

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE E APLICAÇÃO NO PROCESSO DE**  
**HIDRÓLISE DO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**

**André Luis Willerding**

Tese apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia para área agroflorestal. Linha de pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos microbianos.

Manaus – Amazonas

Setembro – 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**

**BIOTECNOLOGIA**

**BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE E APLICAÇÃO NO PROCESSO DE**  
**HIDRÓLISE DO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L.)**

**André Luis Willerding**

Orientador: Ph.D. Luiz Antonio de Oliveira (INPA)

Tese apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia para área agroflorestal. Linha de pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos microbianos.

Manaus – Amazonas

Setembro – 2007

Ficha Catalográfica

(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central - UFAM)

	Willerding, André Luis
W712b	Bactérias produtoras de lipase e aplicação no processo de hidrólise do óleo de buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> L.) / André Luis Willerding. - Manaus: UFAM, 2007.
	111 f.; il. color.
	Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.
	Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira
	1. Lipase 2. Biotecnologia 3. <i>Mauritia flexuosa</i> L. 4. <i>Biotransformação de óleo</i> 5. Óleo de Buriti I.Título
	CDU 663.15+634.614(043.2)

## **Agradecimentos**

- Quero expressar meus sinceros agradecimentos às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma em todas as fases deste trabalho.
- Ao Programa Multi-Indisciplinar de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por possibilitar a realização deste trabalho.
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), pela disponibilização do material biológico depositado na Coleção de Microbiologia de Solo da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônomicas (CPCA).
- Ao meu orientador, Dr. Luiz Antonio de Oliveira, pela confiança no desenvolvimento da idéia e por todos os anos trabalhados juntos.
- Aos professores do curso pelos ensinamentos.
- Aos colegas do INPA, Aloísio, Arlen, Francisco Wesen, Adilson, Manoelzinho, Seu Aurino (pelas coletas de buriti), Dona Bené, Ana da secretaria da CPCA, obrigado pela ajuda nos anos em que estive aí.
- Aos colegas do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), Professor Tetsuo Yamane, Professor João Lúcio de Azevedo, Mayra, Rudi, Luiz Hiroshi, Cláudia Carioca e sua equipe, Isac, Ingrid, Rafael, Cléber e Lécio, pela ajuda.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Processo 624/04).
- Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 474007/2003-0).
- Aos meus familiares que estão em Santa Catarina, lembrando sempre deste que praticamente já é amazonense.
- À minha esposa Luciane e minhas filhas Ana Luiza e Izabela, dedico este trabalho.

Agradeço a todos!

## Sumário

Agradecimentos.....	iv
Índice de Tabelas.....	x
Índice de Figuras.....	xii
Resumo .....	xiv
Abstract .....	xv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos .....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos .....	3
3. Revisão Bibliográfica .....	4
3.1. Biodiversidade .....	4
3.2. Enzimas industriais.....	4
3.3. Lipase (Triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3).....	6
3.4. Aplicação industrial da lipase.....	7
3.5. Processo de biotransformação de óleo por ação enzimática.....	8
3.6. Microrganismos produtores de lipase.....	11
3.7. Classificação das lipases .....	13
3.8. Fisiologia e regulação da produção de lipase.....	14
3.9. Cinética e ativação interfacial .....	15
3.10. A atividade da enzima.....	16
3.11. Purificação da lipase .....	17
3.12. O buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> L.).....	18

3.12.1.	Distribuição e importância regional .....	18
3.12.2.	Utilização do óleo de buriti.....	19
3.12.3.	Transformação enzimática do óleo de buriti pela aplicação da lipase.....	20
3.12.4.	Características físico-química do óleo de buriti.....	21
4.	Referências Bibliográficas.....	22
5.	Capítulo 1: Seleção de linhagens bacterianas produtoras de lipase isoladas de solos da Amazônia. ....	28
5.1.	Resumo.....	28
Chapter 1: Selection of bacterial stream producing lipase isolated from Amazon soils.....		28
5.2.	Abstract.....	28
5.3.	Introdução .....	29
5.4.	Material e Métodos .....	30
5.4.1.	Material biológico .....	30
5.4.2.	Bioensaios .....	30
5.4.3.	Ativação e detecção dos isolados produtores de lipase.....	30
5.4.4.	Efeito da temperatura na atividade da enzima.....	31
5.4.5.	Ensaio com para-nitrofenilpalmitato (p-NPP) .....	31
5.5.	Resultados e Discussão .....	32
5.5.1.	Atividade da lipase sobre o substrato sintético p-NPP.....	40
5.6.	Conclusões .....	44
5.7.	Referências Bibliográficas.....	44
6.	Capítulo 2: Bactérias produtoras de lipase em óleo de buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> L.).....	47
6.1.	Resumo.....	47

<b>Chapter 2: Producing bacteria of lipase in buriti oil.....</b>	<b>47</b>
6.2. Abstract.....	47
6.3. Introdução.....	47
6.4. Material e Métodos.....	49
6.5. Resultados e Discussão.....	50
6.6. Produção de lipase induzida por óleo de buriti em placas de Petri.....	51
6.7. Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP - Buriti.....	54
6.8. Conclusões.....	57
6.9. Referências Bibliográficas.....	57
<b>7. Capítulo 3 : Hidrólise enzimática do óleo de polpa de buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>).....</b>	<b>59</b>
7.1. Resumo.....	59
<b>Chapter 3: Enzymatic hydrolysis of oil from pulp of the buriti fruit.....</b>	<b>59</b>
7.2. Abstract.....	59
7.3. Introdução.....	59
7.4. Material e Métodos.....	62
7.4.1. Planejamento Experimental.....	63
7.4.2. Fracionamento com sulfato de amônio.....	65
7.4.3. Determinação da concentração de ácidos graxos livre.....	66
7.5. Resultados e Discussão.....	66
7.6. Conclusões.....	82
7.7. Referência Bibliográfica.....	82
<b>8. Capítulo 4 : Purificação e caracterização da lipase INPA P-798.....</b>	<b>85</b>
8.1. Resumo.....	85

<b>Chapter 4: Purification and characterization of the lipase INPA P-798 .....</b>	<b>85</b>
<b>8.2. Abstract.....</b>	<b>85</b>
<b>8.3. Introdução.....</b>	<b>86</b>
<b>8.4. Material e Métodos .....</b>	<b>87</b>
<b>8.4.1. Caracterização da lipase .....</b>	<b>88</b>
<b>8.4.2. Determinação das proteínas totais.....</b>	<b>88</b>
<b>8.4.3. Determinação da atividade da lipase .....</b>	<b>88</b>
<b>8.4.4. Reta padrão.....</b>	<b>89</b>
<b>8.4.5. Determinação do pH ótimo .....</b>	<b>89</b>
<b>8.4.6. Determinação da temperatura ótima.....</b>	<b>89</b>
<b>8.4.7. Influência de diferentes reagentes químicos na atividade da lipase purificada.....</b>	<b>90</b>
<b>8.4.8. Efeito da concentração de substrato .....</b>	<b>90</b>
<b>8.5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>91</b>
<b>8.5.1. Purificação .....</b>	<b>91</b>
<b>8.5.2. Caracterização enzimática .....</b>	<b>91</b>
<b>8.5.2.1. Reta padrão.....</b>	<b>91</b>
<b>8.5.2.2. Determinação do pH ótimo .....</b>	<b>93</b>
<b>8.5.2.3. Determinação da temperatura ótima.....</b>	<b>93</b>
<b>8.5.2.4. Efeito de inibidores e promotores.....</b>	<b>94</b>
<b>8.5.2.5. Efeito da concentração de substrato .....</b>	<b>95</b>
<b>8.5.2.6. Medição da Atividade Enzimática: Km e V<sub>máx</sub>.....</b>	<b>95</b>
<b>8.6. Conclusões.....</b>	<b>97</b>

8.7.	Referências Bibliográficas.....	97
9.	Capítulo 5 : Identificação genética das bactérias selecionadas.....	99
9.1.	Resumo.....	99
	Chapter 5: Genetic identification of the selected bacteria .....	99
9.2.	Abstract.....	99
9.3.	Introdução .....	100
9.4.	Material e Métodos .....	101
9.4.1.	Seleção das bactérias.....	101
9.4.2.	Extração de DNA genômico total.....	101
9.5.	Resultados e Discussão .....	103
9.6.	Conclusões .....	106
9.7.	Referência Bibliográficas .....	106
10.	Conclusão Geral .....	109
11.	Perspectivas.....	111

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Aplicações industriais das lipases. ....	7
Tabela 2: Principais microrganismos produtores de lipase.....	12
Tabela 3: Diferentes fontes de substratos para a lipase. ....	14
Tabela 4: Composição química dos ácidos graxos (em %) para o óleo de oliva e buriti. ....	21
Tabela 5: Caracterização física do óleo de buriti. ....	22
Tabela 6: Quantidade de isolados lipase positivos para os grupos estudados .....	32
Tabela 7: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados nas diferentes temperaturas testadas (média de cinco repetições). ....	38
Tabela 8: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados em 30°C a 72 horas em meio de cultura com óleo de oliva (média de cinco repetições). ....	39
Tabela 9: Hidrólise de p-nitrofenilpalmitato ([p-NP] U.mL <sup>-1</sup> ) dos isolados testados em 37°C (média de três repetições). ....	42
Tabela 10: Composição química dos ácidos graxos do óleo de oliva e buriti. ....	51
Tabela 11: Caracterização física do óleo de buriti. ....	51
Tabela 12: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados em 30°C em 72 horas e pH 8,0 em meio de cultura com óleo de buriti. ....	53
Tabela 13: Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP a 37°C ([p-NP] U.mL ).....	57
Tabela 14: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. ....	63
Tabela 15: Matriz do experimento com as combinações dos níveis e variáveis testadas. ....	65
Tabela 16: Resumo dos resultados da hidrólise do óleo de buriti por ácido graxo livre (em %AGL) para as seis bactérias testadas (média de triplicata). ....	67
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do extrato bruto da bactéria INPA P-798 para a variável repostada (%AGL). ....	69
Tabela 18: Hidrólise do óleo de buriti pela enzima purificada da bactéria INPA P-798 em ácido graxo livre (%AGL) (média de triplicata). ....	73
Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios da bactéria INPA P-798 com a enzima purificada para a variável repostada (%AGL). ....	74
Tabela 20: Hidrólise do óleo de buriti pela enzima precipitada da bactéria INPA P-798 em ácido graxo livre (%AGL) (Fração IV). ....	76

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798 para a variável reposta (%AGL).....	77
Tabela 22: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de pH ótimo. ....	89
Tabela 23: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de temperatura ótima. ....	90
Tabela 24: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de inibidores. ....	90
Tabela 25: Tabela de purificação .....	91
Tabela 26: Concentrações de para-nitrofenol (p-NP) e absorvância em 410nm .....	92
Tabela 27: Mix de reação para o protocolo de amplificação do gene 16S rDNA .....	102
Tabela 28: Programação da reação de amplificação do gene 16S r DNA.....	103
Tabela 29: Lista com identificação das bactérias selecionadas.....	105

## Índice de Figuras

Figura 1: Formação do halo ao redor da colônia indicando a ação da lipase. ....	33
Figura 2: Evolução do Índice de Atividade da Lipase (IAL).....	33
Figura 3: Correlação entre o diâmetro médio das colônias e o respectivo Índice de Atividade da Lipase (IAL) em cada momento de avaliação a 30°C (média de 75 isolados). ....	34
Figura 4: Índice médio de atividade da lipase (IAL) nas diferentes temperaturas testadas para os isolados lipase positivos. ....	35
Figura 5: Atividade da lipase até 72 horas em diferentes temperaturas.....	36
Figura 6: Classificação dos índices enzimáticos dos isolados lipase positivos. ....	37
Figura 7: Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP em diferentes temperaturas. ....	41
Figura 8: Hidrólise de para-nitrofenilpalmitato em diferentes temperaturas para os 24 isolados selecionados. ....	43
Figura 9: Índice médio de atividade da lipase (IAL) nas diferentes temperaturas e valores de pH testados para os 24 isolados selecionados. ....	52
Figura 10: Comparação entre os Índices de Atividade de Lipase (IAL) em meios de cultura com óleo de buriti e de oliva. ....	54
Figura 11: Produção de lipase para os seis isolados selecionados nas diferentes temperaturas testadas. ....	55
Figura 12: Atividade da lipase após cultivo induzido em óleo de buriti.....	55
Figura 13: Comparação entre a indução de lipase com óleo de oliva e óleo de buriti para os isolados selecionados (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 e INPA P-799).....	56
Figura 14: Comparação de média de todos os ensaios de hidrólise do óleo de buriti pelos extratos brutos das seis bactérias testadas (teste Tukey $p < 0,5$ ). ....	68
Figura 15: Diagrama de barra para a variável resposta em % AGL a partir da hidrólise do óleo de buriti com o extrato bruto da bactéria INPA P-798. ....	70
Figura 16: Descrição da superfície de resposta para a hidrólise do óleo de buriti.....	71
Figura 17: Curva de contorno para a variável resposta (% AGL) da hidrólise do óleo de buriti a partir do extrato bruto da bactéria INPA P-798.....	72
Figura 18: Determinação do teor de proteína, atividades enzimática e específica do extrato bruto fracionado. ....	75

Figura 19: Diagrama de barra variável resposta em % AGL a partir da hidrólise do óleo de buriti com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798. ....	78
Figura 20: Descrição da superfície de resposta para a hidrólise do óleo de buriti com a enzima precipitada com sulfato de amônio da bactéria INPA P-798. ....	79
Figura 21: Curva de contorno para a variável resposta (% AGL) da hidrólise do óleo de buriti a partir da enzima precipitada com sulfato de amônio da bactéria INPA P-798. ....	80
Figura 22: Comparação dos três sistemas reacionais para a hidrólise do óleo de buriti : EP (enzima purificada), EB (extrato bruto) e Eppt (enzima precipitada) com um sistema reacional com a enzima comercial (Lipase <i>Pseudomonas</i> sp SIGMA®) para a % de ácidos graxos livres (%AGL) . ....	81
Figura 23: Gráfico da curva-padrão para a concentração de p-nitrofenol (p-NP) em 410nm. ....	92
Figura 24: Efeito do pH na atividade da lipase INPA P-798 em diferentes tampões. ....	93
Figura 25: Determinação da temperatura ótima para a atividade da lipase INPA P-798. ....	94
Figura 26: Atividade da lipase INPA P-798 sob influências de diferentes reagentes químicos promotores e inibidores .....	94
Figura 27: Relação entre a atividade da enzima e concentração do substrato .....	95
Figura 28: Gráfico Duplo Recíproco .....	96

# BACTÉRIAS PRODUTORAS DE LIPASE E APLICAÇÃO NO PROCESSO DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa L.*)

## Resumo

As indústrias biotecnológicas vêm buscando novos produtos ou realizando melhorias dos processos já existentes a partir dos recursos genéticos disponíveis. Os avanços recentes em áreas como biossíntese, rotas metabólicas e evolução dirigida de proteínas, indicam uma troca de paradigma da biologia tradicional para a biotecnológica. Esse trabalho apresenta uma seleção de bactérias produtoras de lipase visando a aplicação na hidrólise de óleo de buriti. De 440 isolados bacterianos testados, 181 foram selecionados para os testes qualitativos em placas de Petri. Desses, 75 isolados (41%) foram lipase positivos. A atividade enzimática foi analisada em diferentes temperaturas (30°, 35°, 40° e 45°C). Após 72 horas de cultivo em meio de cultura indutor contendo óleo de oliva como substrato, os índices enzimáticos foram avaliados através da relação entre o diâmetro do halo ao redor da colônia e o diâmetro da colônia. Aos 30°C houve a maior atividade enzimática, servindo assim como temperatura chave para a seleção. Os isolados foram classificados em diferentes categorias conforme a atividade enzimática e comparados com uma estirpe padrão. Assim, vinte e quatro foram selecionados para os testes quantitativos. Desses, foi possível selecionar seis isolados bacterianos (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 e INPA P-799). Não houve diferenças significativas entre esses seis e todos foram selecionados para os testes de hidrólise enzimática do óleo de buriti. A bactéria selecionada (INPA P-798) apresentou a melhor afinidade ao óleo de buriti e o seu rendimento com a enzima precipitada (em % de ácidos graxos liberados) foi superior ao da sua lipase purificada e do seu extrato bruto. A enzima purificada apresentou atividade ótima a 55°C e em pH 8,5. O CaCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub> promoveram o aumento da atividade em 22% e 18%, respectivamente, e o MgSO<sub>4</sub> reduziu a atividade em 13%. Nos ensaios com diferentes concentrações de substrato, a enzima obteve um valor de V<sub>max</sub> = 12500 μM p-NP.mL<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> = 1,125 μM p-NP.min<sup>-1</sup>. Das seis bactérias selecionadas, quatro pertencem ao gênero *Burkholderia*, uma ao gênero *Klebsiella* e uma não foi identificada ao nível de espécie. A bactéria selecionada (INPA P-798) pertence à espécie *Burkholderia cepacia*, uma clássica produtora de lipase.

**Palavras-chave:** Lipase, biotransformação de óleo, óleo de buriti, bactéria, hidrólise enzimática, Amazônia.

## PRODUCING BACTERIA OF LIPASE AND APPLICATION IN THE PROCESS OF HYDROLYSIS OF THE BURITI OIL (*Mauritia flexuosa* L.)

### Abstract

The biotechnology industries look for new products or in the improvement of the already existent processes with the use of the genetic available resources. The recent advancements in areas as metabolic roads and directed evolution of the protein, they indicate an exchange of the paradigm of the traditional biology to biotechnology. This work presents a selection of bacteria producer of lipase, with the objective to apply the enzyme in the Buriti oil hydrolysis. Of 440 activated bacteria, 181 isolated ones were effectively tested in medium inductors. Of this total, 75 isolated ones (41 %) showed lipase production. The enzymatic activity were tested in different temperatures (30°, 35°, 40°, 45°C), with the enzymatic activity lessening with the increase of the temperature. To 30°C had to peak of enzymatic activity. After 72 hours of cultivation in Petri dishes containing olive oil as substrate, the enzymatic index was valued through the relation between the diameter of the halo around the colony and the diameter of the colony. The isolated they were classified in different categories according to the enzymatic activity. Of isolated tested, twenty four were selected for the quantitative lipase tests and also for the affinity tests to Buriti oil in Petri dishes. After, it was possible to select six streams (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 and INPA P-799). There were no significant differences between the six bacterias and they all were selected for the tests of enzymatic hydrolysis of the Buriti oil. The enzymatic hydrolysis was analysed by Response Surface Methodology. The selected bacterium (INPA P-798) presented the biggest affinity regarding the Buriti oil when were compared with others five bacterias. The profit of the hydrolysis with the precipitate enzyme (33,84 % fat acid free ) was superior to that of the purified lipase and crude extract results. The optimal activity were between 6,0 and 8,5 pH values above 3 hours. The extracellular lipase was purified by Sephadex G-25 gel and his kinetic analysis it presented the best activity 55°C and pH 8,5. The lipolytic enzyme was promoted by CaCl<sub>2</sub> and ZnSO<sub>4</sub> that increase of the activity in 22 % and 18 %, respectively. The activity was inhibited by MgSO<sub>4</sub> in 13%. The specific activity of the lipase purified was  $V_{max} = 12500 \mu\text{M p-NP.mL}^{-1} \text{ e } K_m = 1,125 \mu\text{M p-NP.min}^{-1}$ . The selected bacteria is a *Burkholderia cepacia*, a classic producer of lipase.

**Key words:** Lipase, oil biotransformation, Buriti oil, enzymatic hidrolisis, Amazon.

## 1. Introdução

A diversidade biológica expressa todos os recursos biológicos contidos no ecossistema e demonstra toda a diversidade genética. A potencialidade desses recursos biológicos pode ser explorada em espécies de plantas, animais e microrganismos com valor atual ou potencial (BDT, 1998a).

Mesmo havendo uma diversidade de espécies nos diferentes ambientes, todos os ecossistemas no planeta Terra dependem diretamente da ação de microrganismos para o seu funcionamento e manutenção, os quais realizam atividades indispensáveis aos organismos vivos. Dentre essas ações, a produção primária (base da cadeia alimentar), a produção de oxigênio e a decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes são alguns exemplos (Coutinho *et al.*, 2001). Tantas funções são decorrentes da imensa diversidade genética que apresentam. Embora tão diversos, menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta foram caracterizados e descritos. Apesar disso, é importante ressaltar os grandes avanços da agricultura e da biotecnologia moderna que são derivados das descobertas em áreas como genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (BDT, 1998b).

A utilização de microrganismos ocorre em várias áreas. Na área industrial, vários processos biotecnológicos têm como objetivo a produção de compostos comerciais ou a transformação de substrato em produtos de maior valor agregado, tais como antibióticos (estreptomicina, penicilina). No setor agropecuário e de alimentos, destacam-se os microrganismos fixadores de nitrogênio, os empregados na produção de bebidas alcoólicas e sucos (vinho, cerveja, produção de pectinase), processamento de alimentos (queijo, iogurte, panificação), além do controle biológico de pragas e doenças (controle da lagarta da soja, da cigarrinha da cana de açúcar e outros) (Fungaro & Maccheroni Jr., 2002).

Com os avanços da engenharia genética, mencionam-se também os microrganismos geneticamente modificados, que em última instância tiveram a sua origem na biodiversidade (BDT, 1998b). A técnica do DNA recombinante possibilitou que pudessem ser manejados geneticamente, de modo a permitir suas utilizações com maior eficiência como biorreatores em processos industriais (Roitman, 1985; Beilen & Li, 2002).

Atualmente, as estratégias das indústrias de base biotecnológica vêm sofrendo mudanças que visam uma exploração biológica baseada na descoberta de novos produtos ou no melhoramento dos processos já existentes. Os avanços nas últimas décadas em áreas como química, biossíntese, rotas metabólicas, genética e evolução dirigida de proteínas, representam essas novas procuras e indicam uma troca de paradigma da biologia tradicional para a biotecnológica (Bull *et al.* 2000).

Quando um microrganismo é selecionado para um processo industrial, a facilidade com que o processo pode ser melhorado do ponto de vista econômico vai depender do tipo de organismo usado e do tipo do produto final que se deseja. O microrganismo pode ser um fungo ou uma bactéria e o tipo de produto final pode ser um metabólito como um antibiótico ou macromoléculas primárias e secundárias que têm grande aplicabilidade (Bull *et al*, 2000). Sendo assim, é importante ter nos processos de seleção, mecanismos (testes) que possam mostrar, através dos seus resultados, a aptidão que os microrganismos têm com relação a alguma atividade bioquímica específica.

Numa visão geral, os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para novos antibióticos e agentes terapêuticos, probióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas na área de cosméticos e de alimentação, biorremediação de poluentes, biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais, plantas e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas (Coutinho *et al.*, 2001).

A participação dos produtos microbianos no mercado global atinge US\$ 40 bilhões ao ano (Beilen & Li, 2002). Com relação às enzimas, a sua produção mundial aplicada à indústria, representa um mercado anual de US\$ 1,3 bilhões (Panke & Wubbolts, 2002; Castro *et al*, 2004). As lipases participam desse mercado com US\$ 450 milhões somente para o setor de detergentes (Castro *et al*, 2004). Portanto, outros setores em que a lipase pode ser útil representam um desafio e um grande mercado a ser explorado.

Com certeza a amostragem aqui utilizada não cobrirá o todo dessa diversidade e nem será uma amostragem significativa. A pretensão será mais qualitativa do que quantitativa do ponto de vista de encontrar microrganismos produtores de lipase. No entanto, o desdobramento dessa amostragem, mesmo que pequena, refletirá numa exposição do potencial existente e dessa forma, aumentar o conhecimento sobre os microrganismos e aumentar as possibilidades de uso dos óleos da Amazônia.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Selecionar bactérias produtoras de lipase visando a aplicação na hidrólise enzimática do óleo de buriti.

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Detectar qualitativamente e quantitativamente bactérias produtoras de lipase.
2. Verificar entre as bactérias produtoras de lipase, as que apresentam capacidade de hidrolisar o óleo de buriti.
3. Analisar a hidrólise enzimática do óleo de buriti.
4. Purificar e caracterizar a lipase das bactérias selecionadas.
5. Identificar geneticamente por técnicas moleculares as bactérias selecionadas com a utilização de oligonucleotídeos específicos para genes ribossomais - rRNA 16S.

### **3. Revisão Bibliográfica**

#### **3.1. Biodiversidade**

A biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza e responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, além de fonte de um imenso potencial econômico para as atividades agrícolas, pecuárias, pesqueiras e florestais, servindo também como base estratégica para as indústrias biotecnológicas. A diversidade biológica possui, além do seu valor intrínseco, valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural e recreativo. Por tais valores, impõe-se como uma riqueza para a humanidade (BDT, 1998a).

A diversidade genética dos microrganismos ultrapassa em muito a encontrada em plantas e animais superiores. Estudos filogenéticos baseados em seqüências de subunidade menor do RNA ribossômico (rRNA) revelaram que o maior celeiro de genes no planeta reside na fração microbiana da biodiversidade (Coutinho *et al.*, 2001; Dunbar *et al.*, 2002.; Kawai *et al.*, 2002; Peixoto *et al.*, 2002.). A diversidade desses organismos é tão vasta quanto desconhecida. Hoje, cerca de 160.000 espécies de microrganismos são conhecidas e descritas na literatura, onde 50 % são fungos. A cada ano, uma média de 1700 e 120 novas espécies de fungos e bactérias, respectivamente, é descrita na literatura. Não se sabe ao certo o número total de espécies de microrganismos no planeta, porém há quem indique um total de 1.800.000, mas as conhecidas não passam de 10% desse valor (Coutinho *et al.*, 2001).

No entanto, para a análise da diversidade microbiana existem muitos obstáculos, como as suas dimensões microscópicas, descrições taxonômicas incompletas e dificuldades de cultivo. Além disso, as maiores adaptabilidades dos microrganismos às pressões de seleção ambiental, dificultam avaliações baseadas em métodos convencionais de morfologia e fisiologia dos microrganismos (Pickup, 1991; Rosseló-Mora & Amann, 2001).

A alternativa mais viável para avaliar a diversidade de microrganismos sem os vizes intrínsecos ao cultivo em meio de cultura é a adoção de estratégias moleculares (Bach *et al.*, 2001), o que permite conhecer melhor suas características fisiológicas, ecológicas e econômicas (Barbosa *et al.*, 2001; Hungria, 1996; Hungria *et al.*, 2001; Bach *et al.*, 2001; Coutinho *et al.*, 2001; Rosseló-Mora & Amann, 2001).

#### **3.2. Enzimas industriais**

Especificamente para enzimas, a utilização nos processamentos industriais permite a obtenção de produto final mais desejável tanto econômico quanto biotecnologicamente. Embora as enzimas de origem animal e vegetal ainda ocupem uma importante fatia do mercado mundial, existe uma

tendência de substituir essas fontes enzimáticas pelas de origem microbiana (Beilen & Li, 2002; Panke & Wubbolts, 2002).

A preferência pelas enzimas microbianas fundamenta-se nos seguintes pontos: a) facilidade de obtenção de grandes populações celulares produtoras de enzimas; b) facilidade de seleção de linhagens de alta produtividade por manipulação genética; c) procedimentos de extração de enzimas simples e econômicos; d) a não sazonalidade do produto (Fungaro & Maccheroni Jr., 2002).

Outro aspecto importante em relação aos microrganismos, além de sua identificação, diz respeito ao uso de suas enzimas em diversas áreas. As enzimas estão sendo aplicadas em inúmeros processos industriais resultando em significantes reduções de custo. Ao mesmo tempo, o rápido desenvolvimento de tecnologias é um estímulo para as indústrias de diversos ramos para abraçar a utilização enzimática, melhorando seus sistemas produtivos (Beilen & Li, 2002). A elaboração de vários produtos biotecnológicos pode envolver a ação de microrganismos. As aplicações industriais de bactérias, fungos filamentosos e leveduras têm aumentado progressivamente devido à utilização de enzimas no setor econômico (Králová, 1999; Fungaro & Maccheroni Jr., 2002; Haki & Rakshit, 2003).

As catálises produzidas por enzimas são reações químicas de grande especificidade e com altas taxas de otimização. Essas reações, que fazem parte de todos os organismos vivos, provêm grandes oportunidades para uma eficiente e econômica conversão biocatalítica usada nas indústrias, pois se torna um importante componente para empresas que buscam mecanismos de desenvolvimento sustentável. Essas aplicações vão desde o desenvolvimento de processos industriais até a descoberta e produção de produtos biofármacos (Panke & Wubbolts, 2002).

A capacidade de processamento e transformação biológica de materiais orgânicos e inorgânicos pela microbiota presente em vários ambientes naturais, ainda está longe de ser plenamente elucidada. A utilização de enzimas microbianas em processos industriais vem aumentando significativamente, dada a capacidade de elevar a taxa de transformação de substratos e obtenção de produtos com bons índices de produção técnica e economicamente viável (Polizelli *et al.*, 2002). Microrganismos do solo são as fontes primárias de enzimas industriais. Cerca de 50% das enzimas industriais originam-se de fungos e leveduras, 35% de bactérias e 15 % são originados de animais e vegetais. A versatilidade de espécies microbianas estimula a busca de novas enzimas com propriedades adequadas para o desenvolvimento de processos tecnológicos (Fungaro & Maccheroni Jr., 2002).

A maioria das enzimas empregadas na indústria é caracterizada como enzimas extracelulares, sendo as principais classes de enzimas industriais, as hidrolases (proteases, amilases, celulasas e

lipases), as isomerases (triose fosfato isomerase) e oxirredutases (glicose oxidase, catalase e lacase) (Kashyap *et al.*, 2001; Pastore, 2002; Haki & Rakshit, 2003).

O custo global de produção de enzimas intracelulares é maior que o de enzimas extracelulares e como consequência, as intracelulares geralmente são utilizadas imobilizadas para que se propicie a recuperação após o processo (Panke & Wubbolts, 2002). O custo de produção de enzimas está associado não só ao tipo de excreção celular, mas também, ao grau de pureza requerido no processo. Por necessidade, portanto, as tecnologias para produção de enzimas cada vez mais puras evoluíram em diversas direções. As bases competitivas para produzir e vender enzimas se fixam em conseguir a qualidade do produto desejado a um custo aceitável por unidade de produto final (Sutherland, 2001). Com base nesse princípio é que se direciona a busca por microrganismos para a produção industrial. Dentre todas as enzimas mais empregadas na indústria, as proteases representam cerca de 50% do mercado (Pastor *et al.*, 2001). Além das proteases, as lipases apresentam grande potencial de uso (Sharma *et al.*, 2001; Pastore, 2002; Polizeli *et al.*, 2002).

Cada microrganismo produz várias enzimas, mas a quantidade de cada uma delas varia de espécie para espécie e entre estirpes. Assim, para a produção de uma enzima em escala comercial, a escolha do microrganismo deve ser cuidadosa. Embora seja importante, a alta produção enzimática não é o único critério para a escolha da fonte microbiana. Outras características como a não produção de substâncias tóxicas e a não patogenicidade ao homem também são levadas em conta (Fungaro & Maccheroni Jr., 2002).

### **3.3. Lipase (Triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3)**

As lipases verdadeiras (Triacilglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Essas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Essa definição exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (como as esterases) ou que hidrolisam outros lipídios (acilhidrolases, colesterolsterases, tioesterases, entre outras) (Carvalho *et al.*, 2005).

A partir dos trabalhos de Tsujisaka e colaboradores em 1977 ficou comprovado ser possível reverter a hidrólise de TAG no sentido da reação de esterificação, pelo controle do teor de água no meio. Com base nisso, tornou-se possível a utilização de lipases como biocatalisadores de esterificação ou interesterificação de óleos e gorduras. Essas reações trazem alterações na composição e distribuição dos ácidos graxos na molécula de TAG (Carvalho *et al.*, 2003).

As lipase apresentam peso molecular entre 19-77 KDa e possuem cerca de 300 resíduos de aminoácidos. Essas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais

e microrganismos. As lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento, são geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (Carvalho *et al.*, 2005).

### 3.4. Aplicação industrial da lipase

Dentre as enzimas de interesse industrial, as lipases apresentam-se com diversas vantagens. Além da quebra de ligações ésteres de acil gliceróis, possuem características bastante desejáveis, tais como: não requerem cofatores, são de baixo custo, regioespecíficas, atuam em larga faixa de pH (Nascimento *et al.*, 2001).

As lipases são dotadas de uma especificidade pelo substrato que supera todas as outras enzimas conhecidas, atuando de acordo com o tamanho da cadeia do ácido graxo ou posição do ácido graxo no glicerol, o que lhes confere uma aplicação de fronteiras (Sene *et al.*, 2002). Elas podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de gordura e óleos e no tratamento de couros, conforme apresenta a Tabela 1.

**Tabela 1: Aplicações industriais das lipases.**

<b>Indústria</b>	<b>Aplicação</b>
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração de processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema do ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução do conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos e hidrólise de óleos naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue
Couro	Remoção de gorduras da matéria-prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes

Fonte: Pastore *et al.* (2003).

Com tais aplicações, apresentam grande potencial de uso, sendo extremamente versáteis e podem ser obtidas em larga escala de variadas fontes, mas as mais empregadas industrialmente são as de fontes microbianas. O crescente interesse no estudo das lipases pode ser observado pela literatura

publicada nos últimos anos explorando o grande potencial de aplicações distintas apresentadas por essas enzimas (Sharma *et al.*, 2001; Pastore, 2002; Castro *et al.*, 2004).

Sem dúvida, as lipases, assim como as proteases, são produtos candidatos a serem produzidos com emprego de técnicas recentes de engenharia genética ou de biologia molecular que vêm sendo desenvolvidas pela ciência, as quais podem permitir a produção de enzimas com sítios ativos diferenciados para várias aplicações, aumentando a resistência à temperatura, ao pH e diminuindo o tempo de processo. Por outro lado, existe também uma tendência clara de procurar novos microrganismos produtores de enzimas com características específicas como estabilidade térmica, pH ótimo, etc. (Polizelli *et al.*, 2002).

Muitos dos processos industriais os quais se utilizam de lipases, exigem temperaturas que excedem 45°C, o que mostra a vantagem das lipases, que freqüentemente exibem temperatura ótima ao redor de 50°C (Sharma *et al.*, 2002).

