidas por micro-organismos são amplamente utilizadas na
12 indústria devido a sua versatilidade. A caracterização de novos micro-organismos
13 produtores destas enzimas pode prover novas fontes com diferentes especificidades
14 e melhores atividades. Neste contexto, a produção de lipase por *Luteibacter* sp. foi
15 otimizada, utilizando óleo de oliva 2 % adicionado a um meio basal com pH 6 e
16 temperatura de cultivo de 37 °C. A adição do surfactante Tween 80 a 0,25 % após o
17 cultivo da bactéria também aumentou a atividade lipolítica produzida. Com a
18 otimização da produção, a atividade aumentou em cerca de 430 %. A enzima
19 produzida em sobrenadante de cultura (LCS) e extraída com adição de Tween 80
20 (LCST80) foi caracterizada. Ambos os extratos hidrolisaram pNP ésteres com
21 diferentes tamanhos de cadeia carbônica, com preferência por cadeias acil curtas, e
22 apresentaram temperatura ótima de atividade de 45 °C. LCS foi estável em pHs
23 ácidos e alcalinos, enquanto LCST80 foi estável apenas em pHs alcalinos. Metanol,
24 SDS, Triton X-100, EDTA e EGTA não afetaram a atividade da enzima e cátions
25 divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}), exceto Co^{2+} , aumentaram a atividade lipolítica. Ambos
26 os extratos apresentaram atividade de transesterificação sobre pNP ésteres e foram
27 capazes de hidrolisar diversos lipídeos naturais. A caracterização da atividade
28 lipolítica produzida por *Luteibacter* sp. introduz este gênero como uma nova fonte de
29 lipases com grande potencial biotecnológico.

30

31 *Palavras-chave:* lipase; *Luteibacter* sp.; transesterificação; biodiesel; extração de
32 lipase; caracterização enzimática.

33 1. Introdução

34

35 Enzimas microbianas são amplamente utilizadas na indústria por sua
36 versatilidade e facilidade de cultivo e manipulação genética dos micro-organismos
37 [3,4]. Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são serino hidrolases que
38 catalisam a hidrólise de ligações éster de lipídios na interface óleo/água [1,2,3].
39 Muitas lipases são ativas em solventes orgânicos, promovendo reações de síntese e
40 hidrólise, entre outras, com relevância industrial [2]. Contrastando com os
41 catalisadores químicos, reações enzimáticas geralmente são realizadas em
42 condições amenas, com baixo custo energético, apresentando grande interesse
43 industrial.

44 Pela grande variedade de reações que catalisam, lipases são utilizadas em
45 diversos segmentos industriais, como indústria coureira, de detergentes, de
46 alimentos, cosmética, farmacêutica e na produção de biodiesel, entre outras
47 aplicações [2,4]. A prospecção de novos micro-organismos secretores de lipases,
48 estudos visando o aumento e otimização da produção enzimática e a caracterização
49 da atividade lipolítica são muito importantes, pois permitem a obtenção de novas
50 fontes de lipase com diferentes características bioquímicas [5]. Contudo, estima-se
51 que apenas 2 % dos micro-organismos do mundo têm sido avaliados como fontes
52 enzimáticas [4]. Neste contexto, torna-se evidente a importância do estudo de micro-
53 organismos recentemente descritos para produção de lipases e a caracterização e
54 avaliação do potencial biotecnológico associado.

55 A bactéria gram-negativa, *Luteibacter* sp., foi isolada e descrita pela primeira
56 vez em 2005, no solo da rizosfera de *Hordeum vulgare* L. [6]. Desde então,
57 *Luteibacter* sp. tem sido descrita como uma bactéria de solo [7,8,9], capaz de

58 degradar cefalomanina [10], poluentes xenobióticos como bifenilas policloradas
59 (PCB) [7] e formar biofilme associado a líquens [11]. Este trabalho descreve pela
60 primeira vez, a capacidade desta nova espécie em produzir lipases com um amplo
61 potencial biotecnológico. Para tanto, a produção de lipases por *Luteibacter* sp. em
62 meio de baixo custo foi otimizada, e o perfil lipolítico das enzimas produzidas em
63 sobrenadante de cultura foi caracterizado.

64

65 **2. Material e Métodos**

66

67 *2.1. Micro-organismo*

68

69 A linhagem de *Luteibacter* sp. utilizada neste trabalho foi isolada de biofilmes
70 sobre óleos bifenil policlorados, de solos contaminados na Alemanha,
71 (52°N39.923'/09°E 48.563') [12]. O micro-organismo foi mantido em placas de ágar
72 contendo meio Luria-Bertani (LB - 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 10 g
73 de cloreto de sódio por litro) a 4 °C. A sequência de DNA do gene que codifica rRNA
74 16S foi amplificada por PCR e sequenciada como descrito previamente [13] para
75 identificação molecular. As reações foram avaliadas no seqüenciador automático
76 Applied Biosystems 377, e o programa EQUENCHERTM Versão 4.0.5 (Gene Codes
77 Corporation, EUA) foi utilizado para analisar as sequências. O alinhamento de
78 sequências foi feito por BLAST 2.2.9 [14] contra o banco de dados EMBL [15], e a
79 sequência foi depositada sob o número de acesso FR714940 no banco de dados
80 NCBI.

