



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Influência da Composição do Meio de Cultivo na Produção de Lipase por *Yarrowia lipolytica* Silvestre

Thalles Canton Trevisol¹, Kelly da Silva Degani de Oliveira¹, Michele Putti Paludo¹ e Janáina Fernandes de Medeiros Burkert¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474– CEP 96.203-900 Rio Grande – RS - E-mail: michepaludo@gmail.com

RESUMO

*As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, sendo responsáveis por realizar a catálise da conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo-água. Estes biocatalisadores apresentam inúmeras aplicações industriais e biotecnológicas. Apesar disso, o alto custo de produção torna-se um fator limitante para o uso das mesmas. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* através da técnica de planejamento experimental determinando os componentes do meio de cultivo e suas concentrações que influenciam no processo da fermentação submersa. O extrato de levedura e o sulfato de magnésio são as variáveis que exercem os efeitos mais pronunciados sob a atividade lipolítica e de esterificação.*

Palavras-chave: atividade lipolítica, esterificação, lipase, planejamento fracionário, produção.

INTRODUÇÃO

As lipases (EC. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos livres na interface óleo-água, além de reações de transesterificação e de síntese de ésteres com propriedades enantiosseletivas (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; TREICHEL et al., 2010). Estes biocatalisadores são usados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosméticos, química fina, detergentes, couro e tratamento de águas residuais (ROMDHANE et al., 2010). Devido à grande aplicabilidade, as lipases são consideradas o terceiro grupo de enzimas mais empregadas, estando atrás das proteases e carboidrases (BASHEER et al., 2011). As lipases de origem microbiana são as enzimas mais utilizadas em processos biotecnológicos e de química fina (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012), fato associado à ampla estabilidade de pH e temperatura, seletividade e especificidade pelo substrato, facilidade de manipulação genética e maior produção em tempos menores (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Muitos micro-organismos lipolíticos têm sido identificados e usados em processos industriais. Dentre outros bioprodutos produzidos pela levedura *Yarrowia lipolytica* a enzima lipase é um dos mais importantes, possibilitando a degradação de substratos hidrofóbicos como n-alcanos, ácidos graxos, gorduras e óleos por esta enzima. Adicionalmente, esta levedura é considerada pela FDA (Food & Drug Administration) um micro-organismo "GRAS" (generally regard as safe) (COELHO; AMARAL; BELO, 2010). Apesar das inúmeras aplicações, o elevado custo de produção das lipases torna-se um fator limitante, e neste sentido, a realização de pesquisas que utilizem micro-organismos isolados de novos ambientes e avaliando a composição do meio de cultivo são importantes. Diante do exposto, o estudo tem como objetivo do estudo foi avaliar o efeito da concentração



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

dos componentes do meio de produção da lipase obtida por *Yarrowia lipolytica* em cultivo submerso, através da técnica de planejamento experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

A levedura *Yarrowia lipolytica* foi isolada de resíduos oleosos industriais de pescado provenientes da cidade de Rio Grande (Rio Grande do Sul, Brasil) e identificada a partir de técnicas de biologia molecular. Para o preparo do inóculo primeiramente foi realizado o estriamento em ágar inclinado GYMP (BUSSAMARA et al., 2010) incubado a 30°C/96h. Após, acrescentou-se 5 mL do meio de cultivo aos tubos (5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 0,1% sulfato de magnésio, 0,1% de nitrato de sódio e 1% de óleo de oliva), os quais foram incubados por mais 24h. A seguir, transferiu-se para erlenmeyers contendo 45 mL do meio de cultivo de produção a ser estudado segundo o planejamento experimental fracionário 2^{5-1} com 4 pontos centrais (Tabela 1), sendo mantidos sob agitação de 150 rpm, a 30°C e 48h (GOLDBECK; MAUGERI FILHO, 2013). Amostras foram retiradas a cada 12h (0, 12, 24, 36 e 48h) a fim de verificar a atividade lipolítica (FREIRE et al., 1997) e a atividade de esterificação foi avaliada através da reação de síntese do ácido oléico e etanol na razão molar 1:1 (mistura padrão) ao término do cultivo (48h) (LANGONE et al., 2002). Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando o software *Statistica 5,0 (Stat Soft, EUA)* ao nível de 10% de significância ($p < 0,10$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos das diferentes variáveis concentração de peptona (2 a 8%), de extrato de levedura (0,1 a 0,5%), $MgSO_4$ (0 a 0,2%), $NaNO_3$ (0 a 0,2%) e óleo de oliva (0,5 a 1,5%) foram investigados empregando o planejamento experimental fracionário 2^{5-1} , conforme a matriz apresentada na Tabela 1. Verifica-se que a máxima atividade lipolítica foi obtida no ensaio 1 alcançando-se $5,23 \text{ U.mL}^{-1}$ em 36h de cultivo, seguida dos ensaios 9 ($5,12 \text{ U.mL}^{-1}$) e 15 ($4,32 \text{ U.mL}^{-1}$). Em relação à atividade de esterificação, os ensaios 14 e 15 foram os que apresentaram os maiores resultados, $133,19 \text{ U.g}^{-1}$ e $105,22 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente.

