UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Escola de Química

Tese de Doutorado

PRODUÇÃO DE LIPASES ASSOCIADAS ÀS CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* USANDO ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL

Patrícia Martins Botelho Nunes

RIO DE JANEIRO

ABRIL/2015

PRODUÇÃO DE LIPASES ASSOCIADAS ÀS CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* USANDO ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL

Patrícia Martins Botelho Nunes

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos da escola de química da universidade federal do rio de janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de doutor em ciências.

Orientadores:
Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.
Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc.
Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

RIO DE JANEIRO
ABRIL/2015

Ficha Catalográfica

BOTELHO, Patricia

Produção de lipases associadas às células de *Yarrowia lipolytica* usando óleo de fritura residual / Patricia Martins Botelho Nunes. - 2015.

xix, 148f. il.; 29,7 cm.

Tese (Doutorado). – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadoras: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc., Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc., Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

1. Lipases associadas. 2. *Yarrowia lipolytica*. 3. Extração por ultrassom 4. Óleo de fritura residual.

I. Amaral, Priscilla Filomena Fonseca; Rocha-Leão, Maria Helena Miguez; Brígida, Ana Iraidy Santa

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química.

PRODUÇÃO DE LIPASES ASSOCIADAS ÀS CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* USANDO ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL

Patrícia Martins Botelho Nunes

Tese de doutorado submetida ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Orientador (es):

_____

Prof^{a}. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

_____

Prof^{a}. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc.

_____

Profa. Ana Iraidy Santa Brígida, D.Sc.

Banca Examinadora

_____

Patrick Fickers, DSc.

_____

Maria Alice Zarur Coelho, DSc.

_____

Monica Montero Lomeli, DSc.

_____

Rodrigo Pires do Nascimento, DSc.

_____

Priscilla Vanessa Finotelli, DSc.

RIO DE JANEIRO

ABRIL/2015

DEDICATÓRIA

DEDICO à minha família e aos amigos que sempre estiveram comigo. Agradeço pelo carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrada minha gratidão:

Aos meus pais, Rogério e Elizeth, por todo apoio e sacrifícios que fizeram por mim e pela minha educação que é o melhor presente que recebi deles até hoje.

Ao Juan Pablo, pelo apoio e pela paciência, e, principalmente, pelo carinho nos momentos mais difíceis.

À família Botero, por sua amizade e por me incentivar a alcançar meus objetivos.

À minha orientadora, Dra. Priscilla Amaral, pela paciência, por me incentivar e confiar em mim em todos os momentos.

À minha orientadora, a Dra. Maria Helena Miguez Rocha-Leão, pela confiança e por me dar a oportunidade de sempre aprender mais, trabalhando ao seu lado.

À minha orientadora, a Dra. Ana Iraidy Santa Brígida, pela confiança e por dividir comigo seus conhecimentos sobre lipase.

Ao Prof. Patrick Fickers, por me receber em seu laboratório e, pacientemente, dividir comigo seus conhecimentos em biologia molecular e sobre *Yarrowia lipolytica*.

À Profª Mônica Lomelli que iniciou os experimentos de isolamento de dos genes de lipase comigo.

Às amigas dos laboratórios 123 pela paciência, convivência e amizade. Sem vocês: Roberta, Tamiris, Luana, Tatiana e Kelly, o laboratório não seria o mesmo. Temos mais que um convívio de trabalho, dividimos e, com certeza, aproveitamos muito bem as horas juntas.

Em especial à Luana, por me ajudar, escutar, estar sempre me apoiando e incentivando nos experimentos.

À Roseli que pacientemente me ensinou o protocolo da eletroforese.

À Ully e Rafael, que muitas vezes me auxiliaram e foram pacientes comigo.

À Aline, que me acompanhou em muitas etapas de análises.

Ao Hosni Sassi, que não só me auxiliou muito na execução do trabalho na Bélgica, mas também se transformou em um amigo.

A todos os colegas do Lab 103, amigos, professores, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Instituto de Química e, especialmente, à Vanessa Naciuk, que realizou as análises do óleo de fritura residual.

À toda equipe do Laboratório 3Bio da Universidade Livre de Bruxelas, com quem convivi durante os meses na Bélgica.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a Deus, por me dar coragem para superar todos os obstáculos e disposição para buscar ainda mais desafios e também por ter me proporcionado oportunidades para realizar o que mais gosto: a pesquisa.

RESUMO

NUNES, Patrícia Martins Botelho. **Produção de lipases associadas às células de *Yarrowia lipolytica* usando óleo de fritura residual.** Orientadoras: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Helena Miguez da Rocha Leão e Ana Iraidy Santa Brígida. Rio de Janeiro. 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Lipases são enzimas que apresentam um amplo uso na indústria e o interesse na aplicação destas enzimas em bioprocessos industriais está crescendo por causa de sua versatilidade. Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para contornar a limitação econômica e lipases com propriedades mais específicas estão sendo investigadas. Entre os micro-organismos produtores de lipases, *Yarrowia lipolytica* tem atraído um grande interesse na área de biotecnologia, por ter a capacidade para excretar diferentes metabólitos em grandes quantidades. Para a produção de lipase intracelular faz-se necessário o uso de um óleo indutor. O óleo de fritura é geralmente descartado indevidamente no sistema de esgoto e é um resíduo que se acumula e causa prejuízo ambiental. Neste trabalho foi realizado um estudo da produção de lipases associadas às células, utilizando óleo de fritura residual (OFR) como indutor. Além disso, duas metodologias de obtenção das enzimas (vórtex e ultrassom) foram avaliadas. O ultrassom foi mais eficiente como método de extração de proteínas da célula e obtenção de lipases associadas. O OFR apresenta, em sua composição, ácidos graxos e triglicerídeos em quantidade suficiente para induzir de forma eficiente a produção de lipases (máximo de atividade lipolítica 400 U/g), porém ele se mostrou menos eficiente que o azeite de oliva, óleo descrito como principal indutor. Os extratos brutos obtidos com o OFR apresentaram maior especificidade por substratos de cadeias longas. Enquanto que os extratos obtidos com o azeite de oliva apresentam maior afinidade por substratos mistos. Os extratos obtidos com os dois indutores apresentaram pH e temperatura ótimos para a hidrólise de p-nitrofenil laurato a pH 7,0 e a 37 ºC. Tem-se, portanto, dois tipos de biocatalisador com potenciais aplicações distintas.

Palavras-Chave: 1. Lipases associadas. 2. *Yarrowia lipolytica.* 3. Extração por ultrassom 4. Óleo de fritura residual.

ABSTRACT

NUNES, Patrícia Martins Botelho. **Production of associated lipases of *Yarrowia lipolytica* from residual frying oil**. Rio de Janeiro, 2015. Advisors: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Maria Helena Miguez da Rocha Leão e Ana Iraidy Santa Brígida. Rio de Janeiro. 2014. D.Sc. Thesis (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

Lipases are enzymes that have a wide use in industry and the interest in the application of these enzymes in industrial bioprocesses is growing for its versatility. New technologies are being developed to overcome the economic limitation and lipases with more specific properties are being investigated. Some microorganisms have extracellular lipase and enzymes which are associated to cells. Among the microorganisms capable of producing lipase, *Yarrowia lipolyti*ca has attracted great interest in biotechnology, to have the ability to excrete different metabolites in large quantities. Many studies show the production of intracellular lipase with olive oil as inducer. The residual frying oil is usually discarded improperly in the sewage system and is a residue that accumulates and causes environmental damage. In this work we present a comparative study of the intracellular lipases production, using olive oil and residual frying oil as inducers. In addition, a study of two methods for obtaining intracellular enzymes (vortex and ultrasound) were performed. Ultrasound was more efficient as a method of extracting proteins from the cell and obtaining intracellular extracts. It was observed that the residual frying oil, despite having a different fatty acids composition of olive oil was efficient to produce associated lipases. The fatty acids and triglycerides in this residue were in amount sufficient to induce the production of associated lipases (lipolytic activity up to 400 U / g), but it was less efficient than olive oil (max lipase activity 600 U / g). The cell associated and released crude extracts obtained by the OFR had higher specificity for long-chain substrates. While the extracts obtained with the olive oil had a higher affinity for mixed substrates. The extracts obtained with OFR and olive oil showed optimum pH and temperature for hydrolysis of p-nitrophenyl laurate at pH 7.0 and 37 ° C. Therefore, two types of biocatalyst were produced with different applications potentials.

Keyword: 1. Associated lipases. 2. *Yarrowia lipolytica*. 3. Extraction by ultrasound waves. 4. Residual frying oil.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS.....xv

ÍNDICE DE FIGURAS.....xvii

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 LIPASES.....4

2.1.1 Evolução histórica da produção de enzimas.....4

2.1.2 Características e aplicações de lipases.....5

2.2 PRODUÇÃO DE LIPASES.....**11**

2.2.1 Matéria-prima e substrato.....12

2.2.2 Lipases intracelulares.....15

2.3 Y*arrowia lipolytica*.....18

2.3.1 Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*.....20

2.4 ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL.....22

2.4.1 Reaproveitamento de resíduos.....25

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS 28

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS 29

4.1 MATERIAIS.....29

4.2 EQUIPAMENTOS.....29

4.3 MICRO-ORGANISMO.....30

4.3.1 Preservação da cultura.....30

4.3.2 Obtenção do inóculo.....31

4.4 ESTERILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E INSTRUMENTOS.....31

4.5 PRODUÇÃO DE LIPASES UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE CARBONO E INDUTORES.....31

4.5.1 Experimentos Preliminares.....31

4.6 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES INTRACELULARES DE LIPASE.....33

4.6.1 Experimentos preliminares em Erlenmeyers.....33

4.6.2 Experimentos em microplacas.....33

4.6.3 Padronização do método para a separação das frações de lipase.....34

4.6.4 Viabilidade celular.....36

4.7 PRODUÇÃO DE LIPASES INTRACELULARES EM MICROPLACAS UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO COMO INDUTOR.....**36**

4.7.1 Influência da fonte de nitrogênio na produção de lipases intracelulares.....36
4.7.2 Influência da concentração de ácido oleico.....37
4.7.3 Cinética de produção de lipases e consumo de substrato.....37
4.8 PRODUÇÃO DE LIPASES INTRACELULARES DE *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO ÓLEOS COMO INDUTORES.....38
4.9 CARACATERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÀTICOS OBTIDOS UTILIZANDO ÓLEOS COMO INDUTORES.....38
4.9.1 Especificidade em diferentes substratos.....38
4.9.2 Determinação de parâmetros cinéticos.....38
4.9.3 Efeitos do pH e da temperatura na estabilidade operacional dos extratos enzimáticos.....39
4.9.4 Estabilidade à estocagem.....39
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS.....39
4.10.1 – Quantificação da concentração celular.....39
4.10.2 – Quantificação da concentração de glicose.....40
4.10.3 – Quantificação da concentração de glicerol.....41
4.10.4 – Quantificação da concentração de proteína.....41
4.10.5 – Determinação de pH.....42
4.10.6 – Determinação da atividade enzimática.....42
4.10.7 – Análise do teor de ácidos graxos do óleo de fritura residual.....46
4.10.8 – Quantificação de ácido oleico.....46
4.11 – IDENTIFICAÇÂO DE LIPASES INTRACELULARES EM *Yarrowia lipolytica*.....47
4.11.1 – Eletroforese de proteínas.....47
4.11.2 – Extração do DNA genômico (DNAg).....48
4.11.3 – Eletroforese de DNA.....49
4.11.4– Reação em cadeia de polimerase (PCR).....49
4.11.5 – Purificação dos produtos da PCR.....50
4.11.6 – Clonagem e transformação.....51
CAPÍTULO 5 - RESULTADOS 53
5.1 – Experimentos preliminares.....53
5.1.1 – Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento celular.....53
5.1.2 – Padronização do protocolo de obtenção das frações de lipase para o cultivo em Erlenmeyers.....61

5.1.3 – Efeito da fonte de carbono e indutores sobre a atividade hidrolítica de lipases intracelulares de *Y. lipolytica*.....65
5.2 EXTRAÇÃO DAS LIPASES INTRACELULARES.....68
5.2.1 Influência do ultrassom sobre a atividade hidrolítica das lipases intracelulares.....68
5.2.2 – Influência da agitação em vórtex e do ultrassom sobre a atividade hidrolítica das lipases intracelulares.....73
5.3 ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE LIPASES INTRACELULARES UTILIZANDO ÁCIDO OLEICO, AZEITE DE OLIVA E ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL COMO INDUTORES.....79
5.3.1 – Cinética da produção de lipases intracelulares utilizando ácido oleico como indutor.....79
5.3.2 – Efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipases intracelulares.....82
5.3.3 - Efeito da concentração inicial do indutor.....84
5.3.4 - Produção de lipases intracelulares utilizando azeite de oliva e óleo de fritura residual como indutores.....86
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS OBTIDOS UTILIZANDO ÓLEOS COMO INDUTORES.....93
5.4.1 - Efeito da concentração de substrato na hidrólise de para-nitrofenil laurato.....96
5.4.2 - Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade dos extratos enzimáticos.....98
5.4.3 - Estabilidade à estocagem.....101
5.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LIPASES NOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS.....103
5.5.1 – Eletroforese de proteínas nas frações obtidas utilizando os óleos como indutor.....103
5.5.2 - Etração do DNA genômico e reação da cadeia de polimerase (PCR) de LIP 7 e LIP 8 de Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682.....104
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO 109
CAPÍTULO 7 –SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 111
CAPÍTULO 8 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 112

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição média percentual dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais (JORGE *et al*., 2005; GARCIA, 2006).