81

82 *2.2. Produção de lipase e condições de cultivo*

83 O meio basal utilizado para produção de lipase foi Luria Bertani (LB) 10 %
84 diluído em água destilada, esterilizado em autoclave a 121 °C. Todas as fontes
85 lipídicas utilizadas foram previamente esterilizadas por calor seco (180 °C, 60 min) e
86 adicionadas após a esterilização do meio basal. Os cultivos foram realizados em
87 triplicata, em frascos tipo *Erlenmeyer* de 125 mL, contendo 30 mL de meio por 72 h
88 em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C. O meio de cultivo contendo 2 % (v/v) de
89 diferentes óleos vegetais (babaçu, canola, milho, algodão, linhaça, oliva, arroz ou
90 soja) ou gordura animal (suína ou bovina) foi inoculado com 100 µL (de um inóculo
91 com OD₆₀₀ = 0,3) de pré-inóculo de *Luteibacter* sp. (cultivado por 14 h em LB 10%).

92 As duas melhores fontes lipídicas indutoras da produção de lipase, óleo de
93 oliva e gordura bovina, também foram testadas em diferentes concentrações no
94 meio de cultura: 1 %, 2 %, 3 % e 4 % (v/v). Para avaliação do melhor pH inicial do
95 meio para produção de lipase, cinco diferentes valores de pH foram testados (pH 5,
96 6, 7, 8 e 9). O pH do meio foi ajustado com adição de HCl 1M ou NaOH 1M.
97 Diferentes temperaturas de cultivo (25, 30 e 37 °C) também foram analisadas.

98 O efeito de surfactantes para extração da lipase foi avaliado utilizando Triton X-
99 100, Tween 80, Tween 20 e SDS, a 0,25 % (v/v) (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA)
100 [1]. Os surfactantes foram adicionados ao meio após o cultivo [1]. Para o preparo do
101 extrato rico em lipases, o cultivo, com ou sem adição de surfactantes, foi
102 centrifugado (14.000 g por 7 min), e o sobrenadante coletado. O extrato rico em
103 lipase obtido sem adição de surfactantes foi nomeado LCS. O extrato rico em lipases
104 obtido com adição de Tween 80 a 0,25 %, foi nomeado LCST80.

105

106 2.3. Determinações analíticas

107

108 A atividade lipolítica em LCS e LCST80 foi mensurada utilizando o substrato
109 sintético *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP, Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA). Amostras
110 (LCS ou LCST80, 20 μ L) foram misturadas com 80 μ L de solução de substrato em
111 pH 8,0 (0,3 mg/ml de *p*-NPP) [1]. Após 30 min de incubação a 37 °C, a absorbância
112 foi mensurada espectrofotometricamente a 410 nm em um leitor de placas
113 Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), sendo descontada a leitura de
114 um controle preparado com 20 μ L de água destilada no lugar das amostras. A
115 atividade enzimática foi determinada com referência a uma curva de calibração do
116 produto da reação, *p*-nitrofenol (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA). Uma unidade de
117 lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μ mol de *p*-
118 nitrofenol nas condições de ensaio. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados
119 em triplicata, e o valor médio foi calculado.

120

121 *2.4. Caracterização de LCS e LCST80*

122

123 Os ensaios de caracterização enzimática foram realizados utilizando o
124 substrato *p*NPP como descrito acima. A temperatura ótima para atividade enzimática
125 de LCS e LCST80 foi determinada testando diferentes temperaturas de ensaio (25,
126 30, 37, 45 e 50 °C). A estabilidade da atividade lipolítica em diferentes valores de pH
127 foi determinada pré-incubando LCS e LCST80 antes do ensaio em tampões com
128 diferentes valores de pH (de 3,0 a 10,0) a 45 °C durante 30 min. Os tampões
129 utilizados foram: ácido cítrico/fosfato de sódio (de pH 3 a 7), tris-HCl (de pH 7 a 9) e
130 carbonato de sódio/bicarbonato de sódio (pH 10) todos em concentração final de 25
131 mM. O efeito de cátions divalentes, detergentes, agentes quelantes e metanol sobre

132 a atividade lipolítica, também foi determinado pela pré-incubação de LCS e LCST80
133 em diferentes soluções durante 30 min a 45 °C antes do ensaio. As soluções para
134 teste do efeito de cátions divalentes continham 5 mM de sais de cloreto de cobalto,
135 magnésio, zinco ou cálcio. Triton X-100, e SDS a 0,5% (Sigma Chem. Co., St. Louis,
136 EUA) foram utilizados para avaliar os efeitos de detergentes. Metanol (Merck), e os
137 quelantes EDTA e EGTA (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) foram utilizados em
138 concentração de 0,5 % nas mesmas condições descritas acima.