As reações de esterificação preferencialmente envolvem o uso de lipases imobilizadas, tendo em vista que lipases livres tendem a se aglomerar nas paredes do reator, impedindo sua dispersão homogênea no meio, o que é essencial para sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (Castro, 2002). Como forma de contornar esse problema, a produção microbiana de lipases apresenta-se industrialmente mais barata e simples, comparadas com as lipases de origem animal (Castro *et al.*, 2004).

As lipases têm sido empregadas em processos como hidrólise da gordura do leite, melhoramento do sabor/qualidade de massas para pães e bolos, melhoramento no aroma e aceleração de processos de fermentação, no processamento de derivados do ovo, no processamento da qualidade de carne e peixe, com a remoção do excesso de gordura e no processamento e extração de óleos, via melhoramento das propriedades físicas e nutricionais de gorduras por interesterificação, degomagem de óleos vegetais na indústria ou mesmo no desenvolvimento de biodiesel (Nascimento *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2004). Esses processos de biotransformação, quando preparados por processos enzimáticos, podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural (Pandey *et al.*, 1999).

### **3.5. Processo de biotransformação de óleo por ação enzimática**

Óleos e gorduras têm um papel fundamental para o homem por serem fontes de calorias, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), além de fonte de ácidos graxos essenciais, promotores da palatabilidade de alimentos e fonte energética (biodiesel) (Castro, 2002).

Nos últimos quinze anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação de óleos e gorduras. Essa tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes insumos para a indústria química,

farmacêutica e alimentícia. Além disso, o crescimento do mercado consumidor de produtos naturais vem exigindo uma reavaliação dos insumos e processos utilizados pela indústria em geral. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (Pastore *et al.*, 2003). Na Amazônia, há inúmeras espécies vegetais que podem contribuir com seus produtos dentro dessa demanda crescente.

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes. Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes de um composto. Existem casos, entretanto, em que há uma necessidade de se transformar as características do material para adequá-lo a uma determinada aplicação, o que é possível pela manipulação da composição dos triglicerídeos (Castro *et al.*, 2004).

A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada por meio da modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster liberando ácidos graxos (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal de triglicerídeo (interesterificação). Dependendo da condição do meio reacional, com pouca presença de água, pode ocorrer também a reação inversa à hidrólise, isto é, a formação de ligações ésteres (esterificação) formando óleo a partir de um álcool e um ácido orgânico (Carvalho *et al.*, 2003).

Assim, o desenvolvimento de tecnologias alternativas apropriadas para o aproveitamento desse tipo de material se reveste de grande importância, pois pode proporcionar a obtenção de produtos de alto valor agregado, o que valoriza esse ramo da biotecnologia que é a biotransformação de óleo. Os ácidos graxos e seus derivados são matérias primas essenciais às indústrias cosmética e farmacêutica, sendo os óleos vegetais muito utilizados para esse propósito. Atualmente, os processos que utilizam a catálise química são os mais usados comercialmente, mas apresentam alto consumo de energia, formação de subprodutos durante a reação e requerem operações adicionais para purificar o produto desejado. A hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens em relação à catálise química, entre elas o baixo consumo de energia, pois a reação pode ser conduzida em condições reacionais brandas, o que minimiza a degradação térmica do produto (Rodriguez & Fraga, 1999).

Do ponto de vista industrial, as limitações na obtenção desses produtos estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação.

Nesse contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma alternativa atrativa para a exploração na indústria de óleos e gorduras, principalmente quando consideradas algumas das

vantagens apresentadas pela reação enzimática, como maior rendimento do produto, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia, redução da quantidade de resíduos ou introdução de rotas mais acessíveis de produção.

A escolha do tipo de biocatalisador é efetuada entre microrganismos vivos íntegros ou a partir de seus componentes moleculares. O uso de enzimas isoladas é preferível quando existir limitações com relação à permeabilidade do substrato na membrana da célula ou quando ocorrerem a formação de reações secundárias indesejáveis.

Enzimas isoladas ou purificadas possuem um número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação, tais como alta eficiência catalítica (podem elevar a velocidade de reação de  $10^8$  a  $10^{12}$  vezes), seletividade, atuação em condições brandas de temperatura (30° a 70° C) e em pressão atmosférica.

A hidrólise por processo químico é conduzida sob pressão na ordem de 4,83 MPa com temperatura ao redor de 250°C por um período máximo de duas horas. Em contrapartida, nas reações de hidrólise enzimática, as reações acontecem em pressão normal, com temperaturas ao redor de 37°C, mas com uma duração de 7 a 24 horas. A atividade hidrolítica representa uma característica básica das lipases e normalmente se associa com a habilidade de síntese. Wu *et al.* (1996) investigaram essas características utilizando nove lipases. De acordo com os resultados obtidos, a atividade hidrolítica da lipase pode ter pouco valor na predição da atividade sintética. Ao contrário, a lipase pode não exibir atividade sintética, mas pode apresentar alta atividade hidrolítica.

As lipases demonstram especificidade em relação à posição do ácido graxo e seu grau de insaturação ou em alguns casos, enantioseletividade para compostos quirais. A aplicação industrial de lipases em reações de biotransformação para enriquecimento de óleos em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) tem especial importância pela sua especificidade, uma vez que os produtos formados não podem ser obtidos por processos químicos convencionais. Além da hidrólise, existem outras possibilidades de transformação química dos óleos como a transesterificação e a interesterificação. A transesterificação de óleos e gorduras pelo processo químico, embora seja simples, rápido e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens. A primeira refere-se ao catalisador (ácido ou base) que, ao final do processo, permanece misturado com o principal subproduto da reação, que é a glicerina, dificultando sua separação e purificação. Utilizando um processo enzimático, essas dificuldades podem ser minimizadas com maior grau de pureza e possibilidade de reutilização do biocatalisador. Uma segunda desvantagem do processo químico está relacionada com o tipo de álcool utilizado, que, de modo geral, utiliza-se metanol. Nesse caso, a alcoólise enzimática com etanol hidratado apresenta grandes vantagens em relação ao metanol, tais como custo e toxicidade. Além disso, o etanol é um produto obtido através de biomassas e, dessa maneira, o processo se torna totalmente independente do petróleo (Nascimento *et al.*, 2001).

Embora os processos de transesterificação enzimática ainda não sejam comercialmente desenvolvidos em grande escala, novos resultados têm sido reportados em artigos e patentes (Karadzic *et al.* 2006). O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microrganismo que gera a enzima, etc.), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, o rendimento e o tempo de reação são desfavoráveis se comparados com o sistema de reação por catálise básica.

### **3.6. Microrganismos produtores de lipase**

Microrganismos produtores de lipase têm sido encontrados em diversos *habitats* como em resíduos industriais, subprodutos do processamento de óleos vegetais, indústria leiteira, solos contaminados por óleo, sementes oleaginosas e em alimentos em decomposição (Wu *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004). A Tabela 2 apresenta alguns exemplos da diversidade microbiana com atividade lipolítica registrada na literatura.

**Tabela 2: Principais microrganismos produtores de lipase**

<b>Espécie</b>	<b>Referências</b>
<b>Bactéria (gram +)</b>	
<i>Bacillus megaterium</i>	Godtfredsen (1990)
<i>B. subtilis</i> 168	Lesuisse <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tahoun <i>et al.</i> (1985)
<b>Bactéria (gram -)</b>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Yeo <i>et al.</i> (1998)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ito <i>et al.</i> (2001)
<i>P. fragi</i>	Mencher and Alford (1967)
<i>P. fluorescens</i>	Maragoni (1994)
<i>P. fluorescens</i> MF0	Guillou <i>et al.</i> (1995)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Rees and Robinson (1995)
<i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i>	Sztajer <i>et al.</i> (1988)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Anguita <i>et al.</i> (1993)
<b>Fungos</b>	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Salleh <i>et al.</i> (1993)
<i>Aspergillus flavus</i>	Long <i>et al.</i> (1998)
<i>A. niger</i>	Chen <i>et al.</i> (1995)
<i>A. japonicus</i>	Satyana and Johri (1981)
<i>A. nidulans</i>	Mayordomo <i>et al.</i> (2000)
<i>Penicillium cyclopium</i>	Chahinian <i>et al.</i> (2000)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Rapp (1995)
<b>Leveduras</b>	
<i>Candida rugosa</i>	Wang <i>et al.</i> (1995)
<i>Pichia bispora</i>	Hou (1994)
<i>Saccharomyces lipolytica</i>	Tahoun <i>et al.</i> (1985)

Fonte: Sharma *et al.* (2001).

Das bactérias gram-negativas, o gênero *Pseudomonas* apresenta-se como um dos mais importantes, com diferentes espécies produzindo lipase, sendo a espécie com maior dessaque a *P. aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2001). Arpigny & Jaeger (1999) citam que as lipases verdadeiras são caracterizadas como do grupo *Pseudomonas* em virtude de terem sido provavelmente essas, as primeiras bactérias a serem estudadas para essa enzima. Outros gêneros estudados são *Burkholderia*, *Chromobacterium* e *Acinetobacter*. Entre as bactérias gram-positivas, os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* são os mais estudados. Enquanto muitas dessas enzimas são ativas sob temperaturas ao redor de 60° C e pH 7, lipases de *Bacillus thermoleovorans* podem funcionar moderadamente sob extremos valores de pH e temperatura (Haki & Rakshit, 2003). Suas lipases apresentam uma ampla faixa de especificidade de substratos, incluindo a habilidade para hidrolisar substratos hidrossolúveis. A espécie *S. hyicus* apresenta também uma atividade para fosfolipase A e lisofosfolipase. Provavelmente, as lipases com maior aplicabilidade são as de *Bacillus subtilis*, que possuem atividade alcalina (pH 9-10) e termoestabilidade a 60-65°C.

Com relação aos fungos, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Humicola* são os gêneros mais pesquisados. Para as leveduras, o gênero *Candida* é o mais estudado (Sharma *et al.*, 2001).

Considerando que diferentes isolados microbianos podem produzir quantidades diferentes de uma mesma enzima, um grande número de isolados tem que ser investigado para selecionar o mais apropriado. A exploração da variabilidade genética existente na natureza é um passo extremamente importante que não deve ser negligenciado na escolha dos microrganismos selvagens. Mesmo após rigorosa seleção de isolados da natureza, freqüentemente, essas estirpes selvagens produzem a enzima desejada em quantidades consideradas baixas para uso comercial. O principal impedimento na produção de enzima é a repressão catabólica que pode reprimir a biossíntese da várias enzimas (Silva Filho & Vidor, 2000). Por isso, a busca por meios indutores e condições de cultivos adequados é determinante na escolha dos melhores isolados.

### 3.7. Classificação das lipases

As lipases microbianas podem ser classificadas em três grupos, de acordo com a sua especificidade para com o substrato. O **primeiro grupo** não apresenta especificidade posicional com respeito à estrutura química do ácido graxo. Como exemplo, as lipases originadas de *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *Corynebacterium acnes* e *Chromobacterium viscosum* (Arpigny & Jaeger, 1999). O **segundo grupo** hidrolisa apenas ligações éster primárias, isto é, ligações éster em átomos do carbono 1 e carbono 3 do glicerol. As lipases de *Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens* e *P. geniculata* são classificadas nesse grupo (van Oort *et al.*, 1989). As lipases de *P. glumae* e *P. fluorescens* também apresentam uma baixa atividade para ligações éster secundárias (Charton *et al.*, 1991). De

fato, muitas lipases bacterianas têm certa preferência para as ligações ésteres primárias, mas são também capazes de hidrolisar ligações éster secundárias, e assim pertencer ao primeiro grupo. O **terceiro grupo** de lipase tem especificidade por ácidos graxos. Um exemplo são as lipases de *Geotrichum candidum* específicas para ácidos graxos com uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 (Charton *et al.*, 1991). Em relação a essa característica, foi demonstrado que a estereoespecificidade da lipase é estritamente dependente da pressão superficial do substrato (Ransac *et al.*, 1990). Um aumento da densidade lipídica na interface ar-água diminui a estereoespecificidade de muitas lipases. Essa estereoespecificidade pode também ser dependente do comprimento da molécula de ácido graxo do substrato (Rogalska *et al.*, 1993).

### 3.8. Fisiologia e regulação da produção de lipase

Lipases extracelulares normalmente aparecem no meio de cultura quando as células alcançam o final da fase logarítmica de crescimento (Jaeger *et al.*, 1994). Lipases microbianas são produzidas, na maioria das vezes, por cultura submersa (Ito *et al.*, 2001), mas métodos em meio de cultura sólidos também são utilizados (Christensen *et al.*, 2003; Sene *et al.*, 2002). Muitos estudos têm sido desenvolvidos para definir um meio ótimo para os requerimentos nutricionais para a lipase, cuja produção é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, o pH do meio, a temperatura de crescimento e a concentração de oxigênio dissolvido (Coutinho *et al.*, 2001). Muitos trabalhos indicaram a influência dos componentes do meio de cultura com relação à produção de lipase. Com relação às fontes de carbono, alguns estudos confirmam uma alta produção de lipase na presença de óleos como indutores enzimáticos. A presença de óleo de oliva em concentrações que variam de 0,1% a 3% induz fortemente a produção de lipase bacteriana. A Tabela 3 apresenta diversos níveis de concentrações de óleo de oliva para uma boa indução enzimática.

**Tabela 3: Diferentes fontes de substratos para a lipase.**

Organismo	Indutores	%	pH	Temp. (°C)	Ref.
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	óleo de palmeira	0,15	10	60-65	Kim <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus sp A 30-1 (ATCC 53841)</i>	ext. levedura	0,10	9,5	60	Wang <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacillus sp. Wai 28A 45</i>	óleo de oliva	1,00			Sugihara <i>et al.</i> (1991)
<i>Bacillus sp. Wai 28A 45</i>	tripalmitina	0,50	70		Janssen <i>et al.</i> (1994)
<i>Pseudomonas aeruginosa KKA-5</i>	ext. levedura	0,05	45		Sharon <i>et al.</i> (1998)
<i>P. pseudoalcaligenes F111</i>	óleo de oliva	0,40			Lin <i>et al.</i> (1996)
<i>P. sp KW1-56</i>	peptona	2,00	60		Izumi <i>et al.</i> (1990)
<i>P. fluorescens S1K WI</i>	óleo de oliva	2,00	8,5		Lee <i>et al.</i> (1993)

Fonte: Sharma *et al.* (2001).

Pastor *et al.* (1991) observaram uma produção de lipase por *Bacillus* na presença de óleo de oliva em uma concentração de 1% em placa de Petri, com uma significativa redução das atividades na ausência do óleo. Kobori & Jorge (2005) compararam diferentes óleos vegetais como de oliva, soja, girassol, semente de algodão, milho e castanha como fontes de carbono e substratos para a lipase. Dentre os óleos testados, o óleo de oliva promoveu a máxima produção de lipase. O mesmo resultado em relação ao óleo de oliva com indutor para lipase foi obtido por Sharma *et al.* (2002) entre outros, que referenciam também o óleo de oliva como um componente barato e eficiente para análises de lipases e um bom substituto aos substratos sintéticos, que em geral, são caros. A bactéria termofílica *B thermoleovorans* apresentou atividade de exolipase e alta taxa de crescimento sobre substratos lipídicos em temperaturas elevadas (Lima *et al.*, 2003). Esses autores utilizaram óleo de oliva numa concentração de 1,5% como única fonte de carbono, com registro de crescimento a 65° C com uma atividade máxima de lipase no valor de 520 U.L<sup>-1</sup> durante a fase de crescimento exponencial. O isolado cresceu sob uma variedade de substratos lipídicos como óleo de oliva, soja e óleos minerais, triglicerídeos e surfactantes sintéticos (*Tween* 20 e 40).

Além dos óleos como bons indutores para a enzima, as fontes de nitrogênio também influenciam a indução enzimática de lipase. A peptona e o extrato de levedura apresentam-se como as melhores fontes nitrogenadas para lipases microbianas quando comparadas às outras fontes como extrato de carne, triptona ou farelo de trigo (Sharma *et al.*, 2001).

### **3.9. Cinética e ativação interfacial**

As lipases são enzimas que têm em seus substratos naturais, os triglicerídeos e o seu modo de ação se assemelha ao das esterases, porém, sua atividade aumenta quando situada na interface polar/apolar (água/óleo) e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. A teoria atualmente mais aceita para esse fenômeno é de que uma parte da superfície da enzima se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar e que essa conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (Pastore *et al.*, 2003; Akoh *et al.*, 2004)

Como a degradação do lipídio ocorre exclusivamente na interface água-óleo, isso implica que a concentração de moléculas de substratos nessa interface determina diretamente a taxa de lipólise (Jaeger *et al.*, 1994). As propriedades físicas dos lipídios influenciam as propriedades das enzimas lipolíticas, o que pode ser demonstrado pela diferenciação entre esterases e lipases (Sharma *et al.*, 2001). A atividade das esterases ocorre em função da concentração do substrato seguindo a cinética clássica de Michaelis-Menten, com a taxa máxima da reação sendo alcançada bem antes da solução tornar-se saturada. Em contraste, as lipases não mostram quase nenhuma atividade com o mesmo substrato em seu estado monomérico. Contudo, quando o limite de solubilidade do substrato é

excedido, há um incremento na atividade da enzima pela transformação do substrato em uma emulsão (Jaeger *et al.*, 1994). A atividade da lipase depende da presença de uma interface entre o lipídio e a água e quando a lipase relaciona-se com o lipídio, uma mudança conformacional ocorre, fazendo com que a cadeia polipeptídica se afaste, liberando o sítio ativo da enzima que se torna inteiramente acessível, promovendo a interação hidrofóbica entre a enzima e a superfície do lipídio. Essa observação explica o fenômeno de ativação interfacial com a cadeia polipeptídica, causando inativação se nenhuma interface lipídica estiver presente.

### **3.10. A atividade da enzima**

Jaeger & Kouker (1987) apresentaram um trabalho clássico em que analisaram a produção de lipase em placas de Petri contendo trioleoglicerol e Rodamina B. A atividade da enzima foi monitorada com luz ultravioleta (UV) em 350nm. Após 16 horas de incubação a 37°C, colônias com atividade da lipase apresentaram fluorescência laranja e com a contínua incubação, os halos formados ao redor das colônias também passaram a emitir fluorescência laranja sob UV.

Bell *et al.*(1999) analisaram a atividade de lipase isoladas a partir de *Bacillus* e clonadas em *E. coli*. As lipases testadas apresentaram atividade em uma ampla faixa de temperatura, com a máxima ativação próxima a 60°C. A atividade das enzimas com relação ao pH ficou na faixa de 5 a 11, com a máxima atividade em pH 9. Nesse estudo, ficou demonstrado que a lipase de *B. thermoleovorans* foi clonada usando PCR e expressa em *Escherichia coli*. Suas principais características referem-se à termoestabilidade, bem como à atividade em pH alcalino.

Estirpes de *E. coli* que não apresentaram produção de lipase acumularam Rodamina B, isto é, formaram colônias rosadas e não emitiram fluorescência laranja (Jaeger & Kouker, 1987), o que pode ser uma característica identificadora de isolados não produtores de lipase. A aplicação de Rodamina B em meios de cultura em placas de Petri é insensível às mudanças de pH e permite o reisolamento das bactérias, as quais não apresentam nenhuma inibição no crescimento ou mudança das propriedades fisiológicas (Jaeger & Reetz, 1998)

O mecanismo molecular envolvendo a formação de produtos fluorescentes gerados a partir da hidrólise de triacilgliceróis (óleo de oliva, por exemplo) pela lipase é desconhecido. Um mecanismo sugerido é a formação de um complexo entre a Rodamina B catiônica e o íon de ácido graxo (Jaeger & Kouker, 1987).

Uma quantificação direta da lipase é dificultada, presumivelmente, em função da pouca quantidade de moléculas da enzima liberadas no meio a partir das colônias em crescimento. No entanto, uma noção da produção pode ser pela análise do halo de degradação do óleo em placa de

Petri, onde o logarítmo da concentração da lipase liberada é linearmente correlacionado ao diâmetro da zona de degradação (halo) que se forma ao redor das colônias lipolíticas (Gupta *et al.*, 2003).

De qualquer forma, a quantificação direta pode ser feita pelo sobrenadante das colônias crescidas em meios indutores (Jaeger & Kouker, 1987), aplicando-se posteriormente em reações de colorimetria em espectrofotômetro quando do uso de para-nitrofenilpalmitato (p-NPP) ou outro substrato para esse fim.

Bell *et al.* (1999) reportaram a produção de lipase alcalina termoestável a partir de *Bacillus stearothermophilus* L1 em um meio contendo extrato de carne e óleo palmítico. A enzima foi mais ativa na temperatura 60-65°C e pH entre 9 e 10, sob o substrato sintético p-nitrofenilcaprilato. Liu *et al.* (2006), estudando a produção de lipase extracelular de *Burkholderia*, mostraram a sua atividade sob condições alcalinas com pH entre 7 a 10, tendo a máxima atividade ao redor do pH 8,5.

### **3.11. Purificação da lipase**

A purificação das lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica (unidades de atividades/mg de proteína) para a aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final (Koblitz & Pastore, 2004). O seu emprego praticamente determina o seu grau de purificação. Na indústria farmacêutica, por exemplo, é requerido um alto grau de pureza, o que encarece muito a enzima, e por conseqüência o produto final. Na indústria oleoquímica muitas vezes as enzimas parcialmente purificadas (extrato bruto enzimático) conseguem bons resultados (Sharma *et al.*, 2001).

A maioria das lipases microbianas é extracelular e os processos de fermentações geralmente são seguidos pela remoção das células do meio líquido por centrifugação ou por filtração. O extrato bruto enzimático é então concentrado por ultrafiltração, precipitação por sulfato de amônio ou extração com solventes orgânicos. Grande parte dos esquemas de purificação utiliza uma etapa inicial de precipitação, onde cerca de 60% dos métodos utiliza sulfato de amônio e 40% utilizam etanol, acetona ou um ácido (geralmente clorídrico) seguido por uma combinação de métodos cromatográficos (Saxena *et al.*, 2003).

Como regra geral, a maioria dos protocolos de purificação segue a seguinte lógica: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca, como a de troca iônica. Em seguida há a aplicação com colunas de interação hidrofóbica que apresentam a vantagem adicional de dispensarem a diálise de extratos precipitados pela adição de sais (Koblitz & Pastore, 2004).

## **3.12. O buriti (*Mauritia flexuosa* L.)**

### **3.12.1. Distribuição e importância regional**

O buritizeiro é uma das maiores palmeiras da Amazônia, possuindo de 30 a 50 cm de diâmetro e de 20 a 35 metros de altura. Oferece um fruto nutritivo importante para as pessoas e animais da região. A distribuição geográfica do buritizeiro abrange toda a região amazônica, o Norte da América do Sul e estende-se pelo Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Essa palmeira prefere áreas alagadas, igapós, beiras de igarapés e rios, onde é encontrada em grandes concentrações. A água ajuda na dispersão de sementes, formando populações extensas de buritizais. É uma espécie dióica, isto é, apresenta indivíduos masculinos e femininos, os quais florescem durante os mesmos meses (setembro a dezembro) e frutificam de janeiro a julho. Uma palmeira de buriti produz de 40 a 360 quilos de fruto. Em 1 hectare manejado podem ser produzidas de 2,5 a 23 toneladas de fruto por ano. Estima-se que uma palmeira feminina de buriti produz de 1 a 9 cachos e, cada cacho, de 600 a 1200 frutos. Considerando uma média de 64 palmeiras femininas por hectare e uma produção média de 200 quilos de frutos, é possível obter 384 quilos de óleo da polpa por hectare. A produção das palmeiras declina somente após 40 a 60 anos (Castro, 2002).

Do ponto de vista do aproveitamento e do potencial de utilização, as duas espécies mais importantes são a *Mauritia flexuosa* e *M. vinífera*, que dentro do gênero, são as de maior disseminação no país, sobretudo na Amazônia (Crodamazon, 2002). Castro (2002) revela que essas duas espécies são variações ecológicas de uma mesma espécie. O buriti também é conhecido no Brasil como miriti, muriti e buriti-do-brejo e os frutos, folhas, óleo, pecíolo e tronco são utilizados para muitos fins, como suco, doce, picolé, fritura de peixe, sabonete, óleo para pele (Castro 2002).

A coleta florestal para fins comerciais é um modo de exploração arcaico, que na floresta amazônica brasileira teve seu apogeu no início do século, com o período da borracha, e que se refere essencialmente à exploração de produtos florestais não lenhosos. Historicamente, consideram-se como produtos tradicionais do extrativismo a borracha e a castanha-do-Brasil. No entanto, a partir da década de 80 essa prática voltou em voga, aplicada a outros recursos, principalmente frutos e oleaginosos, que então passaram a serem denominados produtos não tradicionais do extrativismo (Pallet, 2002).

Os produtos naturais e os artesanais jamais deixaram de figurar na pauta do consumo mundial, sempre considerados como símbolo de bom gosto e mais recentemente, como de preocupação ambiental. Os frutos e oleaginosos do extrativismo na Amazônia são produtos ancestrais cuja biodiversidade é pouco valorizada fora do contexto amazônico. Atualmente parecem estar surgindo novas oportunidades de mercado para esses produtos. A exploração racional não coloca em risco o

estoque de recursos. Provenientes da floresta, esses produtos estão carregados de valores novos trazidos pela Amazônia e têm uma imagem “ecologicamente correta” e, portanto, encontram facilmente lugar em mercados alternativos do tipo “verde”, “justo ou *fair trade*” e os “orgânicos”. Entretanto, devido às suas especificidades geográficas e sociais, a Amazônia apresenta injunções que justificam uma estratégia diferenciada para a valorização desses produtos, com uso de ferramentas técnicas e organizacionais apropriadas (Pallet, 2002), e que, necessariamente, devem envolver todos os passos da cadeia produtiva, a fim de promover uma maior agregação de valor.

O consumo desse tipo de produto tem aumentado consideravelmente. Como consequência disso, as indústrias mundiais de alimentos, bebidas, cosméticos, agro-químicos e de produtos medicinais começaram a reconsiderar suas produções e a destacar os produtos naturais (Pallet, 2002; Clement *et al.*, 2005).

### **3.12.2. Utilização do óleo de buriti**

Apesar de sua utilização crescente pelas indústrias de cosméticos e fármacos, os óleos provenientes de produtos da Amazônia ainda são pouco conhecidos. A determinação do conhecimento das características físicas e químicas e suas possibilidades de transformação são fundamentais para o processo de extração e industrialização dos óleos.

Na Amazônia, o destaque fica por conta das plantas oleaginosas, mas mesmo assim, a valorização dos frutos e de plantas está sujeita às restrições de desenvolvimento da Região, que conta com limitados conhecimentos científico de apoio e onde as distâncias entre parceiros, fornecedores, clientes e, sobretudo, mercados, implicam em estratégias específicas. Dentre os óleos amazônicos que vêm sendo estudados, os frutos de palmeiras, como o buriti, tucumã, macaúba e a pupunha são fontes potenciais de carotenóides pró-vitamina A. Há ainda o dendê, uma espécie introduzida, mas com grande potencial na Região. Mesmo assim e apesar da diversidade de produtos elaborados a partir dos vários segmentos da palmeira, o buriti não tem sido explorado intensivamente.

O fruto de buriti pode produzir dois tipos de óleos vegetais com potencial de uso nas indústrias químicas e alimentícias. Da polpa dos frutos são extraídos óleos ricos em ácidos oléicos. Das sementes, obtêm-se os óleos ricos em ácidos láuricos. O óleo da polpa do fruto também pode ser usado para fabricar protetor solar, bloqueando completamente as radiações ultravioletas, que são prejudiciais à pele humana (Crodamazon, 2002).

A exploração do óleo de buriti na Amazônia em nível industrial é dificultada, principalmente, por dois fatores: colheita e transporte de frutos. Durante a colheita, os frutos caem da árvore e quase sempre sofrem ruptura parcial da casca, o que expõe a polpa oleosa ao meio ambiente e à

degradação. No transporte, os frutos são armazenados em condições não apropriadas e, muitas vezes, seguem assim por várias horas, oferecendo condições favoráveis à deterioração do óleo. Por isso, os processos existentes para extração (mecânico, físico ou químico) influenciam as propriedades físico-químicas dos óleos (Silveira & Costa, 2005).

O buriti chama atenção por possuir grande quantidade de componentes de alto valor agregado, que se deve à alta concentração de carotenóides, possuindo o mais alto teor de vitamina A. Esse tipo de vitamina não pode ser encontrado nos alimentos, sendo metabolizada pelo próprio organismo humano. Além disso, pesquisas na área de biologia vêm demonstrando que os carotenóides atuam como antioxidantes, protegendo as células e ajudando a prevenir algumas doenças crônicas. Alguns autores se referem à polpa do buriti como sendo a maior fonte vegetal de carotenos. Silveira & Costa (2005) citam que Chaves & Pechnik (1949) reportaram 5000 U.I. de pró-vitamina A.g<sup>-1</sup> de óleo, um nível 5 vezes superior ao do óleo de dendê (*Elaeis guineensis*), enquanto que Rizzini & Mors (1976) reportaram 300 ng de β-caroteno em 100 g de polpa desidratada, quantidade três vezes maior que na polpa do dendê. Esses dados confirmam a variabilidade observada no buriti, mas que pode ser explorada. Análises mais detalhadas são necessárias para identificar variações intra e interpopulacionais na composição do mesocarpo, como também seu valor nutricional, para melhor unir seu uso e melhoramento.

### **3.12.3. Transformação enzimática do óleo de buriti pela aplicação da lipase**

Outro aspecto importante quanto à utilização do óleo é a possibilidade de utilizá-lo no processo de hidrólise aliado à atividade da lipase para a obtenção de monoésteres, ácidos oleicos e β-caroteno (Uenojo *et al.*, 2005). Os catalisadores enzimáticos promovem a hidrólise de óleos vegetais em condições brandas de temperatura e pressão, obtendo-se produtos mais puros e de baixo custo energético, sendo uma alternativa aos inconvenientes associados aos processos físico-químicos, como o alto gasto energético (Vieira *et al.*, 2005). Devido à sua natureza protéica, as lipases são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, composição em ácidos graxos, entre outros e, portanto, um melhor conhecimento da influência desses fatores na atuação da preparação enzimática permitirá a obtenção de rendimentos mais elevados de hidrólise.

Nesse tipo de reação, as propriedades bioquímicas (pH, temperatura, estabilidade térmica) e cinéticas ( $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ ) de uma reação de hidrólise em emulsões são determinantes para o sucesso. Assim, a composição dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal pode influenciar a atividade da lipase, tendo em vista que a literatura indica que a atividade hidrolítica de triglicerídeos por lipases aumenta com: a) massa molecular dos ácidos graxos componentes; b) grau de insaturação e c) número de ácidos graxos na molécula do triglicerídeo. Assim, os triglicerídeos compostos de alguns ácidos, como o oléico e o linoléico, por exemplo, sofrem hidrólise com maior rapidez que os

diglicerídeos e os triglicerídeos de ácidos de cadeia curta, como o butírico. Em geral, as gorduras são atacadas mais ativamente que outros ésteres de ácidos graxos (Snellman *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2005).

### 3.12.4. Características físico-química do óleo de buriti

A composição química do óleo de buriti, que pode ser determinada por cromatografia em fase gasosa, permite identificar a maior participação dos ácidos insaturados, tendo como componentes principais os derivados de ácido oléico, que representam mais de 80% da mistura total. Devido às qualidades do óleo de buriti, sua composição química pode ser comparada à do óleo de oliva, cujos teores em ácidos graxos mostram uma estreita correlação entre ambos. A Tabela 4 compara as respectivas composições química dos óleos de buriti e de oliva.

**Tabela 4: Composição química dos ácidos graxos (em %) para o óleo de oliva e buriti.**

Ácido Graxos	Buriti (%)	Oliva (%)
Ác. Palmítico	16,3	11,3
Ác. Estearico	1,3	0,8
Ác. Palmitoléico	0,4	1,5
Ác. Oléico	79,2	73,4
Ác. Linoléico	1,4	11,4
Ác. Linolênico	1,3	1,2
Ác. Saturados	17,7	12,2
Ác. Insaturado	82,3	87,8

Fonte: Crodamazon (2002).

Do ponto de vista das características físico-químicas, os carotenóides são moléculas hidrofóbicas e conseqüentemente interagem com a parte lipolítica da célula. Sendo moléculas rígidas, elas se dispõem paralelamente na superfície da membrana. Na natureza, carotenóides hidroxilados estão presentes como éster de cadeia longa (fazendo-os mais hidrofóbicos) ou como glicosídeos (deixando-os mais polares) (Silveira & Costa, 2005). Essa características são importantes, pois podem influenciar a atividade da lipase em meio com óleo de buriti.

A intensa coloração vermelha do óleo, que arrasta as substâncias carotenóides no processo de extração, favorece seu emprego como um corante natural de excepcional valor, podendo substituir os aditivos artificiais comumente utilizados na indústria de alimentos ou cosméticos. A Tabela 5 traz a caracterização física do óleo de buriti que serve como padronização do óleo.

**Tabela 5: Caracterização física do óleo de buriti.**

<b>Análise Típica</b>	<b>Característica normal</b>
Aparência (25°)	Líquido
Cor	Vermelho
Odor	Característico
Índice de Acidez	10 máx.
Índice de Saponificação	190- 200
Índice de Iodo	70-80
Índice de Refração (25°)	1,45 – 1,47
Índice de Peróxido	20 máx.
Umidade	1 máx.

Fonte: Crodamazon, 2002.

#### **4. Referências Bibliográficas**

Akoh, C.C.; Lee, G.C; Liaw, Y.C.; Huang, T.H.; Shaw, J.F. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipidic Research* 43(2004), 534-552.

Arpigny, J.E.; Jaeger, K.E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343, 177-183.

Bach, H.J.; Hartmann, A.; Schloter, M.; Munch, J.C. 2001. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. *Journal of Microbiological Methods* 44(2001):173-182.

Barbosa, V.; Ferreira, P. S.; Mano, D. M.; Schloter, M.; Langenbach, T. 2001. The impact of the herbicide atrazine on the diversity of rhizosphere microbial communities. *XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Foz de Iguaçu-PR. Resumos, Microbiologia do solo, M-44. p. 261.