Tabela 2.2. Características físico-químicas originais de óleos de girassol, de milho e de soja comerciais (JORGE et al., 2005).

Tabela 5.1. Taxa específica de crescimento celular (μ) e variação de biomassa (Δx) de *Y. lipolytica*, em 24h de crescimento na presença de diferentes fontes de carbono e indutores obtida através da média de pelo menos três cinéticas de crescimento para cada formulação de meio de cultura.

Tabela 5.2. Teor de ácidos graxos dos óleos de oliva e soja (obtidos na literatura) e concentração relativa (%) dos ácidos graxos do óleo de fritura residual analisado através de cromatografia gasosa, sendo o teor obtido da média de três análises.

Tabela 5.3. Medidas de pH dos meios de cultura contendo azeite de oliva (meio OO) e óleo de fritura residual (meio OF) no início do cultivo e após 24h de experimento.

Tabela 5.4. Atividade hidrolítica da lipase liberada e da lipase que permanece associada às células de *Y. lipolytica* obtida em azeite de oliva e em óleo de fritura residual, determinada através do método espectrofotométrico, utilizando como substrato paranitrofenillaurato, após extração com vórtex e com ultrassom em 24h de cultivo.

Tabela 5.5. Atividade hidrolítica das lipases liberada para o sobrenadante e associada á célula de *Y. lipolytica* cultivada em diferentes fontes de carbono e indutores, depois de submetidas ao tratamento com ultrassom, em 24 h de cultivo.

Tabela 5.6. Atividade hidrolítica e concentração de proteínas no tampão em relação ao tempo de agitação com vórtex para células íntegras e após o tratamento com ultrassom a 20kHz de frequência, com potência 39 W, durante 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Tabela 5.7. Concentração celular e atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio de cultura com 1 % de ácido oleico e diferentes fontes de nitrogênio e em meio contendo somente a emulsão de ácido oleico, cultivadas em microplacas, a 250 rpm/ 28ºC, por até 40h. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Tabela 5.8. Atividade hidrolítica e concentração celular de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 1, 3, 5 e 10 % de azeite de oliva, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Tabela 5.9. Atividade hidrolítica e concentração celular de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 0,5, 1, 3 e 5 % de ácido oleico, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Tabela 5.10. Parâmetros cinéticos dos extratos brutos das lipases liberadas para o sobrenadante (EBL) e associadas á célula (EBA) de *Y. lipolytica* cultivada na presença de azeite de oliva ou óleo de fritura residual como indutores.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases (SHARMAN & KANWAR, 2014).

Figura 2.2. Representação da estrutura de Lip 2 de *Yarrowia lipolytica*: a tampa (T88-L105), as alças (D61-D67 e M101-H126) e a tríade catalítica que compõe o sítio ativo (S162-H289-D230) e resíduos de N-acetilglicosamina dos locais de glicosilação (N134-N113) (BORDES et al., 2010).

Figura 2.3. Esquema representativo das conformações "fechada" (a) e "aberta" (b) da lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* (BORDE et al., 2010).

Figura 2.4. Mecanismo para a produção de lipases por células de *Y. lipolytica* (PEREIRA-MEIRELLES et al., 2000).

Figura 2.5. Esquema representando a localização da lipase durante o cultivo de células de *Y. lipolytica*: (I) lipase intracelular, (L) lipase ligada à célula e (E) lipase extracelular (PEREIRA-MEIRELLES et al., 1997).

Figura 2.6. Esquema representando a maturação e localização de lipases ligadas às células de *R. oryzae* (FUKUDA et al., 2008).

Figura 4.1. Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em aumento de 400x utilizando microscópio ótico Nikon Eclipse E200

Figura 4.2. Imagens das microplacas utilizadas na cultura.

Figura 4.3. Curva de peso seco para quantificação da concentração celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800.

Figura 4.4. Curva padrão para quantificação de glicerol em HPLC.

Figura 4.5. Curva padrão para quantificação de proteínas em microplacas.

Figura 4.6. Curva padrão de p-nitrofenol em microplacas.

Figura 4.7. Curva padrão de ácido oleico em HPLC.

Figura 5.1. Cinética de crescimento celular e de consumo de glicose de *Yarrowia lipolytica* 50682 a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPD* (glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L) ou YPDO* (YPD* acrescido de 1% de azeite de oliva). As curvas representam os perfis de crescimento obtidos com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Figura 5.2 Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* a 250rpm, 28°C em meio de cultura OO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L) ou OF (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204

1g/L e óleo de fritura residual 10g/L). As curvas representam o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Figura 5.3. Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em agitador automático a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual). A curva representa o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Figura 5.4. Cinética de consumo de substrato por *Yarrowia lipolytica* em agitador automático a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual). A curva representa o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Figura 5.5. Imagens obtidas a partir de microscópio ótico de amostras contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x). Em (A) observa-se as células na presença de azeite de oliva antes do procedimento de extração, em (B) são visualizadas células após o procedimento com pérolas de vidro e vórtex e em (C) as células após a exposição ao ultrassom.

Figura 5.6. Imagens obtidas a partir de microscópio ótico de amostras contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x). Em (A) observa-se as células na presença de azeite de oliva após o procedimento com pérolas de vidro e vórtex e em (B) as células após a exposição ao ultrassom.

Figura 5.7. Viabilidade celular de células de *Y. lipolytica* determinada após o procedimento de extração com ultrassom com azul de metileno

Figura 5.8. Porcentagem de atividade hidrolítica detectada nas frações extracelular e intracelular utilizando os indutores azeite de oliva e óleo de fritura residual (OFR), em 24 h de cultivo.

Figura 5.9 Atividade hidrolítica obtida em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências

acústicas por 30 segundos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Figura 5.10. Atividade hidrolítica obtida em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 1 minuto em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Figura 5.11. Atividade hidrolítica obtida em cultivo de Y. lipolytica realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Figura 5.12. Atividade hidrolítica nas células (LA) após sonicação, em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 30 segundos, 1 e 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Figura 5.13. Atividade hidrolítica liberada (LL) após sonicação, em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 30 segundos, 1 e 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Figura 5.14. Atividade hidrolítica nas células e no tampão em diferentes tempos de agitação com vórtex e após o tratamento com ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W, durante 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Figura 5.15. Atividade hidrolítica das células após serem submetidas a 3 minutos de vórtex e a diferentes tempos de ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Figura 5.16. Atividade hidrolítica e a concentração de proteína no tampão antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer,

em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Figura 5.17. Eletroforese de proteínas em gel de Bis-Tris a 12% das células e do sobrenadante (tampão MOPS) antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e tratamento com ultrassom 20 kHz de frequência e a 39 W de potência, durante 30 segundos e 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Figura 5.18. Eletroforese de proteínas em gel de Bis-Tris a 12% do sobrenadante (tampão MOPS) antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e tratamento com ultrassom 20 kHz de frequência e a 39 W de potência, durante 1 e 4 minutos. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Figura 5.19. Cinética de crescimento celular e consumo de substrato para *Y. lipolytica* em meio com 3% de indutor (meio AO). Os cultivos foram realizados em microplacas com 2 mL de meio de cultura, 250 rpm e 28 ºC.

Figura 5.20. Cinética de crescimento celular e produção de lipases de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 3% de ácido oleico, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Figura 5.21. Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio OO com 1 % de azeite de oliva, cultivadas em Erlenmeyers, a 250 rpm/ 28ºC, por 168 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dado experimental.

Figura 5.22. Representação esquemática do mecanismo de lipólise e captação de ácidos graxos em cultivos com *Y. lipolytica* (NAJJAR et al., 2011).

Figura 5.23. Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio de cultura com 1 % de óleo de fritura residual, cultivadas em Erlenmeyers, a 250 rpm/ 28ºC, por 168 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dado experimental.

Figura 5.24. Atividades hidrolítica e lipolítica das fraçoes intracelulares produzidas por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO em cultivos em erlenmeyers, 250 rpm, 28 ºC.

Figura 5.25. Atividades hidrolítica e lipolítica das fraçoes intracelulares produzidas por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF em cultivos em erlenmeyers, 250 rpm, 28 ºC.

Figura 5.26. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por Y. lipolytica 50682, em meio OO. Foram utilizados substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. EBL (extrato bruto liberado) apresentou atividade máxima de 16,2 U/g e EBA (extrato bruto associado) apresentou atividade máxima de 169,0 U/g.

Figura 5.27. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foram utilizados substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. EBL (extrato bruto liberado) apresentou atividade máxima de 59,4 U/g e EBA (extrato bruto associado) apresentou atividade máxima de 223,4 U/g.

Figura 5.28. Influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise de paranitrofenil laurato, em pH 7, a 37 ºC, catalisada pelo extrato de lipases de *Y. lipolytica* liberadas após sonicação.

Figura 5.29. Influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise de paranitrofenil laurato, em pH 7, a 37 ºC, catalisada pelo extrato de lipases de *Y. lipolytica* associadas às células, após sonicação.

Figura 5.30. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foi utilizado paranitrofenil laurato como substrato, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampões de diferentes pH (3, 7 e 9).

Figura 5.31. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO. Foi utilizado paranitrofenil laurato como substrato, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampões de diferentes pH (3, 7 e 9).

Figura 5.32. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram em pH 7,0, diferentes temperaturas (25 a 60 ºC).

Figura 5.33. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram em pH 7,0, diferentes temperaturas (25 a 60 ºC).

Figura 5.34. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO e meio OF, armazenados a 30, 4 e -4 ºC, por até 60 dias. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão pH 7.

Figura 5.35. Eletroforese de extratos brutos enzimáticos obtidos através de sonicação, em 24h de cultivo de *Y. lipolytica*, na presença de azeite de oliva e óleo de fritura residual, revelada com Coomasie.

Figure 5.36. Imagem obtida da eletroforese em gel de agarose 0,75 % do DNA genômico extraído de *Yarrowia lipolytica* 50682 e *Yarrowia lipolytica* Po1g. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

Figura 5.37. Imagem do gel de eletroforese em agarose dos produtos de PCR obtidos com a condição 2 em tampão NH4: (1) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 7 RNAse +, (2) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 7 RNAse +, (3) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 7 RNAse -, (4) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 7 RNAse -, (5) Controle sem DNA, (6) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 8 RNAse +, (7) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse +, (8) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 8 RNAse -, (9) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse -, (10) Controle sem DNA.

Figura 5.38. Imagem dos géis de eletroforese em agarose 0,75 % dos produtos da PCR não purificado e purificado obtidos com a condição 2 em tampão NH4: (7) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse + e (9) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse -.