139 Para determinação da especificidade por substratos, ρ NP-estereato (ρ NPE, 18
140 carbonos), ρ NPP (16 carbonos), ρ NP-miristato (ρ NPM, 14 carbonos), ρ NP-butirato
141 (ρ NPB, 4 carbonos) e ρ NP-acetato (ρ NPA, 2 carbonos) (Sigma Chem. Co., St. Louis,
142 EUA) foram utilizados como substrato.

143 A atividade de esterificação foi mensurada de acordo com Teng e Xu [16]. A
144 atividade enzimática foi determinada com referência a uma curva de calibração do
145 produto ρ -nitrofenol (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). Uma unidade de lipase (U)
146 foi definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μ mol de ρ -nitrofenol nas
147 condições de ensaio. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata e
148 os valores médios foram calculados.

149 A medida de atividade lipolítica por titulação de ácidos graxos foi feita de
150 acordo com Colen et al. [17]. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a
151 quantidade de enzima que libera 1,0 μ mol de ácidos graxos nas condições de
152 ensaio. Controles foram feitos com água destilada no lugar de LCS e LCST80.
153 Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os valores médios foram calculados.

154

155 *2.5 Análise estatística*

156

157 A significância estatística dos tratamentos foi determinada por Análise da
158 Variância (ANOVA), seguida por teste Tukey ($P < 0.05$) no programa para análise
159 estatística *ANOVABrown*.

160

161 **3. Resultados e discussão**

162

163 *3.1. Identificação molecular de Luteibacter rhizovicius*

164

165 O alinhamento da sequência de DNA do gene que codifica o rRNA 16S por
166 BLAST contra o banco de dados EMBL permitiu a identificação da linhagem isolada,
167 ao nível de gênero, *Luteibacter* sp., apresentando 99 % de similaridade com a
168 linhagem LJ96 desta espécie *Luteibacter rhizovicius*.

169

170 *3.2. Produção e extração de lipase*

171

172 Diversos estudos demonstram o aumento da produção de lipases quando
173 óleos são utilizados no meio de cultivo como indutores da secreção enzimática [2].
174 Entre as fontes lipídicas testadas neste trabalho, óleo de oliva apresentou o melhor
175 resultado, com maior valor de atividade lipolítica no sobrenadante de cultura (Fig.
176 1A). Tem sido demonstrado que a capacidade do óleo de oliva induzir a produção de
177 lipase pode ser atribuída à sua composição, formada em mais de 70 % por ácido
178 oléico [18].

179 O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, assim, a gordura
180 bovina é um substrato abundante e comercialmente estratégico no país. Por isso,

181 testamos a influência de diferentes concentrações de óleo de oliva (a melhor fonte
182 lipídica) e gordura bovina (um substrato alternativo, com segundo melhor resultado
183 na produção de lipases). A adição de óleo de oliva em concentração de 2, 3 e 4 %
184 produziu os maiores valores de atividade lipolítica para esta fonte, sem diferença
185 estatística. Já para gordura bovina, a atividade foi inversamente proporcional à
186 concentração (Fig. 1B), seguindo um declínio linear na atividade lipolítica na
187 presença de altas concentrações deste substrato.

188 Utilizando óleo de oliva 2 % como fonte lipídica, houve aumento na produção
189 de lipase quando variamos o pH inicial do meio e a temperatura de cultivo. O melhor
190 pH inicial de cultivo foi 6, enquanto em pH 7, 8 e 9 a atividade lipolítica foi
191 aproximadamente metade da obtida em pH 6 (Tabela 1). Este resultado está de
192 acordo com o observado para outras bactérias, como *Bacillus* sp. [19] e *Geobacillus*
193 sp. [20]. A temperatura de cultivo também influenciou fortemente a produção de
194 lipase, com aumento de 3 vezes na atividade a 37 °C quando comparada com
195 cultivo a 25 °C (Tabela 1), resultado observado para outras bactérias [21].

196 Já é bem descrito que surfactantes podem facilitar o contato entre enzima e
197 substrato, provavelmente alterando a conformação estrutural da lipase ou
198 propriedades da interface óleo/água, aumentando a atividade enzimática
199 [1,21,22,23]. Além disso, a adição de surfactantes para extração de lipases aumenta
200 a concentração de enzimas no sobrenadante de cultura, permitindo a liberação de
201 enzimas que estão associadas à superfície celular externa [24], como descrito para
202 lipases de esporo de *Metarhizium anisopliae* [22,25]. A adição de Tween 80 ao
203 cultivo (produzido em pH 6, com 2 % de óleo de oliva, a 37 °C) antes da
204 centrifugação, resultou em aumento de 80 % na atividade lipolítica, enquanto SDS
205 reduziu a atividade em cerca de 30 % da atividade original. Como *Serratia*

206 *marcescens*, *Luteibacter* sp. exibiu forte inibição da atividade lipolítica por Triton X-
207 100 [26].