BDT - Base de Dados Tropical, 1998 a. Estratégia Nacional de Conservação ex situ. Grupo de trabalho temático: Conservação ex situ. In: <http://www.bdt.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt3>. Página acessada em 21/02/2001.

BDT - Base de Dados Tropical, 1998 b. Estratégia Nacional de Diversidade Biológica:

Microrganismos e Biodiversidade de Solos. In: <http://www.bdt.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt10>. Página acessada em 21/02/2001.

- Beilen, J.B.; Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current opinion in Biotechnology* 2002, 13:338-344.
- Bell, P.J.L.; Nevalainen, H.; Morgan, H.W.; Bergquist, P.L. 1999. Rapid cloning of thermoalkalophilic lipases from *Bacillus* spp using PCR. *Biotechnology Letters* 21:1003-1006.
- Bull, A.T.; Ward, A. C.; Goodfellow, M. 2000. The Search and Strategies of Discovery for Biotechnology: the Change of Paradigm. *Microbiol. Mol. Biol. Ver.* (64):573-606.
- Canhos, V.P. 1998. Infra Estrutura Científica e Tecnológica: Coleções de Culturas de Microrganismos. In: Biodiversity: Perspectives and Technological Opportunities. Base de Dados Tropical, 1998.
- Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G.; Shimizu, M.T.; Silva, D.M. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26(1), 75-80.
- Carvalho, P.O.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Silva, D.M.; Cotesini, F.J.; Bizaco, R. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28(4), 614-625
- Castro, H. F. 2002. Imobilização de lipases e subsequente uso na síntese de ésteres aromatizante. In ENZITEC 2002, Livro de resumos, p48.
- Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* vol 27, nº 1, 146-156.
- Charton, E., Davies, C., Sidebottom, C.M., Sutton, J.I, Dunn. P.P.J., Slabas, A.R.; Macrae, A.R. 1991. Purification and substrate specificities of lipases from *Geotrichum candidum*. In: Lipases: Structure, Mechanism, and Genetic Engineering (1), Alberghina, R.D. Schmid and Verger, R., Eds.), GBF-Monographs Vol. 16. pp. 335 -338. Verlag Chemie, Weinheim.
- Clement, C.R.; Lleras Pérez, E.; van Leeuwen, J. 2005. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociencias*, Montevideo, 9(1-2): 67-71.
- Coutinho, H. L. C.; Oliveira, V. M. de; Manfio, G. P. 2001. *Diversidade Microbiana em Amostras Ambientais*. In: Garay, I & Dias, B. F. S.(eds) 2001. Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Ed. Vozes pp215-232.
- Crodamazon, 2002. Boletim Técnico – Óleo de Buriti. Croda do Brasil – Campinas (SP), 3p
- Dunbar, J; Barns, S.M.; Ticknor, L.O.; Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* June 2002, p.3035-3045.

- Ferreira, M.J.. 2001. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: Garay, I & Dias, B. F. S.(eds) 2001. Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Ed. Vozes pp215-232.
- Fungaro, M.H.P. Maccheroni Jr., W. 2002. Melhoramento genético para a produção de enzimas utilizadas na indústria de alimentos. In: Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C.; Nass, L.L. Valois, A.C.C. 2002. Recursos Genéticos e melhoramento – microrganismos. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 427-453.
- Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotech Appl. Biochem.* (2003) 37:63-71.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzyme: a review. *Bioresource Technology* 89 (2003) 17-34.
- Hungria, M. 1996. O emprego de técnicas de biotecnologia nos estudos de microbiologia do solo: solução para velhos e novos problemas. In: Alvarez, V. H.; Fontes, L. E. F.; Fontes, M. P.F. (eds.). O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentável. Viçosa: SBCS/UFV/DPS, 1996. p. 489-504.
- Hungria, M.; Campos, R. J.; Andrade, D. S.; Chueire, L. M.; Grange, L.; Ferreira, M. C. 2001. Diversity of symbiotic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian soils. In: *XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia*. Foz de Iguaçu-PR. Resumos, Microbiologia do solo, M-37, p. 260.
- Ito, T.; Kikuta, H.; Nagamori, E.; Honda, H.; Ogino, H.; Ishikawa, H.; Kobayashi, T. 2001. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Biosci. Bioeng.* 2001 (91):245-250.
- Jaeger, K.E.; Kouker, G. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology* (1987):211-213.
- Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, M.; Misset, O. 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* (15):29-63.
- Karadzic, I.; Masui, A.; Zivkovic, L.I.; Fujiwara, N. 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(2), 82-89.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, r. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology* 77 (2001) 215-227.

- Kawai, M.; Matsutera, E.; Kanda, H.; Yamaguchi, N.; Tani, K.; Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-Based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* Feb. 2002, p.699-704.
- Koblitz, M. G.B.; Pastore, G.M. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(2):287-292.
- Kobori, C.N.; Jorge, N. 2005. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciênc. Agrotec.* Lavras., 29(5), 1008-1014.
- Krállová, B. 1999. Electrophoretic methods for isolation and characterization of enzymes. *Analytica Chimica Acta*, 383(1999):109-117.
- Lima, V.M.G.; Kriegel, N.; Sarquis, M.I.M; Mitchel, D.A.; Ramos, L.P., Fontana, J.D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol* 41(2):105-110.
- Liu, C.; Lu, W.; Chang, J. 2006. Optimizing lipase production of *Burkholderia sp.* response surface methodology. *Process Biochemistry* 41(2006), 1940-1944.
- Nascimento, M.G.; Neto, P.R.C.; Mazzuco, L.M. 2001. Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* (2001):19; 28-31.
- Pallet, D. 2002. Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos por extrativismo. *Colóquio SYAL – Montpellier*, 2-12.
- Pandey, A.; Benjamin, S. Soccol, C.; Nigan, P. Krieger, N.; Soccol, V., 1999. The realm of microbial lipase in biotechnology: a review. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119-131.
- Panke, S.; Wubbolts, M.G. 2002. Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:111-116.
- Pastor, M.D. ; Lorda, G.S.; Balatti, A. 2001. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology* (2001) 32:6-9.
- Pastore, G. M. 2002. Processos e Produção: Aplicação de Enzimas. *Enzitec* 2002. Brasília. Livros de Resumos p42.

- Pastore, G.M. Costa, V.S.R.; Koblitiz, M.G.B. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23(2):135-140, maio-ago.
- Peixoto, R.S.; da Costa Coutinho, H.L.; Rumjanek, N.G.; Macrae, A.; Rosado, A.S. 2002. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyses bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 2002, 35, 316-320.
- Pickup, R. W. 1991. Development of molecular methods for the detection os specific bacteria in the environment. *Journal of General Microbiology*, 137:1009-1019.
- Polizelli, M. L. T. M.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; Aquino, A. C. M. M.; Rizzatti, A. C. S.; Guimarães, L. H. S. 2002. Enzimas Industriais: Classes e Origens. *Enzitec 2002*. Brasília. Livros de Resumos p23.
- Ransac, S., Rogalska, E., Gargouri, Y., Deveer, A.M.'F.J., Paltauf, F., de Haas, G.H. and Verger, R. (1990) Stereoselectivity of lipases. I. ttydrolysis of enantiomeric glyceride analogues by gastric and pancreatic lipases. A kinetic study using the monomolecular film technique. *J. Biol. Chem.* 265, 20263 20270.
- Rodriguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17(1999) 319-339.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. and Verger, R. (1993) Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality* 5, 24-30. Separation and purification of two lipases from *Chrolobaeterilm uiseoM#n* using AOT reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 38. 1302 13(17).
- Roitman, I. 1985. Microrganismos: biologia e importância. In: Azevedo, J. L.. 1985. *Genética de Microrganismos*. Em *Biotecnologia e Engenharia Genética*. FEALQ. Piracicaba.
- Rosseló-Mora, R.; Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25(2001):39-67.
- Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B. Davidson, W.S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52(2003) 1-18.
- Sene, C.P; Marques , P.D.; Ferro, P.R.S.; Pinheiro, D.M.; Pastore, C.M. 2002. Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina. *Enzitec 2002*, Brasília. Livro de Resumo, p72-73.
- Sharma, R.; Chisti Y.; Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advandes* 19(2001) 627-662.

- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L.; Gupta J., 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. Proc. Biochem. 37, 1075-1084.
- Silva Filho, G. N.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. R. Bras. Ci. Solo, 24:311-319.
- Silveira, B.I.; Costa, D.S. 2005. Estudos dos processos de extração e hidrólise enzimática do óleos da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*). In.: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005. CD dos Anais do Simpósio, 7p.
- Snellman, E.A.; Sullivan, E.R.; Colwell, R. R. (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. Eur. J. Biochem. (2002) 269:5771-5779. 22.
- Sutherland, J.D. 2001. Evolutionary optimisation of enzymes. *Combinatorial Chemistry* (2001) 263-268.
- Uenojo, M.; Belini, M.; Pastore, G.M. 2005. Isolamento e Seleção de Microrganismos Potencialmente Biotransformadores de Carotenóides. In.: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005. CD dos Anais do Simpósio, 7p.
- van Oort, M.G., Debeer, A.M.T.J., Dijkman, R., Tjeenk, M.L., Verheij, H.M., De Haas, G.H., Wenzig, E. and G6tz, F. (1989) Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. Biochemistry 28, 9278-9285.
- Vieira, F.C.V., Pierre, C.T.; Castro, H.F. (2005), Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. *Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Campinas, 1-6.
- Wu, X.; Jaaskelainen, S.; Linko, Y., 1996. An investigation of crude lipase for hydrolysis, esterification and transesterification. *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 226-231.

## **5. Capítulo 1: Seleção de linhagens bacterianas produtoras de lipase isoladas de solos da Amazônia.**

### **5.1. Resumo**

As lipases (Triacilglicerol acil hidrolase E.C. 3.1.1.3) são enzimas de interesse industrial por catalisarem a hidrólise de triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos livres, atuando também em uma ampla faixa de reações de bioconversão como a interesterificação ou esterificação. Esse trabalho apresenta um processo de seleção de bactérias produtoras de lipase. De um total de 440 isolados bacterianos ativados, 181 foram selecionados para os testes qualitativos em placas de Petri. Desses, 75 isolados (41%) foram lipase positivos. Os índices enzimáticos foram analisados em diferentes temperaturas (30°, 35°, 40° e 45°C), com a atividade enzimática diminuindo com o aumento da temperatura. Aos 30° C houve a maior atividade enzimática, servindo assim como temperatura chave para a seleção. Após 72 horas de cultivo em meio de cultura indutor contendo óleo de oliva como substrato e corante Rodamina-B, os índices enzimáticos foram avaliados através da relação entre o diâmetro do halo ao redor da colônia e o diâmetro da colônia. Os isolados foram classificados em diferentes categorias conforme a atividade enzimática e comparados com uma estirpe padrão. Dos isolados testados, vinte e quatro foram selecionados para etapas posteriores de estudo sendo que dez isolados apresentaram um índice igual ou maior do que o padrão usado como referência, demonstrando o potencial da microbiota estudada.

**Palavras-chave:** Bioprospecção de enzima, lipase, bactéria, microbiologia de solo, Amazônia.

## **Chapter 1: Selection of bacterial stream producing lipase isolated from Amazon soils**

### **5.2. Abstract**

The lipases (triacilglycerol acil hidrolase E.C. 3.1.1.3) are enzymes of industrial interest for hydrolysis of triacilglycerols to glicerol and fat acids free, acting also in reactions of bioconversion like the interesterification or esterification. This work presents a selection of bacteria producer of lipase, with the objective to apply the enzyme in the Buriti oil hydrolysis. Of 440 activated bacteria, 181 isolated ones were effectively tested in medium inductors. Of this total, 75 isolated ones (41 %) showed lipase production. The enzymatic activity were tested in different temperatures (30°, 35°, 40°, 45°C), with the enzymatic activity lessening with the increase of the temperature. To 30°C had to peak of enzymatic activity. After 72 hours of cultivation in Petri dishes containing oil of olive like substrate, the enzymatic index were valued through the relation *between* the diameter of the halo around the colony and the diameter of the colony. The isolated they were classified in different categories according to the enzymatic activity. Of isolated tested, twenty four were selected for the quantitative lipase tests and also for the affinity tests to buriti oil in Petri dishes.

**Key words:** lipase, soil microbiology, bacteria, Amazonian.

### 5.3. Introdução

As lipases (Triacilglicerol acil hidrolase E.C. 3.1.1.3) são enzimas de interesse industrial por catalisarem a hidrólise de triacilgliceróis a glicerol e ácidos graxos livres, atuando também em uma ampla faixa de reações de bioconversão como a interesterificação ou esterificação. Suas características únicas incluem especificidade por substrato, estereoespecificidade, regioespecificidade e habilidade para catalisar reações heterogêneas na interface óleo-água (Karl-Erich e Reetz, 1998; Sharma *et al.*, 2002). A gama de aplicações e a tendência crescente do mercado para esse tipo de enzima tornam importante a busca por fontes alternativas a partir da seleção de microrganismos (Jaeger & Kouker, 1987; Sharma *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2003; Haki e Rakshit, 2003; Koblitz e Pastore, 2004; Castro *et al.*, 2004; Nitscke *et al.*, 2004).

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial das enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados. As lipases são solúveis em água, mas catalisam reações envolvendo substratos lipofílicos, devido a sua estrutura molecular composta por uma “tampa”, que protege o sítio ativo predominantemente hidrofóbico da enzima e que somente fica exposto ao substrato conforme aumenta a emulsificação no sistema (Pastore, 2002; Castro *et al.*, 2004). Outra característica relevante diz respeito à estabilidade apresentada em diversos solventes orgânicos, aliada às condições suaves de temperatura e pressão (Sharma *et al.*, 2001). Devido à grande variedade de reações que catalisam, as lipases têm inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticas, química e farmacêutica (Sharma *et al.*, 2002; Koblitz e Pastore, 2004). Lipases microbianas podem ser produzidas em grande parte por culturas submersas (Ito *et al.*, 2001). No entanto, métodos com meios de cultura sólidos podem ser usados para esse fim (Sharma *et al.*, 2001). Lipase imobilizada também tem sido utilizada em outros casos (Hemachander *et al.*, 2001; Nascimento *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2004). Há ainda os métodos que envolvem espectrometria, fluorescência ou titulação para a análise da atividade da lipase (Jaeger *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para definir um meio de cultura com requerimentos nutricionais ótimos para a produção de lipase em placa. Por isso, diversas formulações de meio de cultura são encontradas na literatura. A produção é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono, nitrogênio, pH do meio, temperatura e oxigênio dissolvido (Sharma *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2003). A produção de lipase por microrganismos tem sido intensivamente estudada e a presença de indutores é necessária para a expressão da enzima. Dos indutores citados na literatura, o óleo de oliva é o mais empregado, devido à sua maior porcentagem de trioléina em sua composição, triacilglicerol que é substrato natural para as lipases (Saxena *et al.*, 2003). Além disso, é um substituto comercial barato.

Um fato importante reside no estudo da microbiota amazônica que pode representar a descoberta de novas fontes de produtos metabólicos para os mais diversos fins. As condições

ambientais dessa região favorecem uma alta atividade metabólica e o crescimento de inúmeros microrganismos. É nessa diversidade microbiana que se espera encontrar boas fontes enzimáticas. Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar os isolados bacterianos que melhor produzem a enzima lipase em bioensaios em placas de Petri visando futuras aplicações no processo de biotransformação de óleo de buriti.

## **5.4. Material e Métodos**

### **5.4.1. Material biológico**

A pesquisa foi realizada com isolados bacterianos depositados na Coleção de Microrganismos do Solo da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O material foi isolado a partir de coletas de solo e de raízes tanto em ambiente agrícola como florestal (terra-firme, várzea, clareiras). Inicialmente, tanto a solução de solo como os fragmentos de raízes foram colocados em contato com o meio de cultura específico para bactérias solubilizadoras de fosfato, formulado originalmente em Sylvester-Bradley *et al.* (1982). O universo amostral para essa pesquisa compreende o material biológico coletado em diversas regiões do Amazonas como Barreirinha, Manaus, Rio Preto da Eva, Urucu entre outras localidades. No Acre, o material foi coletado na área do Projeto RECA e em Rondônia foi coletado em diversas localidades, totalizando 440 isolados (Tabela 1).

### **5.4.2. Bioensaios**

A seleção dos isolados foi baseada em bioensaios qualitativos através da visualização em placas de Petri em que o princípio envolvido é o da formação do halo ao redor da colônia, indicando uma atividade positiva para a enzima. A segunda fase de testes foi quantitativa, onde a produção e a atividade de lipase foram analisadas em meio líquido com substrato sintético para-nitrofenilpalmitato (p-NPP).

### **5.4.3. Ativação e detecção dos isolados produtores de lipase**

Os isolados bacterianos foram repicados para a ativação do crescimento em placas de Petri com meio basal contendo glicose (1,0%), extrato de levedura (0,2%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5%),  $\text{MgSO}_4$  (0,2%),  $\text{CaCl}_2$  (0,1%) e agar (1,8%), pH 6,5 e incubados a 30° C. Os isolados que crescerem até 72 horas foram selecionados para os ensaios de atividade da lipase.

A detecção da atividade da lipase foi baseada na visualização a partir de um meio de cultura específico contendo óleo de oliva como substrato para a enzima, adicionado com corante Rodamina B, onde a reação positiva é visualizada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (Jaeger & Kouker, 1987; Saxena *et al.*, 2003). A avaliação da atividade enzimática nessa fase de

pré-seleção foi através do **Índice de Ativação da Lipase (IAL)** obtido da relação entre o diâmetro ( $\phi$ ) do halo translúcido ao redor da colônia e o diâmetro da colônia [ $IAL = \phi \text{ halo (mm)} / \phi \text{ colônia (mm)}$ ], seguindo a metodologia descrita em Berraquero (1976), Stamford *et al.* (1998) e Silva Filho & Vidor (2000). Adicionalmente, cada placa foi exposta à luz ultravioleta (UV-A, 350nm) marca BIO-RAD modelo UV Lamp 1660500, seguindo a metodologia proposta em Jaeger & Kouker (1987) para a confirmação de colônias produtoras de lipase, que se tornam fluorescentes sob essa irradiação quando em contato com o corante.

O meio de cultura indutor para a lipase foi baseado em Sene *et al.* (2002) calibrado em pH 8,0 e contendo óleo de oliva (2,0 % v/v), Tween 80 (1,0 % v/v), peptona (0,3% m/v), extrato de levedura (0,2% m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2% m/v),  $\text{MgSO}_4$  (0,1% m/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,1% m/v), agar (1,8% m/v) e corante Rodamina B (0,001% m/v), com as placas de Petri incubadas durante 15 dias e avaliadas a cada três dias. O pH 8,0 foi mantido constante, pois a enzima apresenta atividade ótima nesse pH (Sharma *et al.*, 2001; Sene *et al.*, 2002; Snellman *et al.*, 2002.; Castro *et al.*, 2004 e Koblitz e Pastore, 2004).

#### **5.4.4. Efeito da temperatura na atividade da enzima**

Foram avaliadas quatro temperaturas (30°, 35°, 40° e 45°C) durante o período de incubação, com cinco repetições por isolado, com o objetivo de determinar em qual temperatura os isolados apresentam uma maior produção de lipase.

#### **5.4.5. Ensaio com para-nitrofenilpalmitato (p-NPP)**

Os testes quantitativos foram realizados com os isolados selecionados na fase dos ensaios qualitativos. A determinação da atividade da lipase sobre o substrato sintético para-nitrofenilpalmitato (p-NPP/SIGMA®) seguiu a metodologia descrita em George *et al.* (2003) e Pastore *et al.* (2003). As culturas selecionadas cresceram em meio sólido basal por 72 horas e então foram repicadas em meio líquido basal e incubadas à temperatura ambiente em agitador orbital (160 rpm) por 48 horas. Em seguida, uma alíquota de 1000  $\mu\text{l}$  desse meio foi transferida para o meio líquido indutor contendo 49 mL com os mesmos ingredientes do meio indutor sólido. Após 72 horas, uma alíquota de 2000  $\mu\text{l}$  da cultura foi centrifugada em 12000 rpm por 20 minutos a 4°C para a obtenção da solução enzimática do extrato bruto.

Foi preparada uma solução de p-NPP [2,5 mmol], contendo 0,189 g do substrato em 200 mL de solução tampão acetato de sódio (pH 8; 50mM) adicionado com 2,1% de Triton X-100, com a homogeneização a 70°C. Uma alíquota de 950 $\mu\text{l}$  dessa solução foi retirada e adicionada em outra alíquota de 50  $\mu\text{l}$  da solução enzimática do extrato bruto de cada isolado selecionado. A reação foi testada sob diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 37°C, 45°C e 55°C) por 15 minutos e em seguida, a reação foi paralisada com choque térmico a 0°C por cinco minutos. A degradação do p-NPP pela

ação da lipase libera para-nitrofenol (p-NP) e promove uma coloração amarela na solução. A leitura da absorbância em 410 nm da solução de cada isolado foi comparada com a da reta-padrão para o p-NP, a fim de quantificar a produção de lipase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-NP.  $\text{ml}^{-1}$  sob as condições do ensaio.

## 5.5. Resultados e Discussão

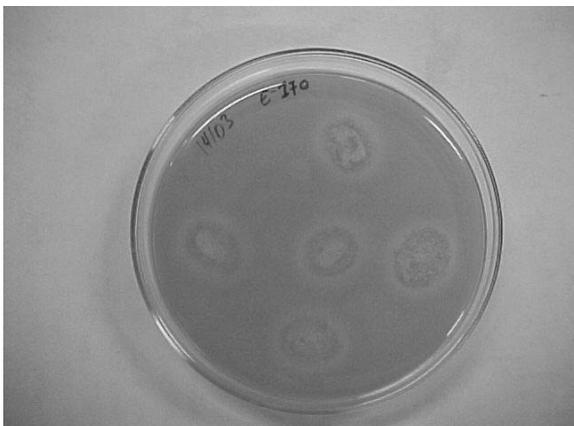
Foram repicados 440 isolados bacterianos. Somente aqueles isolados que apresentaram crescimento de colônias até 72 horas em meio basal foram considerados ativos e, portanto, aptos aos testes de atividade da lipase. Os demais isolados foram rejeitados para os testes posteriores em função de não crescerem no meio basal ou por apresentarem crescimento muito lento. Assim, 181 isolados foram efetivamente testados quanto à atividade lipolítica em meio de cultura sólido. Desse total, 75 isolados (41%) apresentaram atividade positiva nas condições testadas, isto é, promoveram a ação enzimática em meio de cultura sólido contendo óleo de oliva como substrato. Os grupos mais representativos foram os de Rio Preto da Eva (Grupo E – 79 isolados positivos), Urucu (Grupo U - 10 isolados) e do Projeto RECA (Grupo R – 17 isolados). Os demais grupos apresentaram pouco ou nenhum isolado com essa atividade enzimática (Tabela 6).

**Tabela 6: Quantidade de isolados lipase positivos para os grupos estudados**

Coletas	Grupo	Total	Ativos	Lipase +	%
Acre (diversos locais)	A	4	1	1	100%
Barreirinha (AM)	B	19	8	5	63%
Rondônia (diversos locais)	D	11	2	0	0%
Rio Preto da Eva (AM)	E	196	79	39	49%
Manaus (Brasileirinho)	M	22	4	2	50%
Projeto RECA (RO)	R	61	36	17	47%
Urucu (AM)	U	86	42	10	24%
Amazonas (diversos locais)	Z	41	9	1	11%
<b>Total</b>		<b>440</b>	<b>181</b>	<b>75</b>	<b>41%</b>

O meio de cultura contendo triglicerídeo e corante Rodamina-B apresenta-se opaco e com coloração rosa. A utilização do corante facilita as visualizações de microrganismos produtores de lipase (Figura 1). A hidrólise do substrato pela enzima produz o ácido graxo que, ao reagir com o corante, forma um halo translúcido ao redor da colônia (Sene *et al.*, 2002). Essa informação é importante, pois permite diferenciar as colônias lipolíticas daquelas que crescem no meio, mas não

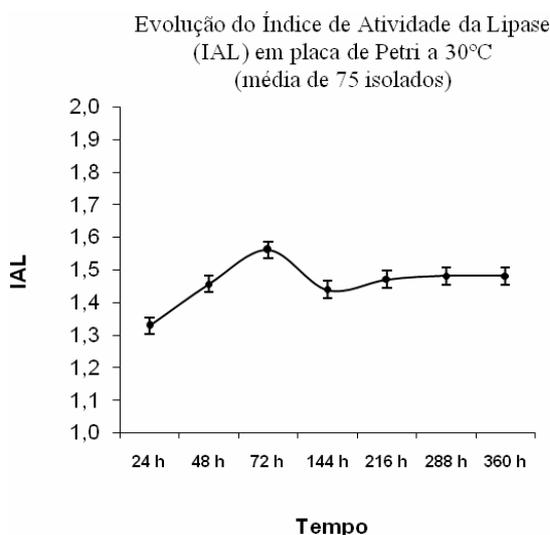
degradam o lipídeo, portanto não formam halo, e que utilizam outras fontes de carbono contidas no meio para o seu metabolismo. Além do halo, o corante promove uma reação de fluorescência nas culturas lipase positivas quando expostas à radiação de luz ultravioleta (Jaeger & Kouker, 1987).



**Figura 1: Formação do halo ao redor da colônia indicando a ação da lipase.**

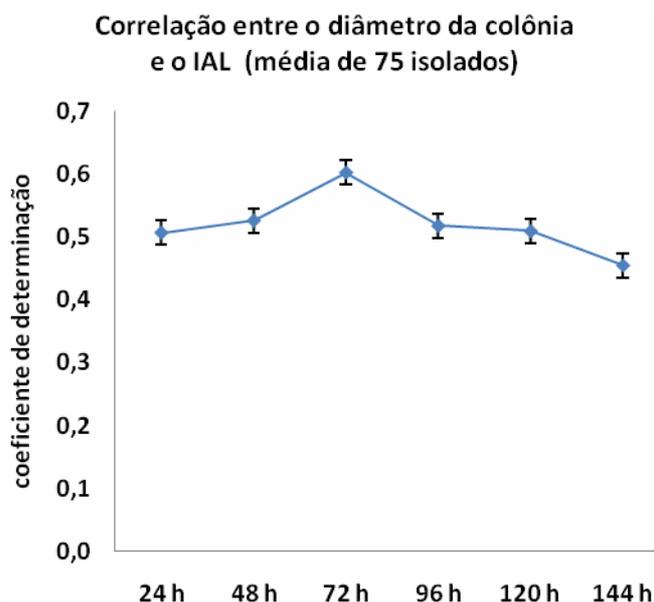
Na literatura, diversos experimentos com diferentes tempos são citados, variando de 1 hora, passando por 24, 72 até 120 horas de ensaio para a análise da atividade da lipase (Samad et al., 1989; Lin, 1996; Sene et al., 2002; Snellman et al., 2002; George et al., 2003; e Lima *et al.*, 2005). Para o presente trabalho, a determinação do IAL foi a intervalos de 24 horas nos primeiros três dias, e após, em intervalos de três dias até o 15º dia.

A Figura 2 apresenta a variação média do IAL para os 75 isolados lipase positivos testados em placas de Petri a 30º C. Pela figura é possível notar que o índice aumenta até 72 horas decaindo posteriormente e estabilizando com o passar do tempo.



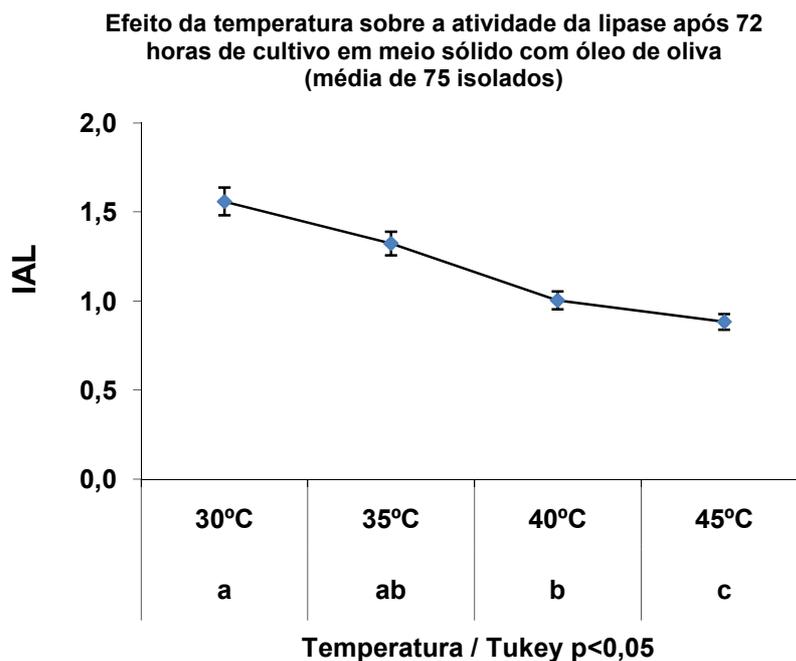
**Figura 2: Evolução do Índice de Atividade da Lipase (IAL)**

A Figura 3 mostra a correlação entre o índice de ativação enzimática (IAL) médio dos isolados selecionados e o diâmetro médio das colônias em cada momento de avaliação. A literatura cita que as bactérias apresentam o pico de produção de lipase em 72 horas (Sene *et al.*, 2002; Snellman *et al.*, 2002 e Lima *et al.*, 2003). Nota-se pelo gráfico que as correlações existentes representam de certa forma a curva de crescimento dos isolados selecionados. Na média, é em 72 horas que se dá o pico de crescimento das colônias concomitantemente com a máxima taxa de produção de lipase, indicada pelo IAL. Esses dados corroboram com o que é citado na literatura quanto ao melhor momento para ativação do gene da enzima, indicando o momento adequado para processos de seleção de linhagens bacterianas.



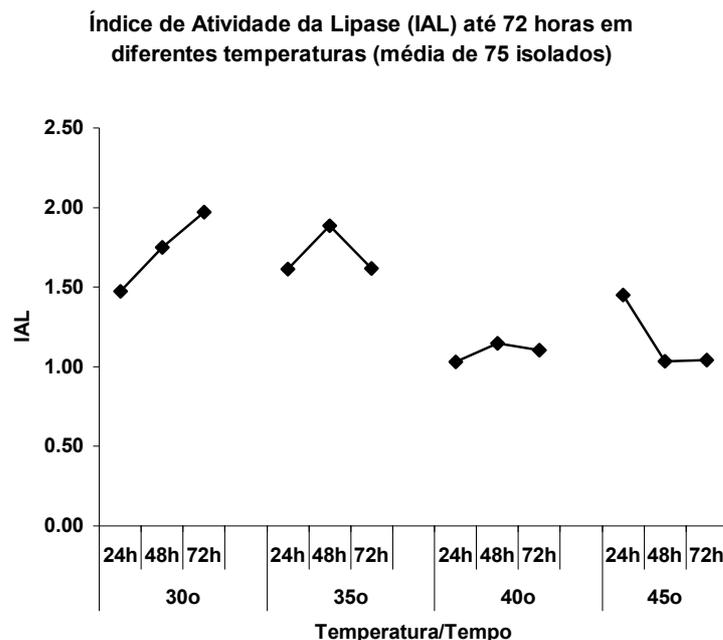
**Figura 3: Correlação entre o diâmetro médio das colônias e o respectivo Índice de Atividade da Lipase (IAL) em cada momento de avaliação a 30°C (média de 75 isolados).**

A Figura 4 apresenta a atividade enzimática média dos isolados testados em diferentes temperaturas em placas de Petri. A atividade enzimática diminui com o aumento da temperatura. O que prevalece na média entre os isolados lipase positivos é a maior atividade enzimática a 30°C, determinando essa temperatura como a ótima para a produção de enzima e ideal para a seleção.



**Figura 4: Índice médio de atividade da lipase (IAL) nas diferentes temperaturas testadas para os isolados lipase positivos.**

A Figura 5 mostra o comportamento médio dos 75 isolados com relação à atividade da lipase sob meio de cultura sólido até 72 horas nas diferentes temperaturas testadas. A produção de lipase apresentou um comportamento diferenciado ao longo do tempo conforme a temperatura. Em nenhum momento a atividade enzimática aumentou após o terceiro dia, daí a representação na figura ser até 72 horas. Numa visão geral, a atividade da lipase aumenta nas temperaturas menores, mas na medida em que há um aquecimento ocorre uma produção da enzima mais cedo, mas com uma visível redução da atividade já a partir de 48 horas. Em 30° C, o IAL médio cresce até o 3° dia. Em 35° C, o pico da produção de lipase se dá em 48 horas, o que demonstra uma maior ativação metabólica com a elevação da temperatura, mas diminuindo mais rapidamente também. Baseado nisso, é provável que as colônias tenham crescido mais rapidamente a 35°C e com isso, produziram a lipase em menor tempo. No experimento a 40°C a produção da lipase apresenta-se baixa em relação às outras temperaturas. O mesmo acontece aos 45° C, onde a produção de lipase, embora tenha uma resposta já em 24 horas devido a um metabolismo acelerado, praticamente paralisa após esse tempo. Tais respostas nessas condições térmicas podem ser em função de uma baixa adaptação dos isolados à temperatura.



