



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

### Avaliação de Diferentes Meios de Cultivo para Produção de Lipase Microbiana

**Thalles Canton Trevisol<sup>1</sup>, Kelly da Silva Degani de Oliveira<sup>1</sup>, Michele Putti Paludo<sup>1</sup> e Janaína Fernandes de Medeiros Burkert<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade 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 microbianas se destacam pela a maior estabilidade e especificidade quando comparadas às de origem vegetal e animal. A seleção de novos micro-organismos, com características desejáveis a diversos processos tecnológicos, compreende uma promissora perspectiva científica e comercial. O objetivo do estudo foi selecionar o meio de cultivo mais promissor para a produção da lipase de *Yarrowia lipolytica*, utilizando seis meios com distinta composição. Os cultivos foram mantidos a temperatura de 30 °C por 48 h e agitação de 150 rpm, determinado-se as atividades lipolíticas e de esterificação. O meio de cultivo mais promissor para a produção de lipase foi o meio 5 (alcançando as maiores atividades lipolítica (3,70 U.mL<sup>-1</sup>) e de esterificação (51,63 U.g<sup>-1</sup>) em 24 h de fermentação.*

**Palavras-chave:** cultivo submerso, atividade lipolítica, atividade de esterificação.

#### INTRODUÇÃO

A utilização de diferentes tipos de enzimas nas indústrias se deve a uma demanda por processos tecnológicos mais eficientes, com elevado rendimento e sem causar danos ao meio ambiente. As lipases de origem microbiana destacam-se por serem aplicadas em alimentos, cosméticos, detergentes, síntese de ésteres, produção de lipídios com níveis elevados de ácidos graxos insaturados e na obtenção de biodiesel (COLLA et al., 2014).

As lipases são hidrolases (E.C.3.1.1.3) que atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. Lipases microbianas são consideradas versáteis (SETH et al., 2014), devido ao fato de apresentarem elevado rendimento de conversão do substrato em produto, elevada adaptação às condições ambientais e capacidade de realizar reações de catálise em condições extremas de temperatura, pH e solventes orgânicos com quimio-, regio- e enantioseletividade (NAGAR; DWIVEDI; SHRIVASTAVA, 2013; SHARMA; KANWAR, 2014).

Sendo assim, dada a importância de estudar a produção de lipase provenientes de novas fontes de isolamento para posterior aplicação, o objetivo do trabalho foi selecionar o meio de cultivo mais promissor para a produção da lipase de *Yarrowia lipolytica*, utilizando seis meios com distinta composição.

#### 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. Primeiramente foi realizado o estriamento em ágar inclinado GYMP (BUSSAMARA et al., 2010) e incubado a 30 °C/96 h. Após, acrescentou-se 5 mL do meio de cultivo aos tubos, os quais foram incubados por mais 24 h. A seguir, transferiu-se para erlenmeyers contendo 45 mL de meio de cultivo, sendo mantidos sob agitação de 150 rpm, a 30°C e 48 h (GOLDBECK; MAUGERI FILHO, 2013). A cada 12 h verificou-se a atividade lipolítica, a partir da titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997). A atividade de esterificação, por sua vez, foi realizada no tempo 48 h de fermentação através da reação de síntese de ácido oleico e etanol na razão molar 1:1 (mistura padrão) (LANGONE et al., 2002). A massa celular seca foi determinada pelo método gravimétrico (CELINSKA; GRAJEK, 2013). Para os cultivos submersos foram utilizados os seguintes meios (p/v): Meio 1 (0,2 % glicose; 0,5 % peptona; 0,01 %  $MgSO_4$ ; 0,1 %  $K_2HPO_4$ ; 2 % óleo de soja) (BUSSAMARA et al., 2010), Meio 2 (5 % peptona; 1 % óleo de soja; 0,1 %  $MgSO_4$ ; 0,1 %  $NaNO_3$ ; pH 7,0) (MALDONADO et al., 2012), Meio 3 (1 % óleo de soja; 0,2 % extrato de levedura; 0,05 %  $KH_2PO_4$ ; 0,05 %  $K_2HPO_4$ ; 0,05 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,01 %  $CaCl_2$ ; 0,01 %  $NaCl$ ; pH 6,0) (MAFAKHER et al., 2010), Meio 4 (0,5 % extrato de levedura; 1 %  $KH_2PO_4$ ; 0,1 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1 % óleo de oliva; pH 6,8) (RAMESH et al., 2014), Meio 5 (0,5 % glicose; 0,3 % extrato de levedura; 0,4 % peptona; 0,2 %  $K_2HPO_4$ ; 0,1 %  $NaCl$ ; 0,06 %  $FeSO_4$ ; 0,04 %  $MgSO_4$ ; 0,01 %  $KCl$ ; 0,08 %  $NH_4Cl$ ; 1 % óleo de oliva) (HASAN- BEIKDASHTI et al., 2012) e Meio 6 (5 % peptona; 0,3 % extrato de levedura; 0,1 %  $MgSO_4$ ; 0,1 %  $NaNO_3$ ; 1 % óleo de oliva; pH 6,0) (GOLDBECK; MAUGERI FILHO, 2013). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente ( $p < 0,05$ ) através da análise de variância e teste de Tukey, utilizando o software *Statistica 5,0* (Stat Soft, EUA).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados dos parâmetros avaliados na seleção dos seis meios de cultivo estudados.