208 Comparando os valores de atividade lipolítica no início dos experimentos de
209 produção (Fig. 1) com os valores obtidos após a otimização e extração de lipase,
210 houve um aumento na atividade em cerca de 215 U/L ou 427 %. Estes resultados
211 atestam a relevância de estudos como esse para produção de enzimas.

212

213 3.3. Caracterização da atividade de LCS e LCST80

214

215 Considerando o aumento da atividade observada com adição de Tween 80
216 ao cultivo antes da centrifugação, decidimos também caracterizar a atividade deste
217 sobrenadante de cultura, nomeado LCST80. Como esperado, as enzimas presentes
218 nos sobrenadantes de cultura atuam variavelmente sobre substratos sintéticos com
219 diferentes comprimentos de cadeia carbônica (Fig. 2). Tanto LCS como LCST80
220 hidrolisaram todos os substratos testados, com o mesmo padrão de atividade, porém
221 a atividade lipolítica em LCST80 foi sempre cerca de 1,4 a 2,7 vezes maior quando
222 comparada com LCS em relação ao mesmo substrato. Os maiores valores de
223 atividade hidrolítica foram observados sobre ρ NPA (com dois carbonos na cadeia de
224 ácido graxo) como previamente descrito para lipase da superfície de esporo de *M.*
225 *anisopliae* [22]. Lipases podem atuar sobre substratos com cadeia carbônica curta
226 ou longa, mas a capacidade de hidrolisar substratos com cadeia longa é uma
227 diferença básica entre lipases e esterases, sendo exclusiva das primeiras [22,29]. O
228 alto valor de atividade lipolítica sobre substrato com cadeia carbônica curta aponta
229 para a possibilidade da presença também de esterases ou mais de uma lipase nos
230 sobrenadantes.

231 A presença de atividade enzimática sobre todos os substratos testados é
232 uma característica interessante para aplicações biotecnológicas, como formulação
233 de detergentes e tratamento de resíduos, os quais requerem a habilidade de
234 hidrolisar substratos com diferentes composições lipídicas e comprimentos de cadeia
235 diversificados [2,3]. LCS e LCST80 apresentaram aumento na atividade lipolítica
236 com elevação na temperatura de ensaio, sendo 45 °C a temperatura ótima (Fig. 3).
237 Este resultado está de acordo com o observado para lipase purificada de
238 *Aeromonas sobria* [5]. A determinação da temperatura ótima de atividade enzimática
239 é importante porque diversos processos industriais geralmente necessitam de
240 temperaturas específicas ou até mesmo de aquecimento em uma ou mais etapas.
241 Da mesma forma, a influência de aditivos na atividade lipolítica é importante, já que
242 muitas vezes enzimas são utilizadas em diferentes formulações, como no caso de
243 detergentes enzimáticos e outras aplicações industriais como síntese química
244 [30,31]. Com isso, testamos a cátions divalentes, detergentes e metanol sobre a
245 atividade de LCS e LCST80. Ambos os extratos apresentaram aumento de atividade
246 de lipase na presença de cátions divalentes, com exceção de Co^{2+} , que diminuiu em
247 aproximadamente 22 % e 39 % a atividade de LCS e LCST80, respectivamente
248 (Tabela 2). Cálcio frequentemente estimula a atividade lipásica, provavelmente pela
249 remoção de produtos da hidrólise, através da formação de um complexo insolúvel de
250 sais de cálcio e ácidos graxos ou simplesmente por estabilização estrutural da
251 enzima [21,22]. Os agentes quelantes EDTA e EGTA não inibiram a atividade
252 lipásica, sugerindo que as lipases nos sobrenadantes não são metais-dependentes
253 (Tabela 2). Da mesma forma, a presença de metanol e detergentes (SDS e Triton X-
254 100), não afetou a atividade lipolítica de LCS e LCST80 (Tabela 2), reforçando o
255 potencial de uso destas lipases na síntese química.

256 No ensaio de estabilidade da atividade enzimática frente a diferentes valores
257 de pH, ambos extratos, LCS e LCST80, apresentaram maior atividade lipolítica em
258 pH 7, mas a atividade de LCS foi cerca de 26 % maior que de LCST80 (Fig. 4). LCS
259 mostrou-se estável em pHs ácidos e alcalinos, mas a atividade em LCST80 diminuiu
260 aproximadamente 50 % em pHs ácidos (3,0 – 5,0), sendo que a partir de pH 6,0 há
261 um aumento na atividade lipolítica que é mantido em pHs alcalinos (Fig. 4).

