



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

DALLECYO CERQUEIRA LOPES

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DA LIPASE PRODUZIDA POR *Yarrowia divulgata***

PALMAS –TO

2019

DALLECYO CERQUEIRA LOPES

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DA LIPASE PRODUZIDA POR *Yarrowia divulgata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Agroenergia.

Orientador (a): Dra. Solange Cristina Carreiro
Coorientador: Thiago Lucas de Abreu Lima

PALMAS – TO
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

L864o Lopes, Dallecyo Cerqueira.
 Otimização das condições de cultivo e caracterização parcial da lipase produzida por *Yarrowia divulgata*. / Dallecyo Cerqueira Lopes. – Palmas, TO, 2019.

87 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2019.

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

Coorientador: Thiago Lucas de Abreu Lima

1. Lipase. 2. Estabilidade a íons. 3. Surfactantes. 4. Óleo residual. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO
PARCIAL DA LIPASE PRODUZIDA POR *Yarrowia divulgata*

ALUNO: Dallecyo Cerqueira Lopes

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:

Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro (UFT)

Examinadores:

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida (UFT)

Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (UFT)

Data da Defesa: 02/04/2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da
Dissertação foram contempladas:

Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro (UFT)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que em sua infinita bondade conduziu-me durante todo o trabalho realizado, ensinando-me sabiamente a ter calma nos momentos de tribulação, paciência nos momentos de angústia e aflição, para que Nele esperemos e encontremos a paz e a felicidade em seus ensinamentos.

Ao Valdemar Lopes da Silva, meu pai, que sempre me apoiou em minhas decisões e me deu força para que continuasse sempre perseverante em minhas escolhas e com seus ensinamentos e sabias palavras de motivação e conforto diante de todas as tribulações.

À Maria Luiza Cerqueira, minha mãe, que durante essa caminhada sempre demonstrou o mais infinito amor, apoio e ensinamento. Esteve sempre presente em minha vida, fazendo dos momentos mais difíceis os mais doces e confortantes.

À Valeria Cerqueira Lopes, minha irmã, pelo carinho, paciência e pela ajuda em diversos momentos dessa caminhada.

À Mayara Soares Cunha, minha namorada, que durante toda essa caminhada esteve ao meu lado sempre presente me acolhendo em seus braços nos momentos de maior fragilidade, me dando força e motivando com suas palavras.

À Prof^o. Dra. Solange Cristina Carreiro pela orientação, auxílio, confiança, dedicação, apoio, amizade e carinho durante todos estes anos de convivência.

A Prof^o. Dra. Paula Benevides de Moraes por ceder a linhagem de *Yarrowia divulgata* para esse estudo.

Ao Prof^o. Dr. Alex Fernando de Almeida pela dedicação, disponibilidade, amizade e ensinamento durante todo o trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Emerson Adriano Guarda pela disponibilidade, ajuda com reagentes e ensinamento durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Thiago Lucas de Abreu Lima pela ajuda com o biorreator e a coorientação no desenvolvimento do trabalho.

A Mayra Ferreira Netto Teixeira, doutoranda, pelo apoio e ajuda com o biorreator e com as dúvidas sobre os procedimentos de análise.

A Ariadna Bandeira, técnica de laboratório, pelo auxílio, ajuda, e pelas conversas nas horas vagas.

Aos colegas de mestrado por todos esses anos de convivência, pela força, ajuda, amizade e união nessa caminhada.

A Maria Gabriela Barros Freire, graduanda, pela ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA), por proporcionar a execução de todo o trabalho e por fornecer os materiais e equipamentos para que o trabalho fosse produzido.

Ao programa de Pós-Graduação em Agroenergia, por abrir as portas e acolher de forma carinhosa durante todos esses anos, proporcionando aprendizado e senso crítico nas mais

diversas áreas de atuação. Formando um profissional competente e com sabedoria a aplicação de todo o conhecimento.

À Profª. Dra. Flavia Lucila Tonani Siqueira, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Agroenergia, pela dedicação, ajuda, ensinamento e amizade. Por se doar de corpo e alma para que o programa sempre alcance a excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

**A todos
os meus sinceros agradecimentos**

RESUMO

Lipases são classificadas como hidrolases e apresentam função de catalisar reações de hidrólise total ou parcial de triglicéridos em diacilglicéridos, monoglicéridos e liberando ácidos graxos livres e glicerol em uma interface óleo-água. Estas enzimas são obtidas através do cultivo sólido ou em cultivo submerso. A fermentação submersa é utilizada na produção de enzimas em virtude das vantagens de operação mais eficiente em relação a pH, temperatura, taxa de oxigênio, relação carbono nitrogênio. No presente estudo objetivou-se estudar as melhores condições de cultivo submerso para a produção de lipase a 30°C e 150 rpm durante 48 h de cultivo pela levedura *Yarrowia divulgata*, utilizando-se experimentos fatoriais (DCCR) para se avaliar o efeito das variáveis, concentração de óleo e pH, utilizando óleo de oliva e óleo de soja residual como fontes de carbono. A produção de lipase foi comparada nos 2 óleos e a melhor condição encontrada foi utilizada para a avaliação da produção da lipase em biorreator de bancada a 28°C durante 72h de cultivo com variação da agitação entre 200 e 400 rpm. Foi avaliada também a influência da adição de surfactantes e emulsificantes (Tween 20, lecitina de soja e goma xantana) na produção da lipase. A lipase produzida foi caracterizada quanto a atividade e estabilidade em diferentes temperaturas, pH, íons metálicos e quanto ao efeito de solventes e surfactante na atividade enzimática. Os resultados obtidos no DCCR (2²) indicam que, entre as fontes de carbono testadas, o óleo de oliva proporcionou maior produção, com atividade de 67,0 U.mL⁻¹ em pH 5.3 e 9,97 g.L⁻¹ de óleo. Utilizando óleo de soja residual a produção de lipase foi de 36,0 U.mL⁻¹ em pH 5.0 e 16,22 g.L⁻¹ de óleo. Na comparação entre os dois óleos, a atividade foi maior em óleo de oliva (57,0 U.mL⁻¹) em comparação ao óleo de soja residual (30,8 U.mL⁻¹). Os ensaios em biorreator de bancada utilizando óleo de oliva como fonte de carbono apresentaram resultados mais expressivos de atividade lipolítica em agitação de 300 rpm (2,939 U.mL⁻¹) e a maior contagem celular (2,56x10⁹ células.mL⁻¹) foi obtida em 400 rpm, após 48h de cultivo. Os ensaios a 200 rpm apresentaram menor atividade e menor acúmulo de células durante 72h de cultivo. O EEB apresentou estabilidade em faixa de pH 3.0 a 8.0, com atividade lipolítica acima de 50% e de pH 3.0 a 6.0 com atividade residual próxima dos 100%. O íon Mn²⁺ foi o único responsável por proporcionar ativação do EEB nas concentrações de 5mM e 10mM e os íons Mg²⁺, Zn²⁺ e Ca²⁺ apresentaram efeito de ativação do EEB apenas em concentração de 5mM. Os surfactantes influenciaram de forma negativa na atividade lipolítica, com exceção do Triton X-100 (1%). Os solventes orgânicos apresentaram ativação da lipase apenas em 1% e o DMSO apresentou influência positiva em 1% e 10%.

Palavras-Chave: óleos, lipase, íons, surfactantes, estabilidade.

ABSTRACT

Lipases are classified as hydrolases and have the function of catalyzing reactions of total or partial hydrolysis of triglycerones in diacylglycerols, monoglycerols and liberating free fatty acids and glycerol in an oil-water interface. These enzymes are obtained through solid culture or in submerged culture. The submerged fermentation is used in the production of enzymes due to the advantages of more efficient operation in relation to pH, temperature, oxygen ratio, carbon /nitrogen ratio. The objective of this work was to study the best conditions of submerged culture for the production of lipase at 30 °C and 150 rpm for 48 h of culture by yeast *Yarrowia divulgata*, using factorial experiments (DCCR) to evaluate the effect of the variables, oil concentration and pH, using olive oil and residual soybean oil as carbon sources. Lipase production was compared in the 2 oils and the best condition found was used for evaluation of lipase production in bench bioreactor at 28 °C for 72 h of culture with stirring variation between 200 and 400 rpm. The influence of the addition of surfactants and emulsifiers (Tween 20, soy lecithin and xanthan gum) on lipase production was also evaluated. The lipase produced was characterized as the activity and stability at different temperatures, pH, metal ions and the effect of solvents and surfactant on the enzymatic activity. The results obtained in the DCCR (2²) indicate that, among the carbon sources tested, olive oil provided higher production, with activity of 67.0 U.mL⁻¹ at pH5.3 and 9.97 g.L⁻¹ of oil. Using residual soybean oil the lipase production was 36.0 U.mL⁻¹ at pH 5.0 and 16.22 g.L⁻¹ oil. In the comparison between the two oils, the activity was higher in olive oil (57.0 U.mL⁻¹) compared to residual soybean oil (30.8 U.mL⁻¹). The assays in bench-top bioreactor using olive oil as carbon source showed more expressive results of 300 rpm (2.939 U.mL⁻¹) agitated lipolytic activity and the highest cell count (2.56x10⁹ cells.mL⁻¹) was obtained at 400 rpm, after 48 h of culture. The assays at 200 rpm showed less activity and less accumulation of cells during 72h of culture. EEB showed stability in the range of pH 3.0 to 8.0, with lipolytic activity above 50% and pH 3.0 to 6.0 with residual activity close to 100%. The Mn²⁺ ion was the only one responsible for providing EEB activation at concentrations of 5mM and 10mM, and the Mg²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ ions presented in EEB activation effect only at 5mM concentration. Surfactants negatively influenced lipolytic activity, with the exception of Triton X-100 (1%). The organic solvents presented activation of the lipase only in 1% and DMSO had a positive influence in 1% and 10%.

Keywords: oils, lipase, ions, surfactants, stability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 A mudança da morfologia do gênero *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. pode ser observado a partir do crescimento das células em diferentes meios, **(a)** Meio contendo 5% de extrato de malte - MEA (malt extract agar) por 7 dias a 25°C. Bar, 10 μ m. **(b)** Cultivo em meio CMA (corn meal agar) por 7 dias a 25°C. Bar, 10 μ m. (NAGY et al, 2013)..... 22

Figura 2 Tipos de inibição reversível. **(a)** Inibidores competitivos [I] se ligam ao sítio ativo da enzima. K_I é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a enzima [E]. **(b)** Inibidores não-competitivos ligam-se em sítios distintos, mas podem se ligar apenas ao complexo [ES]. K_I' é a constante de equilíbrio para a ligação [ES]. **(c)** Inibidores mistos ligam-se a sítios diferentes, mas podem se ligar tanto a [E] quanto a ao complexo [ES] (Adaptado de LEHNINGER et al, 2014)..... 28

Figura 3 Hidrólise sequencial de um triacilglicerol catalisada pela Lipase (triacilglicerol acil hidrolase) (BON et al, 2008). 32

Figura 4 Estrutura canônica de α/β hidrolase. As Folhas- β são representadas por setas e α -hélices são identificadas como cilindros. A tríade catalítica conservada composta por histidina, um ácido e um nucleófilo, são representados por esferas. (LORD et al, 2013). 34

Figura 5 Ilustração de forma mais detalhada das características da lipase, sendo o substrato qualquer tipo de triglicerídeo (GOPINATH et al, 2013). 35

Figura 6 Ativação interfacial da lipase: presença do sítio ativo e *lid* em configuração fechada e aberta (Adaptado de BARBOSA et al, 2015). 36

CAPÍTULO 2

Figura 1 Relação das variáveis pH e concentração de óleo de oliva em relação a atividade enzimática..... 63

Figura 2 Relação das variáveis pH e concentração de óleo residual em relação a atividade enzimática..... 63

Figura 3 Influência do óleo de oliva (barra escura) e residual (barra clara) no crescimento celular e na produção de lipase em meio de cultivo composto por 0,2% $MgSO_4$, 0,2% KH_2PO_4 , 1,0% de peptona, 1,0% de extrato de levedura, 3,0% de $(NH_4)_2SO_4$ e com 9,97 $g.L^{-1}$ de óleo de oliva e pH 5.3 (\blacklozenge) e 16,22 $g.L^{-1}$ de óleo residual com pH 5.0 (\blacktriangle) a 30°C e 150rpm..... 65

CAPÍTULO 3

Figura 1 Relação da contagem de células e da atividade lipolítica em função do tempo ao longo de 72h de cultivo. **C.** = contagem de células; **A.** = Atividade lipolítica..... 78

Figura 2 Efeito da Temperatura (**A**) e do pH (**B**) sobre a estabilidade da lipase produzida por *Yarrowia divulgata*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3.0 a 30°C. A atividade residual da lipase foi dada em relação à atividade no tempo zero..... 80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Classificação das enzimas com base nas reações químicas catalisadas.....	24
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Valores de concentração de óleo e pH utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR (2^2).....	59
---	----

Tabela 2 Contagem de células e atividade lipolítica para o óleo de oliva e o óleo residual em cada ensaio.....	60
---	----

Tabela 3 Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de lipase para óleo de oliva.	61
---	----

Tabela 4 Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de lipase por óleo de soja residual.....	62
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Atividade lipolítica ($U.mL^{-1}$) e contagem de células ($células.mL^{-1}$) obtidas nos ensaios. Média de duas repetições.....	77
---	----

Tabela 2 Efeito dos íons metálicos sobre a estabilidade da lipase de <i>Y. divulgata</i>	81
---	----

Tabela 3 Influência dos solventes orgânicos e surfactantes na atividade lipolítica.....	82
--	----

ABREVIATURAS

[EI]	Enzima-inibidor
[ES]	Enzima-substrato
[I]	Inibidor
[S]	Substrato
ANOVA	Análise de variância
C-N	Ligação carbono-nitrogênio
cultura <i>starter</i>	Cultura inicial padronizada
DAG	Diacilgliceróis
E.C.	Enzyme Commission of the IUBMB
EEB	Extrato enzimático bruto
f.a	Forma assexual
K_{cat}	Constante da etapa limitante
K_I	Constante de equilíbrio com a ligação ao inibidor
K_m	Constante de Michaelis-Menten
<i>Lid</i>	Tampa hidrofóbica
MAG	Monogliceróis
Meio CMA	Corn meal agar
Meio MEA	Malt extract agar
nov.	Nova espécie
<i>p</i> NPP	para-nitrofenil palmitato
<i>p</i> NP	para-nitrofenol
SCP	Proteínas unicelulares
STR	Stirred tank reactor
t_0	Contagem inicial de células
TAG	Trigliceróis
UFT	Universidade Federal do Tocantins
V_0	Velocidade inicial
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima
$V_{m\acute{a}x}/\alpha'$	Velocidade máxima aparente
<i>Y. Divulgata</i>	<i>Yarrowia divulgata</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
	CAPÍTULO 1: Fundamentação Teórica	17
1.1	Leveduras	18
1.1.1	O gênero <i>Yarrowia</i>	20
1.1.2	<i>Yarrowia divulgata</i>	21
1.2	Enzimas.....	23
1.3	Mecanismos de inibição.....	27
1.4	Enzimas hidrolíticas	30
1.5	Lipases.....	32
1.5.1	Estrutura e atuação das lipases	33
1.5.2	Mecanismo de ativação interfacial de lipases	35
1.6	Fermentação em estado submerso.....	37
1.7	Surfactantes e emulsificantes	39
1.8	Microrganismos produtores de lipases	40
1.9	Aplicações biotecnológicas de lipases	41
2.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	CAPÍTULO 2: Produção de lipase por <i>Yarrowia divulgata</i> em frascos agitados	53
	RESUMO.....	54
	ABSTRACT	55
1.	INTRODUÇÃO	56
2.	METODOLOGIA.....	58
2.1	Linhagem de levedura	58
2.2	Obtenção do inóculo	58
2.3	Produção de lipase em frascos agitados.....	58
2.4	Medida da atividade lipolítica	59
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.1	Produção de lipase em frascos agitados.....	60
3.2	Cinética da produção de lipase	65
4.	CONCLUSÃO.....	66
5.	AGRADECIMENTOS	66
6.	REFERÊNCIAS	67

CAPÍTULO 3	69
RESUMO	70
ABSTRACT	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 microrganismo e manutenção	74
2.2 Pré-inoculo	74
2.3 Produção de lipase em biorreator de bancada	74
2.4 Medida da atividade lipolítica	75
2.5 Propriedades Bioquímicas	75
2.5.1 Determinação da estabilidade do EEB à temperatura e ao pH	75
2.5.2 Estabilidade e atividade do EEB à presença de íons	75
2.5.3 Influência de solventes orgânicos e surfactantes na estabilidade e atividade enzimática	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 Produção de lipase por <i>Y. divulgata</i> em biorreator de bancada	77
3.2 Caracterização parcial da lipase	79
3.2.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da lipase de <i>Y. divulgata</i>	79
3.2.2 Efeito da presença dos íons metálicos na estabilidade da lipase de <i>Y. divulgata</i>	81
3.2.3 Efeito dos solventes orgânicos e surfactantes na atividade da lipase de <i>Y. divulgata</i>	82
4. CONCLUSÃO	83
5. AGRADECIMENTOS	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	87

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista a busca pelo desenvolvimento sustentável a sociedade tem despertado sobre a necessidade de explorar de modo mais coerente as matrizes energéticas renováveis (LU et al, 2011; DESTOUNI e FRANK, 2010). Nesse aspecto, o Brasil por suas condições naturais favoráveis tem apresentado crescimento relevante no uso de biomassa e no aproveitamento de resíduos agroindustriais com objetivo voltado para o desenvolvimento agroenergético, apresentando um importante posicionamento estratégico no que diz respeito a sustentabilidade relativa a esse mercado (MENEZES et al, 2012; LU et al, 2011). No entanto, as indústrias voltadas a geração de biocombustíveis no país ainda não se consolidaram por diversos obstáculos relacionados a política nacional sobre biocombustíveis; objetivos estratégicos do governo relacionados a infraestrutura, indústrias de base; investimento em pesquisa; aprimoramento de técnicas e tecnologias mais eficientes (AZEVEDO e LIMA, 2016; BRANCO, 2013).

A variedade de biomassa e de resíduos provenientes da agroindústria apontam para o uso desses recursos como fonte geradora de energia e como matéria-prima para processos industriais, a fim de obter elevada produtividade e redução dos custos (CURRAN e HOWES, 2011). Além da biomassa, diferentes espécies de microrganismos estão sendo alvo de estudos com o intuito de obtenção de enzimas, proteínas, aminoácidos, lipídios, carotenoides e diversos compostos com valor de mercado (BRAGA et al, 2012; BRANDELLI et al, 2010).

Dentre os microrganismos produtores de compostos de interesse industrial as leveduras têm apresentado uma vasta aplicação nos mais diversos segmentos da indústria com potencial para produção de ácido cítrico, lipases, acetaldeídos, ésteres e monoterpenos, especialmente espécies dos gêneros *Candida*, *Saccharomycopsis*, *Saccharomyces* e *Yarrowia* (ALMEIDA et al, 2013; NICAUD, 2012; RAKICKA et al, 2016). O gênero *Yarrowia*, por não se tratar de leveduras clássicas, dentre as normalmente utilizadas em processos industriais, e em virtude da sua atividade lipolítica e proteolítica extracelular, tem despertado interesse em estudos voltados à produção de enzimas, em específico de lipases (NICAUD, 2012; RAKICKA et al, 2016).

As enzimas hidrolíticas produzidas a partir de processo de fermentação submersa apresentam ampla aplicabilidade nas áreas da saúde, alimentícia e energética (ALMEIDA et al, 2013; TAYYAB et al, 2011). Dessa forma, o emprego de enzimas provenientes de microrganismos isolados a partir de espécies nativas, contribui para o desenvolvimento biotecnológico e dos diversos bioprocessos visando ganhos de produtividade, econômicos e

ambientais (GUTIÉRREZ-ARNILLAS et al, 2017; LOPERENA et al, 2012; TAYYAB et al, 2011).

As enzimas microbianas apresentam um alto grau de especificidade das reações a qual catalisam, efetuando conversões eficientes, atuando em baixas concentrações e sob condições moderadas de temperatura e pH, sendo justificada a sua utilização principalmente devido a sua biodegradabilidade e seu alto potencial catalítico (LEHNINGER et al, 2014).

Na produção de enzimas, além da escolha do microrganismo, existem fatores que devem ser considerados, uma vez que podem afetar o desenvolvimento do microrganismo produtor, como o pH do meio, a agitação, a presença e concentração de indutores e os tipos e as concentrações dos nutrientes fornecidos. Portanto, o estudo da influência desses fatores na produção enzimática é fundamental para o desenvolvimento de condições de cultivo apropriadas para maximizar a produção de lipase via fermentação submersa, avaliando a relação de dependência ou não desses parâmetros no cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivos a otimização das condições de cultivo e a caracterização parcial da lipase produzida por *Yarrowia divulgata*, em fermentação submersa.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do pH e da concentração de óleo na produção de lipase em fermentação submersa, utilizando planejamento experimental e análise de superfícies de resposta;
- Comparar a produção de lipase utilizando óleo residual de fritura (óleo de soja) e azeite de oliva como indutores;
- Avaliar a influência da agitação e de emulsificantes na produção de lipase em biorreator de bancada;
- Determinar a estabilidade da enzima bruta produzida à temperatura, ao pH e a presença de íons metálicos;
- Determinar a influência de surfactantes e solventes na atividade enzimática.

CAPÍTULO 1
Fundamentação Teórica

1.1 Leveduras

A observação das leveduras pela primeira vez se deu em meados do século XVII por Antonie Van Leeuwenhoek com auxílio de um microscópio desenvolvido por ele. Van Leeuwenhoek percebeu que as leveduras se apresentavam como glóbulos que estavam suspensos no fluído, mas acreditava que fossem meramente partículas de amido proveniente do processo que ocorria para produção de *whiskey* e cerveja (HUXLEY, 1984).