Figura 5.39. Vector de clonagem pJET1.2/blunt com a lista das endonucleases de restrição que possuem locais de reconhecimento únicos que ladeiam o local de inserção do DNA clonado (MCS) (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit).

ÍNDICE DE SIGLAS

1. INTRODUÇÃO

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3.) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Estas enzimas, que pertencem ao grupo das esterases, apresentam a capacidade de catalisar, preferencialmente, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos insolúveis em água, o que as diferencia das outras esterases, que agem sobre ésteres solúveis. Além disso, outra característica que vem sendo descrita para diferenciar as lipases é a capacidade destas hidrolisarem triacilgliceróis com cadeia maior ou igual a 10 carbonos, enquanto que as esterases utilizam como substrato apenas triacilgliceróis contendo menos de 10 carbonos na cadeia (JAEGER *et al.*, 1999; BRÍGIDA *et al.*, 2007).

Além da hidrólise de triacilgliceróis, as lipases são capazes, em condições microaquosas, de catalisar a síntese de ésteres, através das reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Desta forma, apresentam uma grande utilização no setor industrial e é crescente o interesse de aplicação destas enzimas em bioprocessos industriais, devido a sua versatilidade (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; BRÍGIDA, 2010).

Diferentes setores industriais utilizam lipases em seus processos, sendo amplamente aplicadas na obtenção de produtos de limpeza (detergentes), de alimentos (queijos, chocolates), de ração animal, no tratamento de resíduos e resolução de misturas racêmicas. Existe também uma grande demanda destas enzimas em aplicações especiais, como na indústria farmacêutica e na pesquisa e desenvolvimento de testes diagnósticos (SÁ-PEREIRA *et al.*, 2008). No entanto, o alto custo das lipases ainda mantém essa tecnologia desvantajosa economicamente para determinados processos (RIBEIRO *et al*., 2011).

Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para contornar a limitação econômica e lipases com propriedades mais específicas estão sendo pesquisadas (LI *et al.*, 2004; ADAMCZAK & BEDNARSKI, 2004; WANG *et al*., 2007; HA *et al.*, 2007;). Muitos estudos direcionados para a alteração do meio de cultivo de modo a otimizar a produção e a secreção destas enzimas vêm sendo feitos e a aplicação de lipases imobilizadas tem permitido diminuir custos devido à possibilidade de reutilização das enzimas em vários ciclos e à sua utilização em processos contínuos (ADAMCZAK &

BEDNARSKI, 2004; TAN *et al.*, 2003, BURKERT, *et al.*, 2004; ELLAIAH, *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004).

Alguns micro-organismos apresentam, além da fração extracelular, frações de lipase que permanecem ligadas à célula (OTA *et al.*, 1982). As lipases extracelulares já são extensivamente utilizadas industrialmente, mas, as frações intracelular e ligada à célula possuem pequena aplicação, devido às dificuldades de extração e purificação. Uma alternativa para a utilização destas frações seria usar as próprias células em bioprocessos industriais ou a imobilização passiva destas células em partículas de suporte para biomassa (ADAMCZAK & BEDNARSKI, 2004; IFTIKHAR *et al.*, 2008).

Yarrowia lipolytica é uma levedura "não-convencional" e seu estudo tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH e GAILLARDIN, 1997). Apresenta também a capacidade de produzir lipase e muitos trabalhos com esta levedura utilizam meio contendo óleo de oliva como indutor. Sabe-se que a lipase é produzida no início do cultivo, mas se acumula na célula e passa a ser excretada quando a disponibilidade de substrato diminui e a liberação da enzima se torna necessária para assimilação do substrato remanescente (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 2000).

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER & MENDONÇA-HAEGLER, 1981), laticínios, flora de queijos picantes (BARTH & GAILLARDIN, 1997), produtos avícolas crus (ISMAIL *et al.*, 2001), e é particularmente adaptada a substratos hidrofóbicos.

O óleo de fritura utilizado repetidas vezes em residências e estabelecimentos comerciais, geralmente, é descartado de forma inadequada no sistema de esgoto e se constitui em um resíduo que se acumula nas tubulações, podendo levar ao entupimento das redes. Políticas de descarte adequado e estudos para a reutilização do óleo de fritura residual estão ganhando destaque e incentivo dos governos (ZUCATTO *et al.*, 2013). Existem várias formas de reciclagem dos óleos e gorduras residuais, entre elas, a produção de sabão, cola, tinta e a formulação de ração animal. Diversos trabalhos relatam também a utilização deste resíduo para a produção de biodiesel e muitos estados

brasileiros já possuem políticas de coleta seletiva do óleo de fritura residual com esse objetivo (PINTO, 2009; JUNIOR, 2011).

Pesquisas para a utilização de resíduos na produção de lipases já estão sendo realizadas. Bactérias e leveduras, cultivadas em óleo de fritura residual, são capazes de produzir lipases e bons resultados foram obtidos com bactérias do gênero *Pseudomonas*, cultivadas em resíduos do processo de fritura de azeite de oliva e óleo de girassol (HABA *et al*., 2000). A levedura *Geotrichum candidum*, quando cultivada na presença de óleo de canola, após ser utilizado para fritar batatas, produziu tanto lipases extracelulares quanto intracelulares (RYWIŃSKA *et al.*, 2008).

Neste contexto, este trabalho visa contribuir, principalmente, para os processos biotecnológicos que utilizam a lipase como biocatalisador e vem colaborar para o avanço do estudo de lipases intracelulares, fornecendo conhecimento sobre a produção de lipases intracelulares de *Yarrowia lipolytica*, criando a possibilidade de realização de outras pesquisas para a sua aplicação industrial. Além disso, vale ressaltar que o estudo da utilização de um resíduo, o óleo de fritura residual, para a obtenção desta enzima pode contribuir para a redução nos custos de produção e também para a minimização dos impactos ambientais causados pelo seu acúmulo, além de sugerir mais uma rota de reutilização deste resíduo, a qual poderia trazer também benefícios sócio-econômicos por favorecer a logística reversa de óleos alimentares usados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

2.1.1 Evolução histórica da produção de enzimas

Desde os primórdios da humanidade as enzimas são utilizadas de forma natural para a produção de alimentos e bebidas. O estudo das enzimas começou há muitos anos atrás, através da observação de fenômenos biológicos como a respiração, digestão e fermentação. A primeira enzima descoberta foi a amilase em 1883, por Payen e Person, em Paris. Em seguida, o fisiologista alemão Theodor Schwann isolou uma substância presente no suco gástrico, responsável pela degradação das proteínas e denominou-a pepsina, a primeira enzima isolada a partir de tecido animal (PALMER & BONNER, 2007).

O nome enzima significa do grego *énsimo*, formado de *én* = em e *simo* = fermento ou levedura e foi dado em uma época de muita controvérsia a respeito destas biomoléculas. Alguns pesquisadores, entre eles Louis Pasteur, acreditavam que as enzimas eram inseparáveis das células vivas. Porém, outros pesquisadores acreditavam que a fermentação era apenas uma reação química. Em 1907, Eduard e Hans Büchner, ganharam o Prêmio Nobel de Química por provar que é possível fermentação na ausência de células vivas. Os irmãos Büchner conseguiram demonstrar que o extrato de leveduras podia converter glicose em etanol e dióxido de carbono, exatamente como as leveduras vivas. A partir daí, estas fantásticas biomoléculas começaram a ser extensivamente estudadas, passaram a ser designadas pelo nome do primeiro substrato em que sua ação foi observada, seguido do sufixo *ase* e diversos estudos forneceram informações a respeito de sua especificidade, estrutura proteica e purificação (PALMER & BONNER, 2007; WANDERLEY *et al.*, 2011).

Enzimas participam de todas as reações essenciais à vida. Apresentam estrutura majoritariamente proteica e são produzidas exclusivamente por seres vivos. São catalisadores naturais e, portanto, apresentam a função de viabilizar o metabolismo celular (catabólico e anabólico) através da diminuição a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado. Sem estas moléculas, as reações biológicas seriam muito lentas, o que tornaria a vida impossível (WANDERLEY *et al.*, 2011).

Enzimas são utilizadas em muitos processos biotecnológicos e apresentam várias vantagens quando comparadas a catalisadores químicos: trabalham em condições brandas de temperatura e ampla faixa de pH, não causam danos ao meio ambiente, são versáteis e eficientes. Entre as características mais marcantes no comportamento destas moléculas encontram-se a enorme especificidade e a capacidade de aumentar a velocidade das reações na ordem de 10^{10} a 10^{23}, em comparação com as mesmas reações não catalisadas (VENTURA *et al*., 2008; OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009).

Hoje, as enzimas continuam sendo alvo de inúmeras pesquisas devido à sua importância para a vida humana seja na área médica, para o diagnóstico, tratamento e compreensão de inúmeras doenças ou na área industrial, sendo aplicadas em inúmeros processos (PALMER & BONNER, 2007).

2.1.2 Características e aplicações de lipases

Lipases (triacilglicerol esteracilhidrolases E.C.3.1.1.3.) são enzimas extremamente versáteis que apresentam a peculiar característica de serem estáveis em meios orgânicos e aquosos (SHARMAN & KANWAR, 2014).

São enzimas pertencentes ao grupo das esterases e catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Essas enzimas também são capazes, em condições microaquosas, de catalisar a síntese de ésteres (Figura 2.1) bem como a transesterificação e, desta forma, apresentam grande aplicação industrial, catalisando diferentes reações (PAQUES & MACEDO, 2006; SHARMAN & KANWAR, 2014).

As lipases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, animais e micro-organismos. Foram isoladas pela primeira vez em 1965, a partir do suco pancreático estando relacionadas ao metabolismo lipídico. No entanto, também é possível encontrá-las no plasma sanguíneo, saliva e leite (SANGEETHA *et al.*, 2011; SHARMAN & KANWAR, 2014). As lipases de origem vegetal são provenientes de látex vegetais, sementes, folhas e caules, e estão localizadas em diferentes tecidos, relacionadas ao armazenamento de reservas energéticas (PAQUES & MACEDO, 2006; RIBEIRO *et al*., 2011).

Hidrólise

$RCOOR' + H_2O \longrightarrow RCOOH + R'OH$

Síntese

a) Esterificação

$RCOOH + R'OH \longrightarrow RCOOR' + H_2O$

b) Interesterificação

$RCOOR' + R''COOR^* \longrightarrow RCOOR^* + R''COOR'$

c) Alcóolise

$RCOOR' + R''OH \longrightarrow RCOOR'' + R'OH$

d) Acidólise

$RCOOR' + R''COOH \longrightarrow R''COOR' + RCOOH$

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases (SHARMAN & KANWAR, 2014).

A principal fonte de obtenção de lipases, para fim comercial, é a partir de micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras) por meio de fermentação submersa ou em estado sólido. No caso específico de leveduras, geralmente a produção é feita por fermentação em meio líquido, mas fermentação em estado sólido também pode ser utilizada (TREICHEL *et al.*, 2010; ANDUALEMA & GESSESSE, 2012). Devido ao grande número de organismos produtores, existem vários tipos de lipases com diferentes especificidades quanto ao tipo de substrato e exigências de pH e temperatura (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Lipases apresentam um enorme potencial biotecnológico por várias razões: são estáveis em solventes orgânicos, não necessitam de cofatores, atuam em ampla faixa de pH e temperatura, apresentam elevada enantioseletividade, possuem alto grau de especificidade e, por isso, suas reações raramente formam produtos laterais ou secundários (BORNSCHEUER, 2002; HOFFMAN, 2010; ANDUALEMA & GESSESSE, 2012).

Na indústria de alimentos, as lipases são utilizadas principalmente para a obtenção de ácidos graxos insaturados, os quais promovem aroma e sabor, sendo aditivos com importante função nas características organolépticas do produto e na sua digestibilidade. São utilizadas também na maturação de queijos e modificação de manteigas, com diminuição do seu teor calórico. Na panificação, aumentam o tempo de prateleira dos produtos. As lipases podem também ser usadas para melhorar o aroma de

bebidas e na retirada de gorduras de produtos a base carne e peixe (SHARMA *et al*., 2001; COELHO & SALGADO., 2008; SHARMAN & KANWAR, 2014).