No estudo da produção de lipase observou-se que as maiores atividades lipolíticas foram alcançadas para os Meios 1 ( $4,47 \text{ U.mL}^{-1}$ ) e 5 ( $3,70 \text{ U.mL}^{-1}$ ), não existindo diferenças significativas entre as suas médias. Além da atividade lipolítica, o Meio 5 também possui a atividade de esterificação mais elevada, alcançando  $51,63 \text{ U.g}^{-1}$ , fato que contribui para o emprego das lipases nas reações de esterificação na síntese de bioaromas. Destaca-se que em ambos os meios a máxima atividade foi obtida em 24 h de cultivo, fato que colaborou com as maiores produtividades lipolítica e de massa seca.

O Meio 1 e o Meio 5 são compostos por diferentes nutrientes, tendo em comum a presença de glicose e peptona. Ainda, comparando-se a composição dos meios descritos verifica-se que o Meio 5 é formado por mais sais do que o Meio 1, contendo  $K_2HPO_4$ ,  $NaCl$ ,  $FeSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $KCl$  e  $NH_4Cl$ . Outra diferença entre a composição dos meios está no indutor utilizado, o qual para o Meio 1 foi usado óleo de soja e para o 5 foi azeite de oliva. Assim, como as lipases são enzimas de caráter indutivo, a escolha do indutor ideal é um dos critérios que determina a produtividade do biocatalisador. As matérias primas utilizadas como indutores para a produção de lipases são geralmente óleos, sendo o principal o azeite de oliva, devido a sua grande proporção de trioléina, substrato ideal para muitas lipases (CONTESINI et al., 2010).

## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

### 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Tabela 1: Máxima atividade lipolítica, tempo, produtividade na máxima atividade lipolítica, massa seca, produtividade de massa seca e atividade de esterificação da lipase.

Meio	AL (U.mL <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (h)	Prod. Lip. (U.mL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Massa seca (g.L <sup>-1</sup> )	Prod. MS (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	AE (U.g <sup>-1</sup> )
1	4,47±0,16 <sup>a</sup>	24	0,19±0,01 <sup>a</sup>	5,80±1,12 <sup>a</sup>	0,24±0,05 <sup>a,c</sup>	41,61±0,9 <sup>abc</sup>
2	1,20±0,21 <sup>c</sup>	12	0,10±0,02 <sup>b</sup>	2,04±0,06 <sup>b</sup>	0,17±0,005 <sup>c</sup>	47,25±3,79 <sup>ab</sup>
3	1,05±0,19 <sup>c</sup>	36	0,03±0,01 <sup>c</sup>	2,87±0,07 <sup>b</sup>	0,08±0,002 <sup>b</sup>	39,74±1,71 <sup>bc</sup>
4	0,87±0,18 <sup>c</sup>	24	0,04±0,01 <sup>c</sup>	7,45±0,37 <sup>a</sup>	0,31±0,02 <sup>a</sup>	34,90±3,92 <sup>c</sup>
5	3,70±0,54 <sup>a</sup>	24	0,15±0,02 <sup>a</sup>	6,81±0,57 <sup>a</sup>	0,28±0,02 <sup>a</sup>	51,63 ±5,91 <sup>a</sup>
6	2,23±0,33 <sup>b</sup>	12	0,20±0,19 <sup>a</sup>	0,93±0,09 <sup>b</sup>	0,08±0,02 <sup>b</sup>	21,61 ±4,60 <sup>d</sup>

AL – Atividade Lipolítica; Prod. Lip. – Produtividade Lipolítica; Prod. MS – Produtividade em massa seca; AE – Atividade de Esterificação. Média±desvio-padrão. Letras subscritas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias (p<0,05).