A partir disso, em 1755, Samuel Johnson definiu as leveduras no Dicionário da Língua Inglesa como sendo, "o fermento colocado na bebida para fazê-lo funcionar; e no pão para clarear e inchar". Até o momento não se acreditava que as leveduras se tratavam de organismos vivos, eram consideradas apenas como agentes químicos orgânicos requisitados para os processos de fermentação. Em 1815, o químico francês Joseph-Louis Gay-Lussac fez algumas observações interessantes sobre a importância das leveduras no processo de fermentação. Gay-Lussac determinou que as leveduras eram agentes da fermentação e indispensáveis no processo de fermentação alcoólica (ALBA-LOIS e SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

Em 1835 Charles Cagniard de la Tour, inventor francês, observou que durante a fermentação alcoólica a levedura se multiplicava por brotamento. Esta observação confirmou que as leveduras consistiam em organismos unicelulares intimamente relacionadas ao processo de fermentação. Theodor Schwann, Friedrich Kützing e Christian Erxleben afirmaram, de forma independente, que "os corpúsculos globulares ou ovais, que flutuam tão densamente na fermentação, a ponto de torná-la lamacenta", tratava-se de organismos vivos (ALBA-LOIS e SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

Louis Pasteur foi o primeiro a demonstrar experimentalmente que o processo de fermentação de bebidas é resultado da conversão da glicose em etanol pelas leveduras vivas presentes no meio, demonstrando que esse processo apresenta produtos mais complexos e com quantidade mais expressiva (ALBA-LOIS e SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

A natureza das leveduras passou a ser melhor compreendida a partir de estudos realizados com o intuito de isolamento e aplicação de culturas puras, denominadas culturas *starter*, em processos industriais que visem a fermentação. Em 1880, Emile Christian Hansen descreveu técnicas usadas no isolamento de linhagens de levedura e aplicadas em processos por diferentes indústrias com culturas *starter* de levedura caracterizadas, eficientes e bem definidas. O uso de culturas *starter* em processos de fermentação industrial se tornou prática bastante disseminada, com objetivos principais relacionados a eficiência e consistência do processo

(STEENSELS et al, 2014). A descoberta de que as leveduras têm um papel fundamental na fermentação foi a primeira ligação entre a atividade de um microrganismo e as mudanças físicas e químicas que ocorrem nas matérias orgânicas (TORTORA et al, 2012).

As leveduras caracterizam-se por serem fungos não filamentosos e não apresentam corpo de frutificação em seu estágio sexual; apresentam crescimento vegetativo por brotamento ou por fissão; são organismos unicelulares e não apresentam flagelos para mobilidade; algumas apresentam-se como parasitas oportunistas; em sua maioria são saprofíticas e maiores que as bactérias. A forma celular pode variar de esférica, ovoide, cilíndrica, algumas bastante alongados formando filamentos semelhantes a hifas e pseudo-hifas, sendo estas estruturas mais facilmente visualizados com uso de microscópio (VALE et al, 2015). A filamentação das leveduras está relacionada a condições de estresse ocasionado pela restrição de nutrientes no meio, induzido por variações na relação carbono/nitrogênio e presença de íons metálicos (SANNA et al, 2012; ZHANG et al, 2011). A mudança na morfologia de fase unicelular para filamentosa pode indicar uma vantagem adaptativa para a levedura, visto que em meios com restrição de nutrientes as células acumulam lipídios e apresentam-se alongadas com grandes vesículas de lipídios em seu interior (KIELISZEK et al, 2016; LUO et al, 2015; REIS et al, 2013).

Há registros da existência de leveduras em diversos micro-habitats incluindo órgãos vegetais como os frutos, apresentando diversidade microbiológica não dependente somente de propriedades físico-químicas, mas também de aspectos ambientais (temperatura, disponibilidade de água e oxigênio) para cada espécie (THOMAS e SOLY, 2009; VALE, et al, 2015). As leveduras e os fungos filamentosos têm maior capacidade de se desenvolverem em ambientes com baixa umidade ou alta pressão osmótica quando comparados às bactérias. Esses microrganismos crescem em uma faixa ampla de pH comparada as bactérias, entretanto, o pH ótimo dos fungos e das leveduras geralmente é menor que o bacteriano, encontrando-se entre pH 3.0 e 7.0 (TORTORA et al, 2012).

1.1.1 O gênero *Yarrowia*

As leveduras do gênero *Yarrowia* apresentam características fisiológicas, metabólicas e genômicas específicas, que as diferenciam do gênero *Saccharomyces*. Essas propriedades tornaram as leveduras alvo de pesquisa pela comunidade científica, utilizando do gênero *Yarrowia* como modelo de conhecimento básico para estudos de dimorfismo em leveduras. Com o benefício do desenvolvimento de ferramentas genéticas e abordagens genéticas avançadas, obteve-se progressos significativos no que tange a compreensão de processos biológicos específicos ao gênero (GROENEWALD e SMITH, 2013; HANKO et al, 2018; NICAUD, 2012; RAKICKA et al, 2016).

A levedura *Yarrowia*, usada como organismo modelo em 1960, estabelecia a produção de *single cell protein* (proteína unicelular) usando n-alcano como fonte de carbono. Além de observarem a capacidade da levedura em secretar proteínas de alto nível, o desenvolvimento de ferramentas eficientes para a produção de proteínas heterólogas, a sua capacidade em utilizar eficientemente substratos hidrofóbicos e demonstrando ser um modelo notável para o estudo do complexo mitocondrial I, iniciado por Stefan Kerscher (Alemanha) (NICAUD, 2012).

As leveduras do gênero *Yarrowia* podem se apresentar em três formas morfológicas diferentes: células de levedura, pseudo-hifas e hifas septadas. A espécie *Yarrowia lipolytica* é a única conhecida no gênero *Yarrowia* como teleomorfo (estado sexual) e tem o seu estado anamorfo (isto é, estado assexuado) classificado no gênero *Candida* como *Candida lipolytica* (GROENEWALD e SMITH, 2013). O gênero *Yarrowia* tem sido considerado importante para os estudos relacionados ao dimorfismo em leveduras, tratando-se de organismos suscetíveis à manipulação genética e por apresentar formas morfológicas de fácil distinção. Diferentemente das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida viswanathii* que não possui verdadeiros filamentos e exibe pseudo-hifas quando cresce em condições limitantes de nitrogênio e carbono, respectivamente (ALMEIDA et al, 2013; GROENEWALD e SMITH, 2013).

As leveduras lipolíticas do gênero *Yarrowia*, são geralmente obtidas a partir do seu isolamento em meios que contêm fontes de carbono na forma de lipídios, ambientes que apresentam lipídios em sua composição, sendo assim mais adaptadas a substratos hidrofóbicos. A indução para produção de lipase em *Y. divulgata* ocorre quando há quantidade significativa de ésteres de ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa (Ácido Oleico - 18:1 Δ^9), presentes em óleo de oliva (azeite) com concentração entorno de 70%, óleo de sementes de uva, óleo canola, óleo de gergelim, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de palma e óleo da polpa de

macaúba (63-65%). Estudos com ácido palmítico, esteárico, mirístico e láurico como indutores para produção de lipase não são tão aplicados devido às características químicas, uma vez que esses ácidos são saturados e de difícil homogeneização no meio de cultivo, de modo que a ação dos microrganismos sobre esse substrato fica limitada a sua solubilização em água (NGUYEN et al, 2018). Esta levedura produz lipase de grande interesse em processos biológicos e industriais, além de apresentarem habilidade na produção e excreção de uma variedade de ácidos orgânicos (incluindo o citrato) e proteínas extracelulares no meio (ALMEIDA et al, 2013; RAKICKA et al, 2016).

1.1.2 *Yarrowia divulgata*

A espécie *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. pertencente à classe *Saccharomycetes* e da família dos *Dipodascaceae* foi descrita a partir de estudos que observaram a presença dessa levedura em fígado de galinha na cidade de Griffin, GA, EUA em 1999. As cepas dessa linhagem (NCAIM Y.01485 e NCAIM Y.01487) se encontram em National Collection of Agricultural and Industrial Micro-organisms (NCAIM), Budapest, Hungary. Em 2006, observou essa espécie em uma planta de processamento de bacon na Dinamarca e nos anos de 2007 e 2011 foi investigada a presença desse microrganismo em planta de processamento de peito de frango e carne moída em Budapeste, Hungria (NAGY et al, 2013).

Esta espécie de levedura foi descrita em um banco de dados destinado a documentação de novas nomenclaturas de microrganismos e dados associados (descrição e ilustração das espécies encontradas). O MycoBank é propriedade da Associação Internacional de Micologia e tem além do citado anteriormente a função de identificação polifásicas de fungos e leveduras e alinhamento de sequências de pares de base com outros bancos de dados de referência (ROBERT et al, 2013).

A nomenclatura *Y. divulgata* é referente a ocorrência geográfica generalizada da nova espécie, em que o termo *divulgata* está relacionado a disseminação da espécie em vários habitats (NAGY et al, 2013). Segundo o Código Internacional de Nomenclatura para plantas, algas e fungos (MCNEILL et al, 2012) a nova espécie compõe o gênero *Yarrowia*, e de acordo com a forma de reprodução designada, forma assexual (f.a.), é incluída ao gênero segundo o recomendado por LACHANCE (2012). Por se tratar de uma nova espécie (nov.) o nome proposto para o organismo é *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. Figura 1 (NAGY et al, 2013).

A *Yarrowia divulgata* é uma levedura que apresenta colônias esféricas, lisas, elevada, sem brilho e coloração creme. Estas leveduras apresentam característica de dimorfismo das

células, podendo crescer como célula unicelular esférica, subesférica ou elipsoidal, ou ainda com uma estrutura alongada com brotamento (pseudo-hifas). Essa variação na morfologia do organismo ocorre por limitações de nutrientes disponíveis ao crescimento do microrganismo no meio de cultivo em que, meios com baixa concentração de extrato de malte, por exemplo, possibilita a formar células alongadas (EGERMEIER et al, 2017; NAGY et al, 2013; ORTIZ et al, 2014).

Em relação as células, estas possuem tamanhos diferentes conforme a estrutura da célula, em meio MEA (malt extract agar) apresenta-se esférica ou subesférica, 2,5 a 6 μm ; se em formato elipsoidal, 2.5-6.5 x 3.5-10 μm . As células podem ser observadas isoladamente, em cadeias curtas, em pares ou em pequenos aglomerados Figura 1-a. Em meio CMA (corn meal agar) apresentam-se no formato de hifas verdadeiras e pseudo-hifas Figura 1-b e não ocorreu a formação de ascósporos (NAGY et al, 2013).

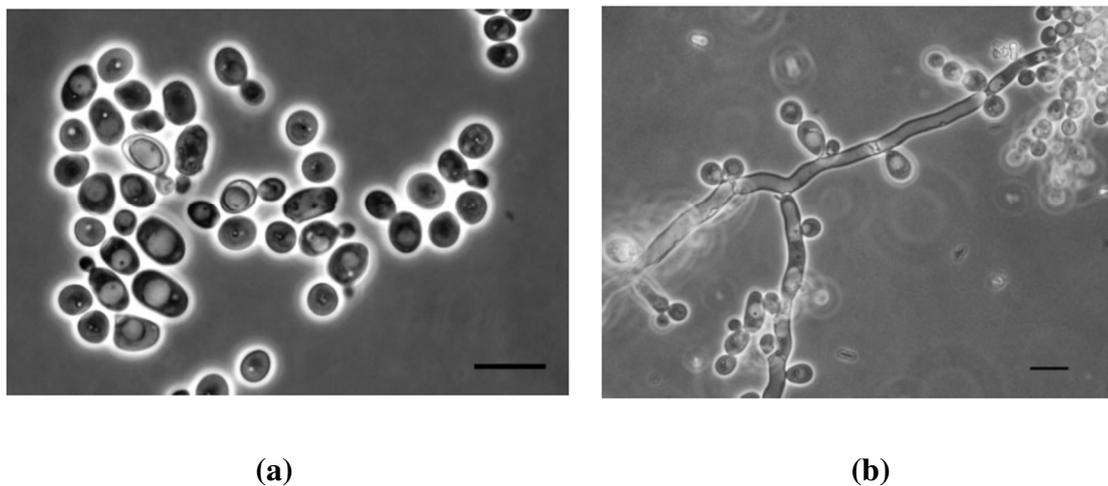


Figura 1 A mudança da morfologia do gênero *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov. pode ser observado a partir do crescimento das células em diferentes meios, (a) Meio contendo 5% de extrato de malte - MEA (malt extract agar) por 7 dias a 25°C. Bar, 10 μm . (b) Cultivo em meio CMA (corn meal agar) por 7 dias a 25°C. Bar, 10 μm . (NAGY et al, 2013).

Alguns compostos utilizados como fonte de carbono são assimilados pela *Y. divulgata* como, D-glicose, salicina (salicinina), arbutina, L-sorbose, D-ribose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (lento ou fraco e lento e variável), D-sorbitol, D-manitol, DL-lactato, succinato, citrato, D-gluconato, glucono-dactona, N-acetil-D-glicosamina, 1,2-propanodiol, 2,3-butanodiol e hexadecano. Assim como, Cloridrato de etilamina e L-lisina (NAGY et al, 2013).

Segundo NAGY et al (2013) não há ocorrência de crescimento da levedura em meios compostos por inulina, sacarose, rafinose (galactose, frutose e glicose), melibiose, D-galactose,

lactose, trealose, maltose, melezitose, metil α -D-glicosídeo, amido, celobiose, L-ramnose, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, metanol, xilitol, galactitol, inositol, l-arabitol, 2-ceto-D-gliconato, D-glucuronato (ácido glicurónico), D-galacturonato (ácido galacturônico), sacarato (ácido sacárico) ou D-glucosamina. Alguns compostos utilizados como fonte de nitrogênio, como nitrato de potássio, nitrito de sódio, creatina, creatinina, glicosamina e imidazol não são assimilados por essa espécie.

A *Y. divulgata* assim como as espécies do gênero apresentam aplicação eficiente em substratos hidrofóbicos como fonte de carbono, sendo frequentemente encontrada em ambientes ricos nestes substratos, como alcanos e/ou lipídios (MESSIAS et al, 2011).

1.2 Enzimas

Historicamente a tecnologia enzimática moderna teve início por volta de 1874, quando um químico, Christian Hansen, conseguiu produzir o coalho (uma mistura das enzimas quimosina e pepsina). Em seguida, William Kuhne propôs, em 1876, que a nomenclatura “enzima” fosse utilizada com termo referente a fermentos isolados de organismos viáveis e vitais. A partir de 1897, o pesquisador Eduard Buchner iniciou os estudos acerca do extrato de levedura para fermentação de açúcares, em específico a sacarose, nomeando a enzima que hidrolisou a sacarose de “zymase”. Somente em 1965 a fermentação microbiana foi estabelecida e padronizada de forma específica para aplicação em grande escala. Com isso, grande quantidade de amilases bacterianas e proteases foram produzidas em cultivo submerso (OLIVEIRA, 2015).

As enzimas são macromoléculas protéicas e catalisam reações químicas que ocorrem em sistemas biológicos. A finalidade do catalisador é reduzir a energia de ativação, aumentar a velocidade da reação química devido ao alto grau de especificidade da enzima com o substrato, orientando para o aumento da probabilidade da reação pelo complexo enzima-substrato formado. As mudanças nos fatores como concentração de substrato, agitação, pH e a presença de indutores interferem na produtividade nos processos biológicos (COLLA et al, 2016). Estes, assim como a atividade enzimática, são parâmetros importantes a serem avaliados em processos de obtenção das enzimas (OLIVEIRA, 2015; SANDSTROM et al, 2012).

As enzimas apresentam um alto grau de especificidade das reações a qual catalisam, efetuando conversões eficientes, atuando em baixas concentrações e sob condições moderadas de temperatura e pH, sendo justificada a sua utilização, principalmente, devido a sua biodegradabilidade e seu alto potencial catalítico (LEHNINGER et al, 2014).

A especificidade das enzimas está associada à sua estrutura e peso molecular, com uma forma tridimensional e uma configuração de superfície específica resultante de estruturas primárias, secundárias e terciárias. A configuração exclusiva de cada enzima proporciona que as mesmas se liguem ao substrato correto dentre todas as moléculas presentes na célula. As enzimas podem catalisar reações bioquímicas com velocidade na ordem de 10^8 a 10^{10} vezes maior que as reações nas quais não há presença de enzimas. No entanto, as enzimas podem existir nas células na forma ativa e inativa, estando diretamente relacionado ao ambiente celular, se necessárias a processos apresentam-se na sua forma ativa, caso contrário na forma inativa (TORRELO et al, 2015; TORTORA et al, 2012).

As enzimas são classificadas em seis classes diferentes com base no tipo de reação química catalisada de acordo com a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (Tabela 1):

Tabela 1 Classificação das enzimas com base nas reações químicas catalisadas.

	Classe de Enzimas	Tipo de reação catalisada	Enzimas
I	Oxidoreduases	Oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Oxidase e Peroxidase, Glicose, Lacase e Tirosinase
II	Transferases	Transferência de grupos acila, fosforila ou metila, aldeídico e cetônicos	Aciltransferase, Glicosiltransferase, Fosforilase
III	Hidrolases	Hidrólise de glicosídeos, ésteres, nitrilas, amidas, lactonas, epóxidos e lactamas	Lipase, Protease, Peptidase e Glicosidase (Amilase, Celulase, Hialuronidase Quitinase, Xilanase)
IV	Liases	Remoção/adição de dupla ligação em grupos ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Aldolase, Decarboxilase, Desidratase
V	Isomerases	Produção de isômeros por transferência de grupos dentro da molécula (rearranjo de átomos dentro de uma molécula)	Epimerase, Isomerase e Racemase
VI	Ligases	Formação e clivagem de ésteres de fosfato e ligações do tipo C-C, C-S, CN e CO, utilizando energia derivada da quebra do ATP	Ligase, Sintetase, Acil CoA e Sintetase

Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014); Rauwerdink e Kazlauskas (2015) e Shoda et al. (2016).

A partir dos recentes avanços da biotecnologia, do mecanismo de reações e de acordo com a necessidade de um processo, diversas enzimas podem ser propostas para as mais diversas

aplicações. Técnicas moleculares têm sido consideradas para melhorar a qualidade e o desempenho de enzimas microbianas ampliando suas aplicações industriais. Como resultado da engenharia genética, dos desempenhos e das técnicas aplicadas a modificação das enzimas, vários produtos de alto valor agregado têm sido sintetizados no mercado global (OLIVEIRA, 2015; NIGAM, 2013).

Em processos industriais, contrariamente aos catalisadores químicos, as enzimas são proteínas biodegradáveis, agem sob condições brandas de temperatura e pH, apresentam alta estabilidade e eficiência catalítica, alta especificidade, sendo responsáveis por reduzir o tempo de reação química e não causarem a degradação dos materiais com os quais estão envolvidas na reação (TORRELO et al, 2015).

A maioria das enzimas comercializadas é de origem microbiana e, são produzidas por linhagens industriais adaptadas aos processos com o objetivo de aumentar a produção. Em sua grande maioria são extracelulares, o que facilita a sua recuperação no meio. As mudanças em fatores como concentração de enzima ou substrato, temperatura e pH interferem na velocidade das reações enzimáticas e estes são parâmetros importantes a serem avaliados em processos de obtenção das enzimas e avaliação da atividade enzimática (OLIVEIRA, 2015; SANDSTROM et al, 2012).

A capacidade das enzimas de acelerar as reações sem a necessidade do aumento da temperatura torna-se crucial para os seres vivos, pois o aumento significativo da temperatura é capaz de destruir ou inativar as proteínas celulares importantes à manutenção do organismo. A função fundamental das enzimas consiste em acelerar as reações bioquímicas a uma determinada temperatura compatível com o funcionamento natural das células catalisando reações de síntese, modificação e degradação de moléculas orgânicas (IBRAHIM, 2008; LEHNINGER et al, 2014).

A capacidade de atuar em condições variadas de temperatura e pH, está entre as características especiais das enzimas microbianas. Dessa forma, as enzimas, assim como os microrganismos, apresentam categorias de resistência a temperatura, sendo classificados como termofílicas, acidófilas ou alcalífilas. Microrganismos com enzimas termofílicas apresentam a possibilidade de aplicação em reações em escala industrial, onde são requeridas altas temperaturas por longos períodos, com o intuito de reduzir a probabilidade de contaminação (OLIVEIRA, 2015; NIGAM, 2013; ZHANG e WU, 2011; WANG et al, 2012).

Enzimas provenientes de organismos extremófilos (extremoenzimas) são biocatalisadores tolerantes a condições extremas de temperatura, sendo alguns tolerantes a solventes (HUANG et al, 2017), o que torna essas enzimas importantes e valiosas para processos industriais (produção de biocombustíveis, degradação de polímeros de carbono, fabricação de papel, alimentos e indústrias têxteis), que por muito tempo foram considerados de difícil implementação quanto ao uso dessas proteínas. Essa classe de enzimas é capaz de catalisar reações em condições não comuns às outras enzimas, em ambientes com mistura água/solvente, não aquosos, em temperaturas de 140°C ou próximas ao ponto de congelamento da água, com pressão elevada, pH mais ácidos e/ou alcalinos e alta concentração de metais (ELLEUCHE et al, 2014, ELLEUCHE et al, 2015; MIRETE et al, 2016).

Entretanto, a maior parte das enzimas utilizadas hoje se originam de organismos mesofílicos, devido as suas vantagens de cultivo, de obtenção das enzimas para aplicação e de possibilidade e disponibilidade na padronização da produção, sendo essas enzimas representantes de uma fração do mercado industrial (ELLEUCHE et al, 2015; MIRETE et al, 2016).

Além desses princípios, para que as enzimas provenientes de microrganismos possam ser utilizadas comercialmente, é necessário que o microrganismo se desenvolva bem em substratos provenientes de biomassa residual (com objetivo de redução de custos), que haja a disponibilidade e padronização do substrato, bem como a qualidade de suprir as necessidades biológicas e nutricionais do microrganismo. Com esses requisitos atendidos, os microrganismos podem apresentar alta produção e rendimento em curto prazo, associados a produção de enzimas com recuperação mais simples (extracelulares) e com estabilidade térmica a pequenas variações (BRÍGIDA et al, 2014; OLIVEIRA, 2015).

Pesquisas relacionadas à biocatálise, tem apresentado como objetivo principal os estudos relacionados à química e biologia no desenvolvimento de novos catalisadores enzimáticos para uso industrial. Nesse aspecto, metodologias de seleção de enzimas e técnicas de biologia molecular podem ser aplicadas na obtenção de enzimas com suas especificidades alteradas. Os catalisadores biológicos nativos apresentam, em sua maioria, limitações quando submetidos a processos industriais. Limitações que estão sendo aprimoradas através da alteração da termoestabilidade, estereoespecificidade e atividade envolvendo técnicas de biologia molecular pertinentes a mutações sítio dirigidas (COELHO et al, 2017).

Os microrganismos estão associados a diversos processos industriais, logo há necessidade de otimização dessas etapas com intuito de utilizar microrganismos de maneira mais eficiente e reduzir o uso de matéria-prima ou utilizar resíduos agroindustriais como forma de redução de custos de processo. Alguns fatores como agitação do meio, pH, temperatura, umidade, pressão osmótica e nutrientes disponíveis, são diretamente responsáveis pelo desempenho microbiano. Dessa forma, faz-se necessário o entendimento do metabolismo microbiano do gênero que se deseja trabalhar e compreendendo o comportamento do microrganismo frente as modificações do meio de cultivo (NICAUD, 2012; VALE et al, 2015).