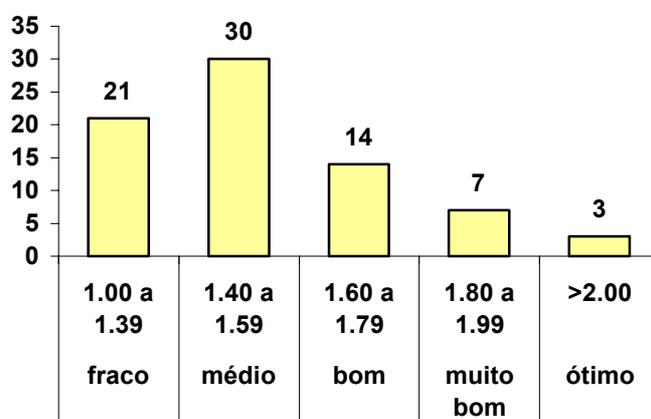
**Figura 5: Atividade da lipase até 72 horas em diferentes temperaturas.**

Quando se deseja a aplicação de microrganismos ou seus produtos metabólicos em processos industriais, os mecanismos de seleção tornam-se cruciais. As Figuras 2 a 5 são importantes nesse sentido, pois mostram dois parâmetros decisivos para o processo de seleção dos isolados. A maior média dos índices de atividade da lipase ocorre a 30°C e o melhor momento em 72 horas. É visível também que a 35° C a produção de lipase é acelerada, mas decai rapidamente quando comparada a 30°C. Talvez esteja aí o detalhe para a temperatura durante o processo de seleção. Sant'Anna *et al.* (1997) testaram a produtividade da enzima a 25, 30 e 35°C, obtendo os melhores resultados a 30°C. Stamford *et al.* (1998) apresentaram um processo de seleção de bactérias lipolíticas *in vitro* a 28° C. George *et al.* (1999) mostraram seus melhores resultados em 37° C. Sharma *et al.* (2001), em uma extensa revisão sobre a enzima lipase citam diversos autores que apresentam as temperaturas ótimas para a enzima variando de 30° a 60°C. Lima *et al.* (2005) registraram a atividade da lipase em três diferentes temperaturas (26°, 29° e 32°C), onde os melhores resultados foram obtidos com os testes em 29°. Os resultados apresentados nesse trabalho parecem corroborar com a literatura, quanto à faixa térmica e o tempo para uma ótima atividade metabólica e produção de lipase.

Definido o momento ideal e a temperatura chave para a seleção dos isolados produtores de lipase, foi aplicada uma classificação para os respectivos índices enzimáticos. A Figura 6 apresenta para os 75 isolados lipase positivos, uma classificação que revela os diferentes níveis de atividade lipolítica após 72 horas e leva em conta como referência, a estirpe *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Stamford *et al.*, 1998), que possui um índice enzimático em meio de cultura sólido específico para lipase em 1,80. Com isso, somente 10 isolados o apresentaram maior ou igual ao da estirpe padrão,

respectivamente com sete isolados classificados como "muito bom" e três como "ótimo". Pelos resultados, os isolados com IAL > 2 são promissores, em virtude de apresentarem índices superiores ao padrão, como os isolados INPA P-146 (2,41); INPA P-784 (2,17) e INPA P-697 (2,12). No entanto, para efeito de pré-seleção, todos os isolados que apresentaram o IAL classificado com "bom" (IAL > 1,60) foram selecionados para os testes quantitativos, totalizando 24 isolados. Essa maior abrangência quanto aos isolados selecionados pode trazer, para as fases futuras de testes enzimáticos, outras possibilidades de seleção.

**Classificação dos índices enzimáticos dos 75 isolados lipase positivos após 72 horas de cultivo a 30 C em meio sólido**



**Figura 6: Classificação dos índices enzimáticos dos isolados lipase positivos.**

A Tabela 7 apresenta a variação dos índices enzimáticos em cada temperatura estudada medidos em 72 horas para os isolados selecionados. A maioria tem a sua atividade enzimática ótima a 30°C, embora tenham ocorrido picos de atividade para alguns isolados a 35°C. Ainda em relação à temperatura, há uma variedade de microrganismos citados na literatura com diferenças nesse parâmetro, variando de 25° a 60°C como temperaturas ótimas para a produção de lipase (Jaeger & Kouker, 1987; George et al., 1999; Sene et al., 2002; Snellman et al., 2002 e Lima *et al.*, 2005).

**Tabela 7: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados nas diferentes temperaturas testadas (média de cinco repetições).**

Isolados	30°	35°	40°	45°
1 INPA P-146	2,41	1,63	1,51	0,00
2 INPA P-697	2,17	1,32	1,28	1,44
3 INPA P-632	2,12	1,37	1,27	1,51
4 INPA P-616	1,96	2,37	1,36	1,58
5 INPA P-613	1,93	1,43	1,08	1,24
6 INPA P-117	1,93	1,73	1,44	1,56
7 INPA P-112	1,91	1,48	1,40	0,00
8 INPA P-108	1,87	1,59	1,52	1,49
9 INPA P-493	1,80	1,33	1,01	1,15
10 INPA P-799	1,80	1,54	1,44	1,15
11 INPA P-803	1,78	1,52	1,38	1,28
12 INPA P-478	1,77	1,61	1,33	1,57
13 INPA P-798	1,76	1,72	1,72	1,71
14 INPA P-024	1,68	1,43	1,29	0,00
15 INPA P-784	1,66	1,23	1,10	1,66
16 INPA P-082	1,65	1,74	1,27	1,49
17 INPA P-540	1,65	1,22	1,05	1,06
18 INPA P-593	1,64	1,73	1,36	1,41
19 INPA P-348	1,63	0,00	0,00	0,00
20 INPA P-106	1,62	1,45	1,45	1,23
21 INPA P-691	1,61	0,00	0,00	0,00
22 INPA P-392	1,60	1,19	1,00	1,03
23 INPA P-124	1,60	1,31	1,31	1,25
24 INPA P-478	1,60	1,34	1,37	1,48
média (dp) <b>Tukey</b> <b>(p&lt;0,05)</b>	1,80 (±0,21) <b>a</b>	1,32 (±0,56) <b>b</b>	1,01 (±0,55) <b>b</b>	1,10 (±0,60) <b>b</b>

A Tabela 8 apresenta a lista com as médias dos respectivos IAL a 30°C. A comparação de média mostra somente um isolado (INPA P-146) superior estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). No entanto, para os testes quantitativos com p-NPP, todos os 24 isolados foram selecionados.

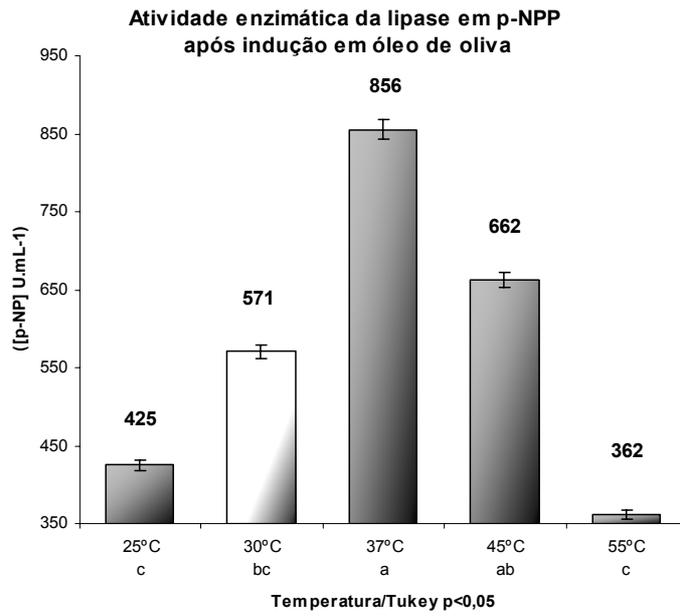
**Tabela 8: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados em 30°C a 72 horas em meio de cultura com óleo de oliva (média de cinco repetições).**

	<b>Isolados</b>	<b>média</b>	<b>dp</b>	<b>Tukey (<math>p &lt; 0,05</math>)</b>
1	INPA P - 146	2,41	0,1	a
2	INPA P – 784	2,17	0,3	ab
3	INPA P – 697	2,12	0,3	abc
4	INPA P - 632	1,96	0,2	abcd
5	INPA P – 616	1,93	0,2	abcd
6	INPA P – 613	1,93	0,3	abcd
7	INPA P – 691	1,91	0,2	abcd
8	INPA P – 124	1,87	0,2	bcd
9	INPA P – 112	1,80	0,1	bcd
10	INPA P – 108	1,80	0,2	bcd
11	INPA P – 493	1,78	0,3	bcd
12	INPA P – 799	1,77	0,3	bcd
13	INPA P – 348	1,76	0,1	bcd
14	INPA P – 478	1,68	0,2	bcd
15	INPA P - 423	1,66	0,4	bcd
16	INPA P – 803	1,65	0,2	cd
17	INPA P – 798	1,65	0,1	cd
18	INPA P – 093	1,64	0,3	cd
19	INPA P – 082	1,63	0,3	cd
20	INPA P - 117	1,62	0,1	d
21	INPA P - 540	1,61	0,1	d
22	INPA P – 106	1,60	0,2	d
23	INPA P - 392	1,60	0,2	d
24	INPA P – 593	1,60	0,1	d

### 5.5.1. Atividade da lipase sobre o substrato sintético p-NPP.

Embora ésteres de p-nitrofenil sejam largamente utilizados como substratos para a medição da atividade da lipase (Snellman *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; Pastore *et al.*, 2003; Koblitz e Pastore, 2004), algumas considerações devem ser feitas. As lipases apresentam uma afinidade pelo substrato que varia conforme a sua constituição (Sharma *et al.*, 2001). Especificamente em relação aos ésteres de para-nitrofenil, a atividade da lipase varia de acordo com o comprimento da cadeia dos ácidos graxos (Snellman *et al.*, 2002). Ésteres de cadeia curta, como p-nitrofenilacetato (C<sub>2</sub>) ou p-nitrofenilbutirato (C<sub>4</sub>), para-nitrofenilcaprilato (C<sub>8</sub>) servem também como substrato para esterases, o que possibilita um resultado falso positivo para lipase. Isso pode ser evitado com o uso de ésteres de cadeia longa. Outras formas de lipase apresentam maior afinidade em ésteres de cadeia carbônica mais longa, como o para-nitrofenilaurato (C<sub>12</sub>) ou para-nitrofenilpalmitato (C<sub>16</sub>) (Snellman *et al.*, 2002). Embora sejam condições de ensaio diferentes, a primeira análise realizada em meio de cultura sólido é de ordem qualitativa e a segunda é de ordem quantitativa e dá uma noção do nível de produtividade da enzima. Essa segunda fase torna-se mais importante quando se pensa na seleção de bactérias para aplicação em escalas maiores de aplicação da enzima ou do organismo produtor na indústria (Bueno *et al.*, 2005).

A atividade da enzima lipase de *Bacillus megaterium* foi analisada por Lima *et al.* (2005) nas temperaturas entre 30 e 85°C, com o pico de atividade entre 55 e 65°C. Snellman *et al.* (2002), estudando as propriedades da lipase extracelular de *Acinetobacter* sobre o substrato p-NPP, verificaram um pico de atividade a 55°C, com a enzima permanecendo ativa até 70°C. A temperatura ótima de reação apresentada no trabalho de Snellman é maior do que as reportadas para muitas lipases bacterianas sob condições similares de ensaio. Lopes *et al.*, (1999), estudando a influência dos parâmetros ambientais sobre a produção de lipase, verificaram que *Lactobacillus plantarum* teve comportamento diferenciado conforme a mudança de temperatura, onde a produção foi analisada entre 22 a 45 °C, com pico a 30 °C. Percebe-se que, conforme varia o gênero bacteriano, os picos de atividade variam também. Depois de constatada a melhor temperatura de indução, realizou-se uma comparação de média entre os isolados para o experimento a 37°C (Figura 7).



**Figura 7: Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP em diferentes temperaturas.**

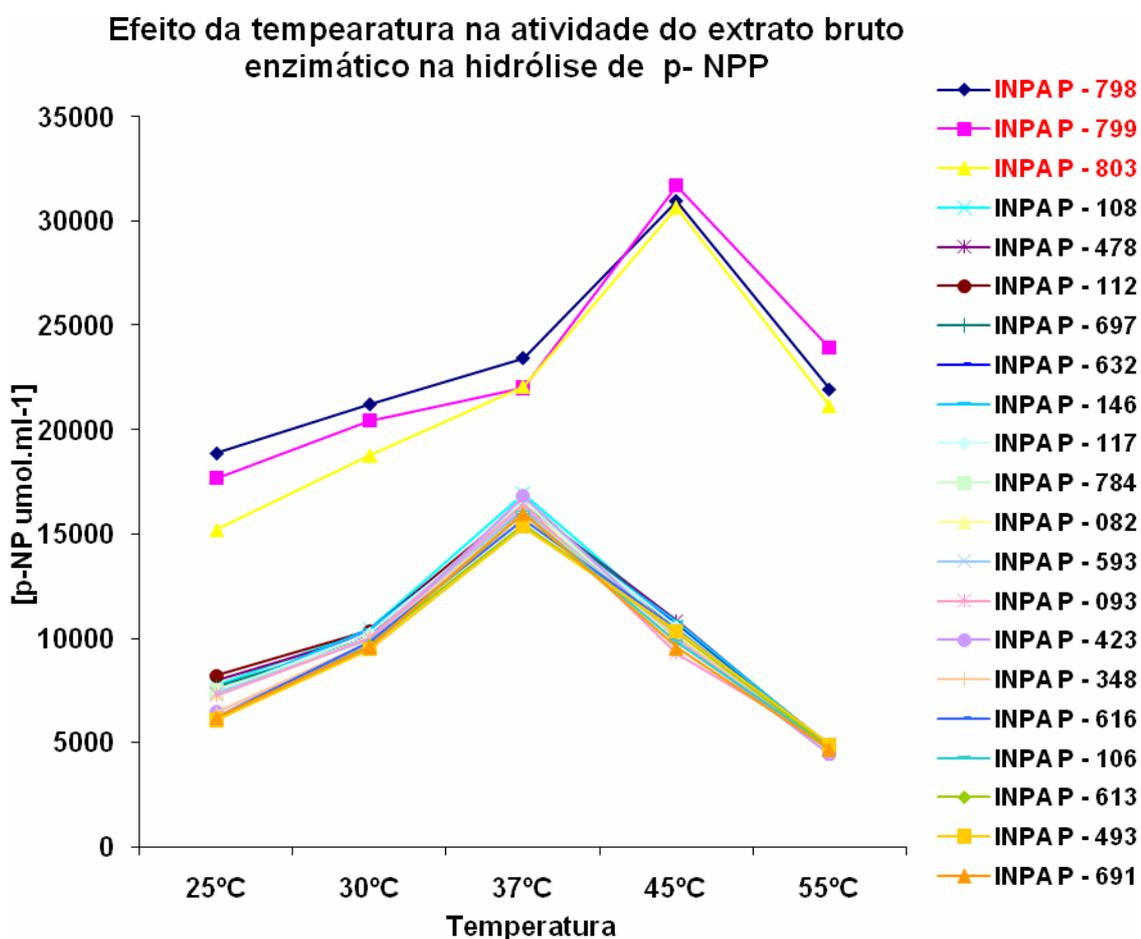
A Tabela 9 mostra três isolados superiores estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ) aos demais nessa temperatura.

**Tabela 9: Hidrólise de p-nitrofenilpalmitato ([p-NP] U.mL<sup>-1</sup>) dos isolados testados em 37°C (média de três repetições).**

<b>n</b>	<b>Código</b>	<b>MÉDIA 37°C</b>	<b>dp</b>	<b>Tukey (p&lt; 0,05)</b>
1	INPA P – 798	1172	0,8	<b>a</b>
2	INPA P – 803	1104	0,1	<b>a</b>
3	INPA P – 799	1100	0,0	<b>a</b>
4	INPA P – 108	847	1,9	<b>b</b>
5	INPA P - 423	841	0,5	<b>b</b>
6	INPA P – 784	828	1,5	<b>b</b>
7	INPA P – 697	825	1,7	<b>b</b>
8	INPA P – 112	823	0,7	<b>b</b>
9	INPA P – 093	822	0,4	<b>b</b>
10	INPA P – 478	820	0,1	<b>b</b>
11	INPA P - 117	816	0,1	<b>b</b>
12	INPA P - 540	815	0,1	<b>b</b>
13	INPA P – 082	814	1,0	<b>b</b>
14	INPA P – 593	811	0,3	<b>b</b>
15	INPA P – 124	808	0,0	<b>b</b>
16	INPA P - 632	807	1,4	<b>b</b>
17	INPA P – 348	801	0,2	<b>b</b>
18	INPA P – 106	800	0,1	<b>b</b>
19	INPA P - 146	800	2,1	<b>b</b>
20	INPA P – 691	799	0,1	<b>b</b>
21	INPA P - 392	799	0,1	<b>b</b>
22	INPA P – 616	786	1,6	<b>b</b>
23	INPA P – 613	773	1,1	<b>b</b>
24	INPA P – 493	767	0,0	<b>b</b>

A Figura 8 apresenta os resultados da atividade da solução enzimática do extrato bruto de cada isolado agindo sobre p-NPP (C<sub>16</sub>) sob diferentes temperaturas. Pela figura, para os isolados INPA P-798, INPA P-803 e INPA P-799 a temperatura ótima de reação da lipase contida no extrato bruto foi

em 45°C. Para todos os demais isolados, o pico de atividade foi em 37°C. Os três isolados citados sempre se apresentaram superiores aos demais sob as condições de ensaio. Isso sugere uma maior afinidade por parte da lipase desses isolados ao substrato p-NPP. Comparando-se os picos de atividade enzimática, a diferença entre os isolados destacados e os outros, a 37°C, chega a ser o dobro. Quando comparados em 45 °C, os resultados do grupo dos três isolados superiores chegam a ser de até 4 vezes maior em relação ao demais. Os resultados apresentados aqui mostram o potencial da microbiota selecionada para outras fases de estudo com a utilização em substratos oleaginosos da flora amazônica, como o buriti (*Mauritia flexuosa*), fase posterior de estudo.



**Figura 8: Hidrólise de para-nitrofenilpalmitato em diferentes temperaturas para os 24 isolados selecionados.**

## 5.6. Conclusões

Os isolados com os melhores resultados nessa fase do trabalho não foram aqueles que apresentaram os melhores resultados na fase qualitativa, onde a análise ocorreu sob condições de meio de cultura sólido e o substrato para a enzima foi o óleo de oliva. Diferenças físicas nas duas condições podem influenciar a liberação da lipase extracelular. Ou mesmo entre os isolados, pode haver isoformas da enzima que se diferenciam no peso molecular, por exemplo, e que pode induzir a uma dificuldade na migração extracelular em meio de cultura sólido, mas que, em meio de cultura líquido, essa dificuldade deixa de existir. Embora ambos os substratos tenham cadeias longas de carbono (C<sub>18</sub> e C<sub>16</sub>) contido nas respectivas constituições do ácido oléico (principal componente do óleo de oliva) e do p-NPP, eles não são a mesma coisa. Assim, nota-se que para alguns isolados a lipase apresentou alta afinidade com o óleo, para outros, a afinidade foi melhor com o p-NPP. No entanto, todos os 24 isolados foram selecionados para a fase posterior de estudo visando à afinidade ao óleo de buriti.

## 5.7. Referências Bibliográficas

- Berraquero, F. R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A. R. Essabelecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, 17(4): 399-406, 1976.
- Bueno, T.; Freitas, L.; Castro, H.F. 2005. Seleção de preparações comerciais de lipase para a hidrólise enzimática do óleo de soja. *Simpósio Nacional de Biofermentações – SINAFEM 2005*. CD-Rom (trabalho 069).
- Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* vol 27, nº 1, 146-156.
- Christensen, A. B.; Riedel, K.; Eberl, L.; Flodgaard, L.R.; Molin, S.; Gram, L.; Givskov, M. 2003. Quorum-sensing-direct protein expression in *Serratia proeamaculans* B5a. *Microbiology* (2003), 149: 471-483.
- George, E.; Tamerler, C.; Martinez, A.; Matinez, M.J.; Keshavarz, T. 2003. Influence of Chemical Technology and Biotechnology. *Journal of Technology and Biotechnology* 74:137-140.
- Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. 2003. Review - Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2003) 37, 63-71.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzyme: a review. *Bioresource Technology* 89 (2003) 17-34.
- Hemachander, C.; Bose, N. Puvanakrishan, R. 2001. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem.* (2001) ; 36:629-33.

- Ito, T.; Kikuta, H.; Nagamori, E.; Honda, H.; Ogino, H.; Ishikawa, H.; Kobayashi, T. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Biosci. Bioeng.* 2001 (91):245-250.
- Jaeger, K.E.; Kouker, G. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology* (1987):211-213.
- Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, M.; Misset, O. 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* (15):29-63.
- Karl-Erich J.; Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases form versatile tool for biotechnology. *Tibtech* September (Vol 16):396-403.
- Koblitz, M., G., B.; Pastore, G.M. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. *Ciênc. Tecnol., Aliment.* 24(2):287-292.
- Lima, V.M.G.; Kriegel, N.; Sarquis, M.I.M; Mitchel, D.A.; Ramos, L.P., Fontana, J.D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol* 41(2):105-110.
- Lima, V.M.G.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. 2005. Caracterização cinética e bioquímica da lipase de *Bacillus megaterium*. *Simpósio Nacional de Biofermentações – SINAFEM 2005*. CD-Rom (trabalho 166).
- Lin, S., Chiou, C.; Yeh, C. Tsai, Y. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology* Mar. 1996, p.1093-1095.
- Lopes, M. F.; Cunha, A.E.; Clemente, J.J.; Carrondo, M.J.T.; Crespo, M. T. B. 1999. Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* (1999) 51: 249-254.
- Nascimento, M.G.; Neto, P.R.C.; Mazzuco, L.M. 2001. Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento* (2001):19; 28-31.
- Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, G.M. 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* (2004) 35:81-85.
- Pastore, G. M. 2002. Processos e Produção: Aplicação de Enzimas. *Enzitec 2002*. Brasília. Livros de Resumos p42.

- Pastore, G.M.; Costa, V.S.R.; Koblitz, M.G. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23(2):135-140.
- Samad, M.Y.A.; Razak, C.N.A.; Salleh, A.B.; Yunus, W.M.Z.W.; Ampon, K.; Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of microbiological methods* 9 (1989) 51-56.
- Sant'Anna, Jr., Freire, D.M.G.; Gomes, P.M.; Bon, E.P.S. 1997. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. *Rev. Microbiol* 28(suppl. 1): 6-12.
- Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B. Davidson, W.S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52(2003) 1-18.
- Sene, C.P; Marques, P.D.; Ferro, P.R.S.; Pinheiro, D.M.; Pastore, C.M. 2002. Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina. *Enzitec 2002*, Brasília. Livro de Resumo, p72-73.
- Sharma, R.; Chisti Y.; Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19(2001) 627-662.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L.; Gupta J., 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Proc. Biochem.* 37, 1075-1084.
- Silva Filho, G. N.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319.
- Snellman, E.A.; Sullivan, E.R.; Colwell, R. R.. Purification and properties of extracellular lipase, LipA, of *Aacinetobacter* sp RAG-1. *Eur. J. Biochem.* (2002) 269:5771-5779.
- Stamford, T.M.; Araujo, J.M.; Stamford, N.P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18 (4) oct./dec.: 1-10.
- Sylvester-Bradley, C.; Asaka, N.; Torraca, L.; M.S.; Magalhães, F.M.M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R.M. levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta amazônica*, 12(1), 15-22, 1982.

## 6. Capítulo 2: Bactérias produtoras de lipase em óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L.)

### 6.1. Resumo

Das plantas oleaginosas amazônicas, o buriti se destaca pelos óleos ricos em ácidos oléicos. O objetivo desse trabalho foi selecionar isolados bacterianos produtores de lipase com afinidade ao óleo. A atividade enzimática foi analisada em placas de Petri pelo Índice de Ativação da Lipase (IAL) que é a relação entre halo de reação e o halo da colônia. A ação da enzima foi superior nos ensaios a 30°C em pH 8,0. Três dos cinco bioensaios sob diferentes temperaturas apresentaram uma atividade enzimática menor, quando comparados aos ensaios com óleo de oliva. Isso significa que o óleo de buriti, mesmo semelhante ao de oliva quanto à composição dos ácidos graxos, apresenta outras características que o fazem de difícil degradação enzimática. Seis isolados apresentaram uma IAL médio de 1,95 ( $\pm 0,11$ ) superior ao padrão (1,80), o que ressalta a importância dos isolados bacterianos selecionados. As análises determinaram quais os isolados que serão utilizados em futuros testes de biotransformação do óleo de buriti.

**Palavras-chave:** Lipase, hidrólise enzimática, óleo de buriti, *Mauritia flexuosa*.

## Chapter 2: Producing bacteria of lipase in buriti oil

### 6.2. Abstract

Of the oleaginous Amazonian plants, the Buriti palm stands out for the rich oils in oleic acid. The aim of this work selected isolated bacterial producers of lipase with affinity to the oil. The enzymatic activity was analysed in plates of Petri by the Rate of Activation of the Lipase (IAL) that is the relation between halo of reaction and the halo of the colony. The enzyme action was superior at 30°C and pH 8.0. Three of the five tests under different temperatures presented difficulty in the enzymatic activity. This represents that the Buriti oil, even similar to that olive oil as for the composition of the oily acids, presents other characteristics that do it from difficult enzymatic degradation. Six isolated ones presented IAL of 1.95 ( $\pm 0.11$ ) superior to the standard (1.80), which emphasizes the importance of the isolated bacterial selectionated. The analyses determined which the isolated ones what future tests will be used of biotransformation of the Buriti oil.

**Key words:** Lipase, Buriti oil hidrolisis, *Mauritia flexuosa*.

### 6.3. Introdução

Os frutos oleaginosos da Amazônia são produtos carregados de valores novos e têm uma imagem “ecologicamente correta”, encontrando facilmente mercados alternativos do tipo “verde”, “fair trade” e “orgânicos” (Pallet, 2002). A tendência de utilizar matérias-primas de origem natural, especialmente vegetal, está desenvolvendo aceleradamente a produção de óleos amazônicos. Sementes de andiroba, cupuaçu, murumuru e buriti estão entre as mais cotadas nas indústrias nacionais e multinacionais que apostam no filão natural. O consumo desse tipo de produto tem aumentado consideravelmente. Como consequência disto, as indústrias de alimentos, bebidas,

cosméticos e de produtos medicinais começaram a reconsiderar suas produções e a destacar os produtos naturais, embora condições de mercado e produção na Amazônia restrinjam a utilização dessas plantas (Clement *et al.*, 2005; Silveira & Costa, 2005).

O buriti é utilizado para muitos fins, como suco, doce, picolé, fritura de peixe, sabonete e óleo para pele (Castro, 2002). Do ponto de vista do aproveitamento e do potencial de utilização, as duas espécies mais importantes são a *Mauritia flexuosa* e *M. vinifera*, com ampla disseminação na Amazônia (Crodamazon, 2002). Castro (2002) comenta que essas duas espécies são variações ecológicas de uma mesma espécie. Essa planta caracteriza-se como palmeira de 30 a 50 cm de diâmetro e de 20 a 35 metros de altura. Oferece um fruto nutritivo importante para as pessoas e animais da região. A palmeira prefere áreas alagadas onde é encontrada em grandes concentrações, pois a água ajuda na dispersão de sementes, formando populações extensas de buritizais. É uma espécie dióica, isto é, apresenta indivíduos masculinos e femininos, os quais florescem conjuntamente entre setembro a dezembro e frutificam de janeiro a julho. Ocorrem em média 64 plantas por hectare, podendo cada planta produzir até nove cachos e, cada cacho, de 600 a 1200 frutos. É possível obter 384 quilos de óleo da polpa por hectare, com a produção declinando após 40 a 60 anos (Castro *et al.*, 2004).

Dentre os óleos amazônicos que vêm sendo estudados, os frutos de palmeiras, como o buriti, tucumã, dendê, macaúba e a pupunha são fontes potenciais de carotenóides pró-vitamina A. Mesmo assim e apesar da diversidade de produtos elaborados a partir dos vários segmentos da palmeira, o buriti não tem sido explorado intensivamente. O fruto de buriti pode produzir dois tipos de óleos vegetais com uso nas indústrias química e alimentícia. Da polpa dos frutos são extraídos óleos ricos em ácidos oléicos e das sementes, obtêm-se os óleos ricos em ácidos láuricos (Crodamazon, 2002). O buriti chama a atenção por possuir grande quantidade de componentes de alto valor agregado, que se deve à alta concentração de carotenóides, possuindo o mais alto teor de vitamina A. Silveira & Costa (2005) citam 5000 U.I. de pró-vitamina A por grama de óleo, um nível cinco vezes superior ao do óleo de dendê (*Elaeis guineensis*). Ainda há o tocoferol (precursor da vitamina E), que pode ser obtido da composição do óleo, servindo também à elaboração de produtos nutracêuticos (Albuquerque *et al.*, 2003).

Outro aspecto importante quanto à utilização do óleo é a possibilidade de utilizá-lo no processo de hidrólise enzimática via lipase para a obtenção de monoésteres, ácidos oléicos e  $\beta$ -caroteno (Uenojo *et al.*, 2005). Os catalisadores enzimáticos promovem a hidrólise de óleos vegetais em condições brandas de temperatura e pressão, obtendo-se produtos mais puros e de baixo custo energético, sendo uma alternativa aos inconvenientes associados aos processos físico-químicos, como o alto gasto energético. Nesse tipo de reação, a composição dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal pode influenciar a atividade da lipase, tendo em vista que sua atividade hidrolítica em

triglicerídeos aumenta com: a) massa molar dos ácidos graxos componentes; b) grau de insaturação e c) número de ácidos graxos na molécula do triglicerídeo. Assim, os triglicerídeos compostos de alguns ácidos, como o oléico e o linoléico, por exemplo, sofrem hidrólise com maior rapidez que os diglicerídeos e os triglicerídeos de ácidos de cadeia curta, como o butírico (Vieira *et al.*, 2005). Do ponto de vista das características físico-químicas, os carotenóides são moléculas hidrofóbicas e conseqüentemente interagem com a parte lipolítica da célula, se dispondo na superfície da membrana. Na natureza, carotenóides hidroxilados estão presentes como éster de cadeia longa (fazendo-os mais hidrofóbicos) ou como glicosídeos (deixando-os mais polares) (Silveira & Costa, 2005). Essas características são importantes, pois podem influenciar a atividade da lipase. O objetivo desse trabalho é selecionar entre os isolados bacterianos testados com atividade da lipase, aqueles com maior afinidade ao óleo de buriti.

#### 6.4. Material e Métodos

A pesquisa foi realizada com isolados bacterianos depositados na Coleção de Microrganismos do Solo da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A análise de atividade de lipase sobre óleo de buriti foi realizada com os isolados selecionados anteriormente (Willerding *et al.*, 2006). De um total de 181 bactérias testadas inicialmente para a atividade da lipase tendo o óleo de oliva como substrato indutor, um grupo de 24 bactérias foi selecionado para esse trabalho.

O óleo foi obtido por doação pela empresa Crodamazon e extraído da polpa do fruto por método mecânico e certificado em relação às características físicas e químicas. Para as análises de afinidade entre a lipase das bactérias e o óleo de buriti, utilizou-se na fase qualitativa o meio de cultura sólido indutor composto por: óleo de buriti (2,0 % v/v), Tween 80 (2,0 % v/v), peptona (0,3 % m/v), extrato de levedura (0,2 % m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 % m/v),  $\text{MgSO}_4$  (0,1 % m/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 % m/v), agar (1,8 % m/v), calibrado em pH 8.

A avaliação da atividade enzimática foi realizada pelo **Índice de Ativação da Lipase (IAL)**, o qual é obtido da relação entre o diâmetro do halo translúcido ao redor da colônia e o diâmetro das colônias, adaptando a metodologia descrita em Silva Filho & Vidor (2000). A análise da evolução do IAL foi a cada 24 horas durante três dias de incubação, com cinco repetições por isolado.

Os testes quantitativos foram realizados com os isolados selecionados após a fase qualitativa. A determinação da atividade da lipase sobre o substrato para-nitrofenilpalmitato (p-NPP/SIGMA®) se baseou nas metodologias descritas em George *et al.* (2003) e Pastore *et al.* (2003). As culturas selecionadas cresceram em meio sólido basal [glicose (1,0 % m/v), extrato de levedura (0,2 %m/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 % m/v),  $\text{MgSO}_4$  (0,2 % m/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,2 % m/v), Agar (1,5 % m/v), pH 6,5] por 72 horas e então foram repicadas em meio líquido basal e incubadas em temperatura ambiente em

agitador orbital (160 rpm) por 48 horas a 30°C. Em seguida, uma alíquota de 1 mL desse meio foi transferida para o meio líquido indutor (49 mL) contendo óleo de buriti. Após 72 horas, uma alíquota de 2 mL da cultura foi centrifugada em 12000 rpm por 20 minutos a 4°C para a obtenção da solução enzimática do extrato bruto.

Foi preparada uma solução de p-NPP [2,5 mmol], contendo 0,189 g do substrato em 200 mL de solução tampão acetato de sódio (pH 8; 50mM) adicionado com 2,1% de Triton X-100, com a homogeneização a 70°C. Uma alíquota de 950 µl dessa solução foi adicionada em outra alíquota de 50 µl da solução enzimática do extrato bruto de cada isolado selecionado. A reação foi testada sob diferentes temperaturas (25, 30, 37, 45 e 55°C) por 15 minutos e em seguida, a reação foi paralisada com choque térmico a 0°C por cinco minutos. O pH 8,0 das reações foi mantido constante, pois a enzima apresenta uma boa atividade nesse pH (Kojima & Shimizu, 2003; Castro *et al.*, 2004 e Koblitz & Pastore, 2004). A degradação do p-NPP pela lipase libera para-nitrofenol (p-NP) e promove uma coloração amarela na solução. A leitura da absorbância em 410 nm da solução de cada isolado foi comparada com a da curva-padrão para o p-NP, a fim de quantificar a atividade da lipase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-NP. mL<sup>-1</sup> nas condições do ensaio.

## 6.5. Resultados e Discussão

A Tabela 10 apresenta a composição química do óleo fornecido e permite comparar a composição com o óleo de oliva, cujos teores em ácidos graxos são semelhantes. Em ambos, há uma maior participação dos ácidos insaturados, tendo como componentes principais os derivados de ácido oléico, que representam mais de 70% da mistura total. Silveira & Costa (2005) analisaram processos físicos, químicos e mecânicos de extração do óleo de buriti e correlacionaram a caracterização físico-química do óleo com cada um dos processos. Quanto aos ácidos graxos, na extração por prensagem mecânica, o ácido palmítico apresentou 16,5% da composição total dos ácidos graxos e o ácido oléico (79,5%), configurando uma composição semelhante ao óleo utilizado aqui. Albuquerque *et al.* (2005) também caracterizaram o óleo de buriti por espectroscopia de absorção e emissão, apresentando uma composição química semelhante, com ácido oléico constituindo cerca de 78% do total de ácidos graxos e ácido palmítico em 17%. A Tabela 11 traz a caracterização física do óleo de buriti que serve como padronização do óleo.