A estimativa dos efeitos, erro padrão, parâmetros t e p para as respostas estudadas estão apresentadas na Tabela 2. Para a atividade lipolítica foi possível notar que o incremento das concentrações nas variáveis peptona, extrato de levedura, $MgSO_4$ e óleo de oliva foram significativos ($p < 0,1$) e negativos, uma vez que diminuíram a atividade lipolítica em 0,89, 0,88, 1,18 e $1,07 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. Já o aumento na concentração do $NaNO_3$ não exerceu efeito significativo sobre a atividade lipolítica ($p > 0,1$). Efeito similar foi observado com o incremento na concentração de extrato de levedura, diminuindo significativamente $22,1 \text{ U.g}^{-1}$ a atividade de esterificação da enzima. Porém, o aumento de 0 para 0,2 % na concentração de $MgSO_4$ e $NaNO_3$ foram significativos, e promoveram um incremento na atividade de esterificação de $22,1 \text{ U.g}^{-1}$ e $21,3 \text{ U.g}^{-1}$, respectivamente. O aumento nas demais variáveis não influenciou significativamente nessa atividade.

Os resultados do planejamento revelaram que as variáveis extrato de levedura e $MgSO_4$ foram as que exerceram os efeitos mais pronunciados sob as atividades enzimáticas avaliadas. A presença dos íons Mg^{+2} e de extrato de levedura também foram estudadas por outros autores na produção de lipase (KUMARI; VERMA; GUPTA, 2012; LOMTHAISONG; BURANAROM; NIAMSUP, 2012; PARK et al., 2013), corroborando com os nossos resultados.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental fracionário 2^{5-1} valores codificados (reais) e máxima atividade lipolítica e atividade de esterificação.

Ensaio	Pep.	Ext. lev.	MgSO ₄	NaNO ₃	Óleo	AL	AE
1	-1 (2)	-1 (0,1)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (1,5)	5,23	32,92
2	+1 (8)	-1 (0,1)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0,5)	3,92	74,65
3	-1 (2)	+1 (0,5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0,5)	2,12	18,53
4	+1 (8)	+1 (0,5)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (1,5)	1,06	66,44
5	-1 (2)	-1 (0,1)	+1 (0,2)	-1 (0)	-1 (0,5)	2,24	51,08
6	+1 (8)	-1 (0,1)	+1 (0,2)	-1 (0)	+1 (1,5)	1,28	52,58
7	-1 (2)	+1 (0,5)	+1 (0,2)	-1 (0)	+1 (1,5)	1,52	11,17
8	+1 (8)	+1 (0,5)	+1 (0,2)	-1 (0)	-1 (0,5)	1,8	11,37
9	-1 (2)	-1 (0,1)	-1 (0)	+1 (0,2)	-1 (0,5)	5,12	19,74
10	+1 (8)	-1 (0,1)	-1 (0)	+1 (0,2)	+1 (1,5)	2,61	42,65
11	-1 (2)	+1 (0,5)	-1 (0)	+1 (0,2)	+1 (1,5)	1,03	24,58
12	+1 (8)	+1 (0,5)	-1 (0)	+1 (0,2)	-1 (0,5)	2,45	36,04
13	-1 (2)	-1 (0,1)	+1 (0,2)	+1 (0,2)	+1 (1,5)	0,83	86,22
14	+1 (8)	-1 (0,1)	+1 (0,2)	+1 (0,2)	-1 (0,5)	1,14	133,19
15	-1 (2)	+1 (0,5)	+1 (0,2)	+1 (0,2)	-1 (0,5)	4,32	105,22
16	+1 (8)	+1 (0,5)	+1 (0,2)	+1 (0,2)	+1 (1,5)	0,97	42,24
17	0 (5)	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (1)	1,91	37,1
18	0 (5)	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (1)	2,99	67,51
19	0 (5)	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (1)	2,35	50,8
20	0 (5)	0 (0,3)	0 (0,1)	0 (0,1)	0 (1)	2,56	57,08

Pep. – peptona (%); Ext. lev. – extrato de levedura (%); MgSO₄ – sulfato de magnésio (%); NaNO₃ – nitrato de sódio (%); óleo – óleo de oliva (%); AL – atividade lipolítica (U.mL⁻¹); AE – atividade de esterificação (U.g⁻¹)

Tabela 2: Estimativa dos efeitos, desvio-padrão, p e t para a atividade lipolítica e de esterificação do planejamento experimental 2^{5-1} .