1.3 Mecanismos de inibição

As enzimas estão sujeitas a inibição por duas principais amplas classes de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis. Inibidores são moléculas responsáveis por diminuir ou interromper a velocidade das reações catalisadas enzimaticamente (AMINE et al, 2016). A inibição competitiva é considerada um tipo mais comum de inibição reversível, isso por que um inibidor competitivo disputa com o substrato, a possibilidade de se ligar ao sítio ativo da enzima. Isso faz com que o inibidor impeça que o substrato se ligue ao sítio ativo da enzima. À medida que há quantidades elevadas de inibidores no meio reacional, esses inibidores competitivos apresentam estruturas similares à estrutura do substrato e se ligam à enzima, formando um complexo estável enzima-inibidor [EI] não acarretando em um mecanismo de ação catalítica da enzima e são responsáveis por reduzir sua eficiência, mesmo que sejam ligações transitórias (LEHNINGER et al, 2014).

Essas ligações reversíveis entre enzima e inibidor pode ser deslocada a favor do substrato pela adição de quantidades maiores de substrato, isso se dá pelo excesso de substrato [S] e a minimização da probabilidade de uma molécula de inibidor [I] se ligar a enzima, proporcionando velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) normal a reação. No entanto, em [S] em que $V_0 = 1/2 V_{m\acute{a}x}$, a presença de inibidores eleva o valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) aparente. Além dessa constante, há a constante de equilíbrio com a ligação ao inibidor (K_I) (LEHNINGER et al, 2014; LU et al, 2017; MARQUES et al, 2016).

Existem dois outros tipos de inibição reversível, a inibição não-competitiva e a inibição mista de acordo com a Figura 6. Esses tipos de inibições são observados somente em enzimas que apresentam dois ou mais substratos, isto é, mais de um sítio ativo para ligação (LEHNINGER et al, 2014; SCALVINI et al, 2016). Um inibidor não-competitivo se liga em um sítio ativo diferente do sítio ativo do substrato, que diferentemente do inibidor competitivo,

liga-se ao complexo ES não competindo com o substrato por um sítio ativo. Com a presença de um inibidor não-competitivo, a equação de Michaelis-Menten é alterada. Pode-se observar que em altas concentrações de substrato a velocidade inicial (V_0) se aproxima da velocidade máxima aparente ($V_{m\acute{a}x}/\alpha'$). O inibidor não-competitivo reduz a $V_{m\acute{a}x}$ medida. O Substrato essencial para atingir $1/2 V_{m\acute{a}x}$ diminui por um fator de α' proporcionado pela redução do K_m aparente (LEHNINGER et al, 2014; MARQUES et al, 2016).

No caso da inibição mista, assim como a inibição não-competitiva, ocorre a ligação a um sítio ativo diferente, em que o substrato está ligado. O inibidor pode se ligar tanto a enzima quanto ao complexo [ES]. Nesse caso o inibidor afeta ambos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (LEHNINGER et al, 2014).

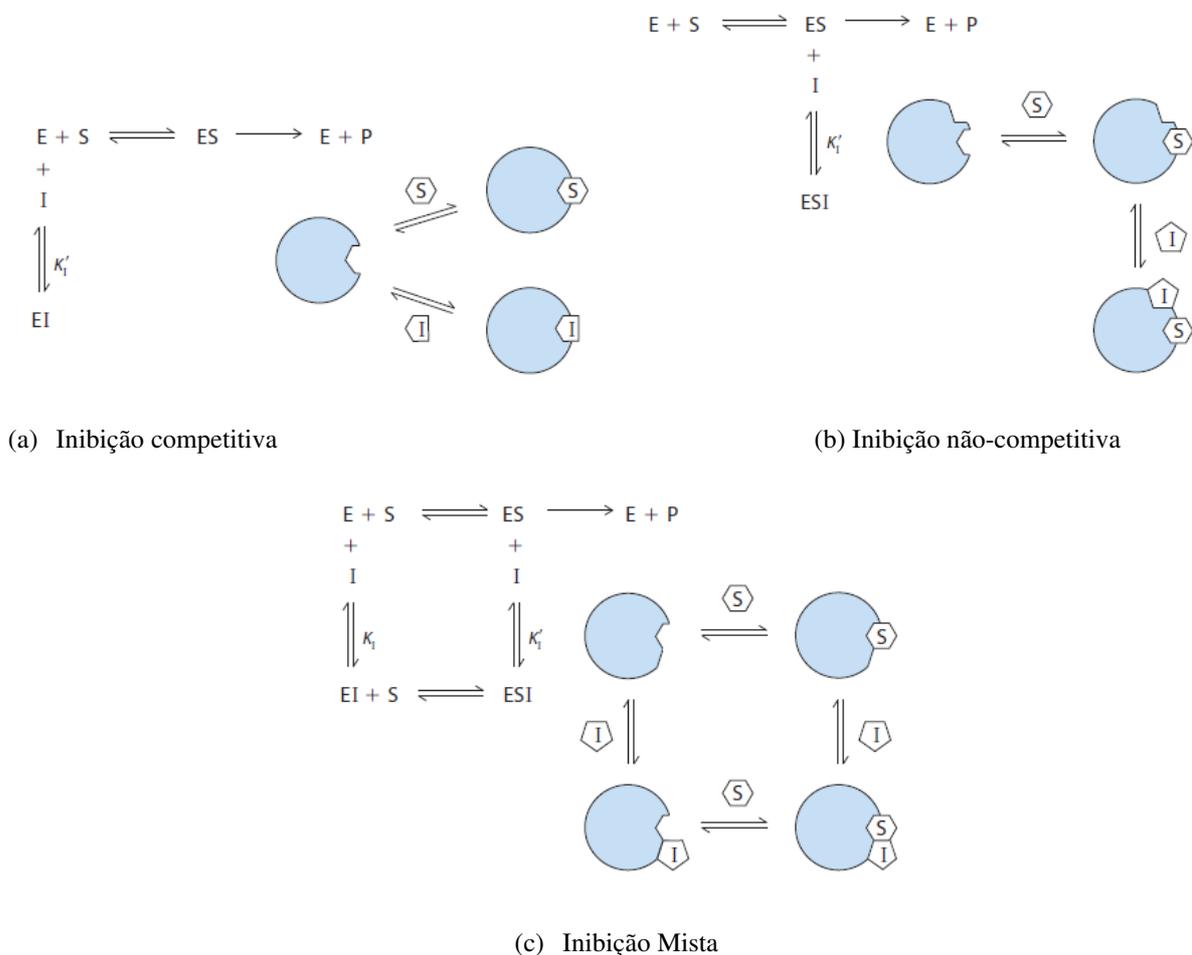


Figura 2 Tipos de inibição reversível. (a) Inibidores competitivos [I] se ligam ao sítio ativo da enzima. K_i é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a enzima [E]. (b) Inibidores não-competitivos ligam-se em sítios distintos, mas podem se ligar apenas ao complexo [ES]. K_i' é a constante de equilíbrio para a ligação [ES]. (c) Inibidores mistos ligam-se a sítios diferentes, mas podem se ligar tanto a [E] quanto a ao complexo [ES] (Adaptado de LEHNINGER et al, 2014).

Outra classe de importância em relação ao estudo dos inibidores de atividades enzimáticas, correspondem aos inibidores irreversíveis. Estes tipos de inibidores ligam-se covalentemente com um determinado grupo funcional da enzima (essencial a atividade enzimática), podem destruir esse grupo funcional ou então formar uma associação estável não covalente com a enzima. Há possibilidade de formação de uma ligação covalente entre um inibidor irreversível e uma enzima, importantes no estudo dos mecanismos de reações. Eventualmente, é possível ocorrer a identificação de aminoácidos que apresentam funções-chave no sítio ativo indicando quais resíduos de aminoácidos tem possibilidade de se ligar covalentemente ao inibidor depois que a enzima é inativada (AMINE et al, 2016; LEHNINGER et al, 2014).

Os inativadores suicidas caracterizam-se como uma classe especial de inibidores irreversíveis. Até que se liguem ao sítio ativo da enzima específica, estes compostos não são reativos. O inativador suicida ao passar pelas primeiras etapas químicas da reação enzimática não é transformado no produto, entretanto, é convertido em um composto químico mais reativo que tem a capacidade de se combinar irreversivelmente à enzima. Esses compostos são identificados como inativadores com base no mecanismo de reação, com intuito de inativar a enzima (AMINE et al, 2016; LEAVER et al, 2015; LEHNINGER et al, 2014).

Um inibidor pode se ligar a enzima de forma irreversível caso este inibidor apresente uma estrutura de transição, pois as enzimas se ligam fortemente a estados de transição das reações que catalisam, com isso é possível planejar moléculas estáveis que se assemelhem ao estado de transição desses compostos e proporcionar a inibição de determinadas enzimas. Essas moléculas são análogas ao estado de transição. O inativador suicida planejado é específico para uma única enzima e permanece inativo e sem reatividade até que se ligue no sítio ativo da enzima definida. Essa ligação acontece devido a quantidade superior de interações fracas que a molécula de inativação forma com a enzima, sendo superior as interações formadas entre enzima-substrato (AMINE et al, 2016; LEHNINGER et al, 2014).

1.4 Enzimas hidrolíticas

Além da classificação das enzimas em seis grandes classes segundo o tipo de reação química catalisada, é atribuída uma sigla de classificação denominada E.C. (*Enzyme Commission of the IUBMB*), com quatro dígitos, em que o primeiro número determina a classe enzimática pertencente; o segundo, a subclasse relacionada a classe inicial; o terceiro número, evidencia o grupo químico específico que participa da reação e o quarto número, expressivamente, a enzima (NELSON e COX, 2014).

As hidrolases pertencem a classe 3 (E.C. 3), são classificadas em 13 subclasses segundo a clivagem de ligações específicas na cadeia. Dentre essas subclasses estão as esterases (E.C. 3.1), que abrange as nucleases, fosfodiesterases, lipases e fosfatases, responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações éster; glicosilases (E.C. 3.2) encarregadas de hidrolisarem açúcares; éter, tioéter e trialquilsulfônio hidrolases (E.C. 3.3) responsáveis por clivagem de ligações éter; peptidases/proteases (E.C. 3.4) como carboxipeptidases, endopeptidases e aminopeptidases, que hidrolisam ligações C-N peptídicas; as hidrolases responsáveis por hidrolisar ligações C-N não peptídicas em nitrilos, amidinas e amidas (E.C. 3.5) e as que atuam em ácidos anidridos que abrangem nucleosídeos di e trifosfatos, e anidridos contendo sulfonilo (E.C. 3.6); há as hidrolases que atuam em ligações C-C (E.C. 3.7), ligações C-haleto (E.C. 3.8), ligações P-N (E.C. 3.9), ligações S-N (E.C. 3.10), ligações C-P (E.C. 3.11), ligações S-S (E.C. 3.12) e ligações C-S (E.C. 3.13) (NELSON e COX, 2014; SOUSA et al, 2015).

As hidrolases são enzimas sintetizadas por microrganismos com a finalidade de degradação de polímeros (quebra das ligações covalentes entre as moléculas), produzindo moléculas menores que serão utilizadas pelos microrganismos afim de obter os compostos essenciais para o seu crescimento e reprodução. Dentre as hidrolases incluem-se glucanases (endo e exo), xilanases, manases, pectinases, lipases, arabinofuranosidases, galactosidases e proteases, representando o maior grupo de enzimas destinadas a aplicações industriais (BENEITO-CAMBRA et al, 2008; MESSIAS et al, 2011; SHODA et al, 2016).

As hidrolases são utilizadas principalmente em processos industriais voltados a indústrias têxtil (amilases, celulases, pectinases e oxidoredutases), papel e celulose (lipase, oxidoredutase, xilanase), couro (lipase e protease), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidoredutase), cosméticos, biossensores e medicamentos, sendo aditivos na produção de detergentes, onde representam a maior aplicação das enzimas destinadas a processos industriais. Enzimas como lipases, proteases, oxidases, amilases, celulases e

peroxidases são adicionadas aos detergentes, sendo responsáveis por catalisar a quebra das ligações químicas, assim como em outros processos industriais (BENEITO-CAMBRA et al, 2008; TORRELO et al, 2015; TORTORA et al, 2012).

O mecanismo de atuação dessas enzimas é o mesmo para todas as subclasses, entretanto os sítios ativos das hidrolases são distintos devido aos aminoácidos presentes na molécula e no seu mecanismo de ação. O primeiro tipo de sítio ativo apresenta resíduos de ácido aspártico ou glutâmico, que são encontrados em enzimas como lisozima e pepsina. O sítio ativo consiste na presença de dois ou mais grupos carboxílicos em que, um dos grupos carboxílicos libera (H^+) e atua como ácido de grande abrangência. O outro grupo carboxílico em que há remoção de um próton (íon H^+) atua como uma base conjugada. As enzimas que utilizam este tipo de sítio ativo são as que catalisam a hidrólise de amida, éster e as ligações glicosídicas. O segundo tipo de sítio ativo é constituído de serino-proteases, e possui um grupo imidazol para ativação da água como um nucleófilo. O mecanismo catalítico compreende a acilação do grupo hidroxila de um tiol, geralmente em uma serina no sítio ativo, e posteriormente a formação de um intermediário acil-enzima (SOUSA et al, 2015).

O terceiro tipo de sítios ativos faz uso de íons metálicos tais como, cobalto (Co), níquel (Ni) ou zinco (Zn) para a ativação do substrato e de molécula de água. Estes íons metálicos habitualmente apresentam grupos carbóxilo de histidina (imidazol) e ácido aspártico ou glutâmico como seus ligantes. Os íons metálicos atuam como agentes eletrofílicos com capacidade de ativar o centro de reação ou podem ter a função de ativadores eletrofílicos que geram cátions hidroxila a partir de uma molécula de água. Um dos principais exemplos destes mecanismos de sítio ativo é a fosfatase alcalina. A quarta categoria de sítio ativo inclui a presença de íons metálicos, tais como Magnésio (Mg) ou Manganês (Mn). Estes íons são adequados há aplicação como agentes eletrofílicos responsáveis por ativar o substrato. Porém, estes íons tem a capacidade de induzir um déficit de eletrodensidade no centro de reação de acordo com a sua força de ação (SOUSA et al, 2015).

1.5 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e apresentam função de catalisar as reações de hidrólise total ou parcial de triglicéridos (TAG) em diacilgliceróis (DAG), monogliceróis (MAG) e ácidos graxos livres e glicerol. Além disso, atuam na síntese de peptídeos, lactonas macrocíclicas em condições de pouca disponibilidade de água ocorrendo a transferência de grupos acila de solventes orgânicos. Catalisam reações de esterificação, interesterificação de lipídios e transesterificação, atuando sobre as ligações ésteres dos compostos, com os acilgliceróis como melhores substratos. A Figura 2 demonstra a ação da lipase na hidrólise do triglicérido (BARRIUSO et al, 2016; BRÍGIDA et al., 2014; OLIVEIRA, 2015).

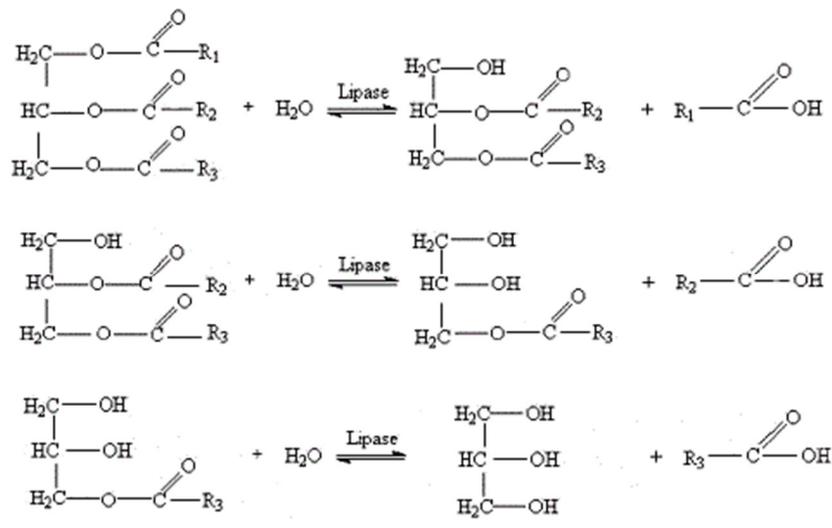


Figura 3 Hidrólise sequencial de um triacilglicerol catalisada pela Lipase (triacilglicerol acil hidrolases) (BON et al, 2008).

Lipases são estáveis em soluções neutras e a temperatura ambiente. Sua termoestabilidade é variável em função da origem, sendo que as lipases provenientes de microrganismos apresentam estabilidade térmica mais elevada (PFLUCK et al, 2018). Lipases constituem um importante grupo de biocatalisadores e são essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos por serem capazes de catalisar as reações com triglicéridos (BUSSAMARA et al, 2010). De acordo com a fonte de produção, as lipases podem apresentar massa molecular variável entre 20 e 75 kDa, temperatura ótima de estabilidade e atividade variando entre 25°C e 70°C, e o pH entre 4.0 a 9.0 (BUSSAMARA et al, 2010).

As lipases provenientes de microrganismos compõem um importante grupo de enzimas, devido à flexibilidade de suas propriedades e a fácil reprodução em grande escala. Lipases microbianas são atrativas para aplicação industrial por apresentarem propriedades enzimáticas diversificadas e mais específicas aos tipos de substratos aos quais serão aplicadas. Isso pode ser justificado pela variedade de microrganismos produtores de enzimas específicas, a possibilidade de manipulação genética desses organismos visando o aumento de produtividade e pelo rápido desenvolvimento dos microrganismos em meios alternativos de baixo custo, possibilitando a aplicação em escala industrial (BRÍGIDA et al, 2014; GONÇALVES et al, 2014).

Diversas indústrias produzem lipases a partir de microrganismos, sendo alguns exemplos a DSM, Novozymes, Amano, Care Systems, Promega, Rudolf Group, Direvo, Harke Services, Kemira, Kuk, Gist Brocades Dupont, BASF, AB Enzimas, CHR.Hansen, Soufflet Group, Longda Bio-produtos, Biocatalisantes, ORBA, Biovet dentre outras (OLIVEIRA, 2015).

1.5.1 Estrutura e atuação das lipases

Desde 1990 a estrutura tridimensional de diversas enzimas foi determinada, dentre elas onze estruturas correspondiam a lipases e a maioria de origem microbiana. As lipases exibem uma característica padrão conhecida como o entrelaçado de α/β hidrolase, o que define a família e determina a estrutura tridimensional (BARRIUSO et al., 2016; BON et al, 2008). Com técnicas como a difração de raio-X empregada com o objetivo de determinar a estrutura tridimensional de algumas lipases, tem-se compreendido os fatos que particularizam sua regioespecificidade, enantiosseletividade e o seu mecanismo de ação, sendo a primeira estrutura evidenciada, a de uma lipase fúngica da espécie *Rhizomucor miehei* (COSTA e AMORIM, 1999; MANOEL et al, 2015; MESSIAS et al, 2011).

As lipases apresentam estruturalmente o resíduo nucleofílico serina localizado na parte C-terminal da folha β_5 de um pentapeptídeo altamente conservado, formando dessa forma a característica principal de “folha β em torno de α hélice”, descrita como cavidade nucleofílica. O sítio é composto de uma folha β central constituída de oito fitas diferentes β (β_1 - β_8) ligadas a seis α hélices (A-F) (Figura 3) (COSTA e AMORIM, 1999; MESSIAS et al, 2011). É importante destacar que os resíduos ocorrem sempre em uma ordem específica de sequência dos aminoácidos e são essenciais para todas as reações catalisadas por lipases, assim classificadas como serino-hidrolases (EGERMEIER et al, 2017).

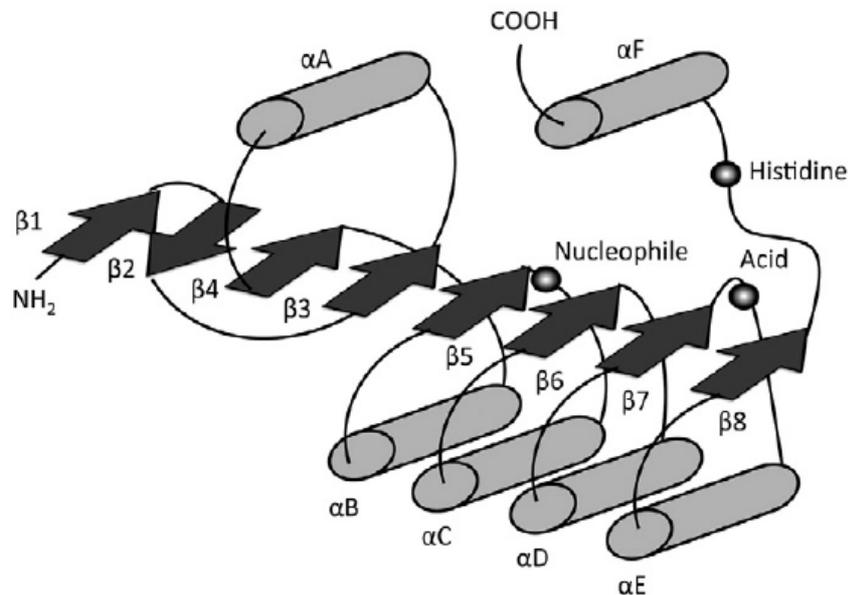


Figura 4 Estrutura canônica de α/β hidrolase. As folhas- β são representadas por setas e α -hélices são identificadas como cilindros. A tríade catalítica conservada composta por histidina, um ácido e um nucleófilo, são representados por esferas. (LORD et al, 2013).

A partir das informações estruturais adquiridas, tornou-se possível estabelecer o sítio catalítico da lipase, que apresenta atividade decorrente da tríade catalítica formada por três aminoácidos, ácido aspártico (ou glutâmico), histidina e serina. Normalmente uma sequência comum que apresenta Gly-X-Ser-X-Gly (com X determinando um aminoácido ácido) se encontra próxima a serina do sítio ativo. A proteção do sítio ativo ao meio é realizada por uma estrutura móvel denominada tampa hidrofóbica ou *lid*, responsável por sofrer alteração conformacional quando em uma interface água/lipídio de forma que o sítio ativo da enzima seja exposto e ocorra a ação enzimática (ANGAJALA et al, 2016; BARRIUSO et al, 2016).