262

263 *3.4. Ensaio de atividade lipolítica utilizando lipídeos naturais como substrato e* 264 *transesterificação*

265

266 No ensaio de titulação, LCS e LCST80 apresentaram atividade sobre
267 diferentes óleos naturais e gordura bovina, sendo os melhores resultados obtidos
268 com incubação a 30 °C (Tabela 3). A presença de atividade lipolítica de LCS e
269 LCST80 sobre diferentes lipídios naturais, demonstra grande potencial para
270 produção de biodiesel, entre diversas outras aplicações. Além disso, a atividade
271 sobre substratos com composição lipídica variada é uma característica importante
272 para lipases utilizadas em detergentes, as quais devem atuar sobre misturas com
273 composição variada [2,29].

274 A alta viscosidade de óleos vegetais e gorduras animais é uma característica
275 desvantajosa para o uso destas matérias primas como combustíveis alternativos.
276 Porém, a substituição de glicerol por uma molécula de álcool (etil ou metil) leva a
277 redução da viscosidade de triglicerídeos. Assim, reações de transesterificação
278 assumem uma posição central na produção de biodiesel [32,33,34]. Tanto LCS
279 quanto LCST80 apresentaram atividade de transesterificação sobre ρNPP (16C) e

280 ρ NPM (14C). LCS apresentou atividade lipolítica de $2,270 \pm 0,110$ U/L sobre ρ NPP e
281 $3,124 \pm 0,459$ U/L sobre ρ NPM, enquanto LCST80 apresentou atividade de $2,078 \pm$
282 $0,714$ U/L sobre ρ NPP e $2,511 \pm 0,306$ U/L sobre ρ NPM. O uso de enzimas para
283 transesterificação permite a síntese de ésteres alquila específicos, fácil recuperação
284 do glicerol e reação com triglicerídeos com alto conteúdo de ácidos graxos livres
285 [32]. Há uma grande diversidade de matéria prima no Brasil para produção de
286 biodiesel, uma vez que o país é o segundo maior produtor de soja [36], o terceiro
287 maior produtor de óleo de mamona [35] e, como mencionado previamente, possui o
288 maior rebanho bovino comercial no mundo, produzindo grandes quantidades de
289 gordura bovina. Além disso, o Brasil produz comercialmente diversos outros óleos
290 vegetais, como óleo de algodão, palma, babaçu e girassol, entre outros [35,36]. Óleo
291 de soja, gordura bovina e óleo de algodão têm sido as matérias primas mais
292 utilizadas para produção de biodiesel no Brasil [35]. Em 2004, o Programa Nacional
293 de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi criado para introduzir biocombustíveis
294 derivados de óleos e gorduras na matriz energética brasileira, estabelecendo a
295 adição de 2 % de biodiesel no óleo diesel produzido no Brasil desde 2008 [36]. Com
296 esta lei, a produção de biocombustíveis tem crescido rapidamente, aumentando o
297 incentivo para pesquisas nesta área e o interesse por novas tecnologias que
298 objetivem a otimização da produção de biodiesel, incluindo o uso de lipases.

299 Avanços nos conhecimentos sobre produção de lipases, o isolamento de
300 novos microrganismos produtores e a caracterização de suas atividades lipolíticas
301 são passos muito importantes para consolidar estas enzimas em diferentes
302 segmentos industriais. A caracterização da atividade lipolítica produzida por
303 *Luteibacter* sp. introduz este gênero recentemente descrito como uma nova fonte de

304 lipases com grande potencial biotecnológico. Estudos futuros com o objetivo de
305 isolar e caracterizar as lipases produzidas podem facilitar a aplicação destas
306 enzimas em diferentes propostas industriais.

307

308 **Agradecimentos**

309

310 Os autores agradecem o suporte financeiro do Conselho Nacional de
311 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de
312 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

313

314 **Referências**

- 315 [1] Silva WOB, Mitidieri S, Schrank A, Vainstein MH. Production and extraction of
316 an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium*
317 *anisopliae*. Proc Biochem 2005;40:321–6.
- 318 [2] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and
319 applications of lipases. Biotechnol Adv 2001;19:627–62.
- 320 [3] Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS. Purification strategies for
321 microbial lipases. J Microbiol Methods 2003;52:1-18.
- 322 [4] Hasan F, Ali Shah A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases.
323 Enzyme Microb Technol 2006;39:235-51.
- 324 [5] Lotrakul P, Dharmsthiti S. Purification and characterization of lipase from
325 *Aeromonas sobria* LP004. J Biotechnol 1997;54:113-20.
- 326 [6] Johansen JE, Binnerup SJ, Kroer N, Mølbak L. *Luteibacter rhizovicinus* gen.
327 nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the

328 rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). Int J Syst Evol Microbiol
329 2005;55:2285-91.