Hasan-Beikdashti et al. (2012) trabalharam com o Meio 5 para otimização da produção de lipase pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* e obtiveram 4459 U.mL<sup>-1</sup>, utilizando a p-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato. Já Bussamara et al. (2012), também avaliaram a atividade da enzima pelo método espectrofotométrico e alcançou 610,40 U.L<sup>-1</sup> para *Pseudozyma hubeiensis* HB85A, em meio contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de gordura bovina. No trabalho de Goldbeck e Maugeri (2013), que isolou o micro-organismo *Metschnikowia pulcherrima* de biomas brasileiros, a máxima atividade lipolítica foi 4,77 U.mL<sup>-1</sup> em 24 h de cultivo, sendo quase duas vezes maior que a obtida neste estudo (2,23 U.mL<sup>-1</sup>), em 12 h para o mesmo meio de produção. Maldonado et al. (2012), otimizou a produção de *Geotrichum candidum* em meio contendo 3,0 % de peptona e 0,5 % de óleo de soja, alcançando 16 U.mL<sup>-1</sup>. Ramesh et al. (2014) no cultivo de *Bacillus sp.* (SRBIT-05) isolado de resíduos de óleo obtiveram 8,76 U.mL<sup>-1</sup>, em 36h. As atividades e produtividades lipolíticas alcançadas neste trabalho previamente a uma otimização do meio de produção são promissoras, uma vez que estão na mesma faixa relatada para alguns trabalhos na literatura utilizando diferentes micro-organismos, meios de produção e condições de processo.

### CONCLUSÕES

O meio de cultivo mais promissor para a produção de lipase a partir da levedura *Yarrowia lipolytica* por fermentação submersa, foi o Meio 5 (0,5 % glicose; 0,3 % extrato de levedura; 0,4 % peptona; 0,2 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 % NaCl; 0,06 % FeSO<sub>4</sub>; 0,04 % MgSO<sub>4</sub>; 0,01 % KCl; 0,08 % NH<sub>4</sub>Cl; 1 % óleo de oliva) alcançando as maiores atividades lipolítica (3,70 U.mL<sup>-1</sup>) e de esterificação (51,63 U.g<sup>-1</sup>) em 24 h de cultivo.

**Agências de Fomento:** Capes, CNPq e Fapergs.

### REFERÊNCIAS

- 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.
- CELINSKA, E.; GRAJEK, W. A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 1-16, 2013.
- COLLA, L. M.; FICANHA, A. M. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, p. 1-9, 2014.
- CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus sp.* lipases: potential biocatalyst for industrial use. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163, 2010.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BOM, E. P. S.; LIPPEL, SANT'ANNA, G. 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-BEIKDASHTI, M.; FOROOTANFAR, H.; SAFIARIAN, M.S.; AMERI, A.; GHAHREMANI, M.H.; KHOSHAYAND, M.R.; FARAMARZI, M.A. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.43, p. 670-677, 2012.
- LANGONE M.A., DE 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.
- MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnology*, v. 27, p. 337-340, 2010.
- MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A. MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Evaluation production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 147-151, 2012.
- NAGAR, M.; DWIVEDI, S. K.; SHRIVASTAVA, D. A review on industrial application in microbial lipases. *International journal of pharmaceutical & research sciences*, v.2, n.4, p.631-641, 2013.
- RAMESH, S., KUMAR, R.; DEVI, R.A.; BALAKRISHNAN, K. Isolation of a lipase producing bacteria for enzyme synthesis in shake flask cultivation. **Internacional Journal Current Microbiology Applied Science**, v. 3, p. 712-719, 2014.
- SETH, S. et al. An insight into plant lipase research-challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v.95, p.13-21, 2014.
- SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, p. 15, 2014.