A atuação da enzima no substrato se inicia com o ataque nucleofílico pelo oxigênio do resíduo da serina no átomo de carbono da ligação éster, ocasionando a formação de um composto intermediário tetraédrico estável pelas ligações de hidrogênio a átomos de nitrogênio pertencentes a resíduos da cadeia principal. Desse processo, um álcool é liberado com a formação do complexo acil-lipase, hidrolisado com a separação dos ácidos graxos e a reestruturação da enzima (HANKO et al, 2018).

As reações catalisadas por enzimas hidrolíticas ocorrem em interface água-lipídios, onde em alguns casos, pode impedir que a cinética das reações enzimáticas possa ser descrita por equações que apenas são válidas se a reação catalisada ocorra em fase homogênea (equação

do tipo Michaelis-Menten), hidrolisando apenas lipídios emulsificados, atuando na interface da reação entre água e lipídios (Figura 4). Da perspectiva de sua especificidade, existem as que hidrolisam em mesma velocidade as três ligações éster dos triglicerídeos e as que hidrolisam determinadas ligações específicas, sendo enzimas sítio dirigidas. Técnicas como a de camada única tem sido utilizada amplamente, assim como a técnica gota-óleo proposta no sentido de estabelecer a cinética de ação da lipase, ao ser monitorada por análise automática da representação de uma gota de óleo suspensa em água. Nesse processo a redução da tensão superficial entre água e óleo, a hidrólise causada pela lipase é medida em função do tempo de atuação (COSTA e AMORIM, 1999; MATHESH et al, 2016; RUEDA et al, 2016).

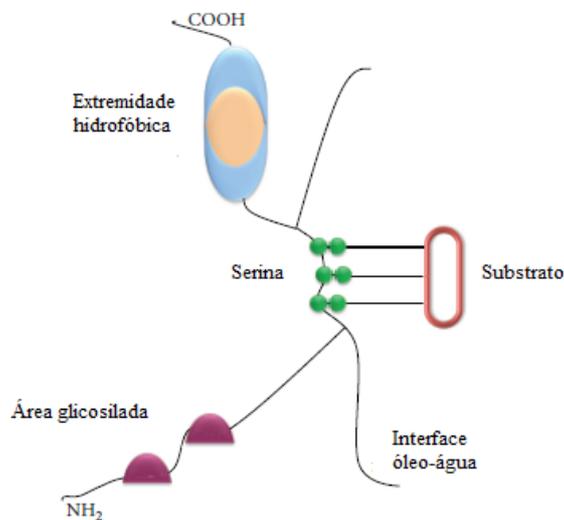


Figura 5 Ilustração de forma mais detalhada das características da lipase, sendo o substrato qualquer tipo de triglicerídeo (GOPINATH et al, 2013).

1.5.2 Mecanismo de ativação interfacial de lipases

Dentre as hidrolases, algumas lipases apresentam um mecanismo designado ativação interfacial (CORTEZ et al, 2017). Esse mecanismo foi descrito em 1958 por Sarda e Desnuelle. Baseia-se na demonstração de que o sítio ativo das lipases é protegido por uma tampa, denominada *lid*, que consiste em uma cadeia de peptídeos de natureza hidrofóbica (Figura 5). Em meio aquoso esse mecanismo que compõe as lipases pode se encontrar em configuração fechada e inativa, e configuração aberta e ativa (SARDA e DESNUELLE, 1958).

A configuração fechada indica que o sítio ativo da enzima está isolado do meio reacional em razão da proteção que a tampa *lid* apresenta. Porém, a configuração aberta é verificada

quando a tampa *lid* se encontra em meio com interface lipídeo-água, ocorrendo a interação entre os mesmos. Isso proporciona o movimento da tampa e a alteração na forma da enzima, passando de fechada e inativa á aberta e ativa, o que permite com que o sítio ativo se exponha e fique acessível ao substrato e assim possa expor uma superfície hidrofóbica ampla que possibilita a catálise (Figura 5) (MATHESH et al., 2016; MESSIAS et al, 2011; RUEDA et al., 2016).

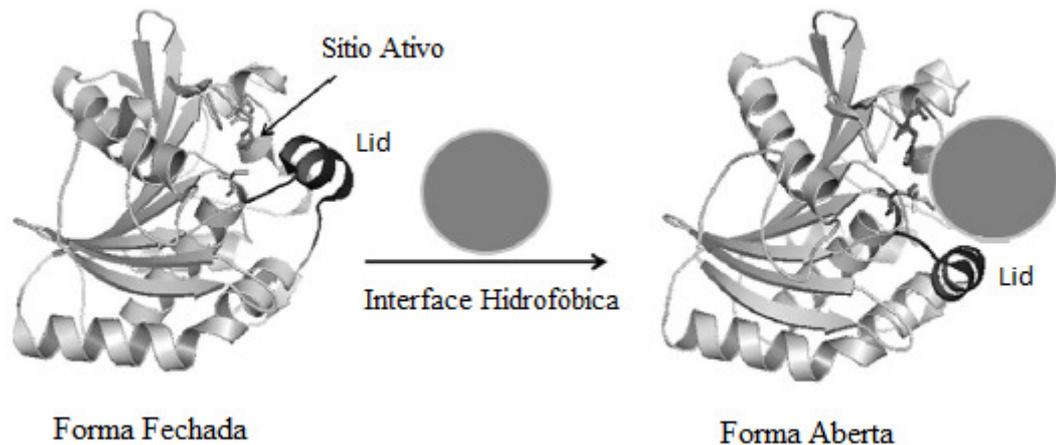


Figura 6 Ativação interfacial da lipase: presença do sítio ativo e lid em configuração fechada e aberta (Adaptado de BARBOSA et al, 2015).

Dessa forma, a ativação interfacial da enzima está relacionada ao aumento da atividade hidrolítica e aos substratos insolúveis, tendo prioridade a ação em substratos emulsionados com interface água-lipídeo e água-solvente orgânico (CORTEZ et al, 2017). A abertura da tampa *lid* apresenta papel importante no que se refere a atividade hidrolítica em algumas lipases, como é o caso das obtidas a partir de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae* (MADEIRA et al, 2016; SÁNCHEZ et al, 2018). No entanto, algumas lipases não apresentam em suas estruturas a tampa *lid* responsável por cobrir o sítio ativo da enzima e determinar sua ativação ou inativação interfacial, além das que não necessitam de interface hidrofóbica para que ocorra a ação catalítica, como é o caso das cutinases produzidas por microrganismos como *Fusarium solani* e *Alternaria solani* (MESSIAS et al, 2011).

1.6 Fermentação em estado submerso

A fermentação submersa, caracterizada pela aplicação dos microrganismos em meio fermentativo líquido e com nutrientes solúveis, é um modelo de processo aplicado a produção de diversos produtos biológicos. O seu uso inicialmente como forma de aumento da capacidade de produção de penicilina durante a segunda guerra mundial tornou-se um marco da aplicação desse processo. Em 1939, Howard Florey e Ernst Chain iniciaram a produção de penicilina via fermentação submersa em escala industrial para fins terapêuticos. Nesta técnica os microrganismos são suspensos em meio líquido rico em nutrientes dissolvidos, o que facilita o controle de parâmetros do processo tais como; homogeneidade do meio de cultura, facilitando no acesso do microrganismo aos nutrientes e concentração de substrato e produto; temperatura; agitação; concentração de indutores; aeração; pH entre outros. Estas são vantagens frente ao processo de fermentação em estado sólido (OLIVEIRA, 2015; PAULOVÁ et al, 2013).

Tipicamente essa configuração de cultivo é adequada a microrganismos que necessitam de alta quantidade de água livre (meio aquoso) para desenvolvimento, como bactérias e leveduras (RAMOS-SÁNCHEZ et al, 2015). É importante, quando se fala de processo fermentativo, manter a esterilidade do meio, principalmente em processos que necessitam de grande disponibilidade de água, pois esse pode ser um vetor de desenvolvimento de organismos competidores. Há possibilidade de que exista uma relação muito próxima entre a morfologia da cultura dos organismos (fungos, bactérias e leveduras) em fermentação submersa e a produção de enzimas por esse processo (OLIVEIRA, 2015; SALIHU et al, 2012).

A determinação de diferentes formas das colônias pode estar relacionada a fatores como nutrientes que compõem o meio de cultivo, a natureza do substrato e condições de cultivo (pH, temperatura e concentração do indutor para produção da enzima desejada). Torna-se difícil inferir as relações gerais entre as variações nas condições de cultivo, na morfologia do organismo e na produção dos metabólitos, em virtude da influência dos parâmetros nas inter-relações estabelecidas nos cultivos (OLIVEIRA, 2015; SALIHU et al, 2012).

Aproximadamente 90% de todos os biocatalisadores (enzimas) industriais são produzidos por algum tipo de fermentação, sendo a fermentação submersa amplamente utilizada com meios de cultivo otimizados e microrganismos adaptados a esses meios. Microrganismos geneticamente modificados consiste em outro ponto importante com objetivo de aumento da produtividade de metabólitos (CONTESINI et al, 2010; PAULOVÁ et al, 2013).

A produção de enzimas em proporções industriais faz-se, frequentemente, por fermentação submersa. A exemplo disso temos, a produção de lipases por essa configuração que é empregada devido a recuperação das enzimas extracelulares e a determinação da massa celular ocorrerem por simples processo de filtração e/ou centrifugação (CORADI et al, 2012; OLIVEIRA, 2015). Atualmente existe uma variedade muito grande de configurações de biorreatores, diferenciados quanto ao sistema de transferência de oxigênio como bandeja ou lagoa; reator de leito fixo; coluna de bolhas; *air-lift*; tanque agitado e aerado; *draught-tube*. Dentre essas configurações, os biorreatores agitados e aerados e os de coluna de borbulhamento estão entre os mais simples e utilizados (LE JOUBIOUX et al, 2014; SALMON et al, 2016).

Os biorreatores agitados mecanicamente STR (*stirred tank reactor* – tanque agitado e aerado) são os mais utilizados para esse tipo de fermentação por apresentarem facilidade de controle de agitação e taxa de aeração. Tendo em vista a aplicação do processo de produção de lipase em escala industrial faz-se necessário o estudo em escala de bancada (de menor proporção) para determinar parâmetros de operação destinados a processos contínuos. Nesse sistema é possível manter os microrganismos na sua fase ascendente de crescimento e de produção dos metabólitos desejados (MACENO et al, 2016; OLIVEIRA, 2015).

Trabalhos como os de Paulová et al (2013) e Salihu et al (2011) fazem referência a utilização da fermentação submersa majoritariamente para a produção de enzimas em virtude das vantagens de operação mais eficiente para os parâmetros de processo, pH, temperatura, taxa de oxigênio, relação carbono/nitrogênio, concentração do substrato; facilidade no controle de grandes volumes e melhor homogeneidade do meio de cultivo, além de facilitar a purificação dos produtos finais.

O tipo de configuração de reatores utilizados nos processos de fermentação visa principalmente a otimização da produção de enzimas por microrganismos adaptados a essa configuração submersa. No entanto, as condições para que esse processo ocorra são importantes para que seja aplicado em configurações industriais com a finalidade de redução de etapas de processo (BRAGA et al, 2015; VANDERMIES et al, 2018).

Logo, torna-se necessária a escolha da configuração do biorreator e a padronização da homogeneidade do meio de cultivo utilizado, bem como a manutenção das variáveis de processo que afetam a produção, tais como temperatura, pH de cultivo, tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio e aeração/agitação (BRAGA et al, 2015; CARDOSO et al, 2009).

1.7 Surfactantes e emulsificantes

Os surfactantes (emulsificantes) são considerados uma classe de compostos anfipáticos que contêm regiões polares e apolares. Moléculas anfifílicas apresentam característica de possuírem região hidrofílica (solúvel em meio aquoso) e uma região hidrofóbica (insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos e lipídios) (SILVA et al, 2016). Os compostos anfipáticos quando misturados em água tem sua região polar de caráter hidrofílico interagindo com a molécula de água e tende a ser dissolvida. No entanto, a região apolar (hidrofóbica) tende a não ter contato com a água, acumulando-se na superfície do solvente em uma interface solvente/ar (FELIPE e DIAS, 2017). Assim as regiões apolares das moléculas tendem a se aglomerar de forma a dispor a menor área hidrofóbica ao solvente hidrofílico. Como consequência desse arranjo as regiões polares são organizadas de forma a potencializar as interações com o solvente aquoso (SANTOS et al, 2018).

Os surfactantes quando adicionados a um solvente polar (como a água) se acumulam na superfície desse solvente formando uma interface solvente/ar. A presença das moléculas de surfactantes na superfície é responsável por reduzir a força de coesão entre as moléculas do solvente que se encontram na superfície e dessa forma diminuir a tensão superficial existente (FELIPE e DIAS, 2017). Após a saturação da superfície entre as fases polar/apolar, a adição de mais moléculas de surfactantes não acarretará na redução da tensão superficial existente. Moléculas de surfactantes adicionadas após a saturação da superfície, formarão agregados moleculares (micelas) tanto no interior da fase polar, quanto no interior da fase apolar (FELIPE e DIAS, 2017; LEHNINGER et al, 2014). A concentração micelar crítica (cmc) corresponde a concentração inicial do processo de formação de micelas, sendo a cmc uma propriedade essencial e característica de cada surfactante. Os surfactantes são aplicados em diferentes processos industriais, biológicos e domésticos, exercendo funções como emulsificante, agentes de suspensão, dispersão de fases e lubrificantes (FELIPE e DIAS, 2017).

Os emulsificantes são usados para manter uma dispersão uniforme de um líquido em outro, com função principal de produzir e estabilizar emulsões. De acordo com a Legislação (Portaria nº 540 de 1997) emitida pelo Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância Sanitária, emulsionante/emulsificante são substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis.

Os surfactantes são classificados de acordo com o grupo presente na parte polar (cabeça) da molécula, distribuídos em catiônicos, aniônicos, anfóteros ou não iônicos. O grupo apolar,

denominado de cauda, é constituída por uma ou duas cadeias carbônicas, ou fluorocarbônicas, ou siloxânicas (CANDON, 2013; FELIPE e DIAS, 2017). Dentre os mais utilizados estão, Triton X-100, o Tween 80, Tween 20 (SANTOS et al, 2018).

1.8 Microrganismos produtores de lipases

Diversos microrganismos são conhecidos como produtores de lipases extracelulares, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (TREICHEL et al, 2010). As lipases podem ser produzidas tanto por organismo eucarioto como por procarioto (CORTEZ et al, 2017), sendo observada inicialmente em bactérias das espécies *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* e *Bacillus fluorescens*, denominadas recentemente *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (MESSIAS et al, 2011).

Os fungos filamentosos são considerados bons produtores de enzimas, e as lipases fúngicas são amplamente aplicadas em processos industriais diversificados. Lipases fúngicas com aplicação comercial são produzidas principalmente por leveduras das espécies *Candida rugosa* (ALMEIDA et al, 2018; BARRIUSO et al., 2016), *Candida antarctica* (ALMEIDA et al, 2018; MOURA et al, 2015), *Candida cylindracea* (ALMEIDA et al, 2018; SALIHU et al., 2011), *Candida viswanathii* (ALMEIDA et al, 2013), *Candida deformans* e *Yarrowia yakushimensis* (GROENEWALD e SMITH, 2013), *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp., *Lipomyces* sp. (RAKICKA et al, 2016), *Yarrowia divulgata* (NAGY et al, 2013) e *Yarrowia lipolytica* (RAKICKA et al, 2016) e fungos filamentosos da espécie *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizomucor* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. (CORTEZ et al, 2017).

Os fungos filamentosos apresentam a capacidade de se desenvolver em substratos de menor complexidade e de baixo custo, além da capacidade de expressar e secretar proteínas. Estas características e os avanços do conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética dos fungos filamentosos tornaram possíveis o uso de seu potencial para a produção de lipase, bem como outras enzimas com possibilidade de aplicação industrial. (CORTEZ et al, 2017).

Dentre os microrganismos produtores de enzimas lipolíticas, as leveduras têm se destacado significativamente devido à diversidade de micro-habitats naturais para essas espécies (VALE, et al, 2015). As leveduras produtoras de lipase proveniente de frutos de oleaginosas são *Aureobasidium pullulans*, *Candida antarctica*, *Candida gropengiesseri*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus buthanensis*,

Kloeckera apis, *Meyerozyma caribbica*, *Metschnikowia reukaufii*, *Pichia guilliermondii*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Starmerella bombicola* e *Yarrowia lipolytica* (ERICSSON et al, 2008; NICAUD, 2012; RAKICKA et al, 2016; VALE et al, 2015).

Os primeiros registros de levedura produtora de lipase se deram no século passado por *Mycotorula lipolítica*. Atualmente a produção de lipase se dá principalmente por leveduras do gênero *Candida* (*C. rugosa*, *C. antarctica* e *C. viswanathii*) e *Yarrowia* (*Y. lipolytica* e *Y. divulgata*) induzidas pela adição de ácidos graxos no meio de cultivo (ácido oleico). As lipases produzidas por esses gêneros têm apresentado capacidade de catalisar reações de esterificação de forma notável, além de apresentarem potencial aplicação na síntese de ésteres de cadeia curta com possibilidade de uso como compostos aromatizantes ou flavorizantes, na síntese de fármacos, bem como na elaboração de detergentes com ação degradante de óleos e gorduras (ALMEIDA et al, 2018; GONÇALVES et al, 2014).

1.9 Aplicações biotecnológicas de lipases

Lipases podem ser produzidas por diferentes organismos, vegetais e microrganismos, embora as lipases produzidas por fungos e leveduras apresentem a vantagem de ser enzimas extracelular, facilitando a recuperação no meio de crescimento (MESSIAS et al, 2011). As lipases são enzimas bastante requeridas para aplicação em diversos segmentos industriais, devido suas múltiplas aplicações e sua forma imobilizada promissora na produção de biocombustíveis e aplicação nas indústrias de papel e celulose, alimentícia, de cosméticos e farmacêutica, indústria de detergentes para uso doméstico e/ou industrial, curtumes, como biossensores, em tratamento de efluentes e uso em hidrólise de lipídios (MESSIAS et al, 2011; PAULOVÁ et al, 2013; TORRELO et al, 2015; TORTORA et al, 2012).

As lipases se tornaram essenciais em processos industriais, especialmente na indústria de detergente em conjunto com outras enzimas de grande importância como proteases, amilases e celulasas, para remoção de óleos e gorduras nos mais variados setores da indústria. Exemplo dessa atuação consiste no tratamento e processamento de couro, limpeza de instalações e tubulações industriais com fluxo de substâncias graxas. Os detergentes produzidos a base biológica possuem boa propriedade de limpeza, apresenta a possibilidade e uso em quantidades reduzidas e diferente dos detergentes sintéticos, são biodegradáveis não apresentando impactos negativos ao meio ambiente (CINELLI et al, 2016; PAULOVÁ et al, 2013; SOUZA et al, 2017).

O uso de lipases nas indústrias químicas, farmacêuticas e de cosméticos tem se intensificado nos últimos anos, por apresentarem atividades com tensoativos e na aromatização de produtos. Alguns agentes tensoativos como, monoacilgliceróis e diacilgliceróis são obtidos a partir da esterificação de gliceríols e são amplamente usados em indústrias farmacêuticas. Em indústrias químicas e farmacêuticas as lipases catalisam reações de acilação, hidrólise regioseletiva e transesterificação em substratos pró-quirais e alguns grupos funcionais como, álcoois e ésteres carboxílicos quirais, aminas e amino-álcoois (MESSIAS et al, 2011).

Na indústria alimentar as lipases têm se tornado importantes no que se refere a intensificação, maturação e produção de aromas e *flavor* em queijos, interesterificação de óleos e gorduras e lipólise de manteiga. Os ácidos graxos de cadeia curta são responsáveis por garantir a formação do *flavor* suave a partir da presença de lipases no meio de produção, isso devido ao tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação. As lipases são aplicadas em indústrias de laticínios e em processamento de peixe, com objetivo de remover lipídios presentes nesses produtos. Na forma de biossensores, as lipases imobilizadas são utilizadas na detecção de ácidos graxos livres e triacilgliceróis presentes em azeites e óleos. Esses ácidos graxos são obtidos com base na hidrólise enzimática seletiva ou parcial dos lipídios. Além da hidrólise de diferentes lipídios as lipases têm sido utilizadas na obtenção de ácido linoleico e α -linolênico, considerados ácidos graxos essenciais (MESSIAS et al, 2011; PATEL et al, 2016).

As lipases apresentam alta versatilidade de aplicação em processos de hidrólise de óleos e gorduras, o que as torna interessantes para aplicação como catalisadores dessas reações em comparação a rotas e reações químicas convencionais a partir de compostos químicos (PATEL et al, 2016). Os métodos aplicados para a produção de ácidos graxos e éster de ácido graxo, ocorrem com hidrólise em alta temperatura e pressão, gerando subprodutos. Os processos catalisados por lipases demonstram melhores condições e facilidade operacional por contar com temperaturas de processo mais brandas, minimização de degradação térmica dos produtos e redução de custo com energia no processo (GUPTA, 2016).

Na indústria de produção de biocombustíveis, em especial o biodiesel, as lipases apresentam potencial aplicação, pelo processo se tratar de um composto de ésteres de ácidos graxos monoalquílicos de cadeia longa, produzidos a partir de óleos e gorduras (triglicerídeos) pela ação de transesterificação de álcool (etanol ou metanol) na presença de um catalizador químico ou biológico. A produção dos biocombustíveis tem apresentado obstáculos em razão da elevada exigência de energia, recuperação de subprodutos do processo (glicerol) e a possibilidade de

formação de reações secundárias que podem gerar compostos não desejados. Dessa forma, a produção de combustíveis com o auxílio de catalisadores biológicos, tem despertado atenção por se tratar de um processo promissor ao utilizar a catalise lipolítica. A lipase é responsável por catalisar reações com necessidade energética inferior à de compostos químicos, além da possibilidade de redução dos custos de produção por imobilização da enzima, maiores ciclos de uso e maior estabilidade enzimática (EL-BATAL et al, 2016; ZHAO et al, 2015).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA-LOIS, L.; SEGAL-KISCHINEVZKY, C. Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. *Beer & Wine Makers. Nature Education*, v. 3, p. 9-17, 2010.

ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Ann Microbiol.* v. 63, p. 1225–1234, 2013. Doi 10.1007/s13213-012-0580-y.

ALMEIDA, A. F.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochemistry* n. 65, p. 71–80, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.019>.

AMINE, A.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* v. 76, p. 180–194, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.010>.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 7, p. 257–270, 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/382062>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2019.