Na indústria de detergentes, as lipases são utilizadas, juntamente com proteases, amilases e celulases, na formulação de produtos de limpeza, para a remoção de manchas de gordura e sujeira de utensílios domésticos. A primeira lipase produzida para esse fim, a LIPOLASE (Novo Nordisk®), foi lançada no mercado em 1988 e incorporada a detergentes de diferentes marcas. Esta enzima foi produzida através de engenharia genética e possui a capacidade de remover diferentes tipos de manchas (batom, gorduras, manteiga, azeite, molhos, etc.) (COELHO & SALGADO, 2008; HASAN *et al.*, 2010).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se principalmente à enantiosseletividade exibida por estas enzimas. A resolução de misturas racêmicas permite a obtenção de produtos opticamente puros, o que é extremamente vantajoso já que, em muitos casos, normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica (MANOEL *et al.*, 2012). Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico, utilizado na síntese de drogas antiflamatórias não esteróides (Ibuprofeno). A forma (S)-Ibuprofeno presente na mistura racêmica do fármaco é 160 vezes mais ativa que seu antípoda na inibição da síntese de prostaglandinas. Lipases são capazes de realizar a reação de esterificação com enantiosseletividade para a forma (R)-ibuprofeno. Desta forma, a enzima catalisa seletivamente a conversão para (R)-éster, discriminando o (S)-ibuprofeno da mistura racêmica, posteriormente, o ácido discriminado, (S)-ibuprofeno, pode ser separado do meio de reação reagindo-o com uma base forte em meio aquoso. A resolução racêmica de derivados de mioinositol, importantes para o tratamento de patologias psiquiátricas, Síndrome de Down e Alzheimer também é realizada de forma muito eficiente por lipases de *Pseudomonas sp.* e pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada, Novozym 435® (CARVALHO *et al.*, 2005; MANOEL *et al*., 2012; SHARMAN & KANWAR, 2014).

Na indústria cosmética, estas enzimas são usadas na síntese de matérias-primas e como ingredientes ativos nas formulações cosméticas. Um exemplo são os retinóicos, eles são importantes agentes anti-acne utilizados em cosméticos. Os derivados hidrossolúveis da vitamina A podem ser obtidos através de catálise com lipases imobilizadas. Também, as lipases, por realizarem hidrólise de triacilgliceróis, são utilizadas no tratamento da pele e cabelos oleosos, fazendo parte da formulação de produtos como géis e xampus, assim como ativos que auxiliam no tratamento de

celulite, através da lipólise dos adipócitos (MAUGARD *et al.*, 2002; SHARMAN & KANWAR, 2014).

Na área ambiental, as lipases podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais e na remoção de óleos que poluem solos e água. Além disso, também podem ser úteis na remoção de depósitos de gorduras que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas e alimentos líquidos. A aplicação de micro-organismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (HASAN *et al.*, 2006);

As lipases apresentam uma enorme utilização na indústria oleoquímica. Quando usadas como biocatalisadores proporcionam a diminuição dos gastos com energia e menor degradação dos produtos. Estas enzimas também são utilizadas na modificação de óleos e gorduras como, por exemplo, a síntese de ácidos graxos insaturados para a indústria de alimentos. Além disso, podem promover a síntese de ésteres com o mínimo de reações secundárias, resultando na formação de menos subprodutos (COELHO & SALGADO, 2008).

O biodiesel é um combustível renovável, produzido a partir de óleo vegetal ou gordura animal, que pode funcionar como um substituto para o díesel. O uso de óleos vegetais para a sua produção traz várias vantagens, pois acarreta a substituição de combustíveis fósseis por fontes alternativas e renováveis de energia e não contribui para a emissão de gases. A utilização de lipase como biocatalisador para a produção de biodiesel é vantajosa, principalmente do ponto de vista ambiental e em relação às condições operacionais, pois minimizam a necessidade de tratamento de água residual, facilitam o tratamento da glicerina formada e reduzem o consumo de energia no processo. No entanto, o alto custo das lipases e os efeitos negativos para a enzima de reagentes (metanol) e produtos (glicerol) da reação de transesterificação ainda mantêm essa tecnologia desvantajosa economicamente (MARCHETTI *et al.*, 2007; SALUM, 2010). Além das áreas mencionadas acima, as lipases também são utilizadas nas indústrias de couros, têxtil e de papel e celulose (COELHO & SALGADO, 2008).

Apesar da grande versatilidade dessas enzimas, seu uso industrial ainda é limitado pelo seu elevado valor comercial, especialmente quando grande quantidade de enzima é necessária ou quando o produto final do processo tem baixo valor agregado (RIBEIRO *et al.*, 2011). Portanto, várias pesquisas têm sido feitas com o objetivo de diminuir o custo destes biocatalisadores e, nos últimos anos, têm se destacado estudos para a produção de lipases através de fermentação em estado sólido, pesquisas para a

utilização da própria biomassa como biocatalisador e para a utilização de resíduos agroindustriais na elaboração do meio de produção (SHUHONG *et al.,* 2010; GALVAGNO *et al*., 2011; HASHEMIZADEH *et al.,* 2011; MOFTAH *et al.,* 2013).

Dependendo da fonte, as lipases podem apresentar atividade enzimática em pH que varia de 4 a 9 e larga faixa de temperatura (27 a 70ºC). Geralmente, lipases são estáveis à temperatura ambiente e em soluções aquosas neutras, mas apresentam atividade ótima em temperatura entre 30 e 40ºC e em pH em torno de 7 (FICKERS *et al.,* 2004).

A estrutura tridimensional da lipase Lip2p foi primeiramente estabelecida por homologia de estruturas de raio-X de enzimas utilizadas como modelo, como as lipases de *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus niveus*, *Thermomyces lanuginosa*, e *Aspergilus niger.* Bordes *et al.* (2010) demonstraram a resolução da estrutura cristalina de Lip2p e confirmaram que esta enzima apresenta uma estrutura que possui um dobramento característico conhecido como dobra hidrolase α/β que também é encontrado em esterases e proteases. Lipases apresentam, em sua maioria, peso molecular variando entre 19 e 60 kDa (FICKERS *et al.,* 2011; ANDUALEMA & GESSESSE., 2012), possuindo em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais um grande número é hidrofóbico e responsável pela interação entre a enzima e substratos insolúveis em água . A estrutura da molécula é composta por uma folha β central com até oito lâminas β (β1 - β8) conectadas por seis α hélices (A – F) e o sítio ativo é composto por uma tríade catalítica, sendo Serina-Asparagina-Histidina e Serina-Glutamina-Histidina as mais frequentes (JAEGER & REETZ, 1998; RIBEIRO *et a*l., 2011). A figura 2.2 mostra a estrutura tridimensional de lipase da levedura *Y. lipolytica* com a presença da tríade catalítica .

Lipases são definidas a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. A atividade das esterases é em função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis e Menten, em meio homogêneo, ou seja, o substrato deve estar solúvel no meio reacional. Porém, a atividade lipásica aumenta quando há formação de interfaces, e este fenômeno chama-se ativação interfacial e, desta forma, a cinética de lipases não pode ser descrita pelas equações de Michaelis Menten (JAEGER & REETZ, 1998).

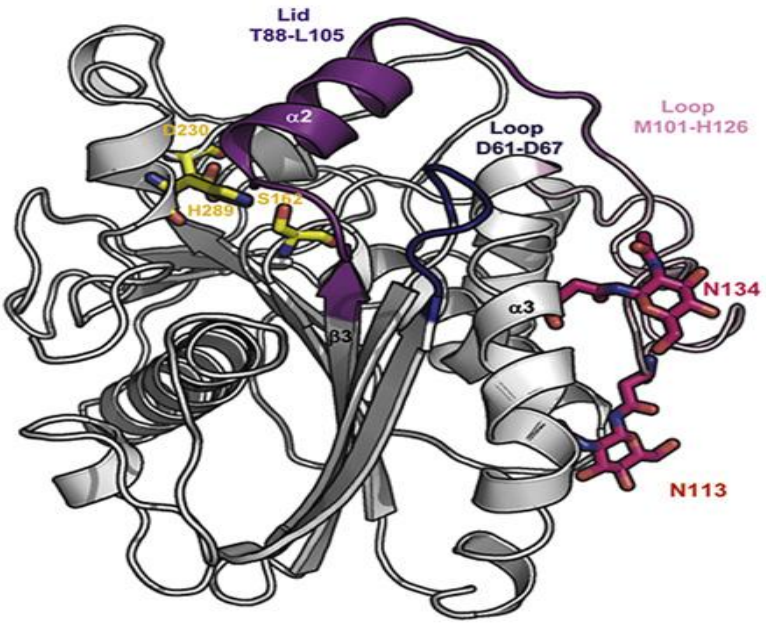


Figura 2.2. Representação da estrutura de Lip 2 de *Yarrowia lipolytica*: a tampa (T88-L105), as alças (D61-D67 e M101-H126) e a tríade catalítica que compõe o sítio ativo (S162-H289-D230) e resíduos de N-acetilglicosamina dos locais de glicosilação (N134-N113) (BORDES *et al.*, 2010).

Muitas lipases apresentam seu sítio catalítico coberto por uma estrutura formada por um ou mais *loops*-tampa *lid* ou aba *flap*. Esta região é um elemento chave na atividade e especificidade de lipases e é composta de uma α-hélice e dois segmentos em dobradiça em lipases fúngicas. Na forma inativa, esta estrutura encontra-se fechada, cobrindo o sítio catalítico da enzima (Figura 2.3). Na forma ativa, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao substrato. Nesse movimento, o lado hidrofóbico fica totalmente exposto, expandindo consideravelmente a superfície não polar do sítio ativo (COSTA & AMORIM, 1999; BORDES *et al*., 2010).

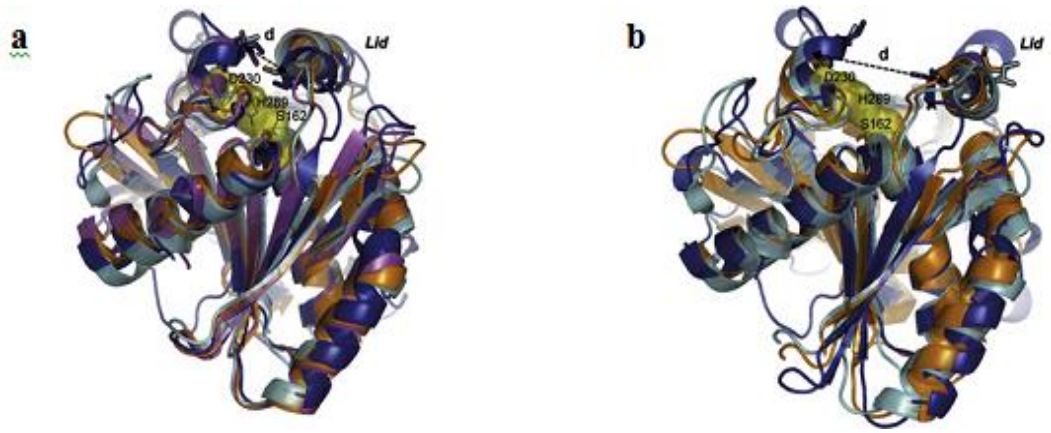


Figura 2.3. Esquema representativo das conformações "fechada" (a) e "aberta" (b) da lipase Lip2 de *Yarrowia lipolytica* (BORDE *et al.*, 2010).

O mecanismo de ativação interfacial pode variar significativamente de acordo com a sua estrutura e origem da lipase (DEREWENDA, 1994; THUREN, 1988; BORDES *et al.*, 2010). Foram descritos dois mecanismos diferentes de ativação:

- Ativação interfacial envolvendo a mudança conformacional por envolver adsorção da enzima à interface do lipídio;

-Mecanismo de ativação em 2 passos: o primeiro envolve a adsorção da enzima na interface do lipídio e o segundo é a formação de um complexo enzima/substrato;

Algumas lipases, apesar de possuírem a presença da tampa, não apresentam a sua atividade relacionada com a ativação interfacial, como, por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia gluma*e e *Candida antarctica*, que apresentam a tampa em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (FERRATO *et al.*, 1997). Existem também lipases que não apresentam essa "tampa", como por exemplo, a lipase de *Bacillus subtilis* (POUDEROYEN *et al.*, 2001).