**Tabela 10: Composição química dos ácidos graxos do óleo de oliva e buriti.**

Ácido Graxos	Buriti (%)	Oliva (%)
Ác. Palmítico	16,3	11,3
Ác. Esteárico	1,3	0,8
Ác. Palmitoléico	0,4	1,5
Ác. Oléico	79,2	73,4
Ác. Linoléico	1,4	11,4
Ác. Linolênico	1,3	1,2
Ác. Saturados	17,7	12,2
Ác. Insaturado	82,3	87,8

Fonte: Crodamazon (2002).

**Tabela 11: Caracterização física do óleo de buriti.**

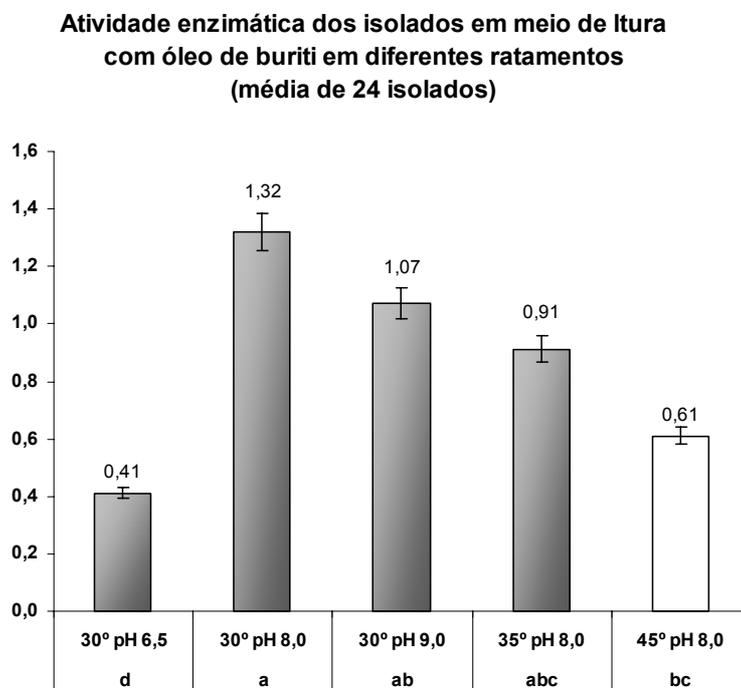
Análise Típica	Característica normal
Aparência (25°)	Líquido
Cor	Vermelho
Odor	Característico
Índice de Acidez	10 máx.
Índice de Saponificação	190- 200
Índice de Iodo	70-80
Índice de Refração (25°)	1,45 – 1,47
Índice de Peróxido	20 máx.
Umidade	1 máx.

Fonte: Crodamazon (2002).

## 6.6. Produção de lipase induzida por óleo de buriti em placas de Petri

A Figura 9 mostra a comparação dos valores de IAL médio nos bioensaios com óleo de buriti. As atividades enzimáticas dos isolados bacterianos em placas de Petri foram superiores estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ) nos ensaios a 30°C em pH 8,0, o que determinou esse tratamento como o ótimo para a avaliação e seleção das bactérias. Três dos cinco bioensaios apresentaram valor médio do IAL < 1,00, indicando que houve atividade reduzida. Isso significa que o óleo de buriti, mesmo semelhante ao de oliva quanto aos ácidos graxos, apresenta outras características que o tornam de difícil decomposição pelas lipases, o que ressalta a importância dos isolados bacterianos a serem

selecionados nesses bioensaios, pois são poucos os registros na literatura quanto à seleção de isolados microbianos promovendo hidrólise de óleo de buriti (Uenojo *et al.*, 2005).



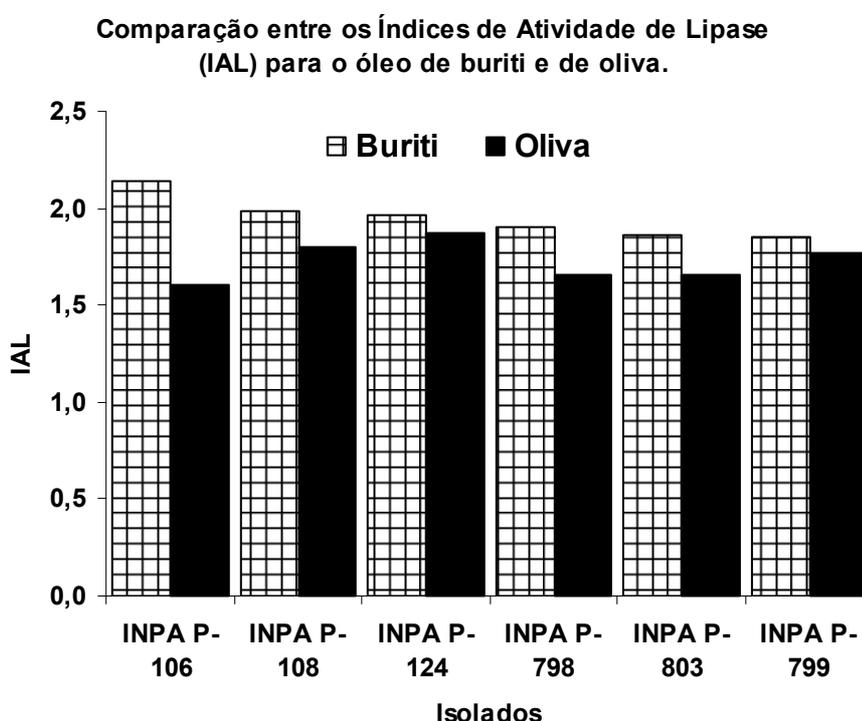
**Figura 9: Índice médio de atividade da lipase (IAL) nas diferentes temperaturas e valores de pH testados para os 24 isolados selecionados.**

A Tabela 12 apresenta a lista com as médias dos respectivos IAL com cinco repetições por isolado. A comparação de média mostra os seis isolados superiores estatisticamente (Tukey,  $p < 0,05$ ) e que foram selecionados para os ensaios quantitativos com p-NPP e para futuros testes de hidrólise do óleo de buriti. Entre os isolados que se apresentaram superiores estatisticamente aos demais (INPA P-106, INPA P-108, INPA P-124, U-O67, INPA P-803, INPA P-799), alguns apresentaram repetições com um IAL  $> 1,80$ , referência usada como padrão a estirpe *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Stamford *et al.*, 1998). A média geral dos 24 isolados selecionados foi igual a 1,33. Uenojo *et al.* (2005), estudando bactérias biotransformadoras de caroteno no óleo de buriti, também verificaram isolados microbianos produzindo halo. Entre seus selecionados, os valores ficaram ao redor de 1,75 para o índice enzimático em placa de Petri. Embora sejam raros os trabalhos na literatura que usem óleo de buriti como substrato para a lipase, o que dificulta a comparação de resultados, percebe-se um potencial no material aqui estudado.

**Tabela 12: Índices de Ativação de Lipase (IAL) dos isolados selecionados em 30°C em 72 horas e pH 8,0 em meio de cultura com óleo de buriti.**

	<b>Código</b>	<b>Média</b>	<b>dp</b>	<b>Tukey (p&lt; 0,05)</b>
1	<b>INPA P – 106</b>	<b>2,17</b>	<b>0,24</b>	<b>a</b>
2	<b>INPA P – 108</b>	<b>2,02</b>	<b>0,28</b>	<b>a</b>
3	<b>INPA P – 124</b>	<b>1,98</b>	<b>0,21</b>	<b>a</b>
4	<b>INPA P – 798</b>	<b>1,92</b>	<b>0,21</b>	<b>a</b>
5	<b>INPA P – 803</b>	<b>1,87</b>	<b>0,19</b>	<b>a</b>
6	<b>INPA P – 799</b>	<b>1,87</b>	<b>0,24</b>	<b>a</b>
7	INPA P – 093	1,46	0,13	b
8	INPA P – 593	1,45	0,11	b
9	INPA P – 348	1,43	0,09	b
10	INPA P – 493	1,40	0,15	b
11	INPA P – 784	1,39	0,07	b
12	INPA P – 616	1,37	0,15	b
13	INPA P – 613	1,35	0,05	b
14	INPA P – 691	1,35	0,20	b
15	INPA P – 697	1,33	0,09	b
16	INPA P – 478	1,29	0,09	b
17	INPA P – 112	1,27	0,09	b
18	INPA P – 082	1,27	0,13	b
19	INPA P - 540	1,26	0,04	b
20	INPA P - 632	1,25	0,04	b
21	INPA P - 392	1,25	0,07	b
22	INPA P - 146	0,00	0,00	c
23	INPA P - 423	0,00	0,00	c
24	INPA P - 117	0,00	0,00	c
		<b>1,33</b>		

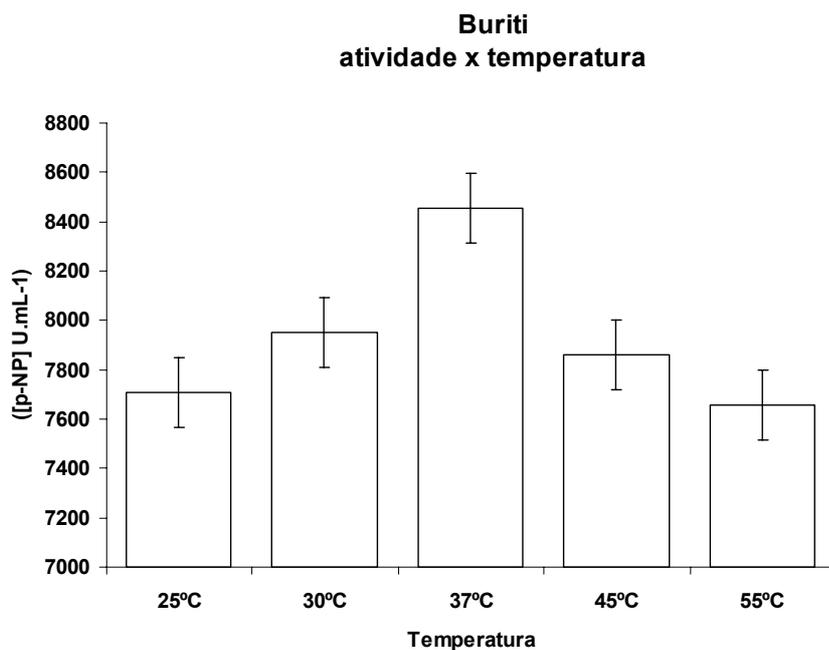
A Figura 10 apresenta a comparação de média do IAL dos isolados selecionados dentro do bioensaio a 30°C em pH 8,0 para o óleo de buriti e de oliva. Embora a média dentro do grupo de 24 isolados tenha sido 1,80 nos bioensaios com óleo de oliva (Willerding *et al.*, 2006) e de 1,33 para o de buriti (Tabela 1), quando se compara os resultados somente entre os seis isolados selecionados aqui, suas médias apresentam-se superiores às obtidas com óleo de oliva. Em buriti, o grupo de seis isolados apresentou um IAL médio de 1,97 ( $\pm 0,11$ ), enquanto esses mesmos isolados em óleo de oliva apresentaram um IAL médio de 1,73 ( $\pm 0,10$ ). Esses resultados mostram a afinidade desses isolados ao óleo de buriti e os classificam para os testes futuros visando a biotransformação do óleo.



**Figura 10: Comparação entre os Índices de Atividade de Lipase (IAL) em meios de cultura com óleo de buriti e de oliva.**

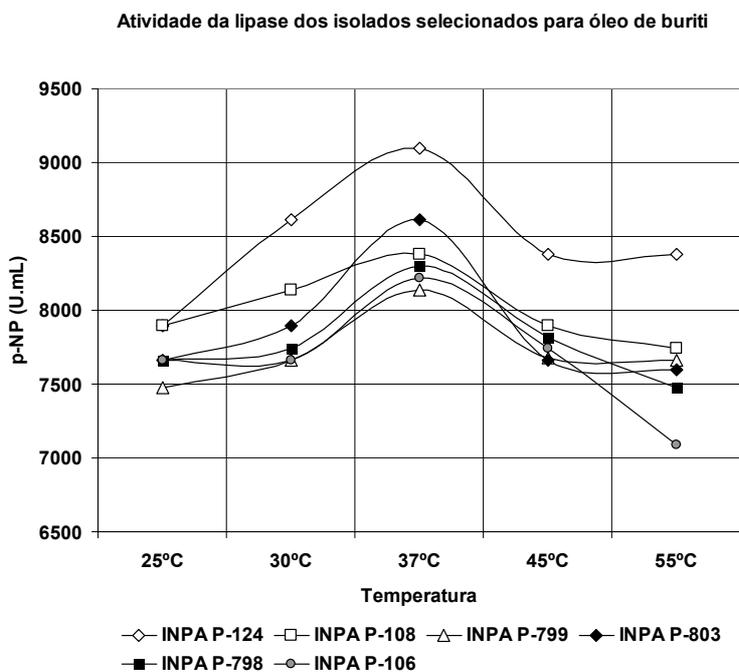
### **6.7. Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP - Buriti**

A partir da seleção dos seis isolados que apresentaram uma maior atividade da lipase em placa de petri, foi realizada uma série de ensaios quantitativos com p-NPP visando analisar o nível de indução enzimática tendo óleo de buriti como substrato indutor. A Figura 11 mostra a produção de lipase para os seis isolados selecionados nas diferentes temperaturas testadas. A temperatura ótima de reação da lipase contida no extrato bruto foi de 37°C para todos os isolados testados.



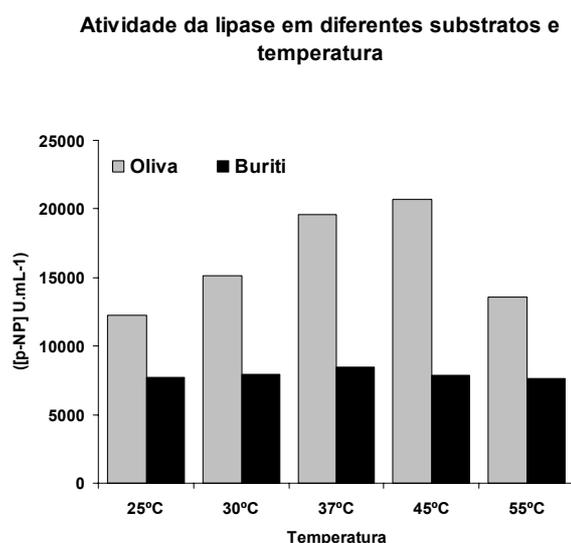
**Figura 11: Produção de lipase para os seis isolados selecionados nas diferentes temperaturas testadas.**

A Figura 12 apresenta a atividade enzimática de cada um dos seis isolados testados. Pelos resultados, o isolado INPA P-124 apresentou afinidade maior com p-NPP em todas as temperaturas quando comparado com os demais, os quais apresentam um comportamento semelhante entre si.



**Figura 12: Atividade da lipase após cultivo induzido em óleo de buriti.**

A Figura 13 compara a produção de lipase entre os seis isolados bacterianos quando induzidos em óleo de oliva e em óleo de buriti. No mínimo, o óleo de oliva induziu 50 % a mais de produção de lipase quando comparado nas mesmas condições de ensaio e com os mesmos isolados bacterianos usando com o óleo de buriti. Diferentemente da atividade da lipase em placa de Petri (ensaio qualitativo), a hidrólise de p-NPP após a indução com óleo de buriti foi bastante reduzida. Isso pode ser em função da composição desse óleo, que possui além dos ácidos graxos, altas concentrações de  $\beta$ -caroteno, que é lipossolúvel e pode desviar a ação da lipase no processo de hidrólise em meio de cultura líquido (Uenojo et al., 2005).



**Figura 13: Comparação entre a indução de lipase com óleo de oliva e óleo de buriti para os isolados seleccionados (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 e INPA P-799).**

A diferença estatística apresentada pelos seis isolados com relação aos demais na fase qualitativa foi decisiva para a seleção visando a aplicação em futuros testes de hidrólise do óleo de buriti. No entanto, não houve diferença significativa entre eles nos ensaios quantitativos, quando comparadas as produções de enzima entre os seis isolados (Tabela 13).

**Tabela 13: Atividade da lipase na hidrólise de p-NPP a 37°C ([p-NP] U.mL ).**

	<b>Código</b>	<b>([p-NP] U.mL )</b>	<b>dp</b>
1	<b>INPA P – 124</b>	454	20,8
2	<b>INPA P – 803</b>	430	0,20
3	<b>INPA P – 108</b>	418	20,8
4	<b>INPA P – 798</b>	414	18,4
5	<b>INPA P – 106</b>	410	18,4
6	<b>INPA P – 799</b>	406	20,8

## **6.8. Conclusões**

Foi possível selecionar pelos ensaios qualitativos seis isolados bacterianos para os testes quantitativos de atividade da lipase (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 e INPA P-799). Nos ensaios quantitativos não houve diferenças significativas entre os isolados. Esses seis isolados foram selecionados para futuros testes de hidrólise enzimática do óleo de buriti.

## **6.9. Referências Bibliográficas**

Albuquerque, M.L.S.; Guedes, I; Alcantara Jr. P.; Moreira, S.G.C. (2003), Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy*, 33,127-131.

Albuquerque, M.L.S.; Guedes, I; Alcantara Jr. P. ;Moreira, S.G.C.; Neto, N.M.B.; Correa, D.S.; Zílio, S.C. (2005), Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. *J. Braz. Chim. Soc.*, 6A, 1113-1117.

Castro, H. F. 2002. Imobilização de lipases e subsequente uso na síntese de ésteres aromatizante. *Anais do ENZITEC 2002*, Brasília, 48.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. (2004), Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v. 27, 146-156.

Clement, C.R.; Lleras Pérez, E.; van Leeuwen, J. (2005), O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociencias, Montevideu*, 9(1-2), 67-71.

Crodamazon. 2002. Crodamazon Buriti. *Boletim Técnico*. Croda do Brasil – Campinas, p. 1-3.

George, E.; Tamerler, C.; Martinez, A.; Matinez, M.J.; Keshavarz, T. (2003), Influence of chemical technology and biotechnology. *Journal of Technology and Biotechnology* 74, 137-140.

Koblitz, M. G.B.; Pastore, G.M. (2004), Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(2), 287-292.

Kojima, Y.; Shimizu, S. (2003), Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 96, 219-226.

Pallet, D. (2002), Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos por extrativismo. *Colóquio SYAL – Montpellier*, 2-12.

Pastore, G. M; Costa, V.S.R.; Koblitz, M.G.B. (2003), Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23(2), 35-140.

Stamford, T. M.; Araujo, J. M.; Stamford, N. P. (1998), Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urbam). *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18 (4), 1-10.

Silva Filho, G. N.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24, 311-319.

Silveira, B.I.; Costa, D.S. 2005. Estudos dos processos de extração e hidrólise enzimática do óleo da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*). *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005*, Recife, CD dos Anais do Simpósio, 7p.

Uenojo, M.; Belini, M.; Pastore, G.M. (2005). Isolamento e seleção de microrganismos potencialmente biotransformadores de carotenóides. *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005*, Recife, CD dos Anais do Simpósio.

Vieira, F.C.V., Pierre, C.T.; Castro, H.F. 2005. Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. *Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Campinas, 1-6.

Willerding, A.L.; Oliveira, L.A.; Moreira, F.W.; Germano, M.G.; Chagas Junior, A.F. (2006). Seleção de linhagens bacterianas produtoras de lipase isoladas de solos da Amazônia. *Anais do VII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 2006*. , Caxias do Sul, p114.

## **7. Capítulo 3 : Hidrólise enzimática do óleo de polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*)**

### **7.1. Resumo**

Os óleos de palmeiras apresentam-se como um importante recurso na economia mundial com diversas aplicações industriais. O objetivo desse capítulo é analisar a hidrólise do óleo de buriti pelo extrato bruto, enzima precipitada e enzima purificada de seis bactérias que apresentaram afinidade ao óleo. A quantificação da atividade enzimática foi determinada pela titulação com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,08 N, dos ácidos graxos liberados da hidrólise do óleo após a ação enzimática. A hidrólise enzimática foi analisada pela metodologia de superfície de resposta. A bactéria selecionada INPA P-798 apresentou a maior afinidade hidrolítica com relação ao óleo de buriti quando comparada com as outras cinco bactérias. O rendimento da hidrólise com a enzima precipitada (33,84% AGL) foi superior ao da lipase purificada.

**Palavras chaves:** Óleo de Buriti, biotransformação, hidrólise enzimática, ácido oléico.

## **Chapter 3: Enzymatic hydrolysis of oil from pulp of the buriti fruit**

### **7.2. Abstract**

The oils of palms trees present themselves an important resource in the world-wide economy with several industrials applications. The objective of this chapter is to analyse the hydrolysis of the Buriti oil for the crude extract, enzyme and purified enzyme of six bacteria that presented affinity to the oil. The quantification of the enzymatic activity was determined by the titrimetric with hydroxide of potassium (KOH) solution 0,08 N of the fat acids released of the oil hydrolysis after the enzymatic action. The enzymatic hydrolysis was analysed by Response Surface Methodology. The selected bacterium (INPA P-798) presented the biggest affinity regarding the Buriti oil when were compared with others five bacterias. The profit of the hydrolysis with the precipitate enzyme (33,84 % fat acid free ) was superior to that of the purified lipase and crude extract results.

**Key words:** Buriti oil, biotransformation, enzymatic oil, oleic acid.

### **7.3. Introdução**

Os óleos de palmeiras apresentam um importante papel na economia mundial, sendo produzidos mais de 30 milhões de toneladas em 2004 (Ebongue *et al.*, 2006).

Na Amazônia, há inúmeras espécies vegetais que, se forem adequadamente estudadas, poderão contribuir com seus produtos para acompanhar essa demanda por sementes ou frutos produtores de óleo (Costa & Silveira, 2004; Clement *et al.*, 2005).

Apesar de sua utilização crescente pelas indústrias de cosméticos e fármacos, os óleos de origem amazônica ainda são pouco explorados comercialmente. No entanto, já estão entre os produtos reconhecidos nos mercados nacional e internacional e há iniciativas industriais em Belém e Manaus (Crodamazon, 2002). Entre os mais atraentes comercialmente figuram os óleos e gorduras

obtidos de *Platonia insignis* (bacuri), de *Virola surinamensis* (ucuuba), e de *Astrocaryum murumuru* (muru-muru), além do buriti (Gilbert, 2006).

O conhecimento das características físicas e químicas e suas possibilidades de transformação são fundamentais para o processo de extração e industrialização dos óleos (Albuquerque *et al.*, 2003). Mesmo assim, a valorização desses frutos e plantas está sujeita às restrições de desenvolvimento da região que conta com limitados conhecimentos científicos e onde as distâncias entre parceiros, fornecedores, clientes e, sobretudo, mercados, implicam em estratégias específicas (Pallet, 2002; Albuquerque *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2005).

Dentre os óleos amazônicos que vêm sendo estudados, os frutos de palmeiras como o buriti, tucumã, macaúba, babaçu e a pupunha são fontes potenciais de carotenóides pró-vitamina A, ácidos graxos (ácidos oléico, palmítico e esteárico), além de monoglicerídeos (Lima *et al.*, 2007). Apesar dessa diversidade de produtos elaborados a partir dos vários segmentos dessas palmeiras, o buriti não tem sido explorado intensivamente (Crodamazon, 2002).

Um problema sério é a falta na região do beneficiamento desses óleos para o desenvolvimento de produtos com valor agregado. Os componentes naturais na maioria dos cosméticos caíram para níveis menores que 10% e muitas vezes menores que 1%, os quais foram substituídos por componentes químicos artificiais. A procura atual de produtos derivados da natureza oferece uma oportunidade de reintroduzir excipientes naturais. Essa tarefa necessita da disponibilidade de tecnologia moderna em associação com um conhecimento largo das fontes naturais de produtos com as propriedades físico-químicas procuradas. No estado atual da arte, essa meta é alcançável e representa uma atividade atraente para colaboração entre academia e indústria (Gilbert, 2006).

A maioria das palmeiras usadas como alimento é rica em óleo. Algumas oferecem quantias importantes de óleo na polpa do fruto (mesocarpo), outras na semente ou em ambos. O óleo do mesocarpo tende a ser rico em ácido oléico (monoinsaturado) e/ou palmítico (saturado) (Albuquerque *et al.*, 2005). Segundo Ebongue *et al.* (2006), o óleo pode representar cerca de 80% do peso da matéria seca do mesocarpo.

O fruto de buriti pode produzir dois tipos de óleos vegetais com potencial de uso nas indústrias química e alimentícia. Da polpa dos frutos são extraídos óleos ricos em ácidos oléicos. Das sementes obtêm-se os óleos ricos em ácidos láuricos. O óleo da polpa do fruto também pode ser usado para fabricar protetor solar, bloqueando completamente as radiações ultravioletas, que são prejudiciais à pele humana (Crodamazon, 2002).

A exploração do óleo de buriti na Amazônia em nível industrial é dificultada, principalmente, por dois fatores: colheita e transporte de frutos. Durante a colheita, os frutos caem da árvore e quase sempre sofrem ruptura parcial da casca, o que expõe a polpa oleosa ao meio ambiente e à

degradação. No transporte os frutos são armazenados em condições não apropriadas e, muitas vezes, seguem assim por várias horas, oferecendo condições favoráveis à deterioração do óleo. Por isso, os processos existentes para extração, (mecânico, físico ou químico) influenciam as propriedades físico-químicas dos óleos (Silveira & Costa, 2005).

Entre as tecnologias de processamento de óleos vegetais, destaca-se a hidrólise, a qual tem a finalidade de produzir ácidos graxos livres, acilgliceróis parciais e glicerol. Os ácidos graxos e seus derivados são matérias primas essenciais às indústrias cosméticas e farmacêutica e, apesar de serem obtidos, em geral, de gordura animal, os óleos vegetais têm sido muito utilizados para esse propósito (Koburi & Jorge, 2005).

As transformações de óleos e gorduras são predominantemente baseadas em processos químicos convencionais (Castro *et al.*, 2004). Embora essas modificações possam ser facilmente conseguidas por via química, há desvantagens associadas como o uso de elevadas temperaturas, formação de subprodutos durante a reação e requerem operações adicionais para purificar o produto desejado, altas pressões e a não especificidade dos catalisadores (Costa & Silveira, 2004). Os processos usados industrialmente são físico-químicos, sob condições como 700 psi de pressão, temperatura de 100 a 280°C, por 2 a 48 horas. Normalmente, o rendimento da hidrólise é acima de 97% e a mistura final deve ser destilada para remover os subprodutos formados durante a reação (Gioielle *et al.*, 1995).

A contrapartida enzimática é a utilização de lipase (EC 3.1.1.3), que atua sobre as ligações ésteres de tri, di e monoacilgliceróis. Elas hidrolisam somente ligações acil de lipídeos emulsificados, sendo ativas na interface água/óleo (George *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). A hidrólise enzimática de óleos vegetais constitui-se numa alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos convencionais, como o alto gasto energético. Os catalisadores enzimáticos promovem a hidrólise de óleos vegetais em condições brandas de temperatura e pressão, obtendo-se produtos mais puros e de baixo custo energético (Vieira *et al.*, 2005). Pelos processos enzimáticos há a possibilidade de aliar à atividade da lipase, a obtenção de monoésteres, ácidos oleicos e  $\beta$ -caroteno (Uenojo *et al.*, 2005).

Embora haja vantagens na utilização de enzimas nesses processos, elas são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura e composição em ácidos graxos, em função da natureza protéica. Portanto, um melhor conhecimento da influência desses fatores na ativação da enzima, permitirá a obtenção de rendimentos mais elevados de hidrólise (Cabral *et al.*, 2003). No caso da lipase, o processo enzimático necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nessa interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando rendimentos maiores na hidrólise (Castro *et al.*, 2004).

Dessa forma, a composição dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal pode influenciar a atividade da lipase, tendo em vista que sua ação hidrolítica em triglicerídeos aumenta com: a) massa molar dos ácidos graxos componentes; b) grau de insaturação e c) número de ácidos graxos na molécula do triglicerídeo. Assim, os triglicerídeos compostos de alguns ácidos, como o oléico e o linoléico, por exemplo, sofrem hidrólise com maior rapidez que os diglicerídeos e os triglicerídeos de ácidos de cadeia curta, como o butírico (Vieira *et al.*, 2005; Silveira & Costa, 2005).

A especificidade por ácidos graxos pelas lipases é de grande interesse industrial. A principal aplicação dessa especificidade é a produção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados de óleos naturais (no caso de reações de hidrólise) ou ésteres graxos poliinsaturados de gorduras derivadas (no caso de reações de síntese) (Carvalho *et al.*, 2005).

A necessidade crescente da otimização de produtos e processos, minimizando custos, tempos, maximizando rendimentos e produtividades, têm levado às técnicas diferenciadas de planejamento de experimentos (Rodrigues & Iemma, 2005). Para a análise das reações de hidrólise, o presente trabalho aplicou a Metodologia de Superfície de Resposta, que consiste em um conjunto de técnicas usadas em estudos experimentais relacionando uma ou mais variáveis independentes a uma variável dependente. Embora essa metodologia tenha sido desenvolvida na década de 50 (Box *et al.*, 1978), somente nos últimos anos ela tem sido mais intensamente utilizada (Rodrigues & Iemma, 2005). Os planejamentos experimentais, com o propósito de determinar o ponto de resposta ótimo, usando o menor número possível de observações, permitem estabelecer a melhor combinação de fatores (Liu *et al.*, 2006).

#### **7.4. Material e Métodos**

O óleo foi obtido por doação pela empresa Crodamazon e extraído da polpa do fruto por extração mecânica e certificado pela empresa em relação às características físicas e químicas. Os ensaios foram realizados no Núcleo de Processamento de Extratos (NPE) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

Para as reações de hidrólise foram utilizados três sistemas reacionais: os extratos brutos das culturas bacterianas selecionadas nas fases qualitativa e quantitativa (Capítulo 2), enzima purificada da bactéria selecionada na fase de extrato bruto (o processo de purificação será detalhado no Capítulo 4) e da enzima precipitada com sulfato de amônio, também da bactéria selecionada. As reações foram conduzidas seguindo os métodos descritos em Silveira & Costa (2005).

A quantificação da atividade enzimática foi determinada pela titulação dos ácidos graxos liberados da hidrólise do óleo após a ação enzimática do extrato bruto, seguindo a metodologia AOCS (1993). O sistema reacional foi preparado com 0,5g de óleo de buriti colocados em balão de

fundo redondo de 250 mL e adição de tampão fosfato com o volume a ser definido pelo desenho experimental. Após o tempo de reação, foram adicionados 100 mL de solução éter-álcool (1:3 v/v) previamente neutralizada e 3 gotas do indicador azul de bromotimol. Após o tempo de reação, foi titulado com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,08 N padronizada, até o aparecimento da cor verde. As reações permaneceram em agitação constante de 90 rotações por minuto e o volume de KOH consumido na titulação foi anotado.

Em todas as reações de hidrólise efetuadas nesse trabalho, os ácidos graxos livres presentes no óleo antes da reação foram subtraídos dos obtidos no final da reação, determinando-se, assim, a conversão verdadeira.

#### 7.4.1. Planejamento Experimental

Para a análise do processo de hidrólise, o delineamento experimental seguiu a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) descrita em Rodrigues & Iemma (2005), considerando as variáveis: temperatura (°C), tempo de reação (h), valores de pH, volume (mL) de enzima na reação e volume (mL) de tampão na reação. O estudo foi conduzido de tal forma a permitir a avaliação das influências isoladas e/ou combinadas das variáveis de entrada com significância estatística para a resposta. Foi utilizada a mesma unidade de atividade para cada extrato enzimático testado, determinando-se como variável resposta ou independente a liberação de ácido graxo (% AGL).

Na primeira etapa das corridas, foi utilizado um projeto fatorial completo com dois níveis e mais um central (Tabela 14). Os resultados obtidos foram avaliados por análise da variância (ANOVA) e diagrama de barras (Diagrama de Pareto). Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menor que 10% ( $p < 0,1$ ) (Costa & Silveira, 2004; Burket *et al.*, 2005).

**Tabela 14: Variáveis de entrada e seus respectivos níveis utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta.**

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	0	Alto (+1)
A – Temperatura (°C)	30	40	60
B – Tempo (h)	1	2	3
C – pH	7	8	9
D – Enzima (mL)	1	2	3
E – Tampão (mL)	0,5	1,0	2,0

Após a ANOVA, foram verificadas quais as variáveis que influenciaram significativamente a liberação de ácidos graxos. Com os fatores influentes, foi aplicada a MSR. O objetivo principal dessa fase é ajustar os modelos que possam prever a conversão percentual da hidrólise enzimática aos dados obtidos a partir de cada enzima testada. A verificação da capacidade desses modelos em reproduzir satisfatoriamente os dados experimentalmente obtidos ocorre através do coeficiente de regressão e do teste estatístico F.

A Tabela 15 mostra a matriz do delineamento experimental gerada a partir do projeto fatorial completo, contendo as variáveis de entrada codificadas. Os ensaios ocorreram para as seis baterias testadas. As combinações dos níveis e das variáveis testadas, bem como a análise estatística foram elaboradas pelo programa de estatística computacional SGPLUS<sup>®</sup>, adequado para esse tipo de metodologia.

Ainda como forma de analisar os resultados da MSR, utilizou-se o programa de estatística computacional Statistica<sup>®</sup> 7.1 para a realização dos gráficos de superfície de resposta e de curva de contorno.

**Tabela 15: Matriz do experimento com as combinações dos níveis e variáveis testadas.**

Ensaio	T°C	Tempo	pH	Enzima	Tampão
1	0	0	0	0	0
2	-1	1	1	1	-1
3	1	1	-1	1	-1
4	1	1	1	-1	-1
5	-1	1	1	-1	1
6	1	1	1	1	1
7	1	-1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	1	-1
9	-1	1	-1	-1	-1
10	0	0	0	0	0
11	-1	-1	1	1	1
12	1	1	-1	-1	1
13	-1	-1	1	-1	-1
14	1	-1	-1	-1	-1
15	-1	1	-1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	1
17	1	-1	1	1	-1
18	1	-1	1	-1	1
19	0	0	0	0	0

#### **7.4.2. Fracionamento com sulfato de amônio.**

Após o cultivo em meio líquido indutor, uma alíquota de 50 mL do caldo da cultura foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante denominado de Fração I foi retirado e submetido a um processo de precipitação com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), seguindo a metodologia descrita em Benjamin & Pandey (2001).