AZEVEDO, A. N. G.; LIMA, B. G. A. Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional. *Revista Direito Ambiental e sociedade*, v. 6, n. 1, p. 77-100, 2016.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Research review paper. Elsevier. Biotechnology Advances* v. 33, p. 435–456, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.

BARRIUSO, J.; VAQUERO, M. E.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*, n. 34, p. 874–885, 2016.

BENEITO-CAMBRA, M.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; RAMIS-RAMOS, G. Rapid classification of enzymes in cleaning products by hydrolysis, mass spectrometry and linear discriminant analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. v.22, p. 3667–3672, 2008.

BON, E. P. S.; GIRIO, F.; PEREIRA JR, N. Enzimas na Produção de Etanol. In: Elba P.S. Bon, Maria Antonieta Ferrara, Maria Luísa Corvo. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia Produção, Aplicações e Mercado*. 10 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda., v. 1, p. 241-269, 2008.

BRAGA, A.; GOMES, N.; BELO, I. Lipase Induction in *Yarrowia lipolytica* for Castor Oil Hydrolysis and Its Effect on γ -Decalactone Production. *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 89, p. 1041–1047, 2012. <https://link.springer.com/journal/11746>.

BRAGA, A.; MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C.; BELO, I. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology. *Biochemical Engineering Journal*. v. 93, p. 55–62, 2015.

BRANCO, L. G. B. Biocombustíveis: Vantagens e desafios. *Revista Eletrônica de Energia*. v. 3, n.1, p. 16-33, 2013.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 85, p. 1735–1750, 2010. Doi 10.1007/s00253-009-2398-5.

BRÍGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 101, p. 148– 158, 2014.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A.M.; DE OLIVEIRA, E.; 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*. 101: 268-275, 2010.

CANDON, Aditivos para Alimentos Ltda. Dossiê Emulsificantes. *Food Ingredients Brasil*, n. 24, p. 51-61, 2013. www.candon.com.br.

CARDOSO, E. R.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Nutrition and growth of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Summa Phytopathologica*, v.35, n. 4, p.267-272, 2009.

CINELLI, P.; SCHMID, M.; BUGNICOURT, E.; COLTELLI, M. B.; LAZZERI, A. Recyclability of PET/WPI/PE Multilayer Films by Removal of Whey Protein Isolate-Based Coatings with Enzymatic Detergents. *Materials*, v. 9, n. 473, p. 1-15, 2016. Doi:10.3390/ma9060473.

COELHO, L. V. A.; BORBA, C. B. A.; MELO, E. J. V.; SILVA, L. A. O. The *Streptomyces* potential in isolated from maués region in hydrolytic enzymes production. *Revista Ciência e Natura*, Santa Maria – UFSM, v.39, n.2, p. 202-210, 2017. ISSN on-line: 2179-460X.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COLLA, E.; MARGARITES, A. C.; COSTA, J. A. V. Production of Lipases by a Newly Isolate of *Aspergillus niger* Using Agroindustrial Wastes by Solid State Fermentation. *Current Biotechnology*. v. 6, n. 4. 2016. Doi: 10.2174/2211550105666160608123800.

CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 163–171, 2010.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma*. *Ann Microbiol*. Doi 10.1007/s13213-012-0500-1. 2012.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. E ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, v. 40, n.1, p. 85-96, 2017. ISSN 0100-4042.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*. v. 22, n. 6, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000600014>.

CURRAN, M. P.; HOWES, S. W. Soil disturbance concerns regarding the use of forest biomass as a source of energy: Examples from Pacific Northwestern North America. *biomass and bioenergy*. v.35, p. 4547-4556, 2011. Doi: 10.1016/j.biombioe.2011.09.017.

DESTOUNI, G.; FRANK, H. Renewable Energy. *AMBIO*. v. 39, p. 18–21. 2010. Doi 10.1007/s13280-010-0059-7.

EGERMEIER, M.; RUSSMAYER, H.; SAUER, M.; MARX, H. Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol. *Frontiers in Microbiology*. n. 8, v. 49. 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00049.

ELLEUCHE, S.; SCHRÖDER, C.; SAHM, K.; ANTRANIKIAN, G. Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 29, p. 116–123, 2014.

ELLEUCHE, S.; SCHRÄDER, C; SAHM, K; SCHRÖDER, C; ANTRANIKIAN, G. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*. v. 25, p. 113-119, 2015.

EL-BATAL, A. et al. Biodiesel Production by *Aspergillus niger* Lipase Immobilized on Barium Ferrite Magnetic Nanoparticles. *Bioengineering*, v. 3, n. 2, p. 14, 2016.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. *Journal of Molecular Biology*, v. 376, p. 109-119, 2008.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. *Quím. nova esc. – São Paulo-SP, BR*. v. 39, n° 3, p. 228-236, 2017.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. *Yarrowia lipolytica* and Its Multiple Applications in the Biotechnological Industry. *The Scientific World Journal*. Volume 2014, Article ID 476207, 14 pages. 2014.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International*. Article ID 154549, 10 pages. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/154549>.

GROENEWALD, M.; SMITH, M. T. The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 103, p. 1023–1028, 2013. Doi 10.1007/s10482-013-9882-8.

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 4, n. 2, p. 1797–1809, 2016.

GUTIÉRREZ-ARNILLAS, E.; ARELLANO, M.; DEIVE, F. J.; RODRÍGUEZ, A.; SANROMÁN, M. Á. Unravelling the suitability of biological induction for halophilic lipase production by *Halomonas* sp. LM1C cultures. *Bioresource Technology*. v. 239, p. 368–377, 2017.

HANKO, E. K. R.; DENBY, C. M.; SÀNCHEZ I NOGUÉ, V.; LIN, W.; RAMIREZ, K. J.; SINGER, C. A.; BECKHAM, G. T.; KEASLING, J. D. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metabolic Engineering*, n. 48, p. 52–62, 2018.

HUANG, Q.; RODGERS, J. M.; HEMLEY, R. J.; ICHIYE, T. Extreme biophysics: Enzymes Under Pressure. *Journal of Computational Chemistry*. v. 38, n. 15, p. 1174–1182, 2017.

HUXLEY, T. H. Popular Lectures and Addresses II. Chapter IV, Yeast (1871). Macmillan, 1894.

IBRAHIM, C. O. Development of applications of industrial enzymes from *Malaysian indigenous* microbial sources. *Bioresource technology* v. 99, n. 11, p. 4572–4582, 2008.

KIELISZEK, M.; BŁAŻEJAK, S.; BZDUCHA-WRÓBEL A.; KURCZ, A. Effects of Selenium on Morphological Changes in *Candida utilis* ATCC 9950 Yeast Cells. *Biological Trace Element Research*. v. 169, p. 387–393, 2016. Doi 10.1007/s12011-015-0415-3.

LACHANCE, M. A. In defense of yeast sexual life cycles: the forma asexualis – An informal proposal. *Yeast Newsletter* v. 61, p. 24–25, 2012.

LEAVER, D. J.; PATKAR, P.; SINGHA, U. K.; MILLER, M. B.; HAUBRICH, B. A.; CHAUDHURI, M.; NES, W. D. Fluorinated Sterols Are Suicide Inhibitors of Ergosterol Biosynthesis and Growth in *Trypanosoma brucei*. *Chemistry & Biology* v. 22, p. 1374–1383, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.08.017>.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Bioquímica: Princípios de Bioquímica*. 6^o ed. São Paulo: Sarvier, p. 1202, 2014.

LE JOUBIOUX, F.; BRIDIAU, N.; SANEKLI, M.; GRABER, M.; MAUGARD, T. Continuous lipase-catalyzed production of pseudo-ceramides in a packed-bed bioreactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 109, p. 143–153. 2014.

LOPERENA, L.; SORIA, V.; VARELA, H.; LUPO, S.; BERGALLI, A.; GUIGOU, M.; PELLEGRINO, A.; BERNARDO, A.; CALVIÑO, A.; RIVAS, F.; BATISTA, S. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 28, p. 2249–2256, 2012. Doi 10.1007/s11274-012-1032-3.

LORD, C. C.; THOMAS, G. S.; BROWN J. M. Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy

metabolism. *Biochimica et Biophysica ACTA*. n. 1831, v. 4, p. 792-802, 2013. Doi:10.1016/j.bbali.2013.01.002.

LU, J.; DONG, Y.; NG, E. C.; SIEHL, D. L. Novel form of the Michaelis–Menten equation that enables accurate estimation of $(k_{cat}/K_M) \cdot K_I$ with just two rate measurements; utility in directed evolution. *Protein Engineering, Design & Selection*, v. 30, n. 5, p. 395–399, 2017. doi: 10.1093/protein/gzx012.

LU, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy & Environmental Science*. v. 4, p. 2451–2466, 2011. Doi: 10.1039/c0ee00593b.

LUO, Y.; WANG, J.; LIU, B.; WANG, Z.; YUAN, Y.; YUE, T. Effect of Yeast Cell Morphology, Cell Wall Physical Structure and Chemical Composition on Patulin Adsorption. *PLOS ONE* v. 10, n. 8, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0136045.

MACENO, M. A. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L. Production of Cellulases by *Phanerochaete* sp. Using Empty Fruit Bunches of Palm (EFB) as Substrate: Optimization and Scale-Up of Process in Bubble Column and Stirred Tank Bioreactors (STR). *Waste Biomass Valor.* v. 7, p. 1327–1337, 2016. Doi 10.1007/s12649-016-9503-7.

MADEIRA, P. V. M.; ZOUHIR, S.; BASSO, P.; NEVES, D.; LAUBIER, A.; SALACHA, R.; BLEVES, S.; FAUDRY, E.; CONTRERAS-MARTEL, C.; DESSEN, A. Structural Basis of Lipid Targeting and Destruction by the Type V Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Biology*. n. 428, p. 1790–1803. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.012>.

MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; LAFUENTE, R. F. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 71, p. 53-57, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>.

MARQUES, E. F.; VIEIRA, P. C.; SEVERINO, R. P. Alcaloides acridônicos inibem catepsina I e v. *Química Nova*, v. 39, n. 1, p. 58-62, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150176>.

MATHESH, M.; LUAN, B.; AKANBI, T. O.; WEBER, J. K.; LIU, J.; BARROW, C. J.; ZHOU, R.; YANG, W. Opening Lids: Modulation of Lipase Immobilization by Graphene Oxides. *ACS Catalysis*, v. 6, n. 7, p. 4760–4768, 2016. DOI: 10.1021/acscatal.6b00942.

MCNEILL, J., BARRIE, F. R., BUCK, W. R., DEMOULIN, V., GREUTER, W., HAWKSWORTH, D. L., HERENDEEN, P. S., KNAPP, S., MARHOLD, K. & OTHER AUTHORS. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Koeltz Scientific Books. 2012. <https://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>.

MENEZES, A.; CHING, W. H.; MACEDO, H.; FERNADES, M.; FONSECA, R. Biodiesel. *Repositório – Sebrae*. p. 7-9, 2012.

MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas.

Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. Doi: 10.5433/1679-0375.

MIRETE, S.; MORGANTE, V.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Functional metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 38, p. 143–149, 2016.

MOURA, M. V. H.; SILVA, G. P.; MACHADO, A. C. O.; TORRES, F. A. G.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Displaying Lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* Using the Yeast Surface Display Approach: Prospection of a New Anchor and Characterization of the Whole Cell Biocatalyst. *PLoS ONE* v. 10, n. 10, 2015. Doi:10.1371/journal.pone.0141454.

NAGY, E.; NISS, M.; DLAUCHY, D.; ARNEBORG, N.; NIELSEN, D. S.; PÉTER, G. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* n. 63, p. 4818–4823, 2013. Doi 10.1099/ijms.0.057208-0.

NICAUD, Jean-Marc. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast primer*. v.29, p. 409-418, 2012.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, *Biomolecules*, v. 3, p. 597-611, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed. 6ªed. p. 186-235, 2014.

NGUYEN, T. A. V.; LE, T. D.; PHAN, H. N.; TRAN, L. B. Hydrolysis Activity of Virgin Coconut Oil Using Lipase from Different Sources. *Scientifica*, Article p. 1-6. 2018. ID 9120942

RAKICKA, M.; KIERON, A.; HAPETA, P.; NEUVÉGLISE, C.; LAZAR, Z. Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass and Bioenergy*. v. 92, p. 48-54, 2016.

OLIVEIRA, T. S. Seleção de leveduras produtoras de enzimas hidrolíticas a partir de frutos do cerrado Tocantinese. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2015.

ORTIZ, S.; SIMIONATTO, E. L.; BARROS, A. A. C. avaliação da capacidade fermentativa e do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cct-3174. *COBEQ, Processos Biotecnológicos*, p. 1-7, 2014.

PATEL, M. et al. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. v. 5, n. 8, p. 214–232, 2016.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRÁNYIK, T. Advanced Fermentation Processes. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, n. August 2013, p. 89–110, 2013.

PFLUCK, A. C. D.; BARROS, D. P. C.; FONSECA, L. P.; MELO, E. P. Stability of lipases in miniemulsion systems: Correlation between secondary structure and activity. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 114, p. 7-14, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.03.003>.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. *Catalysis Letters*, Springer. v. 145, n.1, p. 309-345, 2015.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M. C.; CORDOVA, J.; FICKERS, P. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 5, n. 2, p. 1–9, 2015.

RAUWERDINK, A.; KAZLAUSKAS, R. J. How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: The Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β -Hydrolase Fold Enzymes. *ACS Catalysis*. v. 5, n. 10, p. 6153–6176, 2015. Doi: 10.1021/acscatal.5b01539.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 44, n. 4, p. 1121-1131, 2013.

ROBERT, V.; VU, D.; AMOR, A. B. H.; VAN DE WIELE, N.; BROUWER, C.; JABAS, B.; SZOKE, S.; DRIDI, A.; TRIKI, M.; DAOUD, S. B.; CHOUCHE, O.; VAAS, L.; COCK, A.; STALPERS, J. A. ; STALPERS, D.; VERKLEY, G. J.M.; GROENEWALD, M.; SANTOS, F. B.; STEGEHUIS, G.; LI, W.; WU, L.; ZHANG, R.; MA, J.; MIAOMIAO ZHOU, ; GORJÓN, S. P.; EURWILAICHITR, L.; INGSRISWANG, S.; HANSEN, K.; SCHOCH, C.; ROBERTSE, B.; IRINYI, L.; MEYER, W.; CARDINALI, G.; HAWKSWORTH, D. L.; TAYLOR, J. W.; CROUS, P. W. MycoBank gearing up for new horizons. *IMA Fungus*, v. 4, n. 2, p. 371–379, 2013.

RUEDA, N.; ALBUQUERQUE T. L.; BARTOLOME-CABRERO, R.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; DOS SANTOS J. C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octylAmino agarose beads prevents enzyme desorption. *Molecules*, v. 21, n. 5, 2016. Doi: 10.3390/molecules21050646.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 58, p. 36– 44, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 69, p. 66–73, 2011.

SALMON, D. N. X.; FENDRICH, R. C.; CRUZ, M. A.; MONTIBELLER, V. W.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma* sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. v. 114, p. 288–297, 2016.

SÁNCHEZ, D. A.; TONETTO, G. M.; FERREIRA M. L. *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*. n. 115, p. 6–24, 2018. Doi: 10.1002/bit.26458.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J.; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase a substrate pocket for enantioselectivity using a extremely condensed library. PNAS - Exploring Copper Compounds, v. 3, p. 78-83, 2012.

SANNA, M. L.; ZARA, S.; ZARA, G.; MIGHELI, Q.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I. *Pichia fermentans* dimorphic changes depend on the nitrogen source. Fungal Biology. v. 116, p. 769-777, 2012. Doi:10.1016/j.funbio.2012.04.008.

SANTOS, S. F. M.; MELO, A. L. M.; LIMA, A. O.; PEREIRA, L. M. S.; SANTOS, F. A.; MEDEIROS, N. M.; SILVA, M. G. B. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. Revista Saúde & Ciência Online. v. 7, n. 2, p. 413-425, 2018. ISSN 2317-8469.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. Biochimica et Biophysica Acta, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SCALVINI, L.; PIOMELLI, D.; MOLLI, M. Monoglyceride lipase: Structure and inhibitors. Chemistry and Physics of Lipids. v. 197, p.13-24, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.011>.

SHODA, S.; UYAMA, H.; KADOKAWA, JUN-ICHI.; KIMURA, S.; KOBAYASHI, S. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. Chemical Reviews, v. 116, n. 4, p. 2307-2413, 2016.

SILVA, A. S.; VIEIRA, I. M. M.; MOURA, T. M. F.; RUZENE, D. S.; SOUZA, R. R.; SILVA, D. P. Aplicação de biossurfactantes: avaliação de meios de cultivo a base de amido. Anais do VIII Simpósio de Engenharia de Produção de Sergipe, 2016. ISSN 2447-0635.

SOUSA, S. F. et al. Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. ACS Catalysis, v. 5, n. 10, p. 5877-5887, 2015.

SOUZA, T. F. O.; OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, A. F.; FREIRE, D. M. G.; CARMO, F. L. Mapeamento tecnológico da aplicação de proteases em detergentes e composições de limpeza. Cad. Prospec., Salvador, v. 10, n. 2, p.226-236, 2017.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J.; Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. Annu. Rev. Microbiology, v. 68, p.61-80, 2014.

TAYYAB, M.; RASHID, N.; AKHTAR, M. Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 111, n. 3, p. 272-278, 2011.

THOMAS, P.; SOLY, T. A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand Naine and the affinity of Endophytes to the Host. Microbial Ecology. v. 58, n. 4, p. 952-964, 2009.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. *Catalysis Letters*, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia* [recurso eletrônico]. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva ... [et al.]; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, p. 4, 9,159-161; 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess and Technology*. v. 3, p. 182– 196, 2010.

VALE, S. C. S.; GUIMARÃES, A. P. M.; MORAIS, P. B. Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* mart ex Spreng. *Journal Bioenergy e Food Scienc.*, v.2, n. 4, p. 213-225, 2015.

VANDERMIES, M.; KAR, T.; CARLY, F.; NICAUD, J. M.; DELVIGNE, F.; FICKERS, P. *Yarrowia lipolytica* morphological mutant enables lasting in situ immobilization in bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 102, n. 13, p. 5473–5482, 2018.

WANG, X.; LI, D.; WATANABE, T.; SHIGEMORI, Y.; MIKAWA, T.; OKAJIMA, T.; MAO, L.; OHSAKA, T. A Glucose/O₂ Biofuel Cell Using Recombinant Thermophilic Enzymes. *International Journal of Electrochemical Science*. v. 7, p. 1071 – 1078, 2012.

ZHANG, S.; WU, Z. Identification of aminoacid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the Pop Music algorithm. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 2093–2096, 2011.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, X. L.; LI, Y.; XU, H. P.; ZHAO, B. F.; CHEN, L.; ZHANG, X. D. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O₃ grown in fed-batch culture. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 5, p. 1906–1911, 2011.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, n. April, p. 182–197, 2015.

ZENG, SI-YU; LIU, HU-HU; SHI, TIAN-QIONG; SONG, PING; REN, LU-JING; HUANG, HE; JI, XIAO-JUN. Recent Advances in Metabolic Engineering of *Yarrowia lipolytica* for Lipid Overproduction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, n. 120, 1700352 2018. DOI: 10.1002/ejlt.201700352.

CAPÍTULO 2

Produção de lipase por *Yarrowia divulgata* em frascos agitados

Metodologia de superfície de resposta para a produção de lipase por uma nova linhagem de *Yarrowia divulgata* isolada de *Bactris inundata* (Tucum)

RESUMO

Lipases são pertencentes a classe das hidrolases e apresentam importante função de catalisar reações de hidrólise parcial ou total de triglicilglicerois em uma interface óleo-água. Estas enzimas apresentam flexibilidade de suas propriedades o que as tornam atrativas a aplicação industrial. Na produção de biodiesel as lipases apresentam potencial aplicação substituindo os catalizadores químicos e reduzindo a energia necessária para ocorrência das reações de formação do biodiesel. Os objetivos deste estudo foram avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase por *Yarrowia divulgata* utilizando duas fontes de carbono (óleo de oliva e óleo de soja residual) em diferentes concentrações e pH, em cultivo submerso a 30°C e 150 rpm. A resposta aos tratamentos foi representada alinhando os resultados alcançados entre as fontes de carbono testadas, com o óleo de oliva responsável por proporcionar maior produção de lipase, com atividade de 67,0 U.mL⁻¹ em pH 5.3 e 9,97 g.L⁻¹ de óleo. Utilizando óleo de soja residual a produção de lipase foi de 36,0 U.mL⁻¹ em pH 5.0 com 16,22 g.L⁻¹ de óleo. Na cinética de produção da enzima, nos dois óleos a maior atividade foi obtida para o óleo de oliva (57,0 U.mL⁻¹) e 7,37x10⁹ células.mL⁻¹ em comparação ao óleo de soja residual (30,8 U.mL⁻¹) e 4,94x10⁹ células.mL⁻¹. Estes resultados de atividade lipolítica obtidos com o óleo de oliva podem estar associados à presença de ácido oleico, responsável por induzir a produção de lipase em grande parte das leveduras.

Palavras-chave: leveduras, hidrolases, óleos, lipídios.

Surface response methodology for lipase production by *Yarrowia divulgata* strain isolated from *Bactris inundata* (Tucum)

ABSTRACT

Lipases belong to the class of hydrolases and have an important function of catalyzing partial or total hydrolysis reactions of triglycerols at an oil-water interface. These enzymes present flexibility of their properties which make them attractive to the industrial application. In the production of biodiesel, the lipases present potential application replacing the chemical catalysts and reducing the energy necessary for the occurrence of the reactions of biodiesel formation. The objectives of this study were to evaluate the culture conditions for the production of lipase by *Yarrowia divulgata* using two sources of carbon (olive oil and residual soybean oil) at different concentrations and pH, under submerged culture at 30°C and 150 rpm. The response to the treatments was represented by aligning the results obtained between the carbon sources tested, with the olive oil responsible for providing greater lipase production, with activity of 67.0 U.mL⁻¹ at pH 5.3 and 9.97 g.L⁻¹ of oil. Using residual soybean oil the lipase production was 36.0 U.mL⁻¹ at pH 5.0 with 16.22 g.L⁻¹ oil. In the kinetics of enzyme production, in the two oils the highest activity was obtained for olive oil (57.0 U.mL⁻¹) and 7.37x10⁹ cells.mL⁻¹ compared to residual soybean oil (30.8 U.mL⁻¹) and 4.94x10⁹ cells.mL⁻¹. These results of lipolytic activity obtained with olive oil may be associated with the presence of oleic acid, responsible for inducing lipase production in most yeasts.