O mecanismo para a formação de ésteres e para a hidrólise é o mesmo tanto para esterases, quanto para lipases e ocorre em quatro etapas: O substrato é ligado à serina ativa, obtendo-se um intermediário tetraédrico estabilizado pelos resíduos de asparagina e histidina. Em seguida, o álcool é libertado e um complexo acil/enzima é formado. Então, ocorre o ataque de um nucleófilo (água, na hidrólise; álcool ou éster, na transesterificação), formando novamente um intermediário tetraédrico, o qual libera o produto (ácido ou éster) e a enzima livre (BORNSCHEUER *et al*., 2002).

2.2. Produção de lipases

As lipases podem ser produzidas por muitos micro-organismos e eucariontes superiores, no entanto, a fonte microbiana é responsável pelo fornecimento da maior parte das lipases aplicadas industrialmente. Entre os micro-organismos produtores estão as leveduras, como por exemplo, *Candida rugosa*, *C. antarctica* e *Y. lipolytica*, as bactérias, como *P. aeruginosa* e *B. cepacia* , e fungos filamentosos, como *Geotrichum sp.*e *Aspergillus niger* (MESSIAS *et al*., 2011). A lipase de maior expressão a nível industrial é a lipase tipo B de *C. antarctica* (CALB), já extensivamente estudada (BRÍGIDA, 2010). Vale a pena ressaltar que também é possível obter lipases de tecido

animal e de plantas, no entanto estas possuem uma aplicação menos expressiva, pois são menos estáveis e apresentam maior dificuldade de obtenção (MESSIAS *et al*., 2011).

2.2.1 Matéria-prima e Substrato

As lipases microbianas produzidas são principalmente extracelulares e sua produção sofre grande influência da composição do meio de cultura e de fatores físico-químicos como temperatura, pH e oxigenação do meio. A produção de lipases depende da fonte de carbono e de nitrogênio e cada cepa produtora apresenta uma resposta diferente à composição dos meios de cultura. Meios contendo glicose, glicerol e fontes inorgânicas de nitrogênio não favorecem a produção destas enzimas, por contribuírem para o rápido crescimento das células. Muitos trabalhos relatam o glicerol como um repressor da produção de lipases e, aparentemente, a escassez de fontes de carbono e a presença de fontes de nitrogênio mais complexas favorecem a produção destas enzimas (FICKERS *et al.*, 2011; SALIHU *et al.*, 2012).

Peptona, extrato de lêvedo, caseína e triptona têm sido relatadas como excelentes fontes de nitrogênio para a produção de lipases. Surfactantes como o Tween 80 geralmente podem ser usados para aumentar a liberação de lipases associadas à parede celular e para algumas cepas também funciona como indutor da produção de lipases (DALMAU *et al*., 2000; BRÍGIDA *et al*., 2014).

A produção de lipases é intensa na presença de substratos hidrofóbicos, como óleos, ácidos graxos e metil ésteres (BRÍGIDA *et al.*, 2014). Ácidos graxos de 16 a 22 carbonos, geralmente presentes em óleos vegetais (oliva, soja, girassol, gergelim, semente de algodão, milho e amendoim) são excelentes indutores da produção destas enzimas. Esses óleos possuem, em sua constituição, ácido oleico e linoleico, que, quando usados como fonte de carbono, resultam, geralmente, em altos níveis de atividade lipásica (SHARMA *et al.*, 2001; TAN *et al*., 2003; BURKERT *et al*., 2004). Normalmente a atividade de lipases intra e extracelulares aumenta com o aumento da concentração de lipídeos fornecidos, porém níveis excessivos de lipídeos podem ser tóxicos para as células (ZAREVÚCKA, 2012). Os óleos vegetais são consideradas matérias-primas que permitem uma redução dos custos para a produção de lipase em escala industrial (ANDUALEMA *et al.*, 2012). Os óleos animais, ao contrário dos vegetais, podem não favorecer a produção de lipases (TAN *et al*., 2003).

Somente uma pequena porção da fração total dos lipídios é constituída de ácidos graxos livres. A maior parte da fração lipídica dos óleos vegetais se encontra como ésteres do glicerol, ou seja, como triacilgliceróis.

Azeite de Oliva como principal óleo indutor da produção de lipases

De acordo com a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) 270/2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), azeite de oliva virgem é o produto obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), somente por processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas, que não produzam alteração do azeite, e sem a utilização de outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração.

O azeite de oliva extra-virgem apresenta sabor e cheiro característicos de azeitonas de primeira qualidade, e sua acidez, expressa em ácido oléico, não pode ser superior a 1g/100g (De ROSA, 2009). Cerca de 85 % do azeite de oliva é constituído por triglicerídeos, sendo o restante dos seus constituintes chamados de compostos minoritários e entre estes compostos estão: hidrocarbonetos, vitamina E (α-tocoferol e γ-tocoferol), pró-vitamina A, fitosteróis, pigmentos e compostos fenólicos. Os monoglicéridos, diglicéridos, fosfatídeos, ceras e ésteres de esteróis também são considerados compostos minoritários (BOSKOU, 2011). A tabela 2.1. apresenta a composição de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.

Tabela 2.1. Composição média percentual dos ácidos graxos de diferentes óleos vegetais (JORGE *et al*., 2005; GARCIA, 2006).

Ácidos Graxos	Azeite de Oliva	Soja	Milho	Girassol
Palmítico 16:0	13,75	12,66	12	6
Esteárico 18:0	2,75	3,96	2,9	4,32
Oléico 18:1	74	23,61	32,2	21,09
Linoleico 18:2	12,25	55,26	52,2	67,78
Linolênico 18:3	0,3	4,52	0,7	0,15

***Designação de ácidos graxos: 18:2, onde 18 é o número de átomos de carbono e 2 refere-se ao número de insaturações na cadeia carbônica.**

O óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico C(18:1) e é comumente utilizado como substrato padrão para determinação da atividade lipolítica. Montesinos *et al.* (1996) e Pereira-Meirelles *et al.* (1997) confirmaram que o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, é o principal indutor da produção de lipase.

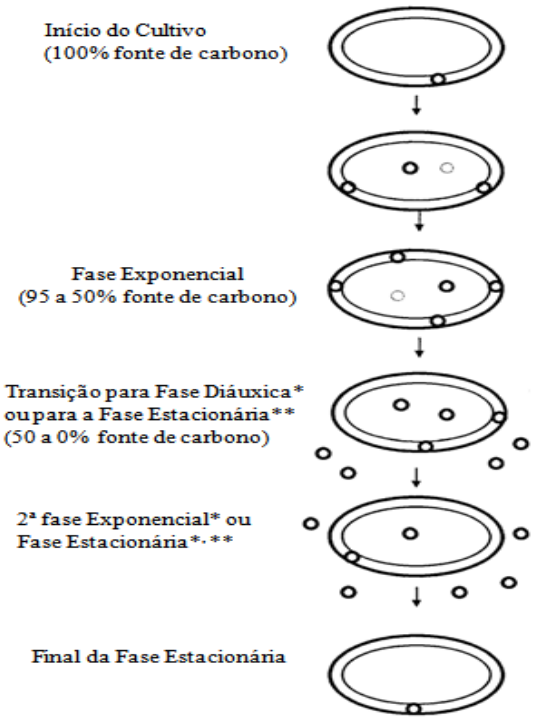
Os mecanismos que regulam a síntese de lipases por micro-organismos variam dependendo de cada cepa. De acordo com Del Rio e colaboradores (1990), quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, *Candida rugosa* utiliza-o de modo sequencial. O triglicerídeo presente no óleo é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipases provenientes do inóculo do micro-organismo, gerando glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol é revertido em biomassa, sem produção de lipase e reprime o consumo de ácidos graxos. Finalmente, os ácidos graxos livres são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases.

Ferrer *et al.* (2001) confirmou os efeitos da glicose (repressor) e do ácido oleico (indutor) sobre a produção de lipases pela levedura *C. rugosa*. Os autores relataram que genes codificadores de lipases podem ser agrupados em duas classes: os expressos constitutivamente e os induzíveis por ácidos graxos. A glicose inibe a síntese de lipases induzíveis, enquanto que o ácido oleico parece impedir a síntese de lipases constitutivas. Além disso, ácido oleico parece favorecer o acúmulo de lipases intracelulares e este acúmulo parece estar relacionado a uma alta velocidade específica de crescimento celular. A adição de glicose após o consumo de ácido oleico parou a síntese de lipases e favoreceu a liberação das lipases para o meio extracelular.

Pereira-Meirelles *et al.* (2000) propuseram um mecanismo para a produção de lipase por *Y. lipolytica* em meio contendo óleo de oliva como indutor, relacionando o consumo de ácido oleico, crescimento celular e a localização da enzima. No início do cultivo, existe uma mínima quantidade de lipase (lipase basal), provavelmente ligada à superfície celular da levedura. O óleo presente no meio extracelular começa a ser degradado pela lipase basal e, são liberados, ácidos graxos, os quais induzem a produção de lipases. A lipase produzida se acumula na parede celular, enquanto o substrato é abundante. Com a continuação do cultivo, a disponibilidade de substrato diminui e a liberação da enzima se torna necessária para assimilação do substrato remanescente. Portanto, obtém-se atividade lipásica extracelular máxima durante a fase estacionária do crescimento e, após a exaustão do substrato, as lipases ligadas à célula voltam ao nível basal (Figura 2.4).

Pereira-Meirelles *et al.* (1997) também compararam a utilização de glicose e óleo de oliva no meio de cultivo de *Y. lipolytica*, obtendo o dobro da atividade lipolítica com a adição do óleo. Além disso, foi possível manter altos valores de atividade por um maior período de tempo, o que foi atribuído pelo autor a níveis inferiores de proteases encontrados no meio contendo óleo de oliva. Em experimentos com a utilização dos

dois substratos concomitantemente, o pico de atividade foi deslocado para tempos superiores (400 h), em relação ao meio com óleo puro (150 h), sugerindo o consumo preferencial de glicose nessas condições. A máxima atividade lipolítica no cultivo de *Y. lipolytica* foi obtida quando a concentração inicial de óleo foi igual a 1% (p/v).



***meio com mais de um substrato (exemplo óleo de oliva: glicerol + ácidos graxos)**

****meio com apenas um substrato (exemplo glicose)**

Figura 2.4. Mecanismo para a produção de lipases por células de *Y. lipolytica* (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 2000).

2.2.2 Lipases intracelulares

São conhecidas três frações de lipases produzidas por micro-organismos: a intracelular, a ligada à membrana celular e a extracelular (PEREIRA-MEIRELLES, 1997) (Figura 2.5.).

As lipases extracelulares são as mais comumente estudadas e aplicadas, mas apresentam na sua produção as etapas de separação e purificação que encarecem a sua utilização (BAN *et al.*, 2002). Desta forma, as lipases intracelulares vêm despertando o interesse pelo seu potencial de uso em biotecnologia, e, portanto, já existem pesquisas para a produção de lipases intracelulares com alta atividade lipolítica e sua aplicação em reações de esterificação e transesterificação (SILVA *et al.*, 2009). Alguns trabalhos descrevem a produção de lipase intracelular ou ligada à célula a partir de leveduras

como *Y. lipolytica* e *Pichia pastoris* (JIANG *et al*., 2007; OTA *et al*., 1982; PEREIRA-MEIRELLES, 1997), de fungos filamentosos como *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus oryzae* (NAKASHIMA *et al*., 1999; MATSUMOTO *et al*., 2002; MONTEIRO *et al.*, 2010), *Rhizopus oligosporusa* (IFTIKHAR *et al.*, 2008) e *Mortierella alliacea* e *Mucor circinelloides* (JERMSUNTIEA et al., 2011; SZCZ¢-ESNA-ANTCZAK *et al.*, 2006). Alguns autores relatam que a viabilidade econômica do processo encontra-se na imobilização dessas células íntegras, ou seja, a imobilização do micélio/células contendo a lipase intracelular ou ligada em um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao micro-organismo (SILVA *et al*., 2009).

