

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR PELA LEVEDURA *YARROWIA LIPOLYTICA* NRRL Y-1095 NA PRESENÇA DO ÓLEO DE MOTOR RESIDUAL

**BRUNO ROSWAG MACHADO¹; AMANDA NAIARA SILVA MORAES¹;
THALITA D'AMORE¹; SUSAN HARTWIG DUARTE¹**

¹Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – brunoroswag@gmail.com;
amanda_moraes@hotmail.com; thalitad amore@hotmail.com; susanduarte@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As lipases são enzimas capazes de catalisar diferentes reações, como hidrólise ou síntese de ésteres, esterificações e transesterificações, apresentando como importante característica a especificidade (KUMAR et al., 2016). Devido a essa característica, essas enzimas vêm sendo empregadas em diversos processos, como tratamento de efluentes (JOSHI; SHARMA; KUILA, 2019).

Sabe-se que algumas leveduras e fungos filamentosos possuem a habilidade de produzir e secretar lipases (BURKERT; MAUGERI; RODRIGUEZ, 2004; PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2004). Dentre elas, algumas cepas de levedura do gênero *Yarrowia* ganham destaque e podem sofrer ação indutora ou inibitória, na produção de lipase extracelular, na presença de compostos lipídicos ou surfactantes como óleos vegetais, Triton X-100, Tween 80 (DOMÍNGUEZ et al., 2003).

Além disso, a preocupação com o destino de óleos residuais ganha destaque no contexto da crescente necessidade de proteger o meio ambiente (UDONNE; BAKARE, 2013). Portanto, uma alternativa para o aproveitamento desses óleos residuais é sua utilização como possíveis indutores da síntese de lipase (MAGDOULI et al., 2017). Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de lipase extracelular pela levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 utilizando azeite de oliva e óleo de motor residual como indutores da síntese dessa enzima.

2. METODOLOGIA

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 foi mantida em tubos inclinados à 5 °C em meio YM g.L⁻¹: (10 glicose, 3 extrato de levedura, 3 extrato de malte, 5 peptona 20 agar) e pH 5,5. O micro-organismo foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 500 mL com volume de meio de 200 mL (10% v/v de inóculo). O meio de cultivo continha na composição (g.L⁻¹): 30 glicerol residual (82% pureza); 5 Triton X-100; 1,5 MgSO₄; 2,5 Na₂HPO₄; 7 KH₂HPO₄; 2 (NH₄)₂SO₄; 0,1 CaCl₂; 0,08 FeCl₃; 0,02 ZnSO₄ e 1,5 extrato de levedura, pH 6,0 (modificado de Papanikolaou; Aggelis, 2002). Para o estudo da produção de lipase foram estudados dois indutores, o ensaio (A) continha 10 g.L⁻¹ de azeite de oliva e o ensaio (B) continha 10 g.L⁻¹ de óleo de motor residual. Os frascos foram mantidos a 180 rpm a 28°C, durante 48 h. Todos os ensaios foram realizando em triplicata.

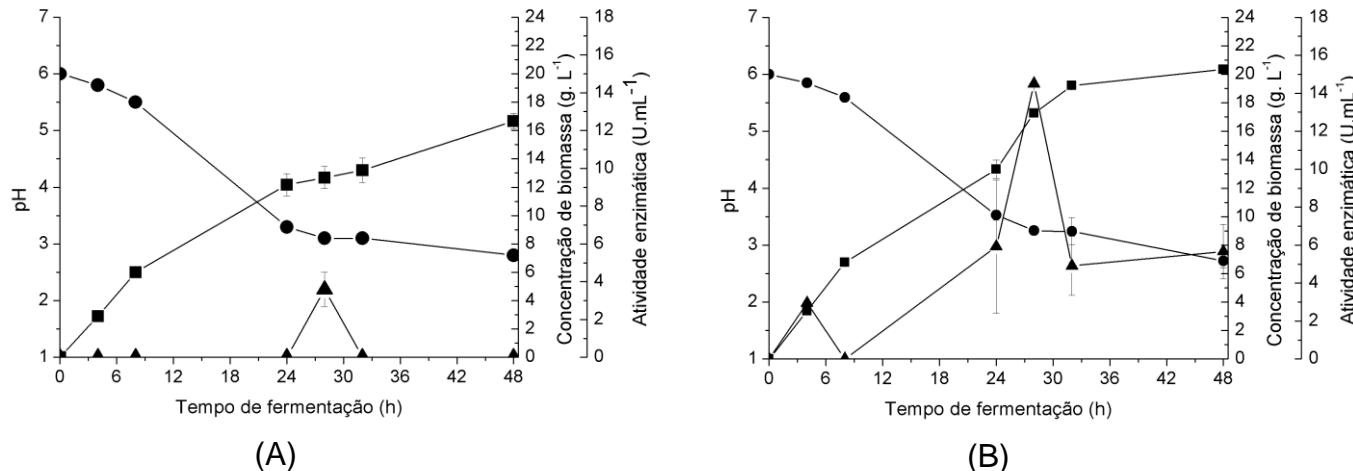
O pH do cultivo foi monitorado utilizando pHmetro de bancada e o crescimento de biomassa por densidade ótica (OD) a 600 nm e relacionado com curva padrão da levedura (LIU et al., 2013). A produção de lipase extracelular foi determinada através da hidrólise do substrato p-nitrofenil-palmitato (pNPP) pela enzima contida no sobrenadante, obtido a partir de centrifugação (4000 rpm) e filtração deste (Millipore 0,45 µm), com liberação de p-nitrofenol e ácido graxo. A