Keywords: yeasts, hydrolases, oils, lipids.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases E.C. 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e apresentam função de catalisar as reações de hidrólise total ou parcial de triglicéridos (TAG) em diacilgliceróis (DAG) e monoglicéridos (MAG) liberando ácidos graxos livres e glicerol em uma interface óleo-água. São responsáveis por catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação de lipídios, atuando sobre as ligações ésteres dos compostos (BARRIUSO et al, 2016). As lipases provenientes de microrganismos são consideradas biocatalizadores eficientes e com propriedades que as diferem das lipases produzidas por outros organismos, apresentando alta especificidade e seletividade, características catalíticas estáveis, altos rendimentos, o que possibilita a ocorrência das reações a condições brandas e facilidade de produção em larga escala (ALMEIDA et al, 2018; SALES et al, 2017).

Lipases são bastante requeridas para utilização em diversos segmentos industriais devido a suas múltiplas aplicações. As lipases destinadas as indústrias de detergente, a produção de biocombustíveis e uso em hidrólise de óleos e gorduras ou como biossensores em tratamento de efluentes, são mais comumente aplicadas como uma mistura heterogênea livre. Quando destinadas a indústria alimentícia, farmacêutica e de cosmético são requeridas nas formas purificadas e imobilizadas (ALMEIDA et al, 2018; HANKO et al, 2018; PAULOVÁ et al, 2013; TORRELO et al, 2015; TORTORA et al, 2012). As lipases têm sido extensivamente estudadas em relação as suas propriedades bioquímicas e sobre sua aplicação industrial na forma livre ou imobilizada (BRÍGIDA et al, 2014).

A produção dessas enzimas em proporções industriais faz-se, frequentemente, por fermentação submersa utilizando leveduras com capacidade de metabolizar os compostos graxos a partir da produção da lipase (CORADI et al, 2012; TORTORA et al, 2012). A fermentação submersa é mais aplicada para a produção de enzimas em virtude das vantagens de operação mais eficiente para os parâmetros de processo: pH, temperatura, taxa de oxigênio, relação carbono/nitrogênio, concentração do substrato; facilidade no controle de grandes volumes e melhor homogeneidade do meio de cultivo, além de facilitar a purificação dos produtos finais (MACENO et al, 2016; PAULOVÁ et al, 2013).

Entre as leveduras produtoras de lipase as do gênero *Yarrowia* apresentam características fisiológicas, metabólicas e bioquímicas que as tornam leveduras eficientes na produção dessas enzimas (RAKICKA et al, 2015). Apresentam a capacidade em utilizar eficientemente substratos hidrofóbicos para produção de lipase (HANKO et al, 2018). Pertencente a esse gênero, a espécie *Yarrowia divulgata* tem como características morfológicas colônias esféricas, lisas, elevadas, sem brilho e coloração creme. Estas leveduras apresentam característica de dimorfismo das células, podendo crescer como célula unicelular esférica, subesférica ou elipsoidal, ou ainda com uma estrutura alongada (pseudo-hifas). Essa variação na morfologia do organismo ocorre por limitações de nutrientes disponíveis ao crescimento do microrganismo no meio de cultivo (EGERMEIER et al, 2017; NAGY et al, 2013; ORTIZ et al, 2014).

A *Y. divulgata* apresenta capacidade de assimilar os substratos hidrofóbicos que são utilizados como fonte de carbono responsável por induzir a produção de lipase. A indução de lipase ocorre quando há quantidades significativas de ésteres de ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa (Ácido Oleico - 18:1 Δ^9), presentes em óleo de oliva (azeite), óleo de soja, óleo de girassol dentre outros (ALMEIDA et al, 2013; NGUYEN et al, 2018; RAKICKA et al, 2016). O objetivo deste estudo foi avaliar as condições de cultivo submerso para a produção de lipase por *Yarrowia divulgata* utilizando duas fontes de carbono (óleo de oliva e óleo de soja residual) em diferentes concentrações e pH.

2. METODOLOGIA

2.1 Linhagem de levedura

A linhagem de levedura utilizada neste trabalho pertence à espécie *Yarrowia divulgata* e faz parte da coleção de culturas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins - UFT. Esta linhagem foi isolada a partir de frutos da palmeira Tucum (*Bactris inundata*), sendo preservada a -80°C em caldo GYMP/glicerol. A identificação da linhagem foi feita através do sequenciamento dos domínios D1/D2 do rRNA (ID = 99%; GenBank accession number: EU194451.1).

2.2 Obtenção do inóculo

A levedura foi reativada em Ágar Sabouraud (5% de glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 2% de ágar) utilizando a técnica de esgotamento por estrias. As placas foram incubadas por um período de 48 horas a 28°C . Para a preparação do inóculo, foi feita uma suspensão celular em solução salina estéril (0,85% de NaCl) e um volume adequado dessa suspensão foi utilizado para inocular os meios para produção de lipase, de modo a se obter uma concentração inicial de 10^6 células. mL^{-1} . A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico comum.

2.3 Produção de lipase em frascos agitados

A produção de lipase ocorreu em frascos Erlenmeyer contendo 50mL de meio de cultivo composto por 0,2% MgSO_4 , 0,2% KH_2PO_4 , 1,0% de peptona, 1,0% de extrato de levedura, 3,0% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (BUSSAMARA et al, 2010). O meio de cultivo foi preparado com o tampão McIlvaine 0,2 M. Utilizou-se azeite de oliva extra virgem adquirido no comércio local e o óleo de fritura foi coletado em uma feira livre da cidade de Palmas – TO, proveniente da fritura de pasteis.

Para se avaliar a influência das variáveis concentração de óleo e pH na produção de lipase utilizou-se um planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR) com 4 ensaios, mais 4 ensaios nas condições dos pontos axiais e 3 repetições do ponto central, segundo metodologia descrita por Rodrigues e Iemma (2014) (Tabela 1). Para cada tipo de óleo (azeite de oliva ou óleo residual de fritura) foi realizado um

DCCR independente. Os resultados obtidos foram analisados através de ANOVA a 10% de significância usando o *software Protimiza Experimental Design*.

Tabela 1 Valores de concentração de óleo e pH utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR (2^2).

Variáveis	Níveis				
	-1,41 (- α)	-1	0	+1	+1,41 (+ α)
Concentração de óleo (g.L ⁻¹)	5,0	7,9	15	22,1	25
pH	3,0	3,6	5,0	6,4	7,0

Os frascos foram incubados a 30°C e 150 rpm por 48 horas. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 60 minutos em centrífuga refrigerada e o sobrenadante (extrato enzimático bruto – EEB) foi congelado para posterior medida da atividade enzimática. A partir dos resultados obtidos em cada DCCR, foram determinados o melhor pH e a melhor concentração de óleo para a produção de lipase para cada óleo. A fim de se verificar qual a melhor fonte indutora para a produção de lipase, foram realizados ensaios, em 5 repetições, para cada tipo de óleo nas melhores condições determinadas. Os frascos foram incubados nas mesmas condições descritas acima e foram acompanhadas a atividade lipolítica e contagem celular a cada 24h até 96h de incubação.

2.4 Medida da atividade lipolítica

A medida da atividade lipolítica foi realizada por método titulométrico segundo a metodologia descrita por Freire et al (1997). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de lipase em frascos agitados

A utilização da ferramenta de planejamento experimental objetivou estabelecer as melhores condições para a produção de lipases apresentando um número reduzido de experimentos. Os resultados da contagem de células e atividade lipolítica para o óleo de oliva e o óleo residual podem ser observados na Tabelas 2. A contagem inicial de células (t_0) foi de $8,70 \times 10^6$ e $1,29 \times 10^6$ células.mL⁻¹ para os meios com óleo de oliva e óleo residual de soja, respectivamente.

Tabela 2 Contagem de células e atividade lipolítica para o óleo de oliva e o óleo residual em cada ensaio.

Ensaio	pH	Concentração de óleo (g.L ⁻¹)	Óleo de Oliva		Óleo Residual	
			48 horas		48 horas	
			Células (células.mL ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)	Células (células.mL ⁻¹)	Atividade (U.mL ⁻¹)
1	3,6	7,9	$7,15 \times 10^8$	38,0	$1,00 \times 10^8$	25,0
2	6,4	7,9	$4,97 \times 10^8$	34,0	$1,05 \times 10^8$	19,0
3	3,6	22,1	$6,70 \times 10^7$	39,0	$1,65 \times 10^8$	23,0
4	6,4	22,1	$8,95 \times 10^7$	38,0	$5,30 \times 10^8$	21,0
5	3,0	15	$1,23 \times 10^8$	39,0	$3,15 \times 10^8$	20,0
6	7,0	15	$6,68 \times 10^7$	42,0	$3,85 \times 10^8$	21,0
7	5,0	5	$3,60 \times 10^8$	45,0	$8,90 \times 10^8$	23,0
8	5,0	25	$5,90 \times 10^8$	48,0	$5,55 \times 10^8$	21,0
9	5,0	15	$4,25 \times 10^8$	60,0	$4,25 \times 10^8$	36,0
10	5,0	15	$5,00 \times 10^8$	65,0	$9,85 \times 10^8$	30,0
11	5,0	15	$2,50 \times 10^8$	67,0	$5,35 \times 10^8$	32,0

Para o óleo de oliva os valores de atividade variaram de 34,0 a 67,0 U.mL⁻¹ e a contagem de células de $6,68 \times 10^7$ a $7,15 \times 10^8$ células.mL⁻¹ em 48 horas de cultivo. Para o óleo residual os valores de atividade enzimática ficaram entre 19,0 e 36,0 U.mL⁻¹ e contagem de células entre $1,00 \times 10^8$ e $9,85 \times 10^8$ células.mL⁻¹, para o mesmo período.

Todos os dados seguiram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk. No entanto, a interação entre a concentração de óleo e o pH não foram significativas a 10% segundo a análise de variância (ANOVA). Dessa forma, analisou-se separadamente as melhores condições para o pH e para a concentração de óleo (oliva e residual), e a análise de variância indicou efeito quadrático para ambos os óleos em relação a produção da lipase e a regressão quadrática foi a que melhor se enquadrou para a análise dos dados (Tabelas 3 e 4).

O coeficiente de determinação obtido para a ANOVA do óleo de oliva foi de 90,74% e o óleo residual de soja apresentou 85,81%, com valores moderados de erro e validando os dados para essa configuração. Dessa forma, a variação da produção de lipase é explicada pela regressão da produção em função da concentração de óleo e do pH. Essa avaliação é importante para determinar qual a configuração mais adaptável e assim estabelecendo um parâmetro para a produção da lipase pela *Y. divulgata*.

Tabela 3 Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de lipase para óleo de oliva.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F calc	p valor
Regressão	1253,8	2,0	626,9	39,2	0,00007
Resíduos	127,9	8,0	16,0		
Falta de Ajuste	101,9	6,0	17,0	1,3	0,09435
Erro Puro	26,0	2,0	13,0		
Total	1381,6	10,0			

Coeficiente de determinação: $R^2 = 90,74\%$

Tabela 4 Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de lipase por óleo de soja residual.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F calc	p valor
Regressão	261,0	2,0	130,5	24,2	0,00041
Resíduos	43,2	8,0	5,4		
Falta de Ajuste	24,5	6,0	4,1	0,4	0,10717
Erro Puro	18,7	2,0	9,3		
Total	304,2	10,0			

Coefficientes de determinação: $R^2 = 85,81\%$

A equação de regressão obtida para a atividade enzimática em função do pH e concentração de óleo de oliva é determinada segundo a equação (2) e para o óleo residual determinada segundo a equação (3) em que:

$$y = 64 - 13,25x_1^2 - 10,25x_2^2 \quad (2)$$

$$y = 32,67 - 5,90x_1^2 - 5,15x_2^2 \quad (3)$$

y = atividade enzimática; x_1 = pH; x_2 = concentração de óleo (g.L^{-1})

De acordo com os dados de atividades enzimáticas obtidos a partir das equações (2 e 3) e as análises estatísticas, a variável concentração de óleo, assim como o pH, apresentaram ação positiva na produção da lipase. Os maiores valores de atividade lipolítica e de produção de células foram obtidos nos ensaios realizados nas condições do ponto central com pH 5,0 e concentração de óleo de 15 g.L^{-1} apresentando valor máximo de 67,0 U.mL^{-1} no ensaio 11 para o óleo de oliva e o maior valor de atividade (36,0 U.mL^{-1}) no ensaio 9 para o óleo residual (Tabela 2). Os ensaios que correspondem às concentrações superiores a 15 g.L^{-1} e muito inferiores a esse valor demonstraram menor produção de lipase, tanto para o óleo de oliva quanto para o óleo residual.

Ao analisar a resposta da *Y. divulgata* a diferentes condições de cultivo utilizando óleo residual e óleo de oliva é possível observar que a região de máxima atividade (região mais escura) está próxima a região dos pontos centrais, demonstrando o melhor desenvolvimento

dessa levedura em meios com pH mais ácidos (5,0) e concentrações de óleo entre 9,0 e 21,50 g.L⁻¹, Figuras 1 e 2.

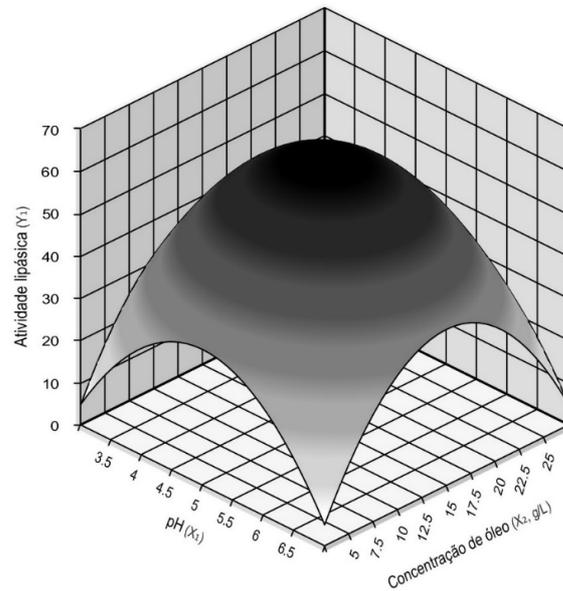


Figura 1 Relação das variáveis pH e concentração de óleo de oliva em relação a atividade enzimática.

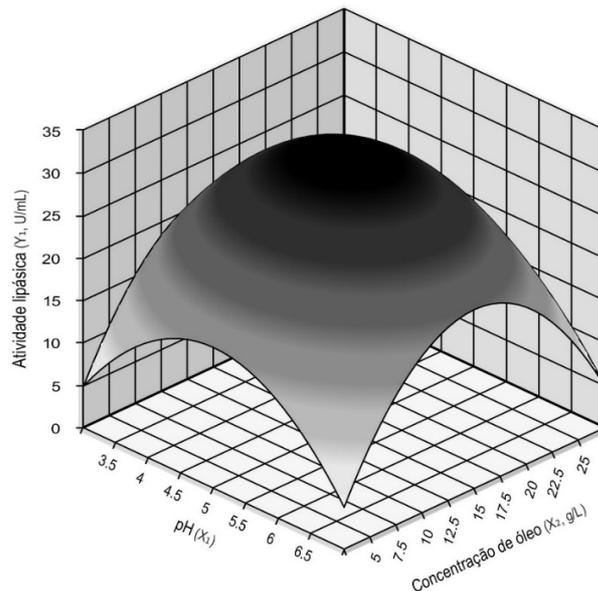


Figura 2 Relação das variáveis pH e concentração de óleo residual em relação a atividade enzimática.

Resultados similares foram observados por Fabiszewska et al (2015) que demonstraram a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* após 65h de cultivo submerso (28°C, 200rpm, pH 5,0) com concentrações de óleo de oliva entre 20 e 30 g.L⁻¹ e determinando que de fato o óleo de oliva é um bom indutor para a produção da enzima em concentrações menores, visto que o aumento da concentração desse substrato resulta na redução da atividade da lipase. Estudos

como de Xiaoyan et al (2017), utilizando óleo residual de cocção, demonstraram a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* M53 após 24h de cultivo em fermentador de 5L do tipo *stirred-tank* (28°C, 250 rpm) obtendo atividade enzimática da ordem de 12,7 U.mL⁻¹.

Valores de atividade enzimática mais elevados são atribuídos ao melhor desenvolvimento das leveduras proporcionado por meios de cultivo com pH mais ácido e concentrações de fonte de carbono e nitrogênio em proporções adequadas, que podem variar de acordo com cada cepa de microrganismo (SALES et al, 2017), como verificado nos testes em pH 5 para a produção de lipase por *Y. divulgata*. A lipase produzida por *Y. divulgata* foi induzida preferencialmente pelo azeite de oliva que possui elevada quantidade de ácido oleico.

Levando em consideração o fator óleo como fonte de carbono para a levedura, as diferenças na composição de ácidos graxos afetam as respostas de atividade lipolítica obtidas (DEIVE et al, 2010). O óleo residual apresenta maior quantidade de ácidos graxos livres devido ao uso em altas temperaturas, o que pode acarretar em uma redução da produção de lipase por *Y. divulgata* nas condições testadas ou pelo fato da elevação da acidez do óleo e a presença de substâncias formadas a partir da degradação do óleo com capacidade de afetar o desenvolvimento da levedura. O aumento na concentração de óleo no meio de cultivo pode influenciar de forma positiva ou negativa a produção da lipase, isso porque as leveduras em concentrações muito elevadas de óleo podem mudar o mecanismo de ação enzimática e não produzir a enzima necessária para atuação no meio.

Dados obtidos por Deive et al (2010) mostraram que a atividade lipolítica mais elevada foi encontrada em ésteres de cadeia média a longa, sustentando a verdadeira característica da lipase, indicando que os ácidos graxos insaturados mais presentes em óleos residuais e no óleo de oliva são os ácidos graxos linoleico (C18:2 Δ^9) e o oleico (C18:1 Δ^9).

O pH no meio é importante para manter a ação das leveduras e reduzir a contaminação do cultivo por outro organismo (bactérias), além de influenciar na ação enzimática no substrato presente. As Alterações de pH podem modificar as cargas dos grupos químicos dos aminoácidos que compõem as lipases (SALES et al, 2017). Baseado nos resultados da estatística e das equações geradas (equações 2 e 3) o valor de pH e concentração de óleo (oliva e residual) ideais para a produção de lipase pela linhagem *Y. divulgata* foi de pH 5,30 e 9,97 g.L⁻¹ para o óleo de oliva e pH 5,0 e 16,22 g.L⁻¹ para o óleo residual. Essas condições foram utilizadas para as fermentações posteriores, para o acompanhamento da cinética da produção de lipase e crescimento celular ao longo de 96 horas de incubação.

3.2 Cinética da produção de lipase

Como forma de comparar o comportamento da *Y. divulgata* para a produção de lipase de acordo com a fonte de carbono, foram realizados ensaios nas condições ótimas obtidas a partir dos planejamentos experimentais realizados. Para o óleo de oliva foi utilizada concentração de 9,97 g.L⁻¹ e pH 5,3 e para o óleo residual concentração de 16,22 g.L⁻¹ com pH 5,0. Os cultivos foram feitos em 5 repetições por 96h a 30°C e 150rpm, com amostras coletadas a cada 24 horas.

Os resultados obtidos nesses ensaios foram condizentes com os obtidos no planejamento experimental e os maiores valores de atividades foram obtidos com 48h de cultivo, tanto para o óleo de oliva quanto para óleo residual de soja. A atividade lipolítica foi de 57,0 U.mL⁻¹ para o óleo de oliva e 30,8 U.mL⁻¹ para o óleo residual. A contagem células para o óleo de oliva foi 7,37x10⁹ e 4,94x10⁹ para o óleo residual de acordo com a Figura 3.

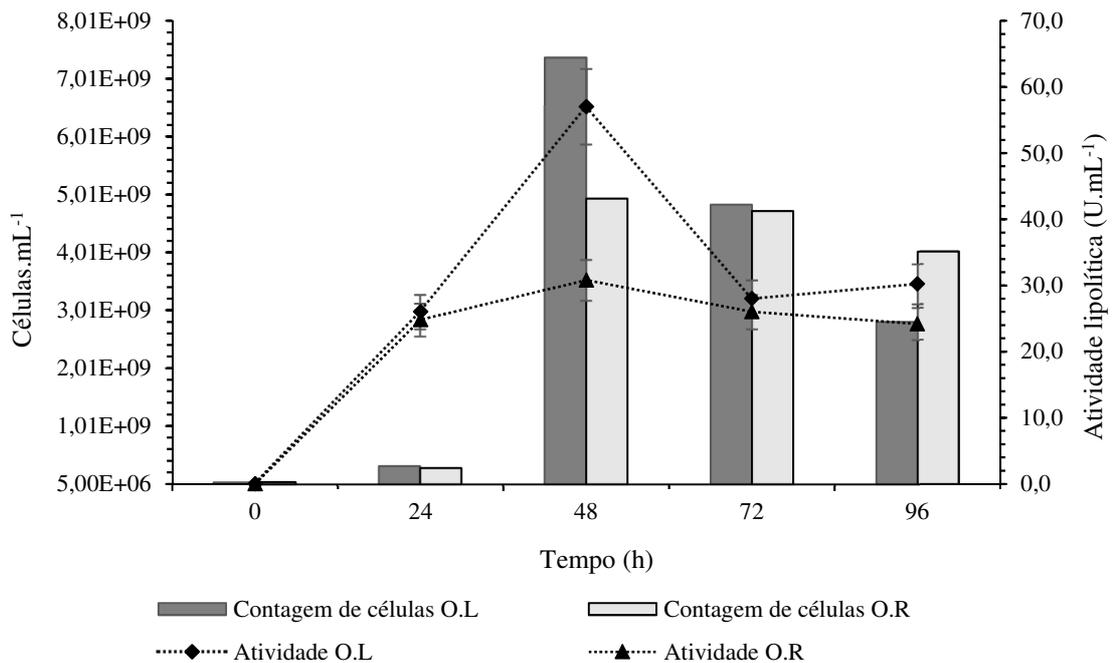


Figura 3 Influência do óleo de oliva (barra escura) e residual (barra clara) no crescimento celular e na produção de lipase em meio de cultivo composto por 0,2% MgSO₄, 0,2% KH₂PO₄, 1,0% de peptona, 1,0% de extrato de levedura, 3,0% de (NH₄)₂SO₄ e com 9,97 g.L⁻¹ de óleo de oliva e pH 5,3 (◆) e 16,22 g.L⁻¹ de óleo residual com pH 5,0 (▲) a 30°C e 150rpm.