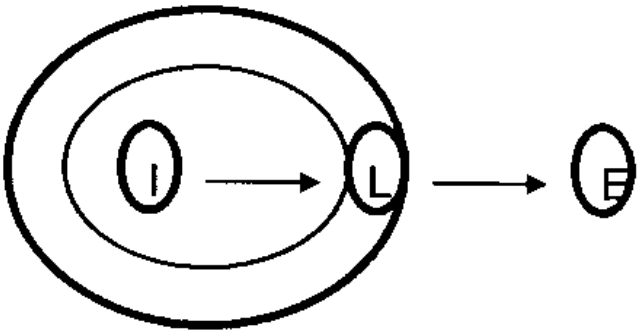


Figura 2.5. Esquema representando a localização da lipase durante o cultivo de células de *Y. lipolytica*: (I) lipase intracelular, (L) lipase ligada à célula e (E) lipase extracelular (PEREIRA-MEIRELLES *et al*., 1997).

A localização de lipases ligadas à célula foi analisada para a utilização das células íntegras em biocatálise e foram identificados dois tipos principais de lipase ligada à superfície celular de *R. oryzae*, com massas moleculares de 34 e 31 KDa. A lipase de 34 KDa (ROL 34) está ligada à parede celular e a lipase de 31 KDa (ROL 31) está ligada à membrana celular (HAMA *et al.*, 2006). ROL 34 é sintetizada e transportada até a parede celular, de onde é secretada como mostra a Figura 2.6.

WATANABE *et al.* (1977) isolaram duas cepas de *P. nitroreducens* capazes de produzir lipases extracelulares e lipases que permanecem ligadas à célula. Células de *Y. lipolytica* também apresentam lipases extracelulares e outras duas ligadas à célula (OTA *et al.*, 1982). Estas moléculas requerem ativadores que podem, inclusive, ser produzidos pelo próprio micro-organismo. PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (2000) estudaram a localização da lipase em células de *Y. lipolytica* e não detectaram lipase extracelular durante as primeiras 24 horas de cultivo, sugerindo que nesta fase a lipase intracelular

(Frações L ligada à célula e I intracelular) começa a ser liberada lentamente no meio de cultura e atinge seu máximo somente no final da fase estacionária de crescimento.

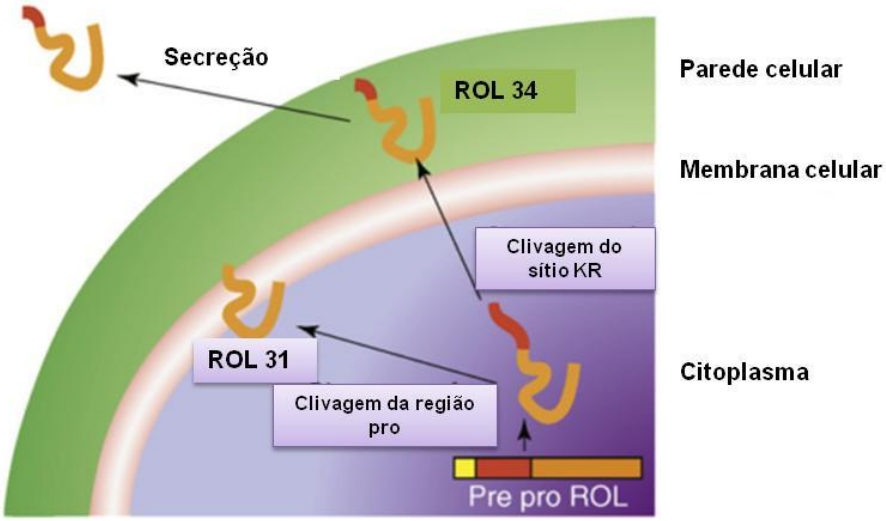


Figura 2.6. Esquema representando a maturação e localização de lipases ligadas às células de *R. oryzae* (FUKUDA *et al.*, 2008).

Considerando a economia da síntese de lipases, a utilização das próprias células ricas em lipases intracelulares, após serem secas com acetona, foi estudada em reações de esterificação (LEGIER & LOUIS, 1992), hidrólise de ésteres (DRUET *et al*., 1992) e acidólise de óleos (LONG *et al.*, 1997). Teng & Shu (2008) relataram a utilização lipase de célula íntegra de *Rhizopus chinensis* como um eficiente biocatalisador, produzindo ésteres de ácidos graxos de cadeias curtas a partir de n-hexano.

Atualmente, uma forma alternativa de utilização de lipases intracelulares que tem ganhado destaque é a imobilização passiva com partículas de suporte para biomassa (ADAMCZAK & BEDNARSKI, 2004). Existem trabalhos que relatam a utilização de células, livres ou imobilizadas, ricas em lipases, em partículas de suporte para biomassa (BSP's) para a produção de biodiesel e os resultados são promissores. Células de *R. oryzae* imobilizadas em BSP, utilizadas como biocatalisador em reações de transesterificação de óleo de soja, na presença de metanol, produziram 90% de metil ésteres ao final de 72 h de reação (BAN *et al*., 2002). Quando o micélio de *R. chinensis*, não imobilizado, foi utilizado para a mesma reação, por 72 h, o teor de metiléster obtido foi 86% (QIN *et al.*, 2008). Lipases intracelulares e ligadas à célula de *S. cerevisiae* foram submetidas a reações de transesterificação, utilizando óleo de soja como substrato e metanol e foram obtidos, respectivamente, 71 e 78% de metil ésteres (MATSUMOTO *et al*., 2001, 2002).

2.3 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um micro-organismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes. Esta levedura, que originalmente era chamada *Candida lipolytica*, é uma espécie das chamadas leveduras não-convencionais e seu estudo tem atraído grande interesse, pois apresenta uma vasta aplicação biotecnológica por sua capacidade de metabolizar lipídeos e hidrocarbonetos e de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para expressão e secreção de proteínas específicas (BARTH & GAILLARDIN, 1997). Na maioria das leveduras não-convencionais, em contraste com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e sendo aeróbio restrito, *Y. lipoly*tica não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (ANDREISCHEVAN *et al*., 1997; FLORES *et al*., 2000).

Esta levedura não é considerada patogênica (PÉREZ-CAMPOS & DOMINGUEZ, 2001) e, portanto, é utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de micro-organismos unicelulares, aroma de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados pela *American Food and Drug Administration* como GRAS (*Generally Regarded As Safe* – Geralmente Reconhecido como Seguro) (TSUGAWA *et al*., 1969). Além disso, esta levedura excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (NICAUD *et al.*, 2002).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. O dimorfismo tem sido estudado como um fator importante para o crescimento e proliferação das espécies que o apresentam (SZABO, 1999).

Yarrowia lipolytica tem como habitat, substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter crescimento ótimo a 30ºC, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32ºC (BARTH & GAILLARDIN, 1997).

A seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada (DUJON *et al.*, 2004), permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas (MULLER *et al*. 1998).

A gama de substratos utilizados por *Yarrowia lipolytica* inclui alcanos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, proteínas e alguns açúcares (principalmente glicose). Apesar de alguns trabalhos terem reportado a inclusão de sacarose nessa gama de substratos (NICAUD *et al.*, 1989), algumas cepas não apresentam atividade invertásica detectável (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997).

A levedura *Y. lipolytica* é geralmente isolada de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLER & MENDONÇA-HAEGLER, 1981), laticínios, flora de queijos picantes (BARTH & GAILLARDIN, 1997), produtos avícolas crus (ISMAIL *et al*., 2001). Essa variedade de fonte demonstra uma grande adaptação a substratos hidrofóbicos.

Amaral *et al.* (2006) realizaram a caracterização da superfície celular desta levedura e observaram que *Y. lipoly*tica IMUFRJ 50682 apresenta alta afinidade por moléculas, líquidos e superfícies hidrofóbicas quando imersas em água. A sua superfície celular é anfifílica, apresentando alta atração por substratos hidrofóbicos e a interação entre as células e estes compostos é realizada por proteínas ou glicoproteínas presentes na parede celular. Além disso, esta levedura secreta um surfactante que facilita a interação superfície celular/superfície hidrofóbica.

Também, *Y. lipolytica* é amplamente utilizada em processos de biorremediação, devido às suas características metabólicas específicas e à sua superfície celular hidrofílica, o que permite excelente degradação de compostos hidrofóbicos (MOFTAH *et al.*, 2013).

Quando substratos hidrofóbicos são utilizados, acredita-se que estes se encontram dispersos no meio, sob a forma de gotas e os micro-organismos possuam mecanismos para facilitar o acesso a ele (AMARAL *et al.*, 2006). A assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante. O micro-organismo tem acesso à maior parte do substrato através de contato (ERICKSON & NAKAHARA, 1975).

*Yarrowia lipo*lytica é capaz de produzir biosurfactante em diferentes fontes de carbono (hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão), porém não produz em substratos solúveis como glicose, glicerol e álcool (CIRIGLIANO & CARMAM, 1984; ZINJARDE & PANT 2002). Amaral *et al*. (2007) relataram a produção de um bioemulsionante, chamado Yansan, pela levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono e PFC (perfluocarboneto). Yansan é um complexo lipídico-carboidrato-proteico, possui alta atividade emulsionante e estabilidade em ampla faixa de pH (3-9). Além disso, forma emulsões com hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos e perfluorocarbonetos.

Yarrowia lipolytica apresenta a capacidade de gerar produtos de alto valor como lipases e ácido cítrico, inclusive quando cultivada em substratos residuais. Moftah *et al.* (2013) relataram que os resíduos do processamento de azeite de oliva fornecem os nutrientes necessários para o crescimento e a produção de lipases por esta levedura, o que leva a uma valorização deste resíduo.

2.3.1 Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é capaz de produzir lipases intracelulares, ligadas à célula e extracelulares e sua produção é muito influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos como temperatura, pH, fonte de nitrogênio e carbono, presença de lipídios e de biosurfactantes, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido (PEREIRA-MEIRELLES, 1997; CORZO & REVAH, 1999; AMARAL, 2007).

Yarrowia lipolytica secreta várias isoformas de lipases, com massa molecular variando de 38,5 a 44 KDa. Estudos genômicos sugerem que esta levedura apresenta 25 supostas lipases, produzidas por seis diferentes cromossomos (A-F) (FICKERS *et al.*, 2005a; LIU *et al*., 2010; NAJJAR *et al*., 2011; FICKERS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al*., 2011; KUMARI & GUPTA, 2012). Cada isoforma tem diferentes propriedades, principalmente em relação às características de especificidade e preferência por substratos (RIBEIRO *et al*., 2011). A lipase Lip2 de *Y. lipolytica* é produzida em grandes quantidades na presença de ácido oleico, que funciona como um fator chave para a ativação do gene lip2 e indução de sua produção.

A variável mais estudada e que sempre impactou a produção de lipases é a fonte de carbono, uma vez que as lipases são facilmente induzidas por lipídios, como óleo ou qualquer outro indutor da mesma natureza. Porém, alguns autores vêm apresentando em

seus trabalhos, na ausência de gorduras ou óleos, expressiva síntese de lipases por esta levedura (AMARAL *et al* 2006).

Lipases extra e intracelulares apresentam atividades diferentes. Ota *et al.* (1970) relataram que a lipase extracelular precisa de um ativador para a hidrólise de triglicerídeos, enquanto que a lipase ligada à superfície celular não, exibindo, desta forma, propriedades diferentes da extracelular. Ota *et al.* (1982), identificaram que a levedura *Saccharomycopsis lipolytica* (hoje, chamada *Y. lipolytica*) é capaz de produzir dois tipos diferentes de lipases ligada à célula: lipase I (39 KDa) e lipase II (44KDa), as quais apresentaram propriedades muito similares e estas lipases foram até 3 vezes mais ativas que a lipase extracelular produzida pela mesma levedura, nas mesmas condições. Em 1986, Gomi e colaboradores concluíram que as lipases de *Y. lipolytica* necessitam de um cofator produzido pela levedura e íons cálcio para manter sua atividade catalítica.