330 [7] Leigh MB, Prouzová P, Macková M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS.
331 Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a
332 PCB-contaminated site. Appl Environ Microbiol 2006;72(4):2331-42.

333 [8] Boer W, Wagenaar A, Gunnewiek PJAK, Veen JA. *In vitro* suppression of fungi
334 caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. FEMS
335 Microbiol Ecol 2007;59:177–85.

336 [9] Wang X, Song M, Gao C, Dong B, Zhang Q, Fang H, Yu Y. Carbendazim
337 induces a temporary change in soil bacterial community structure. J Environ Sci
338 2009;21:1679-83.

339 [10] Li J, Dai J, Chen X, Zhu P. Microbial transformation of cephalomannine by
340 *Luteibacter rhizovicinus*. J Nat Prod 2007;70(12):1846-9. Epub 2007 Nov 15.
341 Erratum in: J Nat Prod. 2008 Apr;71(4):742.

342 [11] Grube M, Cardinale M, Vieira de Castro J, Müller H, Berg G. Species-specific
343 structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses.
344 ISME J 2009;3:1105 - 15.

345 [12] Macedo AJ, Timmis KN, Abraham WR. Widespread capacity to metabolize
346 polychlorinated biphenyls by diverse microbial communities in soils with no
347 significant exposure to PCB contamination. Environ Microbiol 2007
348 Aug;9(8):1890-7.

349 [13] Abraham W-R, Ströempler C, Meyer H, Lindholst S, Moore ERB, Christ R,
350 Vancanneyt M, Tindall B, Bennisar A, Smit J, Tesar M. Phylogeny and
351 polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov.
352 with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and

353 emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. Int J Syst
354 Bacteriol 1999;49:1053-73.

355 [14] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment
356 search tool. J Mol Biol 1990;215:403-10.

357 [15] Kanz C, Aldebert P, Althorpe N, Baker W, Baldwin A, Bates K, Browne P, van
358 den Broek A, Castro M, Cochrane G, Duggan K, Eberhardt R, Faruque N,
359 Gamble J, Diez FG, Harte N, Kulikova T, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Mancuso
360 R, McHale et al. The EMBL nucleotide sequence database. Nucl Acids Res
361 2005;33:D29-33.

362 [16] Teng Y, Xu Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic
363 activity determination in organic solvent. Anal Biochem 2007;363:297-9.

364 [17] Colen G, Junqueira RG, Morais-Santos T. Isolation and screening of alkaline
365 lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World J Microbiol Biotechnol
366 2006;22:881-5.

367 [18] Wang D, Yan X, Shan T. Effects of oils and oil-related substrates on the
368 synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and
369 optimization of the lipase fermentation media. Biochem Eng J 2008;41:30-7.

370 [19] Ertuğrul S, Dönmez G, Takaç S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from
371 olive mill wastewater and improving its enzyme activity. J Hazard Mater
372 2007;149:720-4.

373 [20] Ebrahimpour A, Abd Rahman RNZR, Ch'ng DHE, Basri M, Salleh AB. A
374 modeling study by response surface methodology and artificial neural network
375 on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a
376 newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. BMC Biotechnol
377 2008;8:96-110.

- 378 [21] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production,
379 purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:763-
380 81.
- 381 [22] Silva WOB, Santi L, Berger M, Pinto AFM, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein
382 MH. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent
383 *Metarhizium anisopliae*. *Proc Biochem* 2009;44:829-34.
- 384 [23] Helistö P, Korpela T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as
385 measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb Technol*
386 1998;23:113-7.
- 387 [24] Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C. Effect of different carbon sources
388 on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:657-
389 63.
- 390 [25] Santi L, Silva WOB, Berger M, Guimarães JA, Schrank A, Vainstein MH.
391 Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related
392 with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon* 2010;55:874-80.
- 393 [26] Zhao L, Xu J, Zhao J, Pan J, Wang Z. Biochemical properties and potential
394 applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia*
395 *marcescens* ECU1010. *Proc Biochem* 2008;43:626-33.
- 396 [27] Potumarthi R, Subhakar C, Vanajakshi J, Jetty A. Effect of aeration and
397 agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula*
398 *mucilaginosa*—MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole
399 production medium. *Appl Biochem Biotechnol* 2008;151:700-10.
- 400 [28] Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB. Optimization of lipase production in a triple
401 impeller bioreactor. *Biochem Eng J* 2006;27:287–94.