Na Fração I foi adicionado (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até 20% de saturação por 30 minutos. Em seguida, a solução foi separada por centrifugação (12000 rpm por 10 minutos a 4°C) para a obtenção de um precipitado (Fração II). O sobrenadante resultante foi então saturado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 40%. Após 30 minutos, foi obtido novo precipitado (Fração III) por centrifugação e novo sobrenadante. Assim sucessivamente, os sobrenadantes obtidos foram tratados com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturados em 60 e 80%,

obtendo as frações para os respectivos precipitados. Todos os precipitados foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Subsequentemente, essas frações foram submetidas às determinações do teor total de proteínas pelo método de Bradford, atividades enzimática e específica. Uma unidade (U) de atividade da lipase foi expressa em U.mL<sup>-1</sup> e definida como a quantidade de μMol.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> de p-NP liberado.

#### **7.4.3. Determinação da concentração de ácidos graxos livre.**

A concentração de ácidos graxos livres (% AGL) foi calculada pela equação abaixo:

$$\%AGL = \frac{N \times 28,2 \times V}{m}$$

**Equação 1:** Cálculo de % de ácido graxo livre, segundo AOCS (1993).

Onde:

N – Normalidade real da solução de hidróxido de potássio (0,08 N)

V – Volume de solução de KOH gasto na titulação (mL – ver tabelas a seguir)

m – Massa da amostra de óleo usada nos ensaios (0,5 g)

A porcentagem de hidrólise representa a porcentagem de ácidos graxos liberados após a reação catalisada pela lipase e os resultados obtidos foram subtraídos dos valores de concentração inicial de ácidos graxos livres (%AGL inicial = 0,5%) para cada amostra, demonstrando assim, a real conversão de ácidos graxos livres (AOCS, 1993). A porcentagem de AGL inicial encontrada nas amostras analisadas é semelhante à média encontrada na literatura, que é de 0,55% (Silveira & Costa, 2005) e demonstra a qualidade do óleo, que é o Índice de Acide Livre, pois representa uma fonte de instabilidade para o produto (Moyna *et al.*, 2002).

### **7.5. Resultados e Discussão**

A Tabela 16 apresenta os resultados do volume gasto de KOH e os respectivos valores de % AGL aplicando-se a Equação 1 para as seis bactérias selecionadas e representam a média de triplicatas para cada ensaio. Comparando-se os tratamentos apresentados nessa tabela, nota-se uma superioridade do ensaio 15, onde todas as bactérias apresentaram seus melhores resultados.

Os resultados experimentais observados nas reações variaram de 0 a 19,40 % de AGL da hidrólise do óleo de buriti. Considerando a composição química do óleo (Tabela 10) com 79,2% de

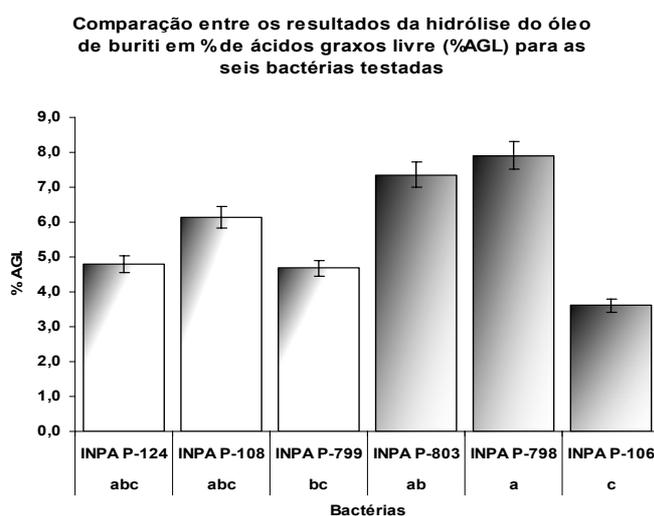
ácido oléico, nota-se o valor máximo obtido nesse processo de hidrólise enzimática em torno de 15,36% para ácido oléico efetivamente liberado.

**Tabela 16: Resumo dos resultados da hidrólise do óleo de buriti por ácido graxo livre (em %AGL) para as seis bactérias testadas (média de triplicata).**

Ensaio	INPA P-124		INPA P-108		INPA P-799		INPA P-803		INPA P-798		INPA P-106	
	KOH (mL)	% AGL	KOH (mL)	% AGL	KOH (mL)	% AGL	KOH (mL)	% AGL	KOH (mL)	% AGL	KOH (mL)	% AGL
1	0,80	3,60	1,99	9,0	1,40	6,3	2,11	9,5	2,59	11,7	0,31	1,4
2	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,91	4,1	0,31	1,4	0,00	0,0
3	2,19	9,90	2,90	13,1	1,99	9,0	2,50	11,3	2,39	10,8	1,80	8,1
4	0,11	0,50	0,71	3,2	0,20	0,9	1,00	4,5	1,20	5,4	0,31	1,4
5	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
6	1,40	6,30	1,51	6,8	1,40	6,3	1,40	6,3	2,30	10,4	0,00	0,0
7	2,11	9,50	1,80	8,1	1,80	8,1	1,91	8,6	2,19	9,9	1,80	8,1
8	1,80	8,10	2,11	9,5	1,99	9,0	1,80	8,1	1,51	6,8	1,99	9,0
9	1,40	6,30	2,11	9,5	1,20	5,4	2,59	11,7	2,59	11,7	1,11	5,0
10	0,80	3,60	1,99	9,0	1,40	6,3	2,11	9,5	2,59	11,7	0,31	1,4
11	0,80	3,60	0,00	0,0	0,31	1,4	0,51	2,3	3,30	14,9	1,11	5,0
12	2,19	9,90	2,19	9,9	2,19	9,9	3,59	16,2	2,70	12,2	1,40	6,3
13	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
14	1,11	5,00	2,30	10,4	0,60	2,7	2,90	13,1	1,31	5,9	1,00	4,5
15	<b>3,50</b>	<b>15,80</b>	<b>3,10</b>	<b>14,0</b>	<b>2,59</b>	<b>11,7</b>	<b>3,79</b>	<b>17,1</b>	<b>4,30</b>	<b>19,4</b>	<b>2,11</b>	<b>9,5</b>
16	1,20	5,40	1,20	5,4	1,20	5,4	1,80	8,1	1,40	6,3	1,71	7,7
17	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
18	0,00	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
19	0,80	3,60	1,99	9,0	1,40	6,3	2,11	9,5	2,59	11,7	0,31	1,4

São poucos os resultados apresentados na literatura sobre hidrólise do óleo de buriti (Silveira & Costa, 2005). Portanto, a comparação da eficiência de hidrólise com relação à liberação de ácidos graxos, especificamente ácido oléico, ocorre com alguns trabalhos envolvendo também outros óleos como fontes de ácidos orgânicos, tais como: óleo de piqui (*Caryocar brasiliense*) com 57% de ácido oléico (Facioli & Gonçalves, 1998), óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) com 18 a 20% de ácido oléico (Costa & Silveira, 2004; Kobori & Jorge, 2005); óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*) com 14% de ácido oléico (Lima *et al.*, 2007). Percebe-se que os valores apresentados na literatura quanto ao rendimento de ácidos orgânico variam muito. Silveira & Costa (2005), trabalhando com óleo de buriti, apresentaram valores 33,7%, 2,9% e 6,4%, respectivamente para prensagem mecânica, extração artesanal e por solvente. Oliveira *et al.* (1999), analisando um processo semelhante de hidrólise com óleo de babaçu, encontraram os valores médios para acidez total variando de 6,52 % a 41,44%, com média entre os tratamentos de 34% de AGL. Considerando a porcentagem de ácido oléico para o óleo de babaçu (14%), obtém-se de 0,91% a 5,80%.

A Figura 14 apresenta as médias das bactérias testadas nos ensaios. A bactéria INPA P-798 foi superior estatisticamente às demais. Esse resultado mostra, nas condições testadas, a maior afinidade dessa bactéria ao óleo de buriti. Em outras condições de ensaio, como na fase qualitativa ou na fase quantitativa (descritas no Capítulo 2), as seis bactérias não diferiram estatisticamente entre si. Aqui, ao contrário, se detectou essa diferença. Com isso, a bactéria INPA P-798 foi selecionada para as reações de hidrólise do óleo de buriti com a enzima purificada, que terá também a sua caracterização cinética descrita no Capítulo 4.



Obs. Mesmas letras não representam diferenças significativa.

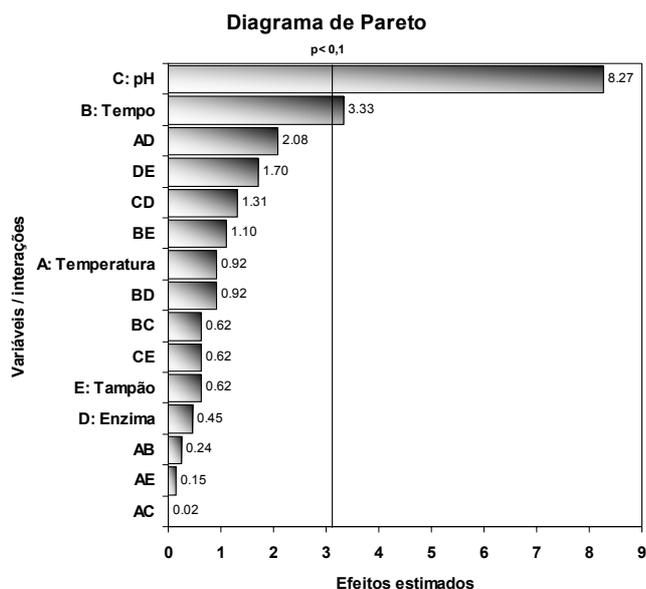
**Figura 14: Comparação de média de todos os ensaios de hidrólise do óleo de buriti pelos extratos brutos das seis bactérias testadas (teste Tukey  $p < 0,5$ ).**

A análise de variância (ANOVA) para os ensaios da bactéria INPA P-798 está apresentada na Tabela 17, onde se verifica que os efeitos de interação de três ou mais fatores foram desprezados, pois segundo Box *et al.* (1978), raramente há interação de mais de dois fatores. Analisando os dados da ANOVA, observa-se que tempo (B) e pH (C) foram as variáveis que mais influenciaram estatisticamente na resposta de liberação de ácido graxo (% AGL).

A partir dos dados da Figura 15, essas constatações podem ser confirmadas pelo diagrama de barras (Diagrama de Pareto). Tais resultados descrevem os valores absolutos que fornecem os valores das barras em ordem crescente. O valor de T tabelado (grau de liberdade/nível de confiança) completa o diagrama fornecendo o valor a partir do qual os efeitos são significativos, o que demonstra também que a maior influência estatística sobre a resposta de liberação de ácidos graxos foi das variáveis: tempo e pH. Portanto, esses fatores significantes serão analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta numa tentativa de aperfeiçoar o processo de hidrólise do óleo de buriti.

**Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do extrato bruto da bactéria INPA P-798 para a variável resposta (%AGL)**

Efeito	SQ	DF	QM	Teste F	Probabilidade (P)
A = Temperatura	4,6225	1	4,6225	0,85	0.4330
B = Tempo	60,0625	1	60,0625	11,08	0.0448*
C = pH	370,5625	1	370,5625	68,34	0.0037*
D = Razão enzima : óleo	1,1025	1	1,1025	0,2	0.6871
E = Razão tampão : óleo	2,1025	1	2,1025	0,39	0.5837
AB	0,3025	1	0,3025	0,06	0.8308
AC	0,0025	1	0,0025	0,00	0.9844
AD	23,5225	1	23,5225	4,34	0.1287
AE	0,1225	1	0,1225	0,02	0.8915
BC	2,1025	1	2,1025	0,39	0.5837
BD	4,6225	1	4,6225	0,85	0.4330
BE	6,5025	1	6,5025	1,2	0.3535
CD	9,3025	1	9,3025	1,72	0.2815
CE	2,1025	1	2,1025	0,39	0.5837
DE	15,6025	1	15,6025	2,88	0.1884
Erro total	16,2667	3	5,4222		
Total (corr)	5187,9042	18			
R <sup>2</sup>	0,968652				* significativo p< 0,1



**Figura 15: Diagrama de barra para a variável resposta em % AGL a partir da hidrólise do óleo de buriti com o extrato bruto da bactéria INPA P-798.**

Oliveira *et al.* (1999) também encontraram o tempo como variável significativa para o processo de hidrólise. Ao longo de um processo enzimático, a cinética envolve a formação do produto a partir do contato enzima-substrato. Enquanto houver estabilidade térmica para a enzima e substrato suficiente para a realização da reação, o processo passa a ser diretamente ligado ao tempo (Cabral *et al.*, 2003).

A atividade da enzima é medida ao longo do tempo em função do aparecimento do produto ou desaparecimento do substrato. Devido à elevada eficiência catalítica, a concentração da enzima na mistura reacional é desprezível quando comparada com a concentração de substrato. Ao se quantificar a reação através do tempo, verifica-se que pode estar ocorrendo uma reação enzimática de primeira ordem, isto é, a velocidade de reação varia linearmente com a concentração do substrato (Kojima & Shimizu, 2003).

O pH varia com a concentração do substrato e com a temperatura. Alterações em seus valores estão relacionadas também com alterações conformacionais na enzima. Portanto, era de se esperar influência dessa variável na atividade da enzima.

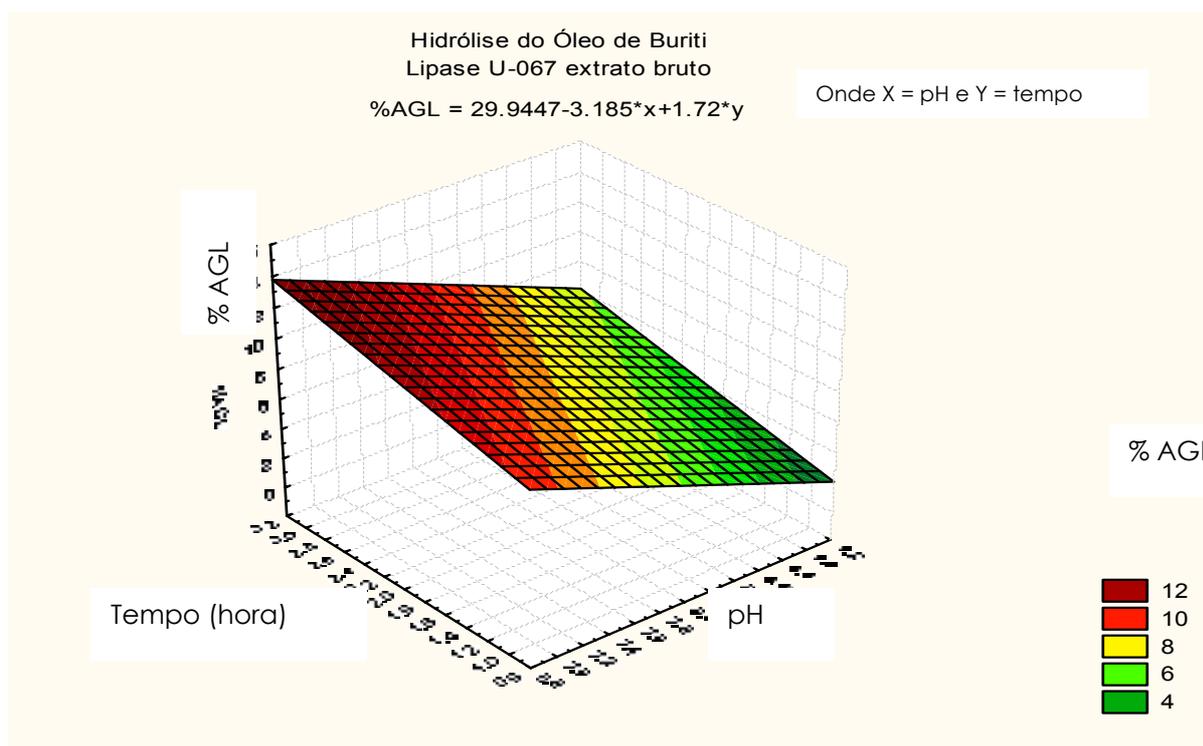
Utilizando-se os termos influentes na resposta, foi desenvolvido um modelo:

$$\%AGL = 29,9447 - 3,185X + 1,72Y \text{ (onde } X = \text{pH e } Y = \text{tempo (hora))}$$

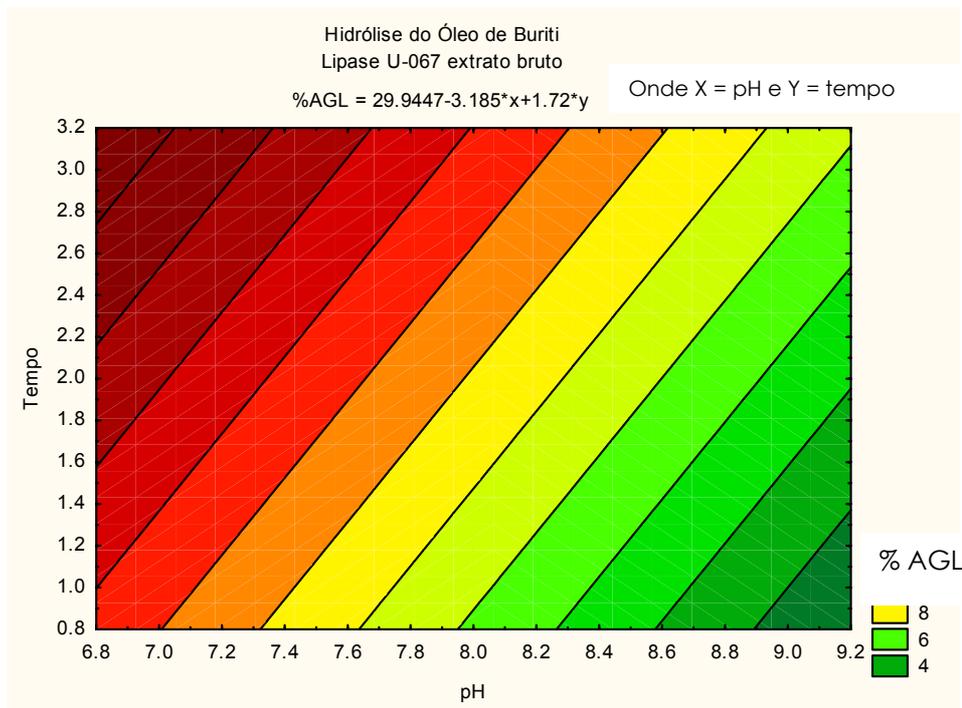
O modelo obtido descreve as relações entre as variáveis significativas pH e tempo dentro dos limites estudados, o que pode ser comprovado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentado na

Tabela 17, cujo valor foi de 0,9686 e que explica em 96,86% os resultados obtidos. De acordo com o teste F, esse pode ser considerado bom para prever a resposta, pois o valor obtido para F calculado foi de 5,42, um pouco maior do que o valor tabelado que é de 5,31 para 10% de significância.

As Figuras 16 e 17 representam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de nível para a conversão de ácido graxo livre em função das variáveis significantes (tempo e pH) para a bactéria INPA P-798. Analisando as figuras, pode-se verificar a existência de uma região ótima para a reação hidrolítica do óleo de buriti dentro de uma faixa de tempo acima de 2 horas e entre a faixa de pH de 6,8 a 8,2. Evidentemente, uma condição de tempo e pH ótimos pode ser fixada para a reação. No entanto, esse resultado fornece uma informação sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação de tempo e pH que pode ser admitida ao redor dos pontos ótimos de atividade. As outras variáveis como temperatura, volume de enzima (extrato bruto) e volume de tampão não apresentaram influência significativa no processo. Por isso, não há a necessidade de gráficos para explicar as hidrólises.



**Figura 16: Descrição da superfície de resposta para a hidrólise do óleo de buriti a partir do extrato bruto da bactéria INPA P-798.**



**Figura 17: Curva de contorno para a variável resposta (% AGL) da hidrólise do óleo de buriti a partir do extrato bruto da bactéria INPA P-798.**

Posteriormente, o processo de hidrólise do óleo de buriti foi repetido sob o mesmo delineamento experimental, mas com a enzima purificada. Para essas reações foram utilizadas alíquotas da lipase purificada a partir do extrato bruto da cultura da bactéria selecionada (INPA P-798). As reações foram conduzidas seguindo o mesmo planejamento proposto anteriormente (Tabelas 14 e 15) e a quantificação da atividade da enzima purificada foi determinada pela titulação dos ácidos graxos liberados da hidrólise. Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e diagrama de barras (Diagrama de Pareto), sendo considerados significativos os parâmetros com p-valor menores que 10% ( $p < 0,1$ ).

Após a ANOVA, foram verificadas quais as variáveis que influenciaram significativamente a liberação de ácidos graxos. A concentração de ácidos graxos livres (% AGL) foi calculada pela Equação 1, sob as mesmas condições anteriormente descritas.

A Tabela 18 apresenta os resultados para os ensaios com a lipase INPA P-798 purificada e representam a média de triplicatas para cada ensaio. Os resultados experimentais observados nas reações variaram de 0,90 a 7,67 % de AGL.

Diferentemente dos resultados apresentados para a hidrólise com o extrato bruto, onde o experimento 15 apresentou o melhor resultado (30°C, 3 horas, pH 7, 3 mL de enzima e 2 mL de tampão), para as reações catalisadas com a enzima purificada, o melhor resultado foi no experimento 9 (30°C, 3 horas, pH 7, 1 mL de enzima e 0,5 mL de tampão). Percebe-se que os parâmetros desses dois experimentos são iguais em três das cinco variáveis, modificando-se no volume de enzima e do tampão utilizado na reação.

**Tabela 18: Hidrólise do óleo de buriti pela enzima purificada da bactéria INPA P-798 em ácido graxo livre (%AGL) (média de triplicata).**

INPA P-798 (Enzima purificada)					
Ensaio	KOH (mL)	%AGL	Ensaio	KOH (mL)	%AGL
1	0,5	2,3	11	0,6	2,7
2	0,6	2,7	12	1,0	4,5
3	0,5	2,3	13	0,4	1,8
4	0,4	1,8	14	0,5	2,3
5	0,5	2,3	15	1,0	4,5
6	0,2	0,9	16	0,8	3,6
7	1,1	5,0	17	0,5	2,3
8	0,7	3,2	18	0,2	0,9
9	1,7	7,7	19	0,5	2,3
10	0,5	2,3			

A análise de variância (ANOVA) para os ensaios da lipase purificada INPA P-798 está apresentada na Tabela 19. Os efeitos de interação de três ou mais fatores foram desprezados. Analisando os dados da ANOVA, observa-se que os efeitos principais temperatura (A) e pH (C), além das interações temperatura versus tempo (AB) e tempo versus concentração de enzima (BD) foram as variáveis que mais influenciaram estatisticamente a resposta de liberação de ácido graxo (% AGL), o que é evidenciado pelos valores de probabilidade (P). Nessas variáveis, o teste de hipótese nula é rejeitado, ou seja, os efeitos possuem uma probabilidade menor que 10% de representar apenas ruído.

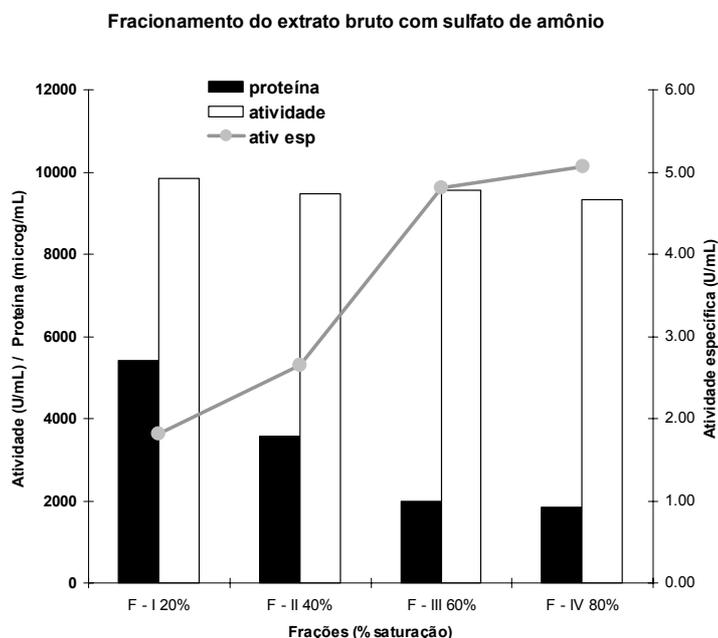
**Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios da bactéria INPA P-798 com a enzima purificada para a variável reposta (%AGL).**

Efeito	SQ	DF	QM	F	P-value
A = Temperatura	4,601	1	4,601	9,52	0,053*
B = Tempo	1,537	1	1,537	3,18	0,172
C = pH	19,360	1	19,360	40,07	0,008*
D = Razão enzima : óleo	0,112	1	0,112	0,23	0,667
E = Razão tampão : óleo	0,012	1	0,012	0,03	0,885
AB	2,873	1	2,873	5,95	0,092*
AC	0,112	1	0,112	0,23	0,667
AD	0,624	1	0,624	1,29	0,338
AE	1,525	1	1,525	3,16	0,173
BC	1,537	1	1,537	3,18	0,172
BD	6,734	1	6,734	13,94	0,033*
BE	1,537	1	1,537	3,18	0,172
CD	1,550	1	1,550	3,21	0,171
CE	1,020	1	1,020	2,11	0,242
DE	1,252	1	1,252	3,16	0,173
Erro total	1,449	3	0,483		
Total (corr)	46,110				
R <sup>2</sup> =	0,969448				

Portanto, esses fatores significantes teriam que ser analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta numa tentativa de aperfeiçoar o processo de hidrólise do óleo de buriti via enzima purificada. No entanto, como os resultados apresentados aqui são inferiores aos obtidos com o extrato bruto, não há sentido no desenvolvimento de um modelo cujo processo é inferior no seu rendimento.

Ainda como forma de busca por um maior aproveitamento do processo de hidrólise, procedeu-se os testes de hidrólise com a enzima precipitada. Após o fracionamento do extrato bruto e as respectivas determinações do teor de proteína, atividades enzimática e específica, foi determinada qual fração precipitada seria a ideal para a hidrólise enzimática.

A Figura 18 apresenta os resultados para cada uma das frações. Foi observado que a Fração IV apresentou a maior atividade específica, o que tornou esta forma da enzima a selecionada para a hidrólise do óleo de buriti.



**Figura 18: Determinação do teor de proteína, atividades enzimática e específica do extrato bruto fracionado.**

A Tabela 20 apresenta os volumes de KOH utilizados na titulação e os respectivos valores de % AGL para os ensaios com a enzima precipitada, aplicando-se a Fração IV. Os resultados experimentais observados nas reações variaram de 5,9 a 33,8 % de AGL da hidrólise do óleo de buriti. Considerando que o óleo de buriti apresenta 79,2% de ácido oléico, nota-se o valor máximo obtido nesse processo variou de 4,6% a 26,8% a concentração de ácido oléico efetivamente liberado. Os melhores resultados foram para os ensaios 11, 12 e 16.

**Tabela 20: Hidrólise do óleo de buriti pela enzima precipitada da bactéria INPA P-798 em ácido graxo livre (%AGL) (Fração IV).**

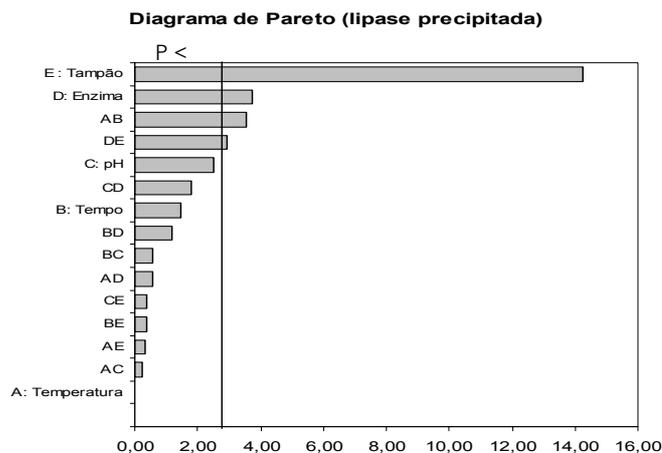
<b>Amostras</b>	<b>Enzima precipitada (Fração IV)</b>	<b>INPA P-798</b>
<b>Ensaio</b>	<b>KOH V(mL)</b>	<b>%AGL</b>
1	3,8	17,1
2	2,4	10,8
3	3,6	16,2
4	1,5	6,7
5	4,9	22,1
6	6,3	28,4
7	6,4	28,8
8	4,2	18,9
9	1,5	6,7
10	3,8	17,1
11	7,5	33,8
12	7,5	33,8
13	1,3	5,8
14	1,5	6,7
15	6,0	27,0
16	7,5	33,8
17	3,2	14,4
18	5,4	24,3
19	3,8	17,1

A Tabela 21 apresenta a análise de variância (ANOVA) para os ensaios com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798. Observa-se que os efeitos principais pH (C), razão enzima:óleo (D) e a razão tampão: óleo (E) foram as variáveis que influenciaram estatisticamente a resposta de liberação de ácido graxo. Também foi significativa a interação temperatura versus tempo (AB). Isto é evidenciado pela ordem de grandeza dos valores numéricos da coluna de probabilidade (P) menores que 10% ( $p < 0,1$ ).

**Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) dos ensaios com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798 para a variável resposta (%AGL)**

Efeito	SQ	DF	QM	F	P-value
A = Temperatura	0,013	1	0,013	0,01	0,968
B = Tempo	13,857	1	13,857	2,13	0,242
C = pH	41,313	1	41,313	6,31	0,087*
D = Razão enzima : óleo	91,920	1	91,920	14,04	0,033*
E = Razão tampão : óleo	1327,327	1	1327,327	202,76	0,001*
AB	83,494	1	83,494	12,75	0,038*
AC	0,316	1	0,316	0,05	0,842
AD	2,139	1	2,139	0,33	0,613
AE	0,620	1	0,620	0,09	0,781
BC	2,139	1	2,139	0,33	0,613
BD	9,287	1	9,287	1,42	0,319
BE	1,025	1	1,025	0,16	0,723
CD	21,414	1	21,414	3,27	0,168
CE	1,035	1	1,035	0,16	0,721
DE	57,040	1	57,040	8,71	0,600
Erro total	19,639	3	6,546		
Total (corr)	1672,578	18			
R <sup>2</sup> =	0,969448		* significativo p < 0,1		

A Figura 19 apresenta o Digrama de Pareto que demonstra que a maior influência estatística sobre a resposta de liberação de ácidos graxos (% AGL) foi feita pelas variáveis significativas (E, D, AB e DE) visto que são interceptados pela reta vertical que indica o limite de rejeição do teste de hipótese nula para 90% de confiabilidade.



**Figura 19: Diagrama de barra variável resposta em % AGL a partir da hidrólise do óleo de buriti com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798.**

Independentemente das variáveis significativas para a hidrólise apresentadas para a o sistema com a enzima precipitada, o que se verifica é um maior rendimento para esse sistema reacional. No entanto, percebe-se aqui a influência do volume do tampão com o mais significativo e a razão enzima:óleo.

Utilizando-se os termos influentes na resposta, foi desenvolvido um modelo:

$$\%AGL = 0,024 + 2,3969X + 12,127Y$$

**(onde X = razão enzima:óleo e Y = razão tampão:óleo)**

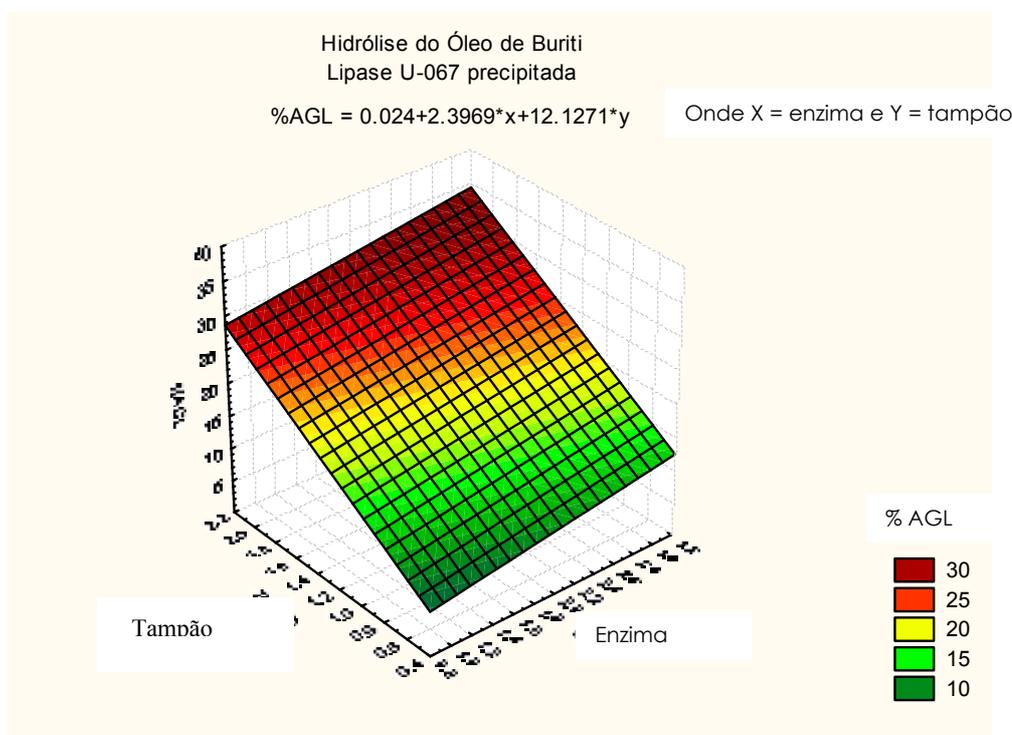
O modelo obtido descreve as relações entre as variáveis significativas razão enzima:óleo e razão tampão:óleo dentro dos limites estudados, o que pode ser comprovado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) apresentado na Tabela 21, cujo valor foi de 0,969448 que explica em 96,94% os resultados obtidos.