A produção das diferentes frações de lipase depende da fase de crescimento em que as células se encontram. A fração de lipase extracelular não é detectada durante as primeiras 24 horas de cultivo de células de *Y. lipolytica* (OTA *et al*., 1970; PEREIRA-MEIRELLES, 1997). Através de análises por *Western Blotting* em membrana de nitrocelulose, usando anticorpos policlonais anti-YLLIP2, a lipase Lip2 foi detectada na superfície celular de *Y. lipolytica* durante a fase exponencial e é liberada para o meio de cultura durante a fase estacionária, quando a concentração de substrato diminui (FICKERS *et al.*, 2004).

Najjar *et al.* (2011) obtiveram resultado similar em cultivo com a mesma levedura. Quando *Y. lipolytica* cresceu na presença de azeite de oliva como sua única fonte de carbono, a lipólise de triglicerídeos ocorreu rapidamente a partir do início do cultivo. Nas primeiras 15 h de cultivo, a atividade lipolítica aumentou continuamente e 60 a 80% dessa atividade estava presente nas células (associada á superfície celular). Neste período, os triglicerídeos foram intensamente degradados, sugerindo que o processo lipolítico ocorre principalmente na superfície celular. Após 15 h, a atividade lipolítica gradualmente aumentou no meio de cultivo e chegou ao máximo em 30 h de cultivo. Em 70-80 h de cultivo, nenhuma atividade foi encontrada no meio, mas uma atividade lipásica residual pôde ser detectada na célula.

Lipases intracelulares em *Y. lipolytica* apresentam diferentes funções. Dulermo *et al.*, 2013 estudaram duas lipases codificadas pelos genes TGL3 e TGL4. Segundo os autores, as lipases YlTgl3 e YlTgl4 atuam na mobilização e na degradação de triglicerídeos e se localizam em corpúsculos lipídicos.

As lipases Lip7p e Lip8p diferem entre si e da lipase Lip2 por apresentarem especificidade por substratos diferentes. Lip2p é a responsável pela maior parte da atividade extracelular detectada nos cultivos com *Y. lipolytica* e apresenta grande afinidade por substratos com cadeias longas de carbono (PIGNEDE *et al.,* 2000; FICKERS *et al.*, 2004). Lip7p e Lip8p estão principalmente associadas ou retidas na célula durante a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento e podem corresponder às lipases descritas por Ota *et al*. (1982) (FICKERS *et al.,* 2005a). Apresentam maior termoestabilidade que a Lip2p e apresentam especificidade por cadeias curtas (C6) e médias (C10), respectivamente (FICKERS *et al.,* 2005a; LIU *et al.*, 2010). Kumari & Gupta (2012) relataram alta atividade de Lip8 também com substratos oleosos ricos em ácido oleico (C18).

Vários trabalhos realizaram o estudo de lip7 e lip8 através da sua ancoragem na superfície celular de micro-organismos ou através de clonagem e expressão extracelular destas lipases. Essas enzimas apresentam diferenças significativas em sua atividade e características de acordo com o tipo de célula em que são expressas ou com o sistema de ancoragem utilizado (LIU *et al*., 2010).

2.4 Óleo de fritura residual

Com a velocidade da vida moderna, existe um grande aumento da procura de alimentos rápidos e as frituras ganharam destaque, pois são práticas e conferem sabor, odor e textura agradável aos alimentos, sendo um processo culinário de grande aceitação em todas as idades e classes sociais. A disseminação do consumo de fritura tem contribuído para o aumento do descarte de óleos e gorduras (CASTELANELLI, 2008).

O óleo de fritura residual (OFR) é proveniente de frituras sucessivas do óleo vegetal que pode ser extraído de soja, milho, canola, algodão, girassol, amendoim, buriti, coco, babaçu, mamona e palma.

Os óleos vegetais são constituídos, predominantemente, de triacilgliceróis e pequenas quantidades de mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, tocoferol, proteínas, esteróis e vitaminas, possuem de 1 a 4 insaturações na cadeia carbônica, sendo líquido à temperatura ambiente. A maioria dos ácidos graxos do óleo comestível apresentam cadeias de 8 a 24 carbonos. Os ácidos graxos insaturados mais

frequentemente encontrados são o oléico, linoléico, α-linolênico, os quais são predominantes seguidos dos ácidos araquidônico, elaídico e erúcico (MORETTO & FETT, 1998; REDA & CARNEIRO, 2007; PEREIRA, 2008).

O óleo de soja comercial possui uma composição média centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico, esteárico, oléico, linoléico e α-linolênico (JUNIOR, 2011), conforme pode ser observado na Tabela 2.2. Esta é a composição comum dos óleos mais utilizados pela população.

Tabela 2.2. Características físico-químicas originais de óleos de girassol, de milho e de soja comerciais (JORGE *et al*., 2005).

Determinações Físico-Químicas*	Soja	Milho	Girassol
Ácidos Graxos Livres (% em ácido oléico)	0,09	0,11	0,13
Índice de peróxidos (meq/Kg)	3,21	1	0,99
Índice de Refração (40ºC)	1,4671	1,4657	1,4679
Compostos polares totais (%)	5,09	3,2	3,1
Composição em ácidos graxos (%)			
Ácido Palmítico 16:0	12,66	12	6
Ácido Esteárico 18:0	3,96	2,9	4,32
Ácido Oléico 18:1	23,61	32,2	21,09
Ácido Linoleico 18:2	55,26	52,2	67,78
Ácido Linolênico 18:3	4,52	0,7	0,15

*Valores obtidos da média de duas determinações

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (85,656 milhões de toneladas) e, por isso, este é o óleo mais utilizado pela população e representa a maior parte do OFR gerado (CASTELANELLI, 2008; JUNIOR, 2011). A produção brasileira de óleo de soja na safra 2013/2014 atingiu 7,4 milhões de toneladas, volume acima dos 6,8 milhões de toneladas produzidas no período anterior, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove).

No Brasil, o consumo de óleos vegetais por família é de 7 Kg/ano, levando em conta que temos em torno de 57.530.555 famílias, é possível estimar uma produção de resíduos de óleos vegetais de 329 t/ano, sem contabilizar a geração desses resíduos em indústrias e restaurantes (ARAÚJO *et al*., 2013; IBGE, 2010).

O mecanismo de degradação do óleo vegetal durante a fritura é complexo e depende de vários fatores, como o tipo de óleo, número de insaturações dos ácidos graxos presentes, tempo de exposição ao calor, etc. Além disso, o tipo de alimento que é frito (de origem animal ou vegetal) também interfere na qualidade do óleo residual. O processo de fritura degrada o óleo vegetal de três formas: por reações de hidrólise

(provocada pela água presente nos alimentos), por oxidação (causada pelo oxigênio do ar) e por alteração térmica, devido à exposição a uma temperatura de aproximadamente 200 °C. Todas estas reações geram produtos diferentes como aldeídos, cetonas, epóxidos e alteram características como o teor de umidade e de lipídeos totais destes óleos (JORGE *et al.*, 2005; TANAMATI *et al.*, 2010; JUNIOR, 2011).

Tanamati *et al*. (2010) relataram que o teor de ácidos graxos livres aumenta com o número de frituras e ácidos graxos trans são formados com a exposição dos óleos vegetais ao calor. Os óleos e gorduras submetidos repetidas vezes à fritura sofrem também alterações organolépticas, se tornam mais escuros, viscosos, apresentam aumento de acidez e desenvolvem odor desagradável, chamado de *ranço*. Portanto, não devem mais ser utilizados em alimentação por conferirem sabor e odor desagradáveis aos alimentos e adquirirem características químicas nocivas à saúde (MORETTO & FETT, 1998; MENDONÇA, 2008).

Haba *et al*. (2000) observaram que o teor de ácido oleico de azeite de oliva residual, obtido após processo de fritura, caiu de 84 para 55%, quando comparado com o azeite nativo. Alteração no teor de ácido linoleico e aumento no teor de ácidos graxos com menos de 12 átomos carbono também foram observadas. Alterações similares foram observadas em resíduo de óleo de girassol.

- O problema ambiental

De acordo com o Programa de Gestão Ambiental do Ministério Público Federal (PGA, 2012) um litro de óleo de cozinha utilizado pode contaminar um milhão de litros de água. O descarte inadequado dos OFR's na rede de esgoto leva a um aumento dos gastos com a manutenção destas redes e à obstrução do sistema. Ocorre um aumento dos níveis de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio) e de SST (sólidos suspensos totais) nas águas residuais a serem tratadas, implicando em maior dificuldade para a limpeza destes ductos. Parte do óleo adere às paredes das tubulações e outras substâncias se acumulam neste material, levando à diminuição do diâmetro dos ductos, provocando vazamentos e diminuindo também a vida útil do sistema (MAURÍCIO, 2008).

Grande parte dos municípios brasileiros apresenta ligação de sua rede de esgoto à rede pluvial e desta à rede fluvial e a lagos. O acúmulo desses óleos em corpos d´águas (rios, mares, lagos) impede a oxigenação e a entrada de luz, a temperatura pode chegar a 60 ºC, dificultando a proliferação de algas, matando diferentes tipos de animais

e vegetais microscópicos e interferindo na cadeia alimentar de vários seres vivos. No solo, o óleo pode causar a proliferação indesejável de micro-organismos, fermentação e danos ao sistema radicular de plantas (SABESP, 2008; MEI & LEITE, 2011).

O estudo realizado por Castelanelli (2008), na cidade de Santa Maria-RS, mostrou que empresas com grande volume de fritura diária geram enorme quantidade de óleo de fritura residual e 57 % deste resíduo é descartado em lixo comum, acondicionado em garrafas PET ou diretamente na pia. Quando a pesquisa foi realizada em residências, 93% do resíduo gerado foi descartado sem aproveitamento, diretamente na pia ou no lixo. Estes dados mostram uma realidade preocupante e a necessidade urgente de implementação de projetos de reaproveitamento dos OFR.

2.4.1 Reaproveitamento de resíduos

De acordo com Reis *et al*. (2007), os óleos vegetais e a gordura animal possuem valor econômico positivo, ou seja, podem ser reaproveitados em seu potencial mássico e energético. Algumas rotas de reaproveitamento deste resíduo já estão estabelecidas: produção de sabão, formulação de tintas, produção de massa de vidraceiro, formulação de farinha básica para ração animal, queima em caldeira e produção de biodiesel, obtendo-se a glicerina como subproduto (ZUCATTO *et al.*, 2013).

- Produção de Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável, produzido a partir de óleo vegetal ou gordura animal, que pode funcionar como um substituto para o diesel. O uso de óleos vegetais para a sua produção traz várias vantagens, pois acarreta a substituição de combustíveis fósseis por fontes alternativas e renováveis de energia e não contribui para a emissão de gases. Os ésteres produzidos com OFR também promovem a redução de emissão de partículas em cerca de 40% e quando é utilizado óleo de fritura residual como matéria-prima, além dos benefícios já mencionados, há a valorização deste resíduo cujo acúmulo causa problemas ao meio ambiente (ALCANTARA *et al.*, 2000; AMORIM, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Excelentes resultados já foram obtidos utilizando óleo de fritura residual para a produção deste biocombustível e sua viabilidade tem sido comprovada (AMORIM 2009; OLIVEIRA, 2010). No entanto, é necessária a realização de algumas etapas (decantação, filtração, neutralização, secagem) para a limpeza do óleo, antes de

submetê-lo à reação de transesterificação, devido à presença de impurezas neste tipo de resíduo e elevado teor de água (CASTELANELLI, 2008; AMORIM, 2009).

Inúmeros projetos piloto para a produção de biodiesel com OFR já existem em todo o país e muitas cidades já possuem campanhas de coleta seletiva e reaproveitamento deste resíduo, entre estes projetos está o Projeto Brasil Biodiesel, liderado pelas empresas Martin-Brower e McDonald's, transformando os resíduos do óleo de cozinha em biocombustível, utilizando-o em caminhões de entrega às lojas da empresa. Além desta iniciativa, o Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) em Porto Alegre – RS possui o Projeto de Reciclagem de Óleo de Fritura, com postos distribuídos em toda a cidade. Em São Paulo, há o programa de Reciclagem de Óleo de Fritura (PROL) da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP). A COPPE e o McDonalds, no Rio de Janeiro, possuem em conjunto um sistema de coleta em mais de 40 lanchonetes da rede para a produção de biodiesel. Ainda no Rio de Janeiro, o projeto PROVE – Programa de Aproveitamento de Óleos Vegetais transforma o óleo de cozinha em biocombustível através de parcerias com cooperativas e secretaria de meio ambiente do Rio de Janeiro. Em Brasília, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) possui em parceria com várias empresas, o "Sistema Produtivo de Biodiesel a partir de Misturas de Óleos Virgens e Usados", projeto chamado "Biofrito" (CASTELANELLI, 2008, JUNIOR, 2011; ZUCATTO *et al.*, 2013).