Resultados semelhantes em cultivos submersos sem taxa de alimentação de fonte de carbono foram descritos por Deive et al (2010) que avaliaram o curso do tempo de crescimento da *Y. lipolytica* CECT 1240 em condição limitante de substrato (fonte de carbono), demonstrando que a fase estacionária foi atingida do 3º para o 4º dia, indicando que o substrato

é um fator limitante no desenvolvimento da levedura. Após as 48h de cultivo ocorreu a fase estacionária e de declínio da cultura, observada pela contagem de células com média de $2,81 \times 10^9$ e de $6,18 \times 10^8$ e a redução da atividade lipolítica para 30,2 e 24,2 U.mL⁻¹ para o óleo de oliva e óleo de soja residual, respectivamente. Em ambos os casos observou-se o aumento da atividade lipolítica e do número de células ao longo do período de incubação, o que demonstra que a produção de lipase acompanha a curva de crescimento celular.

Ao comparar os dados obtidos com a literatura, observou-se que o comportamento das leveduras lipolíticas frente ao uso de óleo residual como fonte de carbono foi similar, com menor produção de lipase em comparação ao uso de óleo de oliva. Estudos como de Ribeiro et al (2011) expressam a produção de lipase a partir de diferentes matérias-primas utilizadas em fermentação submersa com óleo de oliva e óleo de soja residual como indutores da produção, obtendo 21,0 U.mL⁻¹ (120 horas) para *Penicillium* sp. e 5,3 U.mL⁻¹ (18 horas) para *Pseudozyma hubeiensis* HB85A.

4. CONCLUSÃO

A metodologia de superfície de resposta mostrou-se adequada para a otimização das condições para produção de lipase pela linhagem *Y. divulgata* com maiores atividades em pH 5,0 e concentração de 16,22 g.L⁻¹ de óleo de soja residual (30,8 U.mL⁻¹) e pH 5,3 e concentração de 9,97 g.L⁻¹ de óleo de oliva (57,0 U.mL⁻¹), sendo que o tempo de cultivo ideal para maior produção da lipase foi de 48h para ambos os óleos. Também houve maior acúmulo de células após 48h de cultivo. Os resultados mostram que o óleo de oliva é a fonte de carbono mais adequada para a produção de lipase para a linhagem *Y. divulgata*, em comparação ao óleo residual.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo suporte no trabalho e pela bolsa concedida ao primeiro autor. A Dra. Paula Benevide de Moraes por ceder a linhagem de levedura *Yarrowia divulgata* para este estudo.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Ann Microbiol.* v. 63, p. 1225–1234, 2013. Doi 10.1007/s13213-012-0580-y.
- ALMEIDA, A. F.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochemistry* n. 65, p. 71–80, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.019>.
- BARRIUSO, J.; VAQUERO, M. E.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*, n. 34, p. 874–885, 2016.
- BRÍGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* v. 101, p. 148–158, 2014.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A.M.; DE OLIVEIRA, E.; 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.* 101: 268-275, 2010.
- CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma*. *Ann Microbiol.* Doi 10.1007/s13213-012-0500-1. 2012.
- DEIVE, F. J.; SANROMANA, M. A.; LONGO, M. A. A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* v. 85, p. 258–266, 2010. Doi 10.1002/jctb.2301.
- EGERMEIER, M.; RUSSMAYER, H.; SAUER, M.; MARX, H. Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol. *Frontiers in Microbiology.* n. 8, v. 49. 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00049.
- FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Ann Microbiol* n. 65, p. 1495-1503, 2015. DOI 10.1007/s13213-014-0988-7.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* n.63, p. 429-421, 1997.
- HANKO, E. K. R.; DENBY, C. M.; SÁNCHEZ I NOGUÉ, V.; LIN, W.; RAMIREZ, K. J.; SINGER, C. A.; BECKHAM, G. T.; KEASLING, J. D. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metabolic Engineering*, n. 48, p. 52–62, 2018.

MACENO, M. A. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L. Production of Cellulases by *Phanerochaete* sp. Using Empty Fruit Bunches of Palm (EFB) as Substrate: Optimization and Scale-Up of Process in Bubble Column and Stirred Tank Bioreactors (STR). *Waste Biomass Valor.* v. 7, p. 1327–1337, 2016. Doi 10.1007/s12649-016-9503-7.

NAGY, E.; NISS, M.; DLAUCHY, D.; ARNEBORG, N.; NIELSEN, D. S.; PÉTER, G. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* n. 63, p. 4818–4823, 2013. Doi 10.1099/ijms.0.057208-0.

NGUYEN, T. A. V.; LE, T. D.; PHAN, H. N.; TRAN, L. B. Hydrolysis Activity of Virgin Coconut Oil Using Lipase from Different Sources. *Scientifica*, Article p. 1-6. 2018. ID 9120942

ORTIZ, S.; SIMIONATTO, E. L.; BARROS, A. A. C. avaliação da capacidade fermentativa e do crescimento celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cct-3174. *COBEQ, Processos Biotecnológicos*, p. 1-7, 2014.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRÁNYIK, T. Advanced Fermentation Processes. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, n. August 2013, p. 89–110, 2013.

RAKICKA, M.; KIERON, A.; HAPETA, P.; NEUVÉGLISE, C.; LAZAR, Z. Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass and Bioenergy.* v. 92, p. 48-54, 2016.

RAKICKA, M.; LAZAR, Z.; DULERMO, T.; FICKERS, P.; NICAUD, J. M. Lipid production by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* using industrial by-products under different culture conditions. *Biotechnology for Biofuels*, v.8, n. 104, 2015. DOI 10.1186/s13068-015-0286-z.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, 2011. Article ID 615803, 16 pages. 2011. Doi:10.4061/2011/615803.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Casa do Pão Editora, 2014.

SALES, P. S. C.; FONSECA, T. C. S.; AMARAL, F. A. P. C.; SILVA, C. A. A. Production of lipase by *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 in through submerged fermentation in different culture media. *Engevista*, v. 19, n. 5, p. 1340-1351, 2017.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. *Catalysis Letters*, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia* [recurso eletrônico]. Tradução: Aristóboles Mendes da Silva ... [et al.]; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. 10 ed. Dados eletrônicos, Porto Alegre: Artmed, p. 4, 9,159-161; 2012.

XIAOYAN L.; XINJUN Y.; JINSHUN, L.; JIAXING, X.; JUN, X.; ZHEN, W.; TONG, Z.; YUANFANG, D. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food and Bioproducts Processing.* n. 103, p. 86–94, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.002>.

CAPÍTULO 3

Caracterização parcial da lipase produzida por *Yarrowia divulgata*

Uso de Biorreator agitado para a produção de lipase por *Y. divulgata*: efeito da agitação, emulsificantes e propriedades bioquímicas da enzima bruta

RESUMO

As lipases são utilizadas em vários processos industriais, incluindo a área de cosméticos, síntese de fármacos e na formulação de detergentes para degradação de óleos e gorduras. A ação de surfactantes e íons na atividade da lipase pode ser positiva, promovendo a ativação da enzima, ou negativa, por inibição da ação enzimática. A estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura garante maior atuação da lipase em processos industriais. Esta atuação em substratos hidrofóbicos está ligada à sua estrutura tridimensional. Foi avaliada a produção de lipase pela levedura *Yarrowia divulgata* em biorreator de bancada a 28°C durante 72h de cultivo com variação da agitação entre 200 e 400 rpm e a influência da adição de surfactantes e emulsificantes (Tween 20, lecitina de soja e goma xantana) na produção da lipase. A lipase produzida foi caracterizada quanto a atividade e estabilidade em diferentes temperaturas, pH, íons metálicos e foi avaliada a influência de solventes e surfactantes na atividade enzimática. Os resultados de atividade lipolítica foram obtidos com agitação de 300 rpm após 48h de cultivo (2,939 U.mL⁻¹), porém a maior contagem de células, 2,56x10⁹ células.mL⁻¹, foi obtida sob agitação de 400rpm. Os ensaios sob agitação de 200 rpm demonstraram menor atividade (1,696 U.mL⁻¹) e menor acúmulo de células (2,75x10⁹) durante as 72h de cultivo. Os ensaios utilizando Tween 20, lecitina de soja e goma xantana apresentaram dados inferiores, com atividades de 1,400, 1,466 e 2,534 U.mL⁻¹ e contagem de células de 1,41 x10⁹, 1,41 x10⁹ e 1,37x10⁹ em 48h de cultivo sob agitação de 300 rpm. O EEB apresentou estabilidade em faixa de pH 3.0 a 8.0, com atividade lipolítica acima de 50% e de pH 3.0 a 6.0 com atividade residual próxima dos 100%. O íon Mn²⁺ foi o único responsável por proporcionar ativação do EEB nas concentrações de 5mM e 10mM e os íons Mg²⁺, Zn²⁺ e Ca²⁺ apresentaram efeito de ativação do EEB apenas em concentração de 5mM. Os surfactantes influenciaram de forma negativa na atividade lipolítica, com exceção do Triton X-100 (1%). Os solventes orgânicos apresentaram ativação da lipase apenas em 1% e o DMSO apresentou influência positiva em 1% e 10%.

Palavras-chave: surfactantes, solventes orgânicos, estabilidade, ativação enzimática.

Stirred tank bioreactor use to lipase production from *Y. divulgata*: effect of agitation, emulsifiers and biochemical properties of crude enzyme

ABSTRACT

Lipases are used in a number of industrial processes, including the cosmetics area, drug synthesis and in the detergent formulation for degradation of oils and fats. The action of surfactants and ions on lipase activity may be positive, promoting the activation of the enzyme, or negative, by inhibition of the enzymatic action. Stability over a wide range of pH and temperature ensures greater lipase performance in industrial processes. This performance in hydrophobic substrates is linked to its three-dimensional structure. Lipase production by yeast *Yarrowia divulgata* in bench bioreactor at 28 °C for 72 h of culture with varying stirring between 200 and 400 rpm and the influence of the addition of surfactants and emulsifiers (Tween 20, soybean lecithin and xanthan gum) in lipase production. The lipase produced was characterized for activity and stability at different temperatures, pH, metal ions and the influence of solvents and surfactants on the enzymatic activity was evaluated. The results of lipolytic activity were obtained with shaking at 300 rpm after 48h of culture (2,939 U.mL⁻¹), but the highest cell count, 2.56x10⁹ cells.mL⁻¹, was obtained under shaking at 400 rpm. The 200 rpm agitated assays showed lower activity (1.696 U.mL⁻¹) and less accumulation of cells (2.75x10⁹) during the 72 hours of culture. The assays using Tween 20, soybean lecithin and xanthan gum showed lower data, with activities of 1,400, 1,466 and 2,534 U.mL⁻¹ and cell counts of 1.41 x10⁹, 1.41 x10⁹ and 1.37x10⁹ in 48h of culture under agitation of 300 rpm. EEB showed stability in the range of pH 3.0 to 8.0, with lipolytic activity above 50% and pH 3.0 to 6.0 with residual activity close to 100%. The Mn²⁺ ion was the only one responsible for providing EEB activation at concentrations of 5mM and 10mM, and the Mg²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ ions presented at EEB activation effect only at 5mM concentration. Surfactants negatively influenced lipolytic activity, with the exception of Triton X-100 (1%). The organic solvents presented activation of the lipase only in 1% and DMSO had a positive influence in 1% and 10%.

Keywords: surfactants, organic solvents, stability, enzymatic activation.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são moléculas protéicas que agem como catalisadores de reações químicas reduzindo a energia de ativação e aumentando a velocidade de reação devido ao alto grau de especificidade da enzima com o substrato. Atuam em baixas concentrações e sob condições moderadas de temperatura e pH (COLLA et al, 2016). As lipases podem ser obtidas a partir de diferentes espécies de animais, plantas e microrganismos (SALES et al, 2017), sendo que as lipases microbianas são as que apresentam estabilidade térmica mais elevada (PFLUCK et al, 2018).

A produção de lipase em escala industrial ocorre principalmente por fermentação submersa com meios de cultivo otimizados e microrganismos adaptados a esses processos. Com o uso de grandes volumes de meio de cultivo e por necessidade de larga produção, os biorreatores são aplicados a essa finalidade. Existe uma variedade de configurações de biorreatores que diferem quanto ao sistema de agitação e transferência de oxigênio, sendo importante o estudo do tipo de fermentador que proporcionará melhor desenvolvimento do microrganismo a ser utilizado (CORADI et al, 2012).

Os biorreatores agitados mecanicamente (STR – *stirred tank reactor*) são os mais utilizados para as fermentações por apresentarem facilidade de controle de agitação e taxa de aeração. Tendo em vista a aplicação do processo de produção de lipase em escala industrial é necessário determinar os parâmetros de operação para o processo contínuo, mantendo o microrganismo sempre em sua fase exponencial de crescimento e de produção dos metabólitos desejados (LE JOUBIOUX et al, 2014; MACENO et al, 2016; SALMON et al, 2016).

A ação de surfactantes e íons na atividade da lipase pode ser positiva, como mecanismo de ativação da enzima, ou negativa, por um mecanismo de inibição da ação enzimática. A concentração em que estes compostos se apresentam no meio reacional é importante para determinar a influência na estabilidade enzimática (BARROS et al, 2015). Os íons metálicos atuam como agentes eletrofílicos com capacidade de ativar o centro de reação ou podem ter a função de ativadores eletrofílicos que geram cátions hidroxila a partir de uma molécula de água (SOUZA et al, 2015).

O pH e a temperatura também são fatores que influenciam a ação das lipases. As lipases microbianas apresentam característica de melhor atividade em pH neutros ou alcalinos e em temperaturas moderadas. No entanto, algumas lipases têm melhor atividade enzimáticas em pH

ácido, importantes em aplicações industriais (ALVES et al, 2017). Lipases provenientes de *Yarrowia lipolytica* demonstram a tolerância e sua ação eficiente em temperaturas mais elevadas (entre 37°C e 50°C) com rendimentos superiores a 80% e o extrato enzimático bruto apresenta uma abrangente faixa de pH e temperatura (SANTOS et al, 2015).

Lipases são utilizadas em diversos processos industriais, incluindo a síntese de fármacos, aplicadas a área de cosméticos e na formulação de detergentes para degradação de óleos e gorduras (TORRELO et al, 2015). As lipases são enzimas bastante requeridas em diversos processos industriais como catalisadores biológicos, reduzindo a utilização de catalisadores químicos e problemas causados por uso de compostos químicos aos efluentes gerados pela indústria. Essas enzimas apresentam-se como um grupo de biocatalisadores importantes devido a sua alta especificidade e seletividade promovendo reações sob condições moderadas. O uso de sua forma imobilizada é promissor na produção de biocombustíveis, visto que a enzima purificada apresenta maior ação em convergência dos substratos (ALMEIDA et al, 2018).

O estudo teve por objetivo caracterizar parcialmente a lipase obtida a partir do cultivo da *Yarrowia divulgata* em biorreator de bancada quanto a atividade e estabilidade em diferentes temperaturas, pH, íons metálicos e determinada a influência dos solventes orgânicos e surfactantes na atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 microrganismo e manutenção

A levedura foi mantida em Ágar Sabouraud (5% de glicose, 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 2% de ágar) utilizando a técnica de esgotamento por estrias. As placas foram incubadas por um período de 48 horas a 28°C.

2.2 Pré-inóculo

Para a preparação do inóculo, foi feita uma suspensão celular em solução salina estéril (0,85% de NaCl) e um volume adequado dessa suspensão foi utilizado para inocular os meios para produção de lipase, de modo a se obter uma concentração inicial de 10^7 células.mL⁻¹. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico comum.

2.3 Produção de lipase em biorreator de bancada

A produção de lipase foi realizada em cultivo submerso em meio composto por 0,2% MgSO₄, 0,2% KH₂PO₄, 1,0% de peptona, 1,0% de extrato de levedura, 3,0% de (NH₄)₂SO₄ (BUSSAMARA et al, 2010). A fonte de carbono utilizada foi o óleo de oliva (9,97g/L) em pH 5.30 (LOPES et al, 2019). Os experimentos foram conduzidos em biorreator de bancada modelo Minifors Infors-HT com capacidade máxima de 2,5 L (1,0 L de volume de operação) e controle automático dos parâmetros (pH, temperatura e agitação), a 28°C com aeração de 1,0 lpm (controle 0,42-4,20 lpm, 1,21bara, 20°C) durante 72h. Diferentes condições foram testadas avaliando agitação e adição de 1% (m/v) de diferentes surfactantes e emulsificantes (Tween 20, lecitina de soja e goma xantana). As condições testadas foram, Ensaio 1 (200 rpm); Ensaio 2 (300 rpm); Ensaio 3 (400 rpm); Ensaio 4 (300rpm + tween 20); Ensaio 5 (300 rpm + lecitina de soja) e Ensaio 6 (300 rpm + goma xantana). Para cada ensaio foi realizado duas repetições.

2.4 Medida da atividade lipolítica

A atividade da lipase foi determinada espectrofotometricamente utilizando para-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como substrato na temperatura e no pH ótimo da reação enzimática (30 °C e 3.0, segundo CONTE, 2017). O *p*NPP foi primeiramente solubilizado (3,8 mg) em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) então diluído em 19,5 mL de tampão McIlvaine pH 3.0 a 0,5 mM e contendo 0,5% de Triton X-100 e a hidrólise do *p*NPP foi determinada a 30°C. A leitura da absorbância foi realizada a 410nm. Após a pré-incubação do substrato (*p*NPP+tampão+DMSO) em banho-maria por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto devidamente diluído. A reação foi interrompida com choque térmico (90°C, 1 min), seguido da adição de 1mL de solução saturada de tetraborato de sódio, adaptado de YANG et al, 2002. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de *p*NPP por min por mL. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.5 Propriedades Bioquímicas

2.5.1 Determinação da estabilidade do EEB à temperatura e ao pH

A determinação da estabilidade térmica foi realizada incubando-se o EEB em diferentes temperaturas (entre 30 e 55°C, com intervalos de 5°C), por um período de 24h. A determinação da estabilidade em função do pH foi realizada com incubação do EEB na proporção de 1:1 (v/v) com tampão McIlvaine (pH 2.0 a 8.0) e tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 9.0 e 10.0) por 24 horas, a 4 °C. Os resultados foram dados como o percentual de atividade residual da lipase em relação à atividade no tempo zero.

2.5.2 Estabilidade e atividade do EEB à presença de íons

Alíquotas do EEB foram incubadas durante 1 hora a 40°C em solução tampão McIlvaine pH 3.0 contendo uma solução de 1:1 (v/v) dos seguintes íons: MgCl₂, ZnSO₄, CaCl₂ e MnSO₄ nas concentrações de 5mM e 10mM. Após incubação, cada EEB foi utilizado para a medida da atividade lipolítica. Os dados foram apresentados como o percentual de atividade relativa em comparação a um controle (EEB foi incubado nas mesmas condições com água) e a atividade

enzimática foi avaliada em pH 3.0 e 30°C, considerados ótimos para a atividade da enzima segundo Conte (2017).

2.5.3 Influência de solventes orgânicos e surfactantes na estabilidade e atividade enzimática

Foi avaliada a influência dos solventes etanol, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO) e do surfactante Tween 20 na atividade enzimática. Uma mistura de 50% do EEB com alíquotas dos compostos numa concentração final de 1% e 10% em solução tampão de pH 3.0 foi incubada em agitador orbital a 150 rpm, durante 1h e 40°C em frascos hermeticamente fechados. As atividades lipolíticas foram expressas em relação ao controle (EEB foi incubado nas mesmas condições com água) e a atividade enzimática foi quantificada em pH 3.0 e 30°C segundo Conte (2017).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de lipase por *Y. divulgata* em biorreator de bancada

Inicialmente a *Yarrowia divulgata* foi cultivada em diferentes condições, adaptada de Bussamara et al. (2010), em meio contendo 9,97 g.L⁻¹ de óleo de oliva em pH 5,30 durante 72h para avaliar a influência da agitação e do uso de surfactantes e emulsificantes sobre a produção de lipase. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nos ensaios 1 a 6.

Tabela 1 Atividade lipolítica (U.mL⁻¹) e contagem de células (células.mL⁻¹) obtidas nos ensaios. Média de duas repetições.

Ensaio	Atividade lipolítica	Contagem de células	Agitação (rpm) /Surfactante
1	2,694	1,80x10 ⁹	200
2	2,939	2,25x10 ⁹	300
3	2,610	2,56x10 ⁹	400
4	1,400	1,49x10 ⁹	300 + T20
5	1,466	1,41x10 ⁹	300 + LS
6	2,534	1,37x10 ⁹	300 + GX

Os valores de atividade lipolítica e de contagem de células são referentes a 48h de cultivo. Os ensaios de 4 a 6 foram realizados após determinada a melhor agitação. T20 = Tween 20; LS= Lecitina de soja; GX = Goma xantana.

Dentre as condições testadas, a agitação de 300 rpm (ensaio 2) proporcionou a mais expressiva produção de lipase pela *Y. divulgata* em 48h de cultivo com atividade enzimática de 2,939 U.mL⁻¹. Após esse período ocorreu a redução da atividade enzimática, no entanto, se manteve acima de 2,500 U.mL⁻¹ até 72h. O ensaio 3 (com agitação de 400 rpm) apresentou nas primeiras 4h maior atividade lipolítica (1,414 U.mL⁻¹) mantendo-se crescente até 48h com atividade de 2,610 U.mL⁻¹ e reduzindo para 1,731 U.mL⁻¹ em 72h. As contagens máximas de células obtidas para o período de 48h foram de 2,25x10⁹ e 2,56x10⁹ células.mL⁻¹ em 300 e 400 rpm, respectivamente. O ensaio 1 (conduzido a 200 rpm) demonstrou menor atividade e menor acúmulo de células durante as 72h de cultivo com maior valor de atividade lipolítica em 48h de cultivo (2,694 U.mL⁻¹). Agitação de 300 e 400 rpm proporcionaram maior crescimento celular dentre as três agitações testadas e o período de 48h de incubação proporcionaram maior atividade enzimática para todos os ensaios (Figura 1).