As Figuras 20 e 21 apresentam o comportamento dinâmico da hidrólise enzimática do óleo de buriti com a solução da enzima precipitada com sulfato de amônio e representam respectivamente a superfície de resposta e as curvas de nível para a conversão de ácido graxo livre em função das variáveis significantes para o sistema com a enzima precipitada da bactéria INPA P-798. Analisando as figuras, pode-se verificar a existência de uma região ótima para a reação hidrolítica na medida em que aumenta tanto o volume de tampão como o volume de solução enzimática utilizados no sistema reacional. O que se deduz é que a atividade da enzima é aumentada quando da existência da interface água-óleo. Na medida em que há um aumento do volume aquoso pelo tampão e um aumento da

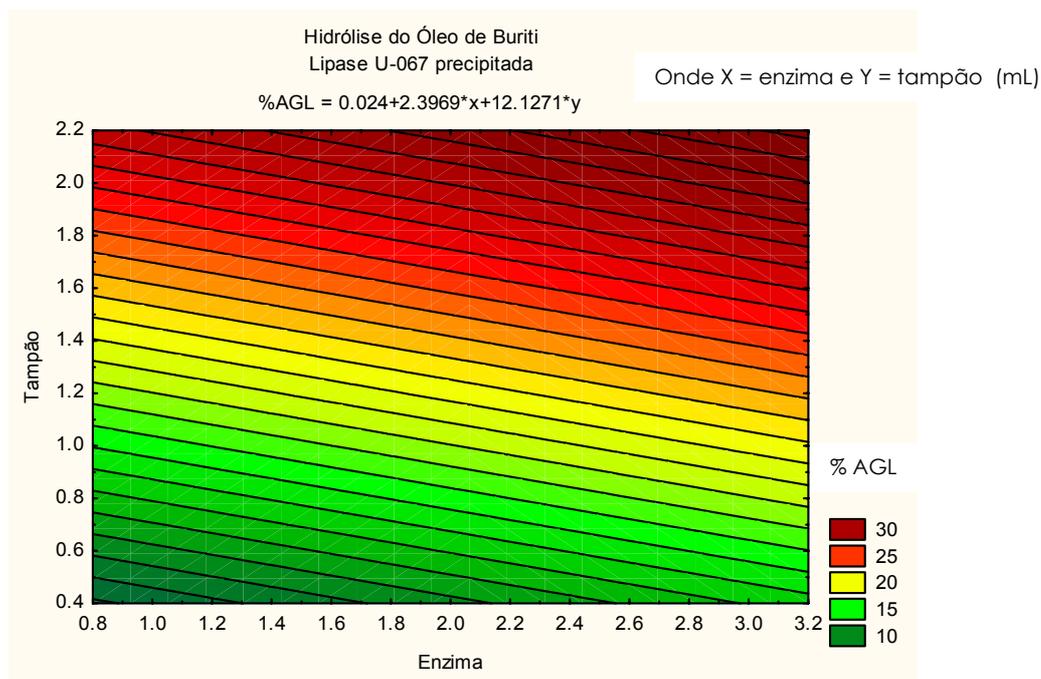
quantidade de enzima no sistema, aliados ao volume de substrato, potencializam-se a atividade enzimática.

Como a degradação do lipídio ocorre exclusivamente na interface água-óleo, isso implica que a concentração de moléculas de substratos, enzima e água nessa interface determina diretamente a taxa de lipólise (Jaeger *et al.*, 1994).

Da mesma forma que na análise de MSR anterior, esse resultado fornece uma informação sobre a robustez do processo, ou seja, qual a variação de volume de tampão e enzima que pode ser admitida ao redor dos pontos ótimos de atividade. As outras variáveis como temperatura e tempo não apresentaram influencia significativa no processo. Por isso, não foram desenvolvidos gráficos para explicar as hidrólises.



**Figura 20: Descrição da superfície de resposta para a hidrólise do óleo de buriti com a enzima precipitada com sulfato de amônio da bactéria INPA P-798.**

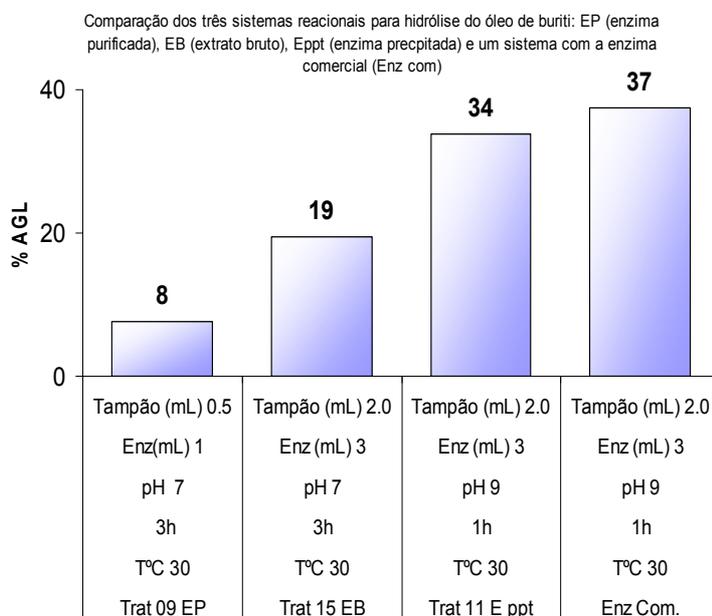


**Figura 21: Curva de contorno para a variável resposta (% AGL) da hidrólise do óleo de buriti a partir da enzima precipitada com sulfato de amônio da bactéria INPA P-798.**

A Figura 22 mostra a comparação entre os três sistemas reacionais contendo formas diferentes da enzima selecionada: [EP (enzima purificada), EB (extrato bruto) e Eppt (enzima precipitada)] mais um sistema reacional contendo uma lipase comercial (SIGMA). Quando comparados os sistemas contendo a lipase selecionada, percebe-se que há uma superioridade do sistema Eppt quanto ao rendimento da hidrólise. Quando se compara as médias, o tratamento com enzima purificada apresentou 8% AGL e o tratamento com extrato bruto 19 %AGL, o que representa 237% de incremento no rendimento. Quando se observa os valores obtidos com a enzima precipitada (33% de AGL em média), há um acréscimo de 412% com relação à produtividade da enzima purificada e 174% com relação ao extrato bruto. Esses dados indicam o tratamento do caldo de cultura com posterior precipitação com sulfato de amônio como o mais adequado para a obtenção da enzima apta para o processo de hidrólise.

Após a constatação de que a enzima precipitada apresentou o melhor rendimento na hidrólise do óleo, repetiu-se o mesmo tratamento (trat. nº11) com a enzima comercial, mantendo-se a mesma concentração de enzima ( $1200 \text{ U.mL}^{-1}$ ) que foi utilizada no sistema reacional com a enzima precipitada. O resultado obtido nesse sistema (37% AGL) foi superior a todos os outros testados. No entanto, ao se comparar as médias, o sistema com enzima precipitada alcançou 90% de eficiência quando comparado com a enzima comercial. O extrato bruto alcançou 52% de eficiência e a enzima purificada 20%. Estes são dados muito importantes, pois foi obtido um rendimento com uma enzima não melhorada e sob condições de laboratório e de reação que podem ser otimizadas. Portanto, ao se

alcançar 90% do rendimento de uma enzima comercial pura e liofilizada, apresenta-se aqui uma enzima com potencial de uso na hidrólise do óleo de buriti. Além do que, a enzima precipitada alcançou um máximo de 23% de ácido oléico efetivamente liberado do óleo de buriti, visto que 79% de ácido graxo do óleo são compostos de ácido oléico. Este valor obtido de ácido oléico é semelhante aos valores apresentados na literatura já citados anteriormente (páginas 70 e 71).



**Figura 22: Comparação dos três sistemas reacionais para a hidrólise do óleo de buriti : EP (enzima purificada), EB (extrato bruto) e Eppt (enzima precipitada) com um sistema reacional com a enzima comercial (Lipase *Pseudomonas* sp SIGMA®) para a % de ácidos graxos livres (%AGL) .**

Na indústria oleoquímica muitas vezes o extrato bruto enzimático consegue bons resultados quando comparado com a enzima purificada (Sharma *et al.*, 2001). Com relação à enzima precipitada, só o fato dela não passar pelos sucessivos processos de purificação, o que pode promover desnaturação, proporciona uma conservação melhor da molécula. Na purificação, muitas vezes, o processo ocorre em temperatura ambiente. No processo de precipitação, esse ocorre em ambiente refrigerado (4°C). Isso pode ser um dos motivos para o melhor rendimento apresentado pela hidrólise a partir da enzima precipitada.

## 7.6. Conclusões

A bactéria selecionada INPA P-798 apresentou uma afinidade ao óleo de buriti e o rendimento da hidrólise com a enzima precipitada foi superior ao extrato bruto e à lipase purificada em pH 9.

O que precisa ser feito é um melhoramento no processo nos níveis de suas variáveis e da solução enzimática, no sentido de buscar um melhor desempenho da hidrólise. Percebe-se também o óleo de buriti como uma boa fonte de ácido oléico, quando comparado com outros óleos vegetais, e que deve ser mais bem aproveitado nesse sentido, visando aplicações biotecnológicas.

## 7.7. Referência Bibliográfica

Albuquerque, M.L.S.; Guedes, I; Alcantara Jr. P.; Moreira, S.G.C. 2003. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. *Vibrational Spectroscopy* 33,127-131.

Albuquerque, M.L.S.; Guedes, I; Alcantara Jr. P. ;Moreira, S.G.C.; Neto, N.M.B.; Correa, D.S.; Zílio, S.C. 2005. Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. *J. Braz. Chim. Soc.*, 6A, p. 1113-1117.

AMERICAN OIL CHEMISTS'S SOCIETY, 1993. Official methods and recommended practices of the AOCS, 5 ed.

Benjamin, S.; Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44(2), 213-221.

Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. 1978. *Statistic for experimenters*. New York, Ed. Wiley, p.510-539.

Burket, J.F.M.; Maldonado, R.R.; Maugeri Fº, F.; Rodrigues, M.I. 2005. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:61-67p.

Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. 2003. *Engenharia Enzimática*. Ed. Lidel, Lisboa, 250p.

Carvalho, P.O.; Calafatti, S.A.; Marassi, M.; Silva, D.M.; Cotesini, F.J.; Bizaco, R. 2005. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28(4), 614-625

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. (2004), Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156.

- Clement, C.R.; Lleras Pérez, E.; van Leeuwen, J. 2005).O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Agrociencias, Montevideu*, 9(1-2), p. 67-71.
- Costa, D.S.; Silveira, B.I. 2004. Estudo do processo de hidrólise enzimática do óleo da semente de maracujá através de um projeto fatorial completo e de metodologia de superfície de resposta. *Anais do II Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada*, Curitiba, p. 8-16.
- Crodamazon, (2002), Crodamazon Buriti. *Boletim Técnico – Óleo de buriti.. Croda do Brasil – Campinas*, p. 1-3.
- Ebongue, G,F.N; Dhouib, R.; Carriere, F.; Zollo, P.H.A.; Arondel, V. 2006. Assaying lipase activity from oil palm fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 44(2006), 611-617.
- Facioli, N.L.; Gonçalves, L.A.G. 1998. Modificação enzimática da composição triglicéridica do oleo de piqui (*Caryocar brasiliense*). *Química Nova* 21(1), 16-19.
- George, E.; Tamerler, C.; Martinez, A.;Matinez, M.J.; Keshavarz, T. (2003), Influence of Chemical Technology and Biotechnology. *Journal of Technology and Biotechnology* 74, p.137-140.
- Gilbert, B. 2006. Produtos naturais industrializáveis da Amazônia. FarManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Comunicação Pessoal. 11p.
- Gioielli, L.A.; Pitombo, R.N.M., Vitolo, M., Barufaldi, R., Olioveira, M.N., Moreno, P. C. 1995. Enzymatic hydrolysis of oil and fats. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* v. 72, n. 3, p. 115-117, 1995.
- Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, M.; Misset, O. 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* (15):29-63.
- Kobori, C.N.; Jorge, N. 2005. Caracterização dos oleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. *Ciênc. Agrotec. Lavras.*, 29(5), 1008-1014.
- Kojima, Y.; Shimizu, S. (2003), Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 96, p. 219-226.
- Lima, J.R.O.; Silva, R.B.; Silva, C.C.M.; Santos, L.S.S.; Santos Jr., J.R.S.; Moura, E.M.; Moura, C.V.R. 2007. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp) obtido por via etanólica. *Química Nova* 30(3), 600-603.
- Liu, C.; Lu, W.; Chang, J. 2006. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. response surface methodology. *Process Biochemistry* 41(2006), 1940-1944.

- Moyna, P.; Dellacasa, E.; Menéndez, P. 2002. *Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais*. In: Serafini, L.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. 2002. *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul, EDUCS, 165-194p.
- Oliveira, A.L.A.; Gioielli, L.A.; Oliveira, M.N. 1999. Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* V 19(n2), 21-27.
- Pallet, D. (2002), Perspectivas de valorização dos frutos amazônicos obtidos por extrativismo. *Colóquio SYAL – Montpellier*, p. 2-12.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. 2005. *Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos*. 1ª Ed. Campinas. Casa do Pão Editora, 326p.
- Sharma, R.; Chisti Y.; Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19(2001) 627-662.
- Silveira, B.I.; Costa, D.S. 2005. Estudos dos processos de extração e hidrólise enzimática do óleos da polpa de Buriti (*Mauritia flexuosa*). *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005*, Recife, CD dos Anais do Simpósio, 7p.
- Uenojo, M.; Belini, M.; Pastore, G.M. 2005. Isolamento e Seleção de Microrganismos Potencialmente Biotransformadores de Carotenóides. *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos 2005*, Recife, CD dos Anais do Simpósio, 7p.
- Vieira, F.C.V., Pierre, C.T.; Castro, H.F. (2005), Influência da composição da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática. *Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*. Campinas, p. 1-6.

## 8. Capítulo 4 : Purificação e caracterização da lipase INPA P-798

### 8.1. Resumo

A purificação da lipase visa à obtenção da enzima parcialmente pura, para uma melhor caracterização da cinética, massa molecular, determinação da seqüência dos aminoácidos, estrutura tridimensional e um melhor entendimento da relação estrutura-função durante as reações hidrolítica e de esterificação. Além disso, é possível obter um produto com maior atividade específica. O objetivo desse trabalho foi purificar a enzima da bactéria selecionada (INPA P-798) e determinar as propriedades cinéticas em função da estabilidade térmica, concentração do substrato, presença de inibidores e valores de pH. A purificação da enzima seguiu o processo em cromatografia líquida de baixa pressão com o AKTA PRIME® da GEHealthcare. A primeira etapa de purificação foi com uma coluna de troca iônica HiTrap DEAE- FF Sefarose pré-equilibrada com tampão Tris-HCl, pH 8,0 20mM. O material foi eluído com tampão Tris-HCl, pH 8,0 20mM contendo NaCl 1,0 M. A segunda etapa de purificação consistiu na aplicação em coluna de interação hidrofóbica HiTrap Phenyl FF, pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 50mM contendo 1,5 M de sulfato de amônio. O material foi eluído com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 50mM. A etapa final de purificação foi com uma coluna de filtração em gel (GF) com coluna HiTrap Desalting Sephadex G-25 pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 20mM contendo NaCl 0,15 M. A enzima apresentou atividade ótima em pH 8,5 em tampão fosfato de sódio a 55°C. No experimento com inibidores e/ou promotores, o CaCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub> promoveram o aumento da atividade em 22% e 18%, respectivamente quando comparados com a testemunha e o MgSO<sub>4</sub> foi o maior inibidor, reduzindo a atividade em 13%. Nos ensaios com diferentes concentrações de substrato, a enzima apresentou um valor de V<sub>max</sub> = 12500 µM p-NP.mL<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> = 1,125 µM p-NP.min<sup>-1</sup>.

**Palavras chave:** Lipase, Purificação, Cromatografia Líquida, Akta Prime, Bactéria.

## Chapter 4: Purification and characterization of the lipase INPA P-798

### 8.2. Abstract

The purification of the lipase aims for getting the partially pure enzyme, for a better characterization of the kinetic one, molecular mass, determination of the sequence of the aminoacids, three-dimensional structure and a better understanding of the relation structure-function into hydrolytic and esterification reactions. The objective of this work was purified the enzyme of the selected bacterium (INPA P-798) and determined the kinetic properties in function of the thermal stability, substrate concentration, presence of inhibiting/promoter and pH values. The purification of the enzyme followed the process in chromatography liquid system with the Akta Prime® set of the GEHealthcare. The first step of purification was with a ionic exchange column HiTrap DEAE - FF Sefarose pre-equilibrated with Tris-HCl buffer, pH 8,0 20mM. The material was eluted with Tris-HCl buffer, pH 8,0 20mM containing NaCl 1,0 M. The second step of purification consisted of the application of hydrophobic interaction column HiTrap Phenyl FF, pre-equilibrated with sodium phosphate buffer, pH 7,0 50mM containing 1,5 M ammonium sulphate. The material was eluted with sodium phosphate buffer, pH 7,0 50mM. The final stage of purification was with a gel filtration column with column HiTrap Desalting Sephadex G-25 pre-equilibrated with sodium phosphate buffer, pH 7,0 20mM containing NaCl 0,15 M. The enzyme presented the best activity in pH 8.5 in sodium phosphate buffer at 55°C. In the experiment with inhibiting and / or promoters, the CaCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub> promoted the increase of the activity in 22 % and 18 %. The MgSO<sub>4</sub> was the biggest inhibiting one, reducing the activity in 13%. In the tests with different concentrations of substrate, the enzyme obtained a value of V<sub>max</sub> = 12500 µM p-NP.mL<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> = 1,125 µM p-NP.min<sup>-1</sup>.

**Key words:** Lipase, Enzyme Purification, Liquid Chromatography, Akta Prime, Bacteria.

### 8.3. Introdução

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise da acilgliceróis em ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Jiang *et al.*, 2006). Seus substratos naturais são triglicerídeos e o seu modo de ação se assemelha ao das esterases. Porém, sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresentam afinidade por ácidos graxos de cadeia longa.

A teoria atualmente aceita para esse fenômeno diz que uma parte da superfície da enzima se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida nessa interface e que essa conformação coloca o sítio ativo em posição favorável para a catálise.

A lipase pode ser encontrada em células de tecido animal, vegetal e em microrganismos. Do ponto de vista industrial, as lipases de origem microbiana são as mais significantes comercialmente (Sharma *et al.*, 2001), em função do seu maior potencial de produção em larga escala em comparação com outras fontes de lipase (Pastore *et al.*, 2003). Entre os microrganismos produtores de lipase, os mais estudados são as leveduras *Candida rugosa*, *C. antarctica* e as bactérias *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligene* e *Bacillus subtilis* (Alves *et al.*, 2006).

A purificação da lipase visa a obtenção da enzima parcialmente pura, para uma melhor caracterização da cinética, massa molecular, determinação da seqüência dos aminoácidos, estrutura tridimensional e um melhor entendimento da relação estrutura-função durante as reações hidrolítica e de eterificação (Saxena *et al.*, 2003). Além disso, é possível obter um produto com maior atividade específica (unidades de atividades/mg de proteína) para a aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final (Koblitz & Pastore, 2004) e o seu emprego praticamente determina o seu grau de purificação.

Como regra geral, a maioria dos protocolos de purificação segue a seguinte lógica: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca, como a de troca iônica. Em seguida há a aplicação com colunas de interação hidrofóbica que apresentam a vantagem adicional de dispensarem a diálise de extratos precipitados pela adição de sais (Koblitz & Pastore, 2004). E numa etapa de polimento, a purificação ocorre com a aplicação da amostra em colunas de filtração em gel.

A maior parte das lipases obtidas de microrganismos é extracelular e o processo de fermentação é seguido pela remoção das células a partir do caldo de cultura por centrifugação ou por filtração. Na maioria das vezes, um único passo no processo de purificação não é suficiente para se obter um nível de pureza satisfatório. A cromatografia líquida por troca iônica é o processo de purificação mais comum, sendo empregada em 67% dos esquemas de purificação. Para esse processo, usualmente é utilizada a resina da coluna de purificação o grupo dietilaminoetil (DEAE), especificamente para trocas aniônicas e a utilização de carboximetil (CM) para trocas catiônicas. A

cromatografia líquida por filtração em gel é a segunda mais utilizada, sendo empregada em pelo menos 60% dos esquemas de purificação. Há outras possibilidades pela cromatografia líquida de purificação, como a afinidade (22% da aplicação) e interação hidrofóbica, aplicada em 18% dos processos (Saxema *et al.*, 2003).

O presente capítulo teve por objetivo purificar a enzima da bactéria selecionada nos processos de hidrólise enzimática do extrato bruto sob óleo de buriti (Capítulo 3), com o intuito de determinar as propriedades cinéticas em função da estabilidade térmica, concentração do substrato, presença de inibidores e valores de pH.

#### **8.4. Material e Métodos**

Após o processo de hidrólise do óleo de buriti, foi selecionado o isolado bacteriano INPA P-798 e então aplicado o processo de purificação da lipase. Para a obtenção da enzima, a bactéria foi inoculada em meio líquido indutor já descrito anteriormente, baseado em Sene *et al.* (2002) calibrado em pH 8,0 e contendo óleo de buriti (1,0 %), *Tween* 80 (1,0 %), peptona (0,3%), extrato de levedura (0,2%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2%),  $\text{MgSO}_4$  (0,1%),  $\text{CaCl}_2$  (0,1%), calibrado pH 8, incubada a 30 °C. Após 72 horas, uma alíquota de 2000  $\mu\text{l}$  da cultura foi centrifugada em 12000 rpm por 20 minutos para a obtenção da solução enzimática do extrato bruto.

A técnica de troca iônica (IEX) é ideal para o processo de captura da enzima a partir do extrato bruto (Amersham, 2004). Na fase de captura o objetivo é concentrar e estabilizar a molécula em questão. O produto da purificação deve ser concentrado e armazenado em condições que conservem a atividade da enzima (5°C).

Teoricamente, o processo intermediário de purificação pode ser a interação hidrofóbica (HIC). Se a amostra tiver uma baixa força iônica, ela pode ser aplicada em IEX. Após a eluição em IEX, a amostra estará com uma alta força iônica (a molécula alvo concentrada) e pode então ser aplicada por HIC. Após o processo intermediário, o polimento da amostra, isto é, a separação refinada da molécula alvo pode ser feita com a purificação por filtração em gel (GF) (Amersham, 2004).

A purificação da enzima seguiu o processo descrito em Jiang *et al.* (2006). Para o processo de purificação da lipase em cromatografia líquida de baixa pressão, foi utilizado o aparelho AKTA PRIME® da GEHealthcare. O sobrenadante das amostras centrifugadas a partir do extrato bruto foi utilizado na primeira etapa de purificação com uma coluna de troca aniônica HiTrap DEAE- FF Sefarose pré-equilibrada com tampão Tris-HCl, pH 8,0 20mM. O material adsorvido na coluna foi eluído com tampão Tris-HCl, pH 8,0 20mM contendo NaCl 1,0 M. O fluxo foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e foram coletadas frações de 1,0 mL. As frações representadas por picos no cromatograma foram

reunidas para a determinação da concentração de proteína, atividade enzimática e determinação da atividade específica, bem como foram separadas para a aplicação na segunda etapa de purificação, que consistiu na aplicação em coluna de interação hidrofóbica HiTrap Phenyl FF, pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 50mM, contendo 1,5 M de sulfato de amônio. O material adsorvido na coluna foi eluído com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 50mM. O fluxo foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e foram coletadas frações de 1,0 mL. Como etapa final de purificação (“polimento”), ocorreu a purificação em filtração em gel (GF) com coluna HiTrap Desalting Sephadex G-25 pré-equilibrada com tampão fosfato de sódio, pH 7,0 20mM contendo NaCl 0,15 M. O fluxo foi de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e foram coletadas frações de 1,0 mL. As frações foram separadas para as mesmas determinações das etapas anteriores de purificação.

A escolha dos tampões seguiu as recomendações do fabricante das colunas de purificação e do aparelho. Após as fases de purificação, as frações com a enzima purificada foram utilizadas para determinação da cinética enzimática

#### **8.4.1. Caracterização da lipase**

A determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade da enzima purificada seguiu os procedimentos descritos em Kojima & Shimizu (2003) e Karadzic *et al.* (2006).

#### **8.4.2. Determinação das proteínas totais**

Para a determinação das proteínas totais do extrato bruto e das soluções com enzima purificada, foi utilizado o método de Bradford, que utiliza o corante “Coomassie Brilliant Blue” BG-250. Durante a reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm, lido em espectrofotômetro marca Shimadzu modelo UVmini 240. Cada alíquota de 100µL da amostra foi adicionada em 1000µL da solução do reagente de Bradford, seguindo o descrito em Zaia *et al.* (1998).

#### **8.4.3. Determinação da atividade da lipase**

A cultura selecionada cresceu no meio indutor anteriormente citado. Após 72 horas, uma alíquota de 2000 µl da cultura foi centrifugada em 12000 rpm por 20 minutos a 4°C para a obtenção da solução enzimática do extrato bruto.

Foi preparada uma solução de para-nitrofenilpalmitato (p-NPP/SIGMA®) [2,5 mmol], contendo 0,189 g do substrato em 200 ml de solução tampão fosfato de sódio (pH 8; 50mM) adicionado com 2,1% de Triton X-100, com a homogeneização a 70°C, conforme descrito em Pastore *et al.* (2003). Uma alíquota de 950µl dessa solução foi retirada e adicionada em outra

alíquota de 50 µl da solução enzimática do extrato bruto de cada isolado selecionado. A reação foi testada a 37°C por 15 minutos e em seguida, a reação foi paralisada com choque térmico a 0°C por cinco minutos. A leitura da absorbância no espectrofotômetro em 410 nm da solução de cada isolado foi comparada com a da curva-padrão para o p-NP, a fim de quantificar a produção de lipase pelos isolados. Uma unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de p-NP. ml<sup>-1</sup> sob as condições do ensaio.

#### 8.4.4. Reta padrão

A degradação do p-NPP pela ação da lipase libera para-nitrofenol (p-NP) e promove uma coloração amarela na solução que pode ser lida a 410nm. Foi desenvolvida uma curva padrão com diferentes concentrações de p-NP (µM), como forma de quantificar a atividade enzimática.

#### 8.4.5. Determinação do pH ótimo

A faixa de pH estudada foi de 5,0 a 11,0 com os seguintes tampões: Acetato de sódio (pH 5,0 a 6,0) [50mMol], tampão fosfato de potássio (pH 6,0 a 7,0), tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0 a 8,5) e tampão fosfato de sódio (pH 8,5 a 11,0) [50mMol]. A Tabela 20 mostra o *mix de reação* e o sistema de incubação. Após 30 minutos, a reação foi paralisada por choque térmico a 0°C por cinco minutos.

**Tabela 22: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de pH ótimo.**

Reagentes	Volume (µL)
Tampão	700
p-NPP	250
Enzima	50
Tempo de reação	30 min.
Temperatura de reação	30°C

#### 8.4.6. Determinação da temperatura ótima

Para a determinação da temperatura ótima, os ensaios da atividade foram realizados com temperaturas variando de 10 a 80°C. Os ensaios foram realizados em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 com as concentrações dos reagentes no *mix de reação*, tempo de reação e pH descritas na Tabela 23. Após 30 minutos, a reação foi paralisada por choque térmico a 0°C por cinco minutos.

**Tabela 23: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de temperatura ótima.**

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
Tris HCl 0,1 M pH 8,0	700
p-NPP	250
Enzima	50
Tempo de reação	30 min.

#### **8.4.7. Influência de diferentes reagentes químicos na atividade da lipase purificada**

Foram adicionados ao meio reacional vários componentes com potencial inibidor ou promotor para a atividade da enzima (KCl; ZnSO<sub>4</sub>; FeSO<sub>4</sub>; CaCl<sub>2</sub>; MgCl<sub>2</sub>; CuSO<sub>4</sub> e EDTA) por 30 minutos em tampão Tris HCl 0,1 M pH 8,0 na concentração de 10mM. A Tabela 24 mostra as concentrações dos reagentes no *mix de reação*.

**Tabela 24: Mix de reação e sistema de incubação no experimento de inibidores.**

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
Tris HCl 0,1 M pH 8,0	600
p-NPP	250
Enzima	50
Inibidor (10mM)	100
Tempo de reação	30 min.

#### **8.4.8. Efeito da concentração de substrato**

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade enzimática foi realizado variando-se a concentração de p-NPP entre 0,5 mM e 5 mM. Para tentar descrever o comportamento cinético da lipase INPA P-798, os dados foram analisados segundo a equação de Michaelis-Menten  $\{V_o = V_{max} \cdot [S] / K_m + [S]\}$ .

## 8.5. Resultados e Discussão

### 8.5.1. Purificação

A Tabela 25 apresenta o resumo do processo de purificação, com os respectivos valores de concentração da proteína, atividade enzimática, atividade específica, nível de recuperação e fator de purificação.

**Tabela 25: Tabela de purificação**

Etapa	Proteína		Atividade Específica (U/ug)	Recuperação (%)	Fator de purificação
	total (mg.mL)	Atividade (U.mL)			
Sobrenadante	6.47	9406.7	1453.5	100%	1.0
HiTrap DEAE FF	3.84	8613.7	2242.0	92%	1.5
HIC HiTrap Fenil FF	3.04	8174.4	2691.3	87%	1.9
GF HiTrap Desalting	1.44	7266.3	5041.1	77%	3.5

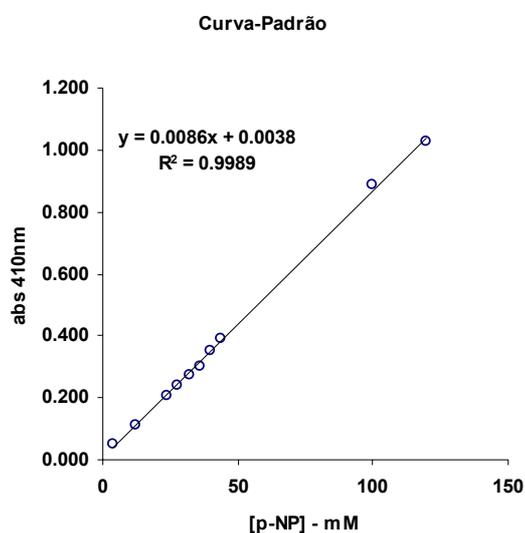
### 8.5.2. Caracterização enzimática

#### 8.5.2.1. Reta padrão

A Tabela 26 apresenta as respectivas concentrações de p-NP em milimolares (mM) e as respectivas leituras de absorbância no espectrofotômetro. Para cada concentração e a respectiva absorbância média, foi feito um gráfico de distribuição e a equação de regressão para a formatação da reta-padrão a ser aplicada nos experimentos a seguir (Figura 23).

**Tabela 26: Concentrações de para-nitrofenol (p-NP) e absorbância em 410nm**

[p-NP] $\mu$ M	rep 1	rep 2	rep 3	média
4	0,049	0,05	0,049	0,049
12	0,110	0,110	0,111	0,110
24	0,206	0,208	0,208	0,207
28	0,238	0,24	0,241	0,239
32	0,272	0,274	0,275	0,273
36	0,299	0,300	0,301	0,300
40	0,347	0,349	0,355	0,350
44	0,387	0,389	0,39	0,388
100	0,885	0,887	0,888	0,886
120	1,022	1,027	1,029	1,026



**Figura 23: Gráfico da curva-padrão para a concentração de p-nitrofenol (p-NP) em 410nm.**

A equação obtida pela reta padrão foi aplicada em todos os experimentos de caracterização enzimática para determinar a atividade da lipase sob as diferentes condições de pH, temperatura, concentração do substrato e inibidores/promotores. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi considerado bom e explica em 99,89% a atividade da enzima.

### 8.5.2.2. Determinação do pH ótimo

A Figura 24 mostra o comportamento da atividade da enzima nos diferentes valores de pH. Os resultados referentes à influência do pH na atividade da enzima indicam que a atividade ótima se concentra no pH 8,5. A enzima atua melhor sob condições alcalinas, visto que em valores de pH ácido (pH 5,0 e 6,0) sua atividade ficou bem abaixo quando comparada com o pH ótimo (pH 8,0). Acima do pH 10,0 a atividade enzimática foi drasticamente reduzida. Assim, determinou-se como ótimo o pH 8,5 para a atividade da lipase INPA P-798.

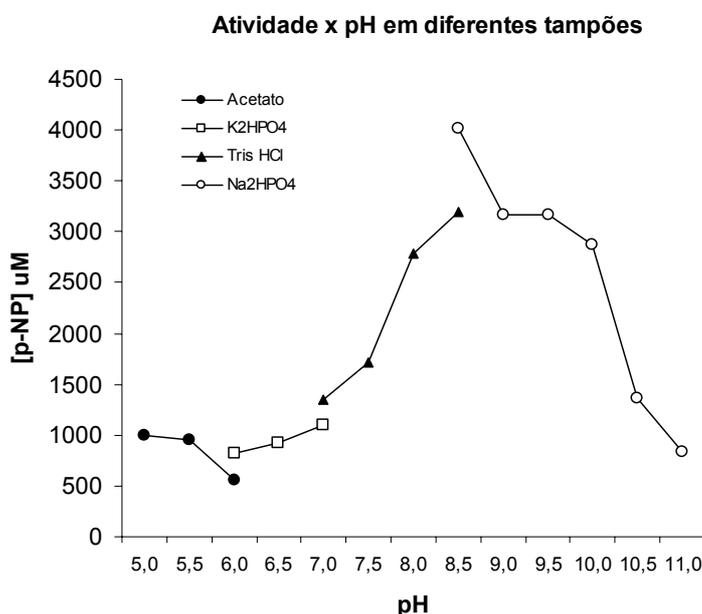
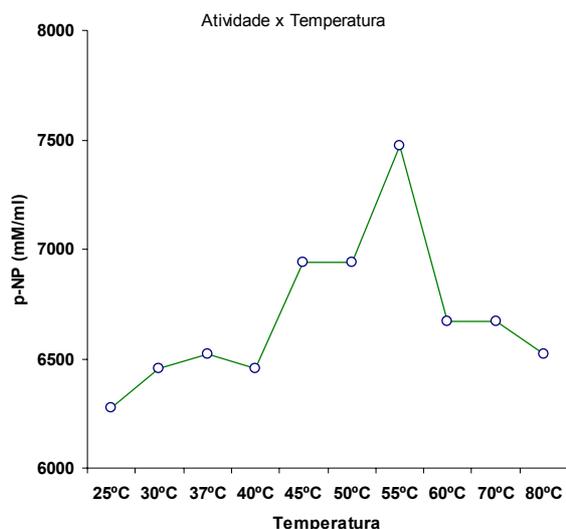


Figura 24: Efeito do pH na atividade da lipase INPA P-798 em diferentes tampões.