- Utilização de resíduos como substrato para micro-organismos

Vários trabalhos relatam a utilização de substratos alternativos para a produção de meios de cultura e de produtos de médio ou alto valor como vantagem sobre os processos tradicionais de produção. A chamada "tecnologia limpa" busca na reciclagem de materiais uma alternativa sustentável para o desenvolvimento das atividades humanas. Com base nisso, muitos autores estão pesquisando a utilização dos resíduos agroindustriais como substrato para a transformação microbiana. Vários resíduos agrícolas têm sido relatados como eficientes para a produção de lipases, são eles: farelos (trigo, arroz, soja, cevada), tortas (soja, azeite, gergelim, babaçu) e bagaço (cana de açúcar) (SALIHU *et al*., 2012).

Borras do processo de obtenção de óleos de canola, milho e girassol foram utilizadas por Santos (2012) como indutores da produção de lipases fúngicas através de fermentação em estado sólido. Foram encontrados valores significativos de atividade

lipásicas e com a borra de óleo de girassol obteve-se os melhores resultados, provavelmente devido ao predomínio de ácido oleico e linoleico na sua constituição.

Haba *et al.* (2000) pesquisaram a produção de lipases por 47 cepas de bactérias e leveduras, cultivadas em óleo de fritura residual e obtiveram bons resultados de atividade lipásica com bactérias do gênero *Pseudomonas*, cultivadas em resíduos do processo de fritura de azeite de oliva e óleo de girassol.

A produção de lipases também foi relatada com a levedura *Geotrichum candidum*, quando cultivada na presença de óleo de canola, após ser utilizado para fritar batatas. Foi observado que a levedura apresentou capacidade de sintetizar tanto lipases extracelulares quanto intracelulares e os valores de atividade lipolítica variaram somente com a concentração de óleo utilizado. No entanto, os melhores resultados de produção de lipases foram obtidos com óleo de oliva, isso foi devido, provavelmente, a problemas relacionados às condições de cultivo (RYWIŃSKA *et al*., 2008). Em outro trabalho, Mladenoska & Dimitrovski (2013) demostraram que o resíduo de óleo de soja foi eficiente fonte de carbono para a produção de lipase por *Geotrichum candidum penicillatum* em meio contendo extrato de lêvedo como fonte de nitrogênio.

Yarrowia lipolytica foi capaz de produzir lipases utilizando resíduos do processamento do óleo de oliva. Águas residuais e resíduos sólidos da extração do óleo de azeitona bruto forneceram os nutrientes necessários para o crescimento da levedura e a produção da enzima em quantidades promissoras que motivaram, inclusive, estudos com outras enzimas (MOFTAH *et al*., 2013).

Resíduos da fritura de óleo de palma foram usados como única fonte de carbono para a biossíntese comercial dos biopolímeros poli (3-hidroxibutirato) e poli (3-hidroxibutirato-co- 3-hidroxi-hexanoato) pela bactéria *Cupriavidus necator*. O resíduo de óleo de palma se mostrou eficiente fonte de carbono para a produção dos biopolímeros, oferecendo a possibilidade de substituição da matéria-prima atualmente utilizada e redução dos custos de produção (KAMILAH *et al*., 2013).

Com base no exposto, considera-se importante e promissor o estudo de novas rotas para a reutilização dos óleos residuais de fritura, os quais podem ser transformados em matéria-prima industrial de grande valor. Desta forma, o óleo de fritura residual de soja foi testado como indutor da produção de lipase no presente trabalho.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese consistiu em produzir e caracterizar lipases associadas às células de *Yarrowia lipolytica* utilizando como indutor o óleo de soja proveniente de processos de fritura.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a produção de lípases extracelulares e associadas às células através do emprego de diferentes fontes de carbono e indutores;
2. Quantificar a atividade das enzimas por metodologias padrão;
3. Verificar a influência dos métodos de separação das frações enzimáticas na atividade da enzima;
4. Realizar a caracterização bioquímica dos extratos obtidos (pH, temperatura, afinidade por diferentes substratos);
5. Identificar as lipases intracelulares através de técnicas de biologia molecular;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados foram: peptona bacteriológica e extrato de lêvedo (*Oxoid* - Hampshire, UK), glicose P.A. (Vetec-RJ, Brasil), agar-agar (Vetec – RJ, Brasil). *Antifoam* 204 foi adquirido em *Sigma-Aldrich CO* (MO, USA) com o propósito de controlar a formação de espuma no meio fermentativo. Azeite de oliva (Gallo®) e óleo de fritura residual (obtido do processo de fritura de óleo de soja do restaurante do Museu Nacional/ UFRJ) foram utilizados como indutores. A matéria-prima utilizada como fonte de glicerol foi gentilmente cedida pelo CENPES, sendo proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol via catálise básica. A glicerina foi submetida a uma etapa de neutralização na própria planta piloto, apresentando pH neutro. A goma arábica utilizada nas reações de hidrólise foi adquirida de Vetec - RJ, Brasil.

4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e nas análises foram:

1) Incubador com agitação (shaker) (Tecnal TE – 420);
2) Capela de fluxo laminar BioFlux II 90A;
3) Centrífuga *Eppendorf* modelo *Centrifuge 5804R*;
4) Centrífuga *Fanem* modelo *204-NR*;
5) Espectrofotômetro *Bel Photonic* modelo *SP2000-UV*;
6) Espectrofotômetro *Shimadzu* modelo *UV-1800*;
7) Microscópio ótico Nikon Eclipse E200;
8) HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), Waters 1525;
9) pHmetro de bancada digital Digimed, modelo DM-22;
10) Deionizador ORG 300 (IDEOXIMA);
11) Sonicador Ultrasonic Cleaner;
12) Fonte para eletroforese digital GSR, 300 STD;
13) Sistema de Eletroforese XCell surelock Mini cell system (Life Technologies);
14) Titulador automático Metrohm 869.

15) Ultra Turrax Digital IKA T25;
16) Vórtex NOVA;
17) Ultra Freezer CL 120 -80V Cold-Lab;
18) Liofilizador Terroni Enterprise I;
19) Termociclador MJ Mini Thermal Cycle (Bio Rad);
20) Sistema de documentação de géis Gel Doc™ EZ Imager (Bio Rad);
21) Ultrassom Analis VCX 130 PB;

4.3 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (Figura 4.1) selecionada de um estuário no Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

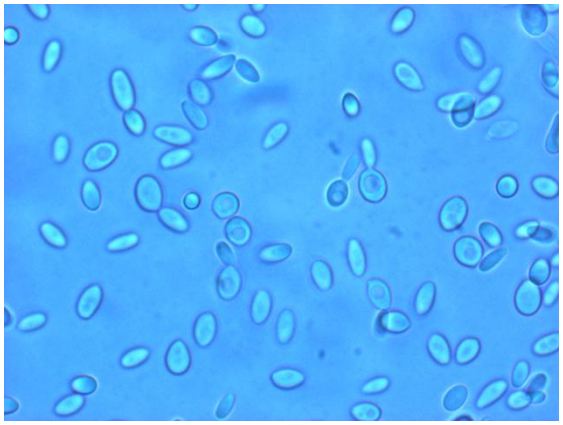


Figura 4.1. Imagem de microscopia ótica da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em aumento de 400x utilizando microscópio ótico Nikon Eclipse E200

4.3.1 Preservação da cultura

As células foram conservadas por repiques regulares em tubo de ensaio com meio YPD ("*Yeast Extract*, *Peptone*, *Dextrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e solidificado com agar 3%. Após incubação a 28 ºC (BARTH e GAILLARDIN, 1997) por 48 horas na estufa, as culturas são refrigeradas a 4 ºC.

4.3.2 Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.3.1) inoculou-se, de forma estéril com uma alça de platina, em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL o qual foi incubado em um agitador rotatório a 28ºC, 160 rpm de agitação por 72 h. Após este período, a absorvância (570 nm) de uma amostra desse cultivo foi determinada e, em seguida, as células foram centrifugadas de forma estéril a 1258 *g* por 5 minutos e ressuspensas, servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse inóculo é suficiente para obter-se a concentração inicial de células desejada em mg p.s.cel/mL nos meios de cultivo.

4.4 Esterilização de meios de cultura e instrumentos

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 20 minutos. As pipetas, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 20 minutos.

4.5 Produção de lipases utilizando diferentes fontes de carbono e indutores

4.5.1 Experimentos Preliminares

Com base no estudo realizado por Pereira-Meirelles *et al*. (1997), selecionou-se azeite de oliva para realizar os testes iniciais de produção de lipase intracelular isoladamente ou associado a outras fontes de carbono como glicose e glicerina bruta obtida por catálise básica. Posteriormente, outros ensaios foram realizados utilizando óleo de fritura residual como substituto do azeite de oliva na indução da produção de lipases intracelulares por *Yarrowia lipolytica*. Os experimentos preliminares foram realizados em *shaker*, utilizando os seguintes meios de cultura preparados com água destilada:

Meio YPD*, constituído por glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L.

Meio YPDO*, constituído por glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L.

Meio YPG, constituído por glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L.

Meio YPGBO, constituído por glicerina bruta, com concentração ajustada para 20 g/L de glicerol; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L; antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L.

Meio YPGBOF, constituído por glicerina bruta, com concentração ajustada para 20 g/L de glicerol; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L; antifoam 204 1g/L e óleo de fritura residual 10g/L.

Meio OO, constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L.

Meio OF, constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e óleo de fritura residual 10g/L.

Estes experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 500 mL de meio de cultivo, inoculados com células cultivadas em meio YPD, como descrito no item 4.3.2, em quantidade suficiente para obter uma concentração celular inicial de, aproximadamente, 1,0 mg de peso seco de células (p.s. cel)/ mL. Esses meios de cultivo foram incubados em um agitador rotatório (*shaker*) a 250 rpm, 28ºC por até 100 horas com amostragens em 6, 15, 24, 30, 48, 72 e 96h.

De forma a identificar a influência das fontes de carbono e dos indutores na produção de lipase intracelular, as atividades enzimáticas (intracelular, extracelular e associada à célula) foram monitoradas durante o processo através das metodologias descritas no item 4.10.6.

Amostragem

Inicialmente, foram realizadas amostragens do meio de cultura para determinação da atividade da lipase intracelular por até 7 dias de cultivo. Posteriormente, foi estabelecida amostragem em 24 h. O procedimento consistiu em retirar duas amostras do meio de produção: uma para a obtenção da concentração celular e outra alíquota foi separada e centrifugada a 1258 *g* por 5 minutos, a 4ºC e o sobrenadante utilizado para determinação do pH e o restante congelado (-4ºC) para posterior análise da concentração do substrato e de atividade enzimática da fração extracelular. O centrifugado obtido foi utilizado no procedimento de isolamento das

demais frações (intracelular e associada à célula). Estas frações foram congeladas para posterior medida da atividade enzimática.

4.6 Obtenção das frações intracelulares de lipase

4.6.1 Experimentos Preliminares em Erlenmeyers

Para determinar o melhor método para a obtenção das frações de lipase em cultivos em Erlenmeyers, foram utilizados os meios contendo somente os indutores como fonte de carbono (meio OO e meio OF). Os cultivos foram realizados em *shakers* a 250 rpm e 28°C e amostras foram coletadas em 24 h de cultivo e submetidas aos dois métodos de extração avaliados (vórtex e ultrassom).

4.6.2 Experimentos em microplacas

Para otimizar a avaliação dos efeitos do ultrassom e do vórtex sobre a atividade das