- 402 [29] Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. What distinguishes an
403 esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 2000;82:1033-
404 41.
- 405 [30] Hemachander C, Puvanakrishnan R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an
406 additive in laundry detergent formulations. *Proc Biochem* 2000;35:809-14.
- 407 [31] Rathi P, Saxena RK, Gupta R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia*
408 *cepacia* for detergent formulation. *Proc Biochem* 2001;37:187-92.
- 409 [32] Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. Biodiesel production through lipase
410 catalyzed transesterification: An overview. *J Mol Catal B Enzym* 2010;62:9-14.
- 411 [33] Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic
412 production of biodiesel. *Bioresource Tech* 2008;99:3975-81.
- 413 [34] Meher LC, Vidya Sagar D, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production
414 by transesterification – a review. *Renew Sustain Energy Rev* 2006;10:248-68.
- 415 [35] César AS, Batalha MO. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult
416 reality. *Energy Policy* 2010;38:4031-9.
- 417 [36] Pousa, GPAG, Santos ALF, Suarez PAZ. History and policy of biodiesel in
418 Brazil. *Energy Policy* 2007;35:5393-8.

419 **Legendas das Figuras**

420

421 **Fig.1.** Efeito de fontes lipídicas sobre a produção de lipases por *Luteibacter* sp. em
422 meio basal a 30 °C e 150 rpm por 72 h. (A) produção de lipase utilizando diferentes
423 fontes lipídicas na concentração de 2 %; (B) produção de lipase utilizando óleo de
424 oliva ou gordura bovina em diferentes concentrações. Barras de erro representam o
425 desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente
426 diferentes de acordo com o Teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

427

428 **Fig. 2.** Efeito do comprimento da cadeia de ácido graxo do substrato sobre a
429 atividade lipolítica de LCS e LCST80. Substratos ρ NP ésteres utilizados: ρ NPA (2C),
430 ρ NPB (4C), ρ NPM (14C), ρ NPP (16C) e ρ NPE (18C). Barras de erro representam o
431 desvio padrão.

432

433 **Fig. 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica de LCS e LCST80. A
434 atividade hidrolítica sobre ρ NPP foi determinada nas temperaturas indicadas e
435 tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Os valores de atividade são expressos
436 relativamente a atividade máxima. Barras de erro representam o desvio padrão.

437

438 **Fig. 4.** Efeito do pH sobre a estabilidade de atividade de LCS e LCST80. Ambos os
439 extratos foram pré-incubados a 45 °C por 30 min em vários tampões com diferentes
440 valores de pH. Atividades são expressas como atividade residual relativas a um
441 controle feito com LCS ou LSCT80 incubados com água destilada. Barras de erro
442 representam o desvio padrão.

443 **Tabela 1.** Efeito do pH e temperatura sobre a produção de lipase por *Luteibacter* sp.

Condição de cultivo	Atividade lipolítica (U/L.h)
pH*	
5,0	49,50 ± 1,75 ^a
6,0	90,92 ± 3,83 ^c
7,0	49,63 ± 3,95 ^b
8,0	54,75 ± 2,45 ^b
9,0	39,40 ± 3,03 ^a
Temperatura (°C)**	
25	44,45 ± 3,50 ^a
30	94,71 ± 4,79 ^b
37	146,23 ± 6,72 ^c

444 *Meio basal acrescido de 2 % de óleo de oliva, incubado a 30 °C em agitador orbital
445 a 150 rpm, por 72 h.

446 ** Meio basal acrescido de 2 % de óleo de oliva, ajustado para pH 6, incubado a 30
447 °C em agitador orbital a 150 rpm, por 72 h.

448 ± Desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente
449 diferentes de acordo com Teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

450 **Tabela 2.** Efeito de íons, detergentes e outros reagentes sobre a atividade lipolítica
 451 de LCS e LCST80.

Reagentes*	Atividade lipolítica residual (%)	
	LCST80	LCS
Controle	100,00 ± 7,44	100,00 ± 0,00
Ca ²⁺ 5 mM	110,53 ± 10,53	198,2 ± 12,21
Zn ²⁺ 5 mM	315,79 ± 7,44	505,15 ± 10,33
Co ²⁺ 5 mM	60,53 ± 18,61	78,30 ± 2,08
Mg ²⁺ 5 mM	113,16 ± 3,72	135,71 ± 10,10
EDTA 5 mM	110,53 ± 7,44	155,40 ± 4,30
EGTA 5 mM	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

452 ± Desvio padrão.

453 *LCS e LCST80 foram pré-incubados a 45 °C durante 30 min com diferentes
 454 reagentes. Atividades são expressas como atividade residual relativas a um controle
 455 feito com LCS ou LCST80 adicionado de água destilada ao invés dos compostos
 456 testados.

457 **Tabela 3.** Atividade lipásica de LCS e LCST80 sobre diferentes substratos naturais.