absorbância das amostras após reação foram medidas por espectrofotômetro a 410 nm e relacionada com curva padrão de p-nitrofenol 0,14 mM (SILVA et al., 2005). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de reação estudadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1A e B apresentam os resultados de concentração de biomassa, bem como a variação do pH para os ensaios com azeite de oliva e óleo de motor residual respectivamente. A queda no valor de pH observada pode ser decorrente do consumo da fonte principal de carbono (glicerol) e, consequente produção de ácidos orgânicos pela levedura *Y. lipolytica* Y-1095 (LEVINSON; KURTZMAN; KUO, 2007). Além disso, em ambos os ensaios o crescimento de biomassa foi observado na presença dos indutores. A produção de lipase foi observada apenas em 28 h de fermentação no ensaio com 10 g.L⁻¹ de azeite de oliva (Figura 1A). O ensaio B (Figura 1B), com 10 g.L⁻¹ do óleo de motor residual apresentou atividade em 4, 24, 28, 32 e 48 h de fermentação.

Figura 1 – Resultados de pH (●), concentração de biomassa (■) e atividade enzimática de lipase (▲) para os ensaios com azeite de oliva (A) e óleo de motor residual (B)



A Tabela 1 apresenta a máxima produção de biomassa e lipase pela levedura *Y. lipolytica* Y-1095 na presença de azeite de oliva e óleo residual de motor. A máxima concentração de biomassa para ambos os ensaios ocorreram em 48 h de fermentação, além disso, a maior produção de biomassa ($20,5 \pm 0,2$ g.L⁻¹) foi observada na presença do óleo de motor residual ($p < 0,05$). A máxima produção de lipase foi observada em 28 h de fermentação para ambos os ensaios, e a maior produção da enzima ($14,5 \pm 0,02$ U.mL⁻¹) ocorreu na presença do óleo de motor residual ($p < 0,05$).

Tabela 1 – Máxima concentração de biomassa e atividade enzimática de lipase para os ensaios com azeite de oliva (A) e óleo de motor residual (B)

Ensaios	Máxima concentração biomassa (g.L ⁻¹)	Máxima atividade enzimática (U.mL ⁻¹)
A	$16,7 \pm 0,5^b$ (48 h)	$3,6 \pm 0,5^b$ (28 h)
B	$20,5 \pm 0,2^a$ (48 h)	$14,5 \pm 0,02^a$ (28 h)

Diferentes letras sobreescritas representam que há diferenças significativas na coluna. (Student-t teste T, $p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

A levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 se mostrou promissora na produção de lipase extracelular quando o óleo de motor residual foi empregado como indutor. A máxima produção da enzima ($14,5 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$) foi constada na presença de 10 g.L^{-1} do óleo de motor residual em 28 h de fermentação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.
- DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F. J.; SANROMÁN, M. A.; LONGO, M. A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 78, n. 11, p. 1166-1170, 2003.
- JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 134-140, 2019.
- KUMAR, A.; KHAN, A.; MALHOTRA, S.; MOSURKAL, R.; DHAWAN, A.; PANDEY, M. K.; SAMUELSON, L.; A. Synthesis of macromolecular systems via lipase catalyzed biocatalytic reactions: applications and future perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 24, p. 6855-6887, 2016.
- LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 292-295, 2007.
- LIU, Z.; GAO, Y.; CHEN, J.; IMANAKA, T.; BAO, J.; HUA, Q. Analysis of metabolic fluxes for better understanding of mechanisms related to lipid accumulation in oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource technology**, v. 130, p. 144-151, 2013.
- MAGDOULI, S.; GUEDRI, T.; TAREK, R.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource technology**, v. 243, p. 57-68, 2017.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. **Bioresource technology**, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002.
- PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. HM.; SANT'ANNA, G. L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 1, p. 71-75, 2000.
- SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.
- UDONNE, J. D.; BAKARE, O. Recycling of used lubricating oil using three samples of acids and clay as a method of treatment. **International Archive of Applied Sciences and Technology**, v. 4, n. 2, p. 8-14, 2013.