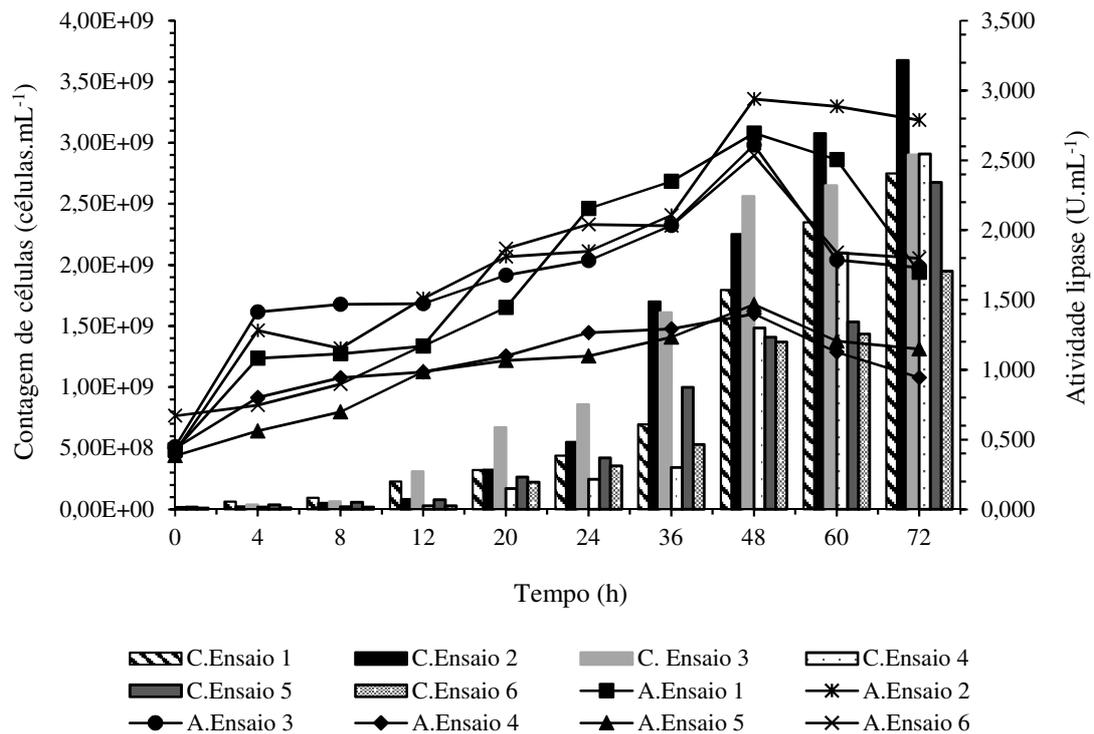


Figura 1 Relação da contagem de células e da atividade lipolítica em função do tempo ao longo de 72h de cultivo. C. = contagem de células; A. = Atividade lipolítica.

A agitação que proporcionou a maior atividade lipolítica (300 rpm) foi utilizada para os testes com diferentes surfactantes e emulsificantes a fim de determinar a influência dessas substâncias no desenvolvimento e na produção de lipase pela *Y. divulgata*.

Os ensaios com adição de tween 20 e lecitina de soja apresentaram comportamento similar de atividade lipolítica ao longo de 72h de cultivo. Em 48h de cultivo a atividade lipolítica foi de 1,400 e 1,466 U.mL⁻¹ para os ensaios 4 e 5, respectivamente (Figura1). Os ensaios com goma xantana apresentaram menor contagem de células ($1,37 \times 10^9$) ao longo do experimento e a atividade lipolítica (2,534 U.mL⁻¹) em 48h de cultivo esteve próximo do encontrado nos ensaios com agitação de 200 rpm (2,694 U.mL⁻¹) e 400 rpm (2,610 U.mL⁻¹).

O ensaio 6 apresentou nas primeiras 12h atividades inferiores a 1,50 U.mL⁻¹ e contagem de células ($2,91 \times 10^7$) abaixo do observado para os outros ensaios e a partir de 24h de cultivo apresentou dados de atividade lipolítica semelhante ao ensaio 3. Após as 48h de cultivo os ensaios de 4 a 6 apresentaram maior acúmulo de células e menor produção de lipase. As contagens de células para os ensaios com adição de surfactante e emulsificantes foram menores do que as observadas para os ensaios sem adição dessas substâncias, demonstrando que esses compostos podem ter interferido no desenvolvimento e na produção da lipase pela *Y. divulgata*.

Os resultados de baixa atividade obtidos nesse estudo podem estar associados ao método analítico de quantificação, visto que Santos et al (2015) relatam a atividade hidrolítica superior em biorreator de bancada e utilizando o método titulométrico para determinação da atividade lipolítica. Barros et al (2015) relatam em seu estudo que surfactantes apresentaram efeito negativo na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* em concentração de 1,5mM.

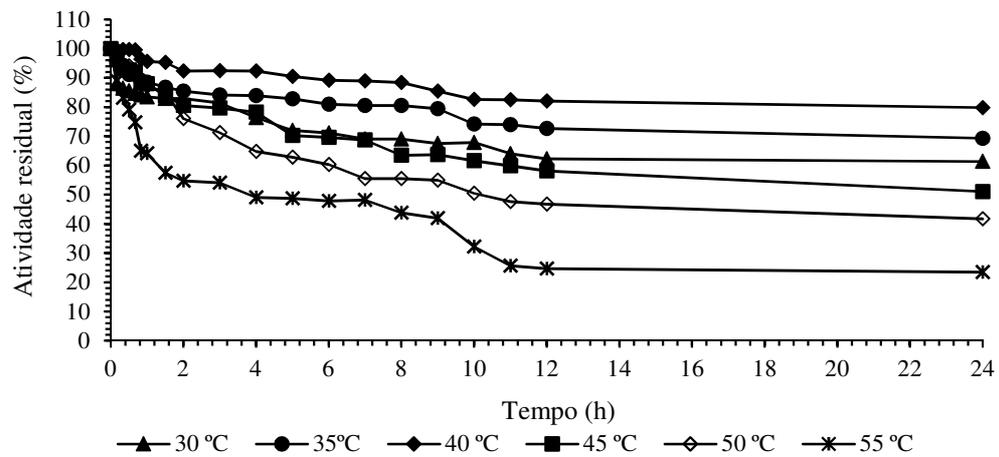
De acordo com Delorme et al (2011) a redução da atividade lipolítica ao utilizar surfactantes está relacionada as mudanças na estrutura da enzima causada por ação dessa substância. Os surfactantes competem com a lipase pela adsorção no meio, além de formar agregados miceliais que podem interagir com a parte hidrofóbica da lipase. As interações entre altas concentrações surfactantes e a enzima pode provocar a desativação. Entretanto, os efeitos nas lipases podem ser variados dependendo das características do surfactante (QUILLES et al, 2015; SANTOS et al, 2018).

3.2 Caracterização parcial da lipase

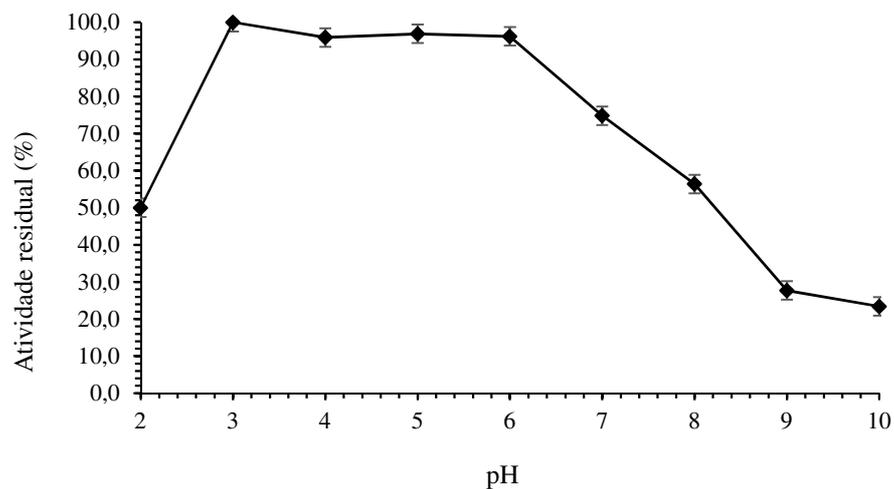
3.2.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade da lipase de *Y. divulgata*

A termoestabilidade das lipases consiste em um aspecto importante nos processos enzimáticos, sendo que a sua instabilidade térmica pode inativar a enzima e dificultar a sua aplicação em processos industriais. Diversas lipases produzidas por leveduras mesófilas apresentam baixa estabilidade térmica em temperaturas acima de 45°C (GUPTA et al, 2015; PFLUCK et al, 2018).

Como forma de avaliar a estabilidade térmica da lipase produzida por *Y. divulgata*, o EEB bruto foi incubado em diferentes temperaturas. O aumento da temperatura levou a redução do tempo necessário para que houvesse a desnaturação da proteína, conseqüentemente a perda de função da enzima (Figura 2A). Após 24h a 40°C o EEB apresentou 80,0% de atividade, sendo esse o melhor resultado dentre as temperaturas testadas. Os valores estimados de meia vida para 45, 50 e 55 °C foram 24h, 10h e 4h, respectivamente. Cabe ainda destacar, que a termoestabilidade das enzimas produzidas em fermentação submersa apresentou rendimentos inferiores a 70% e 62% para as temperaturas de 35 e 30 °C (Figura 2A). Segundo Gupta et al (2015) os principais fatores responsáveis pela termoestabilidade da enzima são a hidrofobicidade da proteína, o número de ligações dissulfeto e de hidrogênio, a composição dos aminoácidos e as interações intermoleculares da proteína.



(A)



(B)

Figura 2 Efeito da Temperatura (A) e do pH (B) sobre a estabilidade da lipase produzida por *Yarrowia divulgata*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3.0 a 30 °C. A atividade residual da lipase foi dada em relação à atividade no tempo zero.

Para verificar a estabilidade do EEB ao pH, incubou-se a enzima em diferentes soluções tampão por um período de 24h a 4°C. De acordo com os resultados apresentados na Figura 2B a lipase manteve sua atividade próxima de 100% em uma faixa de pH entre 3.0 e 6.0 e acima de 50% em pH 2.0 e 7.0. Em pH 9.0 e 10.0 o EEB apresentou menor estabilidade e com atividade residual inferior a 27%, sendo o pH 10.0 o que apresentou menor estabilidade com 23,4% de atividade residual. Assim como o relatado por Akil et al. (2016) após 4h de incubação da lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* o rendimento reduziu para 20 e 40% (pH 9.0 e 11.0) e reduziu 30% (pH 3.0 e 9.0) e para pH 5.0 e 7.0 manteve a sua atividade em 100%.

3.2.2 Efeito da presença dos íons metálicos na estabilidade da lipase de *Y. divulgata*

A Tabela 2 apresenta o efeito dos íons metálicos sobre a estabilidade do EEB produzido por *Y. divulgata*. O íon Mn^{2+} foi responsável por ativar a atividade do EEB em 115,5 e 101,0% em uma concentração de 5mM e 10mM, respectivamente. Os íons Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} apresentaram efeito de ativação do EEB apenas na concentração de 5mM, não sendo observado efeito positivo na presença destes íons a 10mM. O efeito de ativação do EEB por esses íons indica seu possível papel como cofatores iônicos nas ligações enzima-substrato e na estabilidade da lipase.

Resultados diferentes foram relatados por Lu et al. (2018) utilizando lipase produzida por *Candida* sp. em solução contendo íons (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} e Ba^{2+}) em concentração de 0,05mM durante 72h, apresentando ativação pouco significativa da enzima apenas na utilização de Sn^{2+} . Ping et al, (2018) demonstraram o efeito inibidor para a lipase por ação dos íons Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e efeito positivo com os íons Ca^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} em concentração de 1mM para a estabilidade da lipase extracelular produzida por *Y. lipolytica*.

Tabela 2 Efeito dos íons metálicos sobre a estabilidade da lipase de *Y. divulgata*.

Substâncias	Atividade relativa (%)	
	EEB	
	5mM	10mM
Controle	100,0	100,0
MgCl ₂	109,7	95,3
ZnSO ₄	111,2	96,0
CaCl ₂	101,9	98,6
MnSO ₄	115,5	101,0

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3.0 a 30 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 2,75 U.mL⁻¹ para o EEB.

3.2.3 Efeito dos solventes orgânicos e surfactantes na atividade da lipase de *Y. divulgata*

A Tabela 3 apresenta o efeito de solventes orgânicos e de surfactantes sobre a estabilidade do EEB produzido pela *Y. divulgata*. Entre os surfactantes testados, o Triton X-100 apresentou fator de ativação para o EEB na concentração de 1%. O tween 20 não apresentou efeito sobre a atividade enzimática para a lipase em nenhuma concentração testada. Diferente do relatado por Ping et al. (2018) que observaram forte inibição da atividade lipolítica por ação do surfactante Triton X-100 e Tween 20 a 1mM.

Os solventes orgânicos (etanol, acetona e DMSO) apresentaram ativação enzimática numa concentração de 1% com atividade relativa de 117,1, 109,2 e 120,8 %, sendo o DMSO o único solvente testado que apresentou ativação nas concentrações de 1% e 10%, com atividade relativa de 120,9% na concentração de 10%. As lipases apresentam diferentes sensibilidades a solventes orgânicos sendo que, de uma forma geral, solventes polares miscíveis em água desestabilizam mais facilmente a enzima quando comparados a solventes imiscíveis em água. É reconhecido que os solventes apolares provavelmente promovem mudanças no equilíbrio entre a conformação fechada e aberta da tampa *lid* e modificam a estrutura do substrato e dos produtos formados na reação, ao passo que, os solventes polares desestabilizam mais facilmente a estrutura da proteína por remoção da camada de solvatação da enzima (FRAGA et al, 2018; GUPTA et al, 2015). Dessa forma, o DMSO (composto polar com momento dipolar de 3,96 D) apresentou estabilidade sobre a lipase testada com efeito sobre a atividade lipolítica. Sendo os compostos polares o que apresentam efeito positivo sobre a ativação da lipase de *Y. divulgata*.

Tabela 3 Influência dos solventes orgânicos e surfactantes na atividade lipolítica.

Substâncias	Atividade relativa (%)		Momento dipolar (D)
	EEB		
	1%	10%	
Controle	100,0	100,0	-
Etanol	117,1	95,4	1,69
Acetona	109,2	97,5	2,88
DMSO	120,8	120,9	3,96
Tween 20	78,8	68,9	-
Triton X-100	112,1	67,0	-

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3.0 a 30 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 0,236 U.mL⁻¹.

4. CONCLUSÃO

A produção de lipase por *Y. divulgata* apresentou melhores resultados a partir de uma agitação de 300rpm e tempo de cultivo de 48h a 28°C. A agitação de 400 rpm proporcionou maior acúmulo de células em 48h de cultivo dentre todos os ensaios e após esse período a levedura manteve crescimento reduzido. Os ensaios com agitação de 200 rpm demonstraram menores atividades e acúmulo de células durante as 72h de cultivo.

A incorporação de Tween 20 e lecitina de soja no meio proporcionou crescimento da levedura após 48h de cultivo, com crescimento similar ao ensaio com agitação de 400 rpm. As atividades lipolíticas para esses ensaios foram as menores observadas. Os ensaios utilizando goma xantana foram os que apresentaram crescimento celular menor após 48h de cultivo, ainda sim, apresentaram atividade lipolítica similar aos ensaios com agitação de 400 rpm.

O aumento da temperatura levou a redução do tempo necessário para que houvesse a desnaturação da proteína, conseqüentemente, a perda de função da enzima. O EEB apresentou estabilidade térmica ao longo de 24h, demonstrando que a lipase produzida por *Y. divulgata* é termoestável a temperaturas de até 45°C. O EEB apresentou estabilidade em uma faixa de pH 3.0 a 8.0, com queda da estabilidade em pH 10.0.

A presença do íon Mn^{2+} no meio reacional para análise da estabilidade do EEB produzido por *Y. divulgata* foi o único responsável por proporcionar a ativação do EEB nas concentrações de 5mM e 10mM e os íons Mg^{2+} , Zn^{2+} e Ca^{2+} apresentaram efeito de ativação do EEB apenas na concentração de 5mM. Os surfactantes influenciaram de forma negativa na estabilidade, com exceção do Triton X-100 a 1%. Os solventes orgânicos apresentaram ativação da lipase, sendo o DMSO o que apresentou influência positiva em concentrações 1% e 10%. A estabilidade da lipase a uma ampla faixa de pH e a temperaturas de até 45°C proporcionam a lipase de *Y. divulgata* a possibilidade de futuras aplicação em processos industriais, com linhagem mais adaptadas a cada configuração desejada.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo suporte no trabalho e pela bolsa concedida ao primeiro autor. A Dra. Paula Benevides de Moraes por ceder a levedura *Yarrowia divulgata* para o estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIL, E.; CARVALHO, T.; BÁREAC, B.; FINOTELLI, P.; LECOMTEC, J.; TORRES, A. G.; AMARAL, P.; VILLENEUVEC, P. Accessing regio-and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 109 p. 101–111, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.019>.

ALMEIDA, A. F.; TERRASAN, C. R. F.; TERRONE, C. C.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochemistry* n. 65, p. 71–80, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.019>.

ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal* v. 311, p. 1–12, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>.

BARROS, M.; REZENDE, M. I.; ANDRADE, M. M.; BARBOSA, A. M. Efeitos de surfactantes na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina-PR. p. 1-4. 2015.

BRÍGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 101, p. 148– 158, 2014.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A.M.; DE OLIVEIRA, E.; 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*. 101: 268-275, 2010.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COLLA, E.; MARGARITES, A. C.; COSTA, J. A. V. Production of Lipases by a Newly Isolate of *Aspergillus niger* Using Agroindustrial Wastes by Solid State Fermentation. *Current Biotechnology*. v. 6, n. 4. 2016. Doi: 10.2174/2211550105666160608123800.

CONTE, C. G. Otimização da produção de lipase em cultivo submerso utilizando levedura isolada do coco tucum. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2017, 50p.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma*. *Ann Microbiol*. Doi 10.1007/s13213-012-0500-1. 2012.

DELORME, V.; DHOUIB, R.; CANAAN, S.; FOTIADU, F.; CARRIERE, F.; CAVALIER, J.F. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharmaceutical Research*, vol. 28, p. 1831-1842, 2011.

FRAGA, J. L.; PENHA, A. C. B.; PEREIRA, A. S.; SILVA, K. A.; AKIL, E.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. F. Use of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized in cell debris for the

production of lipolyzed milk fat (LMF). *International Journal of Molecular. Science*, v. 19, n. 11, 2018. doi:10.3390/ijms19113413.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research* v. 57 p. 40–54, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.

LE JOUBIOUX, F.; BRIDIAU, N.; SANEKLI, M.; GRABER, M.; MAUGARD, T. Continuous lipase-catalyzed production of pseudo-ceramides in a packed-bed bioreactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 109, p. 143–153. 2014.

LU, J.; WANG, P.; KE, Z.; LIU, X.; KANG, Q.; HAO, L. Effect of metal ions on the enzymatic hydrolysis of hemp seed oil by lipase *Candida* sp. 99–125. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 922–928, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.168>.

MACENO, M. A. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L. Production of Cellulases by *Phanerochaete* sp. Using Empty Fruit Bunches of Palm (EFB) as Substrate: Optimization and Scale-Up of Process in Bubble Column and Stirred Tank Bioreactors (STR). *Waste Biomass Valor.* v. 7, p. 1327–1337, 2016. Doi 10.1007/s12649-016-9503-7.

PFLUCK, A. C. D.; BARROS, D. P. C.; FONSECA, L. P.; MELO, E. P. Stability of lipases in miniemulsion systems: Correlation between secondary structure and activity. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 114, p. 7-14, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.03.003>.
PING, L.; YUAN, X.; ZHANG, M.; CHAI, Y.; SHAN, S. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. *International Journal of Biological Macromolecules* v. 106, p. 302–311, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.016>.

QUILLES, J. C. J.; BRITO, R. R.; BORGES, J. P.; ARAGON, C. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; GOMES, E.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GUIBAN, J.M. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. *Biochemical Engineering Journal* v. 93, p. 274–280, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.009>.

SALES, P. S. C.; FONSECA, T. C. S.; AMARAL, F. A. P. C.; SILVA, C. A. A. Production of lipase by *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 in through submerged fermentation in different culture media. *Engevista*, v. 19, n. 5, p. 1340-1351, 2017.

SALMON, D. N. X.; FENDRICH, R. C.; CRUZ, M. A.; MONTIBELLER, V. W.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma* sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. v. 114, p. 288–297, 2016.

SANTOS, S. F. M.; MELO, A. L. M.; LIMA, A. O.; PEREIRA, L. M. A.; SANTOS, F. A.; MEDEIROS, N. M.; SILVA, M. G. B. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. *Revista saúde & ciência*. v. 7, n. 2, p. 413-425, 2018. ISSN 2317-8469.

SANTOS, T. C.; FINOTELLI, P. V.; AMARAL, P. F. F. Caracterização parcial do extrato bruto e pré-purificado de lipase de *Yarrowia lipolytica*. V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina-PR, p. 1-5, 2015. DOI: 10.5151/biochem-vsimbtecc-22101.

SOUZA, S. F. et al. Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. *ACS Catalysis*, v. 5, n. 10, p. 5877–5887, 2015.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. *Catalysis Letters*, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, vol. 15, p. 147-152, 2002.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo apresentado nessa dissertação consistiu no desenvolvimento de trabalhos utilizando uma espécie de levedura isolada de um fruto típico da região para a produção e caracterização parcial da lipase com a finalidade de aplicação em processos industriais.

A utilização da levedura *Yarrowia divulgata* em cultivo submerso para a produção de lipase foi testada a partir de um planejamento experimental com intuito de determinar a melhor condição de cultivo para a produção da lipase utilizando óleo de oliva e óleo residual de soja como fontes de carbono em diferentes pH. Nesse aspecto, existem passos a serem dados para caracterizar a atuação dessa lipase frente a diferentes íons, solventes, surfactantes e até mesmo características relacionadas a aplicação em escala industrial.

Os resultados de atividade lipolítica obtidos com uso de óleo residual de soja mesmo inferiores ao óleo de oliva demonstraram possibilidade de uso por se tratar de uma matéria prima de baixo custo, que apresenta grande impacto ao meio ambiente por descarte inadequado e a destinação do resíduo a um processo industrial visando a obtenção de um produto de maior valor agregado. O estudo da estabilidade térmica, ao pH, a íons e a surfactantes e emulsificantes é importante para conhecer as características da enzima produzida, possibilitando a destinação adequada da lipase em processos. O resultado de estabilidade da lipase a uma ampla faixa de pH e a temperaturas de até 45°C proporcionam a lipase de *Y. divulgata* a possibilidade de futuras aplicação em processos industriais, com linhagem mais adaptadas a cada configuração desejada. Dessa forma, novos estudos voltados a produção e aplicação do extrato enzimático bruto a processo, melhor aproveitamento da biomassa celular, purificação do extrato enzimático bruto e imobilização desta enzima com intuito de aplicação em processo contínuo, ampliação das escalas de produção, aplicação das lipases a tratamentos de resíduos e outras finalidades poderão ser desenvolvidos.