*Variáveis	Atividade lipolítica				Atividade de esterificação			
	Efeito	DP	t(3)	P	Efeito	DP	t(3)	P
Média ^{Ω n}	2,375	0,100	23,621	0,000	51,055	2,843	17,955	0,000
Peptona ^Ω	-0,897	0,224	-3,996	0,028	13,711	6,358	2,157	0,120
Ext. lev. ^{Ω n}	-0,887	0,224	-3,952	0,029	-22,179	6,358	-3,488	0,040
MgSO ₄ ^{Ω n}	-1,180	0,224	-5,254	0,013	22,189	6,358	3,490	0,040
NaNO ₃ ⁿ	-0,087	0,224	-0,390	0,723	21,394	6,358	3,365	0,044
Óleo ^Ω	-1,072	0,224	-4,775	0,017	-11,390	6,358	-1,789	0,171

*nível de confiança 90%; DP- desvio-padrão; Ext. lev. – extrato de levedura; Óleo- óleo de oliva; Ω variáveis significativas para AL; n variáveis significativas para AE

Assim, em sequência do estudo visando uma otimização com um incremento da atividade lipolítica, e em função do efeito negativo, a faixa de concentração da peptona e extrato de levedura devem ser diminuídas, o MgSO₄ e NaNO₃ podem ser eliminados do meio de produção



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

uma vez que já foram estudados no nível -1 (0%) e o óleo de oliva pode ser fixado em 0,5%, mesmo tendo apresentado efeito negativo, pois ele atua como indutor na produção da enzima.

CONCLUSÕES

Portanto, a partir dos resultados dos efeitos do planejamento fracionário foi definido a retirada do $MgSO_4$ e $NaNO_3$ do meio de produção, a concentração do óleo de oliva foi mantida fixa em 0,5% e a faixa de concentração da peptona e extrato de levedura diminuída para minimização de custos. Neste trabalho os máximos para atividade lipolítica foram de 5,23 U.mL⁻¹ e 133,19 U.g⁻¹ para a esterificação.

Agências de Fomento: Capes, CNPq, FAPERGS.

REFERÊNCIAS

- BASHEER, S.M.; CHELLAPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K.K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**. v. 28, n. 6, p. 627-638, 2011.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRÍA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 268-275, 2010.
- COELHO, M. A. Z.; AMARAL, P. F. F.; BELO, I. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. v. 2, p. 930-940, 2010.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA Jr, G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a batch-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.63 - 65, p. 409-421, 1997.
- GOLDBECK, R.; MAUGERI FILHO, F.; Screening, characterization and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. **Food Science Biotechnology**. v. 22, p. 79-87, 2013.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial Technology**. v. 39, p. 235-251, 2006.
- KUMARI, A.; VERMA, V. V.; GUPTA, R. Comparative biochemical characterization and *in silico* analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 from *Yarrowia lipolytica*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 3103-3111, 2012.
- LANGONE, M. A.; ABREU, M. E.; REZENDE, M. J.; SANT'ANNA Jr, G. L. Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 98-100, p. 987-996, 2002.
- LOMTHAISONG, K.; BURANAROM, A.; NIAMSUP, H. Investigation of Isolated Lipase Producing Bacteria From Oil-contaminated Soil with Proteomic Analysis of its Proteins Responsive to Lipase Inducer. **Journal of Biological Sciences**. v. 12, n. 3, p. 161-167, 2012.
- PARK, S-Y.; KIM, J-Y.; BAE, J-H.; KIM, H-R. Optimization of Culture Conditions for Production of a Novel Cold-Active Lipase from *Pichia lynnferdii* NRRL Y-7723. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p. 882-886, 2013.
- ROMDHANE, I. B-B.; FENDRI, A.; GARGOURI, Y.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophiles* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**. v. 53, n. 1, p. 112-120, 2010.
- SINGH, A.K.; MUKHOPADHYAY, M. **Overview of Fungal Lipase: A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 3, p. 486-520, 2012.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**. v. 3, p. 182 – 196, 2010.