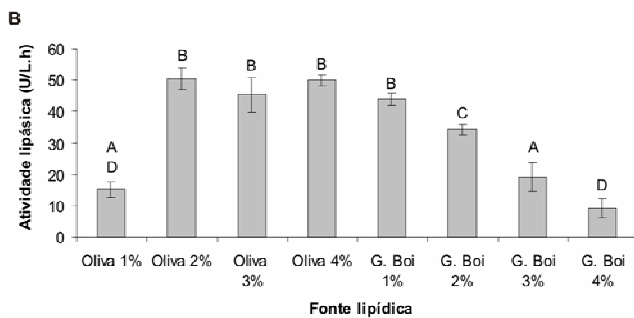
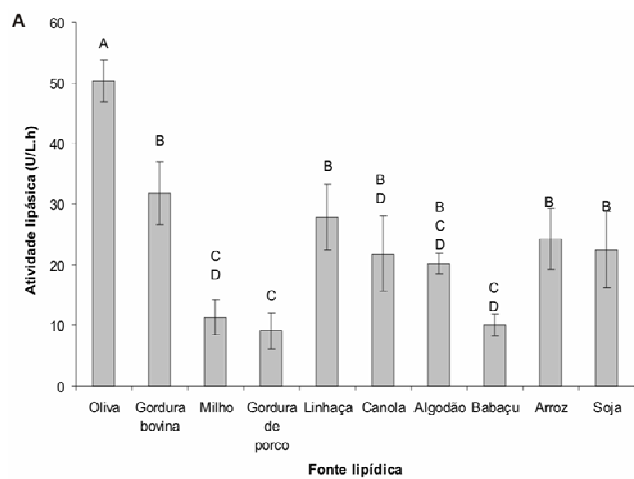
Substrato	Atividade lipolítica (U/ml.h)					
	30 °C		37 °C		45 °C	
	LCST80	LCS	LCST80	LSC	LCST80	LCS
Canola	10,0 ± 0,0	15,0 ± 7,1	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	16,7 ± 5,8
Milho	14,0 ± 5,5	33,3 ± 5,8	10,0 ± 0,0	15,0 ± 7,1	16,7 ± 5,8	20,0 ± 0,0
Oliva	16,7 ± 5,8	35,0 ± 7,1	23,3 ± 5,8	23,3 ± 5,8	20,0 ± 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

458 Titulação de ácidos graxos utilizando óleos vegetais e gordura bovina incubados em

459 diferentes temperaturas, durante 30 min a 150 rpm na presença de LCS ou LCST80.

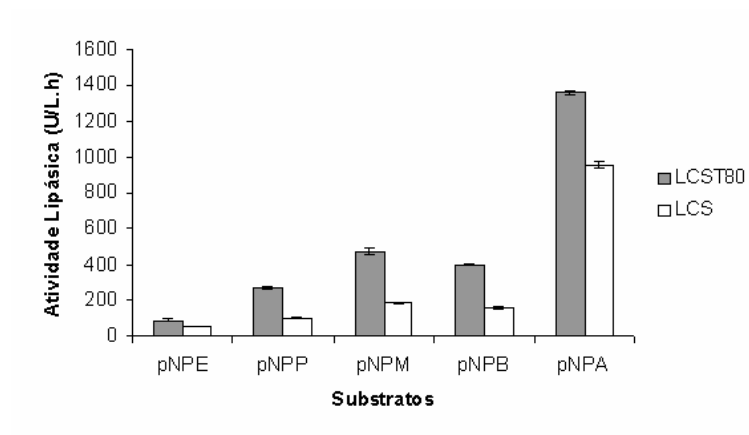
460 ± Desvio padrão.

461 Figura 1



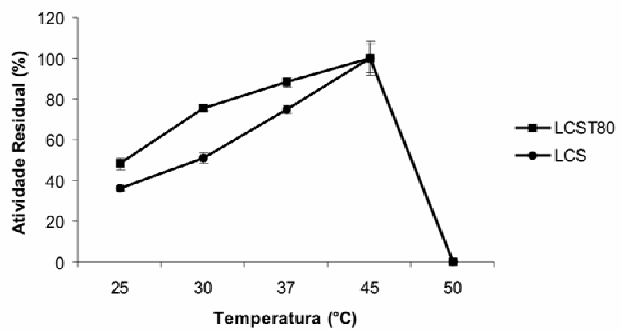
462

463 Figura 2



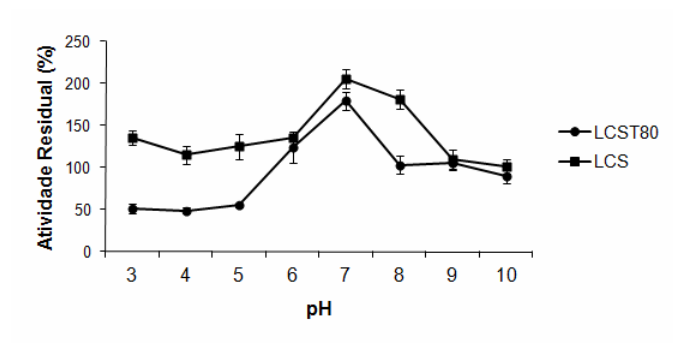
464

465 Figura 3



466

467 Figura 4



468