### 8.5.2.3. Determinação da temperatura ótima

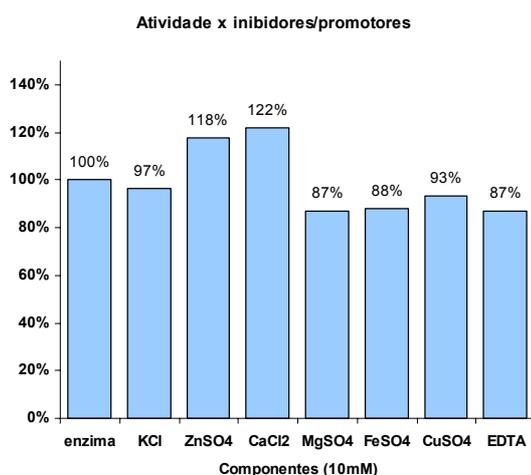
A temperatura atua sobre a velocidade da reação enzimática, tal como acontece com qualquer reação química. Todavia, no caso das enzimas, o efeito produzido é mais complexo devido à natureza protéica da enzima. O aumento da temperatura acima do valor ótimo afeta consideravelmente a estrutura terciária da enzima, bem como a estabilidade do complexo substrato-enzima. Em temperaturas superiores há uma rápida perda de atividade enzimática que resulta na desnaturação da proteína (Cabral et al., 2003). É exatamente o observado na Figura 25. A enzima teve testada sua atividade em temperaturas de 10°C (ambiente refrigerado), mas sua atividade foi nula. A partir de 25°C (temperatura ambiente) até 55°C a atividade foi aumentando até alcançar o seu ótimo. Acima de 55°C a atividade diminuiu consideravelmente. Portanto, a lipase INPA P-798 apresentou a melhor atividade a 55°C.



**Figura 25: Determinação da temperatura ótima para a atividade da lipase INPA P-798.**

#### 8.5.2.4. Efeito de inibidores e promotores

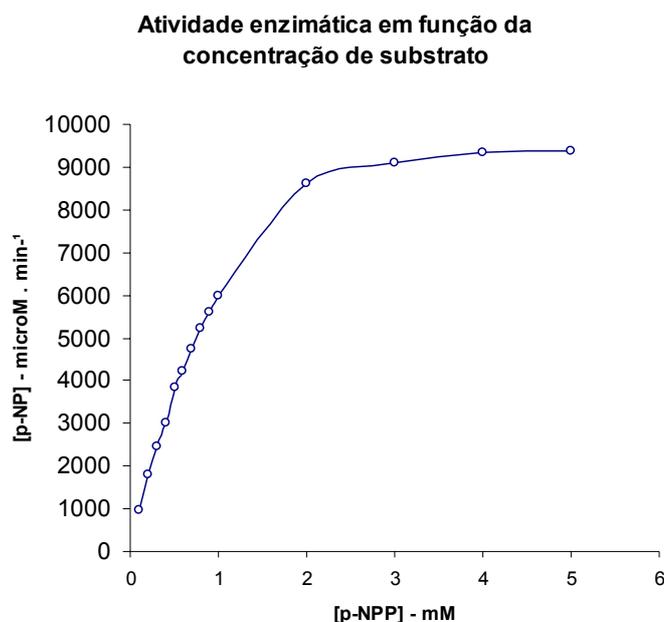
Conforme a Figura 26 é possível notar entre os reagentes testados, que o  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{ZnSO}_4$  promoveram o aumento da atividade em 22% e 18%, respectivamente, quando comparados com a testemunha e o  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  e EDTA foram os maiores inibidores, reduzindo a atividade entre 12 e 13%.



**Figura 26: Atividade da lipase INPA P-798 sob influências de diferentes reagentes químicos promotores e inibidores**

### 8.5.2.5. Efeito da concentração de substrato

A Figura 27 mostra a velocidade inicial ( $V_0$ ) da formação do produto [p-NP] sob diferentes concentrações iniciais do substrato [p-NPP] na reação enzimática. A atividade da enzima corresponde à formação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto nas condições de ensaio.



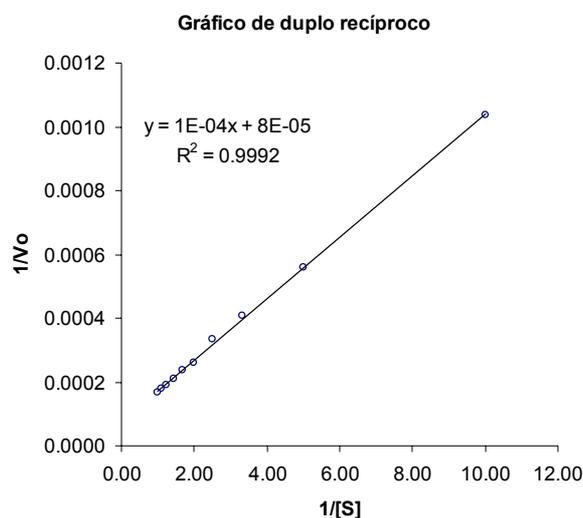
**Figura 27: Relação entre a atividade da enzima e concentração do substrato**

A velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ) é obtida quando todas as moléculas da enzima estiverem na forma do complexo enzima-substrato [ES] e a concentração de enzima livre é praticamente desprezível. Isto é, a enzima fica “saturada” pelo substrato e a velocidade da reação não aumenta mais com o aumento do substrato. A partir dessa constatação, o modelo Michaelis-Menten pode ser aplicado para a determinação da cinética enzimática (Cabral et al., 2003).

### 8.5.2.6. Medição da Atividade Enzimática: $K_m$ e $V_{\text{máx}}$ .

Aplicando os valores invertidos da Figura 27, obtém-se o gráfico de duplo recíproco ou do Método de Lineweaver-Burk (Figura 28). A aplicação desse método ocorre pela inversão dos valores de [S] e velocidade inicial ( $V_0$ ) para a determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ ), que determina a formação de produto e a velocidade máxima de reação ( $V_{\text{máx}}$ ). Essas duas constantes expressam a afinidade da enzima pelo substrato. A constante  $K_m$  é equivalente à concentração do substrato na qual a velocidade inicial é metade da velocidade máxima ( $V_0 = \frac{1}{2} V_{\text{máx}}$ ). Quanto menor for o valor de  $K_m$ , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Toda enzima que segue um comportamento

hiperbólico na relação velocidade de reação e concentração de substrato, segue a cinética de Michaelis-Menten, e a partir da equação formada pelo gráfico de duplo recíproco, é possível calcular  $V_{max}$  e  $K_m$ . Conforme a Figura 24, a enzima em questão segue esse comportamento.



**Figura 28: Gráfico Duplo Recíproco**

Baseado nos valores apresentados no modelo proposto (Figura 28), foram calculados os valores de  $V_{max}$  e  $K_m$  da enzima lipase INPA P-798. Conforme os cálculos abaixo, os valores foram respectivamente  $V_{max} = 12500 \mu\text{M p-NP.mL}^{-1}$  e  $K_m = 1,125 \mu\text{M p-NP.min}^{-1}$ . O modelo proposto representa em 99,92% a atividade da enzima ( $R^2 = 0,9992$ ). O cálculo seguindo o Método de Lineweaver-Burk segue abaixo:

**Modelo:**

$$Y = 0,0001X + 0,00008$$

$$\left[ \frac{1}{V_o} \right] = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{V_o} = 0,0001 \times \frac{1}{[S]} + 0,00008$$

$$\frac{1}{V_{\max}} = 0,00008 \Rightarrow V_{\max} = 12500 \mu\text{M p-NP.mL}^{-1}$$

$$\frac{K_m}{V_{\max}} = 0,0001 \Rightarrow K_m = 0,0001 \times 12500$$

$$K_m = 1,125 \mu\text{M p-NP.min}^{-1}$$

Uma unidade de atividade enzimática alternativa é a constante catalítica (Kat), que representa em uma equação enzimática de primeira ordem, a conversão química do complexo [ES] em produto [P] e enzima livre [E] (Taipa & Gama, 2003). Isto é, a quantidade de enzima que converte um mole do substrato por segundo.

De acordo com esse conceito: 1 U = 0,01666 Kat ou 16,67 ηKat. Portanto:

$$Kat = \frac{Km}{60}$$

$$Kat = \frac{1,125}{60}$$

$$U = 18,75 \eta\text{Kat}\cdot\text{s}^{-1}$$

## 8.6. Conclusões

A enzima apresentou atividade ótima em pH 8,5 em tampão fosfato de sódio e a 55°C.

No experimento com inibidores e/ou promotores, o CaCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub> promoveram um aumento da atividade em 22% e 18%.

O MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> e EDTA foram os maiores inibidores, reduzindo a atividade em 13%. Nos ensaios com diferentes concentrações de substrato, a enzima apresentou um valor de V<sub>max</sub> = 12500 μM p-NP.mL<sup>-1</sup> e K<sub>m</sub> = 1,125 μM p-NP.min<sup>-1</sup>

## 8.7. Referências Bibliográficas

Alves, A.C.; Cardoso, J.J.F.; Almeida, M.A.P.; Melo, C.K.; Louzeiro, H.C.; Córdias, H.T.C. 2006. Reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. [www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Reaproveitamento01.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/producao/Reaproveitamento01.pdf) (acessado em 12/05/2006).

Amersham Bioscience, 2004. *Protein Purification – Handbook*. GEHealthcare, 99p.

Cabral, J.M.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. 2003. *Engenharia Enzimática*. Ed. Lidel, Lisboa, 250p.

Jiang, Z.; Wang, H.; Ma, Y.; Wei, D. 2006. Characterization of two novel lipase genes isolated directly from environmental sample. *Appl. Microbiol Biotechnol* 70:327-332.

Karadzic, I.; Masui, A.; Zivkovic, L.I.; Fujiwara, N. 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(2), 82-89.

Koblitz, M. G.B.; Pastore, G.M. 2004. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(2):287-292.

Kojima, Y.; Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96(3), 219-226.

Pastore, G.M. Costa, V.S.R.; Koblitz, M.G.B. 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 23(2):135-140, maio-ago. 2003.

Sharma, R.; Chisti Y.; Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19(2001) 627-662.

Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B. Davidson, W.S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52(2003) 1-18.

Sene, C.P; Marques , P.D.; Ferro, P.R.S.; Pinheiro, D.M.; Pastore, C.M. 2002. Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina. *Enzitec 2002*, Brasília. Livro de Resumo, p72-73.

Taipa, M.A; Gama, M. 2003. Estrutura e função das enzima. *In.* Cabral, J.M.S.; Aires-Barros, M.R.; Gama, M. 2003. *Engenharia enzimática*. Ed. Lidel. Lisboa, 13-66p.

Zaia, D.A.M.; Zaia, C.T.B.I.; Lichtig, J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova* 21(6);787-793.

## 9. Capítulo 5 : Identificação genética das bactérias selecionadas

### 9.1. Resumo

A homologia de DNA é a técnica molecular adotada como consenso para a determinação das espécies bacterianas, embora haja também técnicas bioquímicas e moleculares para a diferenciação de espécies, como o perfil lipídico das membranas citoplasmáticas. O objetivo desse capítulo é apresentar a identificação genética das bactérias selecionadas. A homologia entre seqüências de 16S rDNA, gene que codifica para o 16S rRNA, têm sido usadas para inferir relações filogenéticas, sendo esse o critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre espécies de bactérias. As lipases ocorrem amplamente na biosfera, sendo encontrada em bactérias, fungos e leveduras. Uma variedade de lipases de bactérias gram-positiva e gram-negativa tem sido purificada e caracterizada bioquimicamente, além de terem o seqüenciamento e clonagem dos respectivos genes. Assim, é de extrema importância a identificação das bactérias selecionadas, uma vez que, com posse dessa informação, é possível desenvolver *primers* específicos do gene da lipase. Quando se compara somente as seis bactérias selecionadas, quatro bactérias pertencem ao gênero *Burkholderia*, (INPA P-108; INPA P-799; INPA P-803 e INPA P-798), uma ao gênero *Klebsiella* (INPA P-106) e uma não foi possível identificá-la (INPA P-124). A bactéria (INPA P-798) selecionada com maior afinidade ao óleo de buriti é da espécie *Burkholderia cepacia*, uma clássica produtora de lipase.

**Palavras chave:** Lipase, *Burkholderia cepacia*, identificação genética, 16S rRNA

## Chapter 5: Genetic identification of the selected bacteria

### 9.2. Abstract

The DNA homology is the molecular technique adopted like consensus for the determination of the bacterial species, though there are also biochemical and molecular techniques for the differentiation of species, like the lipidic profile of the cytoplasmatic membranes. The objective of this work is to show the genetic identification of the selected bacteria. *Between* sequences of 16S rDNA, gene what it encodes for it 16S rRNA, they have been used to infer filogenetic relations, when the criterion is this most used to appreciate *between* sorts of bacteria. The lipases take place widely in the biosphere, when found in bacteria, fungus and yeasts. A variety of lipases of bacteria gram-positive and gram-negative it has been purified, characterized biochemically besides they have the sequence and cloning of the respective genes. So, there is of extreme importance the identification of the selected bacteria, as soon as, with possession of this information, it is possible to develop primers specific of the gene of the lipase. When one compares only six selected bacteria, four bacteria pertecem to the type *Burkholderia*, (INPA P-108; INPA P-799; INPA P-803 and INPA P-798), one to the type *Klebsiella* (INPA P-106) and one was not possible to identify it (INPA P-124). The bacterium (INPA P-798) selected with bigger affinity to the Buriti oil is *Burkholderia cepacia*, a classic producer of lipase.

**Key words:** Lipase, *Burkholderia cepacia*, genetic identification, 16S rRNA

### 9.3. Introdução

Muita atenção tem sido dispensada para a estimativa do número de espécies de microrganismos. Contudo, a respeito da enorme contribuição de procariotos (*Eubacteria* e *Archeobacteria*) para a biosfera, sua diversidade e importância têm sido muitas vezes subestimadas. Uma das razões para isto é que menos de 5000 espécies de procariotos foram descritas (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Esse número relativamente baixo é causado pelos problemas recorrentes do isolamento de microrganismos. Apenas 10% dos microrganismos encontrados no solo são cultiváveis em condições de laboratório (Peixoto *et al.*, 2002). Contudo, o isolamento de um microrganismo em cultura pura ainda é um indispensável requisito para o reconhecimento da espécie procariótica. Mesmo assim, há um grande potencial e uma diversidade desconhecida entre os microrganismos não cultiváveis (Bertilsson *et al.*, 2002).

A taxonomia é tida, modernamente, como sinônimo de sistemática e tradicionalmente dividida em três partes, segundo Pisa (2006):

- 1) Classificação: ordenação dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade entre eles.
- 2) Nomenclatura: rotulagem das unidades definidas na classificação.
- 3) Identificação dos organismos desconhecidos: determinações de quais pertencem às unidades genômicas e ecológicas pré-existentes.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que dividam 70% ou mais de hibridização DNA-DNA (Pisa, 2006). Uma espécie de bactéria é uma categoria que circunscreve um grupo de indivíduos (estirpes/isolados) coerentes, genomicamente, que dividam um alto grau de similaridade em muitos aspectos independentes, testados comparativamente sob condições padronizadas (Stackebrandt *et al.*, 2002). Análises de seqüências do gene que codifica para o 16S rRNA (16S rDNA) têm sido usadas para inferir relações filogenéticas, sendo esse o critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre espécies de bactérias: a homologia entre seqüências de 16S rRNA. Uma vantagem dessa abordagem é que seqüências de DNA e produtos gênicos podem ser comparados em um contexto evolucionário (sistemática molecular) (van Berkun *et al.*, 2000). Uma opinião estabelecida é que a evolução de alguns genes de bactérias processa-se numa taxa constante por mutação e seleção darwiniana e que a história evolutiva do gene de 16S rRNA aproxima-se da história evolutiva do genoma total, tornando-se dessa forma, aceitável reconstruir relações evolucionárias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de 16S rRNA (van Berkun *et al.*, 2000).

Embora haja outras técnicas para a diferenciação de espécies, bioquímicas e moleculares, como o perfil lipídico das membranas citoplasmáticas, a homologia de DNA é atualmente a abordagem adotada como consenso para estabelecer limites entre espécies bacterianas (Pisa, 2006).

As lipases ocorrem amplamente na biosfera, sendo encontrada em bactérias, fungos e leveduras (Wu *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004) e existe uma diversidade microbiana com atividade lipolítica registrada na literatura (Tabela 2). Uma variedade de lipases de bactérias gram-positiva e gram-negativa tem sido purificada, caracterizada bioquimicamente, além de terem o seqüenciamento e clonagem dos respectivos genes.

Assim, é de extrema importância a identificação das bactérias selecionadas, uma vez que, com posse dessa informação, é possível desenvolver *primers* (iniciadores) específicos do gene da lipase, pois há uma diversidade genética de gênero para gênero, às vezes, entre espécies.

O objetivo desse capítulo é apresentar a identificação genética das bactérias selecionadas.

## **9.4. Material e Métodos**

### **9.4.1. Seleção das bactérias**

No Capítulo 1 foram selecionadas as 24 bactérias com melhor produção de lipase na fase qualitativa, que então foram utilizadas no processo de identificação com a utilização de oligonucleotídeos específicos para genes ribossômicos - rRNA 16S.

### **9.4.2. Extração de DNA genômico total**

O protocolo de extração de DNA se baseou no descrito em Sambrook *et al.* (1989) para a extração do DNA genômico. Após incubação em meio mínimo sob agitação (72h x 30°C), foi obtida uma alíquota da cultura (1 mL) e realizou-se uma centrifugação por 6 minutos a 12000g com posterior descarte do sobrenadante. Em seguida, procedeu-se a ressuspensão do material precipitado com 500 µL de TE (Tris a 50 mM, pH 8,0 e EDTA-Na2 a 20 mM, pH 8,0) e adição de 60 µL de SDS mais lisozima (5 mg.mL<sup>-1</sup>). Após uma homogeneização por 10 minutos, adicionou-se 200 µL de fenol e 300 µL de clorofórmio para purificar o DNA. Novamente, outra homogeneização do tubo ocorreu por 10 minutos, seguida por uma centrifugação durante 10 minutos a 12.000 g. Do material centrifugado, transferiu-se o sobrenadante para posterior precipitação do DNA, utilizando 750 µL de álcool isopropílico com 50 µL de NaCl 5M, colocando-se em repouso por 1 hora a 4°C. Em seguida, ocorreu a centrifugação sob refrigeração por 12 minutos a 12.000 g, descartando o sobrenadante com 200 µL de etanol a 70%. Após esse passo, o material foi posto para secar e em seguida adicionou-se 50µL de água milliQ®, armazenando em seguida na refrigeração por 24h, para posteriormente ser

armazenado em freezer (-20°C). Para a detecção da pureza e concentração do DNA, aplicou-se 5 µL da amostra de DNA em eletroforese em gel de agarose de 8 cm x 10 cm a 1,5% agarose com posterior coloração com brometo de etídio.

A Tabela 27 apresenta o mix de reação para a amplificação do gene 16S rDNA executado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador marca Eppendorf, modelo Mastercycler Gradient. A Tabela 28 apresenta a programação utilizada na reação de PCR no equipamento citado. A diversidade genética foi avaliada por meio do seqüenciamento das regiões de 16S (Primer 1: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e (Primer 2: 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). Após a PCR, produto da reação foi purificado com o kit GFX PCR (Invitrogen) e seqüenciado em aparelho MEGABACE na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

**Tabela 27: Mix de reação para o protocolo de amplificação do gene 16S rDNA**

Reagente	Volume (µL)
Tampão	5,00
MgCl <sub>2</sub>	2,00
dNTP	2,50
Primer 1	1,00
Primer 2	1,00
Taq	0,25
H <sub>2</sub> O	33,25
Total	45,00

Volume de DNA: 5 µL

Volume de Mix: 45µL

Volume de reação: 50µL

**Tabela 28: Programação da reação de amplificação do gene 16S r DNA.**

Amplificação gene 16S		
Passos	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
1	94°	0:03:00
2	94°	0:00:30
3	60°	0:00:30
4	72°	0:02:00
5	Repetição passo 2 até 4 (30 vezes)	
6	72°	0:10:00
7	10°	0:10:00

Após a extração, o DNA foi submetido ao seqüenciamento e com posterior análise da seqüência no banco de dados BLAST a partir de regiões conservadas em seqüências depositadas nos bancos de dados genéticos internacionais do National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 9.5. Resultados e Discussão

A Tabela 29 apresenta a identificação genética para o grupo de 24 bactérias selecionadas no Capítulo 1. Infelizmente, para as bactérias INPA P-146; INPA P-124; INPA P-112 e INPA P-348 não foi possível a identificação completa (em espécie) devido à falta de qualidade da leitura do DNA por parte do sequenciador de DNA. As bactérias que estão em negrito (INPA P-124, INPA P-108, INPA P-799, INPA P-803, INPA P-798 e INPA P-106) foram as selecionadas no Capítulo 3, quando da afinidade pelo óleo de buriti, sendo que a bactéria INPA P-798 foi a que apresentou os melhores resultados na hidrólise do óleo.

Das seis bactérias selecionadas na fase final do trabalho, quatro são do gênero *Burkholderia*, notadamente um importante gênero produtor de lipase (Jaeger *et al.*, 1994; Rosselló-Mora & Amann, 2001; Saxena *et al.*, 2003; Coenye & Vandamme, 2003; Liu *et al.*, 2006). Um isolado bacteriano (INPA P-124) não está identificado com um grau de confiabilidade adequado. Mesmo assim, apresentou o gênero *Burkholderia*, o mesmo das outras quatro bactérias selecionadas (INPA P-108, INPA P-799, INPA P-803, INPA P-798). A bactéria INPA P-106 foi identificada como da espécie *Klebsiella variicola*.

O gênero *Burkholderia* contém mais de 30 espécies e foi criado em 1992 por Yabuuchi e colaboradores (Coenye & Vandamme, 2003) para acomodar um grupo de bactérias diferenciadas

pelo rRNA a partir de *Pseudomonas*, excluindo *P. picketti* e *P. solanacearum* que foram transferidas para o gênero *Ralstonia*.

O complexo *Burkholderia cepacia* envolve além dessa espécie, mais nove (*B. multivorans*; *B. cenocepacia*; *B. stabilis*; *B. vietnamiensis*; *B. dolosa*; *B. ambifaria*; *B. anthina*; *B. pyrrocinia*; *B. ubonensis*) e ocupa um lugar de destaque em diversos nichos ecológicos, variando desde solos contaminados, rizosferas de plantas, água doce e salgada, até o trato respiratório humano. Essas espécies têm sido exploradas para várias possibilidades de aplicação, incluindo controle biológico de fitopatógenos, biorremediação de recalcitrantes xenobióticos, promotores de crescimento vegetal e produtores de enzimas (Liu *et al.*, 2006). Infelizmente, há nesse complexo representantes patógenos ao homem (Coenye & Vandamme, 2003). No entanto, a bactéria selecionada nessa tese advém de rizosfera de plantas, sendo caracterizadas inicialmente como produtoras de fosfatase na coleção do INPA, contribuindo para o crescimento das plantas.

Quanto ao gênero *Klebsiella*, embora seja reconhecidamente um patógeno humano, a sua distribuição ocorre em água, solo e em plantas (Martinez *et al.*, 2004). Esse não é um gênero que se destaca na produção de lipase, mas no presente trabalho, apresentou afinidade ao óleo de buriti.

**Tabela 29: Lista com identificação das bactérias selecionadas.**

<b>Isolado</b>	<b>Acesso</b>	<b>Local</b>	<b>Cultura hospedeira</b>	<b>Família Botânica</b>	<b>Identificação (16S rRNA)</b>	<b>Identidade</b>
1	INPA P - 146	RPE	Graviola	Anonaceae	<i>Burkholderia sp</i>	
2	INPA P - 784	Urucu	Mata-pasto	Leguminosa	<i>Burkholderia cepacia</i>	94%
3	INPA P - 697	Urucu	Mucuna	Leguminosa	<i>Burkholderia cepacia</i>	98%
4	INPA P - 632	Reca	Pupunha	Arecaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	97%
5	INPA P - 616	Reca	Pupunha	Arecaceae	<i>Pseudomonas fluorescensn 2R37</i>	96%
6	INPA P - 613	Reca	Pupunha	Arecaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	95%
7	INPA P - 691	Urucu	Stilosantho	Leguminosae	<i>Pseudomonas fluorescens 2R37</i>	97%
<b>8</b>	<b>INPA P - 124</b>	<b>RPE</b>	<b>Pupunha</b>	<b>Arecaceae</b>	<b><i>Burkholderia SP</i></b>	
9	INPA P - 112	RPE	Abacate	Lauraceae	?	
<b>10</b>	<b>INPA P - 108</b>	<b>RPE</b>	<b>Graviola</b>	<b>Anonaceae</b>	<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>100%</b>
11	INPA P - 493	RPE	Coco	Arecaceae	<i>Burkholderia cepacia</i>	97%
<b>12</b>	<b>INPA P - 799</b>	<b>Urucu</b>	<b>M. Pasto</b>	<b>Leguminosae</b>	<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>98%</b>
13	INPA P - 348	AM	Macaxeira	Euphorbiaceae	?	
14	INPA P - 478	RPE	Coco	Arecaceae	<i>Klebsiella sp. Y45</i>	97%
15	INPA P - 423	RPE	Biribá	Anonaceae	<i>Enterobacter aerogenes m9</i>	97%
<b>16</b>	<b>INPA P - 803</b>	<b>Urucu</b>	<b>Visgueiro</b>	<b>Leguminosae</b>	<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>99%</b>
<b>17</b>	<b>INPA P - 798</b>	<b>Urucu</b>	<b>M. Pasto</b>	<b>Leguminosae</b>	<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<b>99%</b>
18	INPA P - 093	RPE	Abiu	Sapotaceae	<i>Klebsiella pneumoniae mcp11d</i>	90%
19	INPA P - 082	RPE	Laranja	Rutaceae	<i>Raoultella terrigena KNUC166</i>	98%
20	INPA P - 117	RPE	Abacate	Lauraceae	<i>Klebsiella variicola</i>	97%
21	INPA P - 540	RPE	Goiaba	Myrtaceae	<i>Klebsiella sp. P4</i>	99%
<b>22</b>	<b>INPA P - 106</b>	<b>RPE</b>	<b>Graviola</b>	<b>Anonaceae</b>	<b><i>Klebsiella variicola</i></b>	<b>98%</b>
23	INPA P - 392	RPE	Café	Rubiaceae	<i>Klebsiella sp. A3 16S</i>	98%
24	INPA P - 593	Reca	Pupunha	Arecaceae	<i>YNUCC0237</i>	98%

## 9.6. Conclusões

As bactérias foram obtidas de amostras de rizosfera de nove famílias botânicas diferentes sendo que de plantas de palmeiras (Arecaceae), foram obtidos 7 isolados (30%), seis bactérias (25%) foram obtidas a partir das raízes de leguminosas e 4 bactérias de Anonaceae. As demais, ficaram distribuídas em Lauraceae, com duas bactérias, e Euphorbiaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Rutaceae e Sapotaceae com uma bactéria cada.

Cinco das seis bactérias selecionadas pertencem ao gênero *Burkholderia* [isolado 10 (INPA P-108); isolado 12 (INPA P-799); isolado 16 (INPA P-803) e isolado (INPA P-798)], sendo que o isolado 8 (INPA P-124) não foi possível identificá-lo ao nível de espécie. E um isolado foi classificado como pertencente ao gênero *Klebsiella* (isolado 22, INPA P-106). Do ponto de vista de hospedeiros, da onde foram isoladas a partir da rizosfera, três delas são de Leguminosae (INPA P-799, INPA P-803, INPA P-798), duas delas são de Anonaceae (INPA P-108 e INPA P-106) e uma de Arecaceae (INPA P-124).

Nota-se que há uma distribuição das bactérias produtoras de lipase independente da família botânica com a qual a bactéria se associa por protocooperação, não sugerindo uma associação específica entre bactérias produtoras de lipase e uma planta hospedeira específica. A bactéria selecionada é da espécie *Burkholderia cepacia*, uma clássica produtora de lipase.

## 9.7. Referência Bibliográficas

- Bertilsson, S.; Cavanaugh, C.M.; Polz, M.F. 2002. Sequencing-Independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec. 2000, 6077-6086.
- Carvalho, P.O.; Campos, P.R.B.; Noffs, M.D.; Oliveira, J.G.; Shimizu, M.T.; Silva, D.M. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26(1), 75-80.
- Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* vol 27, nº 1, 146-156.
- Coenye, T.; Vandamme, P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* 5(9), 719-729.
- Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Heuvel, M.; Misset, O. 1994. Bacterial lipases, *FEMS Microbiology Reviews* (15):29-63.

Martinez, J.; Martinez, L.; Rosenblueth, M.; Silva, J.; Martinez-Romero, E. 2004. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *klebsiella*. *International Microbiology* (2204) 7: 261-268.

Peixoto, R.S.; Coutinho, H.L.C.; Runjanek, N.G.; Macrae, A.; Rosado, A.S. 2002. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 316-320.

Pisa, G. 2006. Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 112p.

Rosselló-Mora, R. Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25(2001), 36-67.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B. Davidson, W.S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52(2003) 1-18.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Truper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. E Whitman, W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. 52, 1043–1047.

Sharma, R.; Chisti Y.; Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19(2001) 627-662.

Van Berkun, P.; Fuhrmann, J. J.; Eardly, B.D. Phylogeny of Rhizobia. In: Pedrosa, F.O.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8.

Wu, X.; Jaaskelainen, S.; Linko, Y., 1996. An investigation of crude lipase for hydrolysis, esterification and transesterification. *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 226-231.

## 10. Conclusão Geral

- Dos 440 isolados bacterianos destacados para os testes de lipase, 75 bactérias apresentaram atividade para lipase e destas, 24 bactérias foram selecionadas para os testes quantitativos de lipase e de afinidade ao óleo de buriti.
- Os isolados com os melhores resultados na fase quantitativa não foram aqueles que apresentaram os melhores resultados na fase qualitativa. Talvez, diferenças físicas nas duas condições podem influenciar a liberação da lipase extracelular. Ou mesmo entre os isolados, pode haver isoformas da enzima que se diferenciam no peso molecular e que pode induzir a uma dificuldade na migração extracelular em meio de cultura sólido, mas que, em meio líquido de cultura, esta dificuldade deixa de existir. Nota-se que para alguns isolados a lipase apresentou alta afinidade com o óleo, para outros, a afinidade foi melhor com o paranitrofenol palmitato (p-NPP).
- A partir dos ensaios qualitativos em meio de cultura contendo óleo de buriti como substrato, foi possível selecionar seis isolados bacterianos para os testes quantitativos (INPA P-106; INPA P-108; INPA P-124; INPA P-798; INPA P-803 e INPA P-799) No entanto, para estes ensaios, não houve diferenças significativas entre os isolados e todos os seis foram selecionados para os testes de hidrólise enzimática do óleo de buriti.
- Durante a fase de hidrólise enzimática, a bactéria INPA P-798 apresentou a maior afinidade ao óleo de buriti e o seu rendimento da hidrólise com a enzima precipitada foi superior ao do extrato bruto da bactéria e da sua lipase purificada.
- A faixa de pH em que apresentou o melhor resultado foi entre 6 e 9. No entanto, conforme aumenta o tempo de reação de hidrólise, acima de 3 horas, a atividade alcança um ótimo entre pH 6,5 a 8,5.
- A enzima purificada atividade ótima a 55°C em pH 8,5. No experimento com inibidores e/ou promotores, o CaCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub> promoveram o aumento da atividade em 22% e 18%, respectivamente. O MgSO<sub>4</sub> foi o maior inibidor, reduzindo a atividade em 13%.
- Nos ensaios com diferentes concentrações de substrato, a enzima obteve um valor de  $V_{max} = 12500 \mu\text{M p-NP}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $K_m = 1,125 \mu\text{M p-NP}\cdot\text{min}^{-1}$ .
- Das seis bactérias selecionadas, quatro pertencem ao gênero *Burkholderia*, uma ao gênero *Klebsiella* e uma não foi possível identificá-la.

- Do ponto de vista de hospedeiros, da onde foram isoladas estas bactérias a partir da rizosfera, três delas foram isoladas de rizosfera Leguminosas, duas isoladas de rizosfera de Anonaceae e uma de Arecaceae (INPA P-124). Não há uma distribuição das bactérias produtoras de lipase dependente da família botânica, não sugerindo uma associação específica entre bactérias produtoras de lipase e uma planta hospedeira específica.
- A bactéria selecionada é da espécie *Burkholderia cepacia* , uma clássica produtora de lipase.

## 11.Perspectivas

- Como continuidade da linha de pesquisa, há uma perspectiva de otimização dos processos de hidrólise do óleo de buriti, buscando uma melhoria na eficiência da enzima.
- Testes de hidrólise incluindo diferentes óleos amazônicos com as enzimas selecionadas deverão ocorrer procurando afinidade a outros substratos.
- Para as técnicas enzimáticas, será desenvolvido protocolo de imobilização das referidas enzimas, o que poderá potencializar a ação da lipase na aplicação.
- Também haverá a detecção molecular do gene para lipase nas respectivas bactérias selecionadas visando o processo de clonagem e melhoramento da enzima.
- Aplicação industrial dos componentes do óleo, tais como ácido oléico e b-caroteno em produtos de cosméticos, farmacêuticos e alimentícios.
- Desenvolvimento de um processo de patente com relação ao gene da enzima e o processo de biotransformação do óleo.