

Caracterização parcial do extrato bruto e pré-purificado de Lipase de *Yarrowia lipolytica*

Tamires Carvalho dos Santos¹, Priscilla Vanessa Finotelli² e Priscilla Filomena Fonseca Amaral¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Engenharia Bioquímica
CEP 21941–909 Rio de Janeiro – RJ - E-mail: tcsantos@ufrj.br

²Universidade Federal do Rio de Janeiro –Departamento de Produtos Naturais e Alimentos
21941-590 Rio de Janeiro – RJ

RESUMO

As lipases são serina hidrolases definidas como triacilglicerol acilhidrolases que catalisam naturalmente a hidrólise da ligação éster de tri-, di- e mono -gliceróis de ácidos graxos de cadeia longa em ácidos graxos e glicerol. Em condições termodinamicamente favoráveis, esses biocatalisadores são capazes de catalisar reações de síntese, tais como esterificação ou transesterificação de grande interesse industrial. A produção da lipase realizada em biorreator de bancada de 3 L gerou, após 24 h de cultivo, um extrato enzimático bruto (EEB) com atividade hidrolítica de 61,4 U/mL e atividade proteolítica foi de 0,175 U/mL, com a purificação o a atividade enzimática da lipase foi reduzida para 43,29 U/mL, já para a protease a atividade foi reduzida, quantificada a 0,035 U/mL. Com a caracterização parcial é possível estabelecer, que a enzima apresenta grande possibilidade de inserção industrial tanto em seu estado bruto quanto no purificado.

Palavras-chave: biorreator, temperatura ótima, pH ótimo.

INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas em seu ambiente natural. Estas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (ZAREVUCKA et al., 1995). Elas representam um grupo de biocatalisadores acessíveis, que em geral, são flexíveis quanto à sua especificidade. São as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico (BREUER et al., 2004).

Além disso, as lipases usualmente atuam sobre substratos não naturais. A maioria dos custos de produção para um produto biológico simples reside na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de se estabelecer técnicas de biosseparação eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. Neste estudo, foi realizada a produção de lipase extracelular da levedura *Yarrowia lipolytica* e caracterização e purificação parcial da enzima em relação à força iônica e temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo utilizado

A levedura empregada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram conservadas a 4°C após 24 horas

de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD ("Yeast Extract, Peptone, Dextrose") contendo (em m/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 2% (AMARAL, 2007).

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 2.1) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em Erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 29°C, 160 rpm, as células foram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo, servindo de inóculo dos experimentos descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, $1,0 \pm 0,1$ mg p.s.cél/mL nos meios de cultivo (AMARAL, 2007).

Processo fermentativo para obtenção da enzima

A produção de lipase ocorreu em reator Microferm de New Brunswick MF-114, com volume efetivo para de 3 litros, em condições anteriormente otimizadas por Amaral (2007). A fermentação foi conduzida com, agitadores tipo Rushton, aeração a $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, com agitação mecânica, velocidade de agitação 650 rpm e temperatura mantida a 28°C. Após o período ótimo reacional (24 h), o meio foi coletado e centrifugado a temperatura ambiente durante 10 min a 2016 g. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático, uma vez que a *Yarrowia lipolytica* produz lipase extracelular (KORDEL et al., 1991).

Métodos analíticos

A atividade lipolítica foi determinada por titulação dos ácidos graxos gerados na reação de hidrólise do óleo de oliva segundo a metodologia descrita por Macedo e colaboradores (1997), utilizando uma emulsão contendo 5mL de azeite de oliva e goma arábica a 7%, 2mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (10mM) e 1mL de extrato enzimático. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto.

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um kit enzimático para medida colorimétrica de glicose (HUMAN GmbH - Germany®). O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro (SHIMADZU – UV-2450) a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco. A medida de atividade de protease foi realizada segundo PINTO (1998). Para determinar o efeito da massa molar do tampão a atividade lipolítica (força iônica) do extrato bruto variando-se o pH do meio à concentração do tampão fosfato pH 7 (10mM e 100mM). O efeito da temperatura na atividade da enzima foi avaliado variando a temperatura reacional de 20 a 100 °C, já o efeito do pH foi avaliado na faixa de 3 a 9, segundo Santos et al. (2013).

Purificação parcial

Para a purificação parcial do extrato bruto enzimático, foram adicionados 4% (m/v) de caulim industrial, com homogeneização de 3 minutos em agitador tipo vortex. Após 15min de repouso, em temperatura ambiente, foi filtrado em papel filtro Whatman nº1, a vácuo. As proteínas do filtrado foram concentradas com 3 vezes o valor do volume inicial de acetona a frio, centrifugadas a 4000 g e o precipitado ressuspensão em 10% do volume inicial de filtrado (GOULART et al., 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a cinética de consumo de glicose e de crescimento celular durante a produção de lipase. No crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo glicose como fonte de carbono, foi observado um decaimento na concentração de glicose ao decorrer do tempo, até sua exaustão em menos de 24 h. O crescimento celular (ΔX) em 24 h foi de 12 mg de cél/mL e a taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ) foi $0,1 \text{ h}^{-1}$. Ao fim do processo (24 horas) a

atividade da lipase (atividade hidrolítica sobre p-nitrofenillaurato – p-NFL) do extrato bruto livre de células atingiu 61,4 U/mL e a quantidade de proteína solúvel foi 0,315 mg/mL. No mesmo extrato foi quantificada a atividade de 0,175 U/mL de protease. Com a purificação parcial realizada com acetona e caulim a atividade final da lipase do extrato concentrado foi de 43,29 U/mL, com 0,431 mg/ml de proteína solúvel e protease quantificada a 0,035 U/mL. O fator de purificação (F.P.) foi de apenas 0,5. Porém, como vantagem observou-se que houve redução da atividade de protease, condição relevante para maior estabilidade da enzima de interesse.

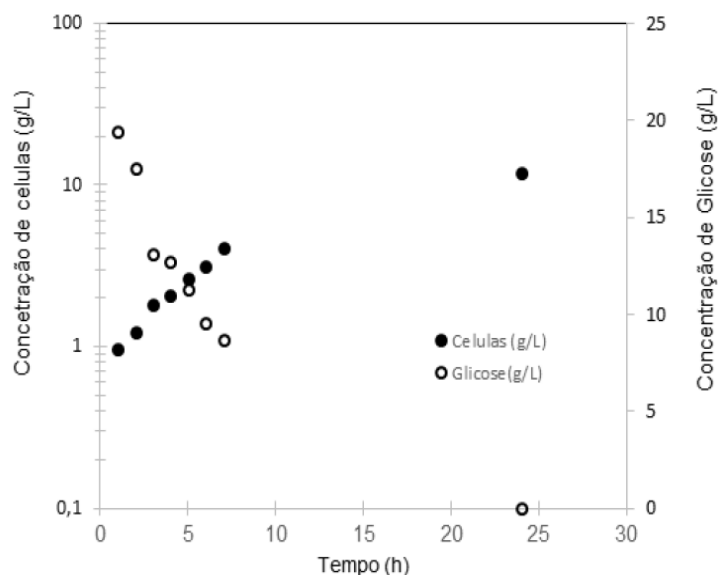


Figura 1: Cinética de crescimento celular e consumo de glicose para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* em biorreator.

A figura 2 apresenta a influência da força iônica do meio, obtida com diferentes massas molares de tampão fosfato em pH 7, na atividade da hidrolítica do extrato enzimático bruto em p-NFL. Neste ensaio foi possível observar que as melhores atividades de hidrólise do p-NFL, está numa faixa compreendida entre 40 e 60mM. A medida de atividade de lipase é realizada em usualmente com tampão fosfato 50mM (AMARAL, 2007). Portanto, o resultado obtido no presente trabalho está de acordo com a literatura. Com base nisso, a massa molar do tampão fosfato escolhida para os demais ensaios foi 50mM.

Na figura 3 são apresentados os ensaios relativos à temperatura e pH ótimos do EEB e do extrato purificado de lipase em relação à hidrólise do óleo de oliva. Observa-se perfis similares para os dois extratos, mostrando que a purificação não causou alterações significativas na enzima. A figura 3a mostra que a temperatura ideal do EEB está próxima a 37 °C, porém a enzima manteve uma atividade considerável a 40 e 50°C com a atividade relativa quantificada em 96 e 82% respectivamente, o que pode indicar que a enzima apresenta tolerância a temperaturas mais elevadas. Para o extrato purificado, a atividade ótima encontra-se em uma faixa ligeiramente inferior (20 a 30°C), mas apresenta também atividade relativa elevada à 50°C. Na figura 3b é possível observar que a atividade da enzimática foi máxima entre os pHs 5 a 7, tanto para o EEB como para o extrato purificado, o que favorece o seu melhor desempenho em uma faixa próxima a neutralidade.

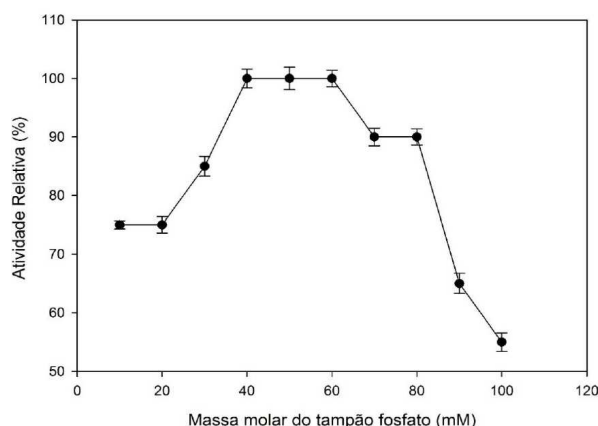


Figura 2: Influência da força iônica do meio reacional na atividade hidrolítica do extrato enzimático bruto em p-nitrofenil-laurato.

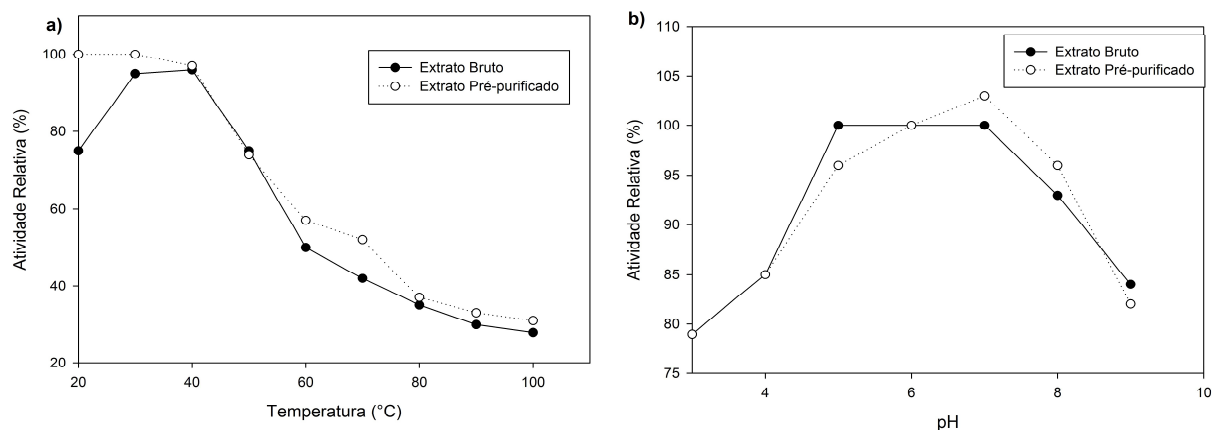


Figura 3: Caracterização parcial do extrato bruto e purificado parcialmente da lipase: a) temperatura ótima; b) pH ótimo.

CONCLUSÕES

A produção da lipase por *Yarrowia lipolytica* em biorreator de 3 L apresentou resultados de atividade elevados, comparáveis com o que a literatura reporta. O extrato bruto livre de células e sua forma purificada parcialmente, apresentam uma abrangente faixa de pH e temperatura.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico**. 2007. 220 p. 29,7 cm. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2007.
- BREUER, M., DITRICH, K., HABICHER, T., HAUER, B., KESSELER, M., STURMER, R., ZELINSKI, T. **Industrial methods for the production of optically active intermediates**. Angewandte Chemie International Edition, v. 43, n. 7, pg.788-824, 2004.
- HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Applied and Environmental Microbiology, v. 41, n.1, p. 173–178, 1981.
- ZAREVUCKA, M.; ZALSKA, Z.; REJZEK, M.; STREINZ, L.; WIMMER, Z.; MACKOVA, M.; DEMNEROVA, K. **Lipase- mediated hydrolysis and esterification**. Enzyme Microbiology Technology, v. 17, n. 10, pg.866-869, 1995.
- SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; MACHADO, F. P. P.; BONOMO, R. C. F.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; FRANCO, M. **Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the purple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue**. Food Science and Biotechnology, v. 22, p. 1-7, 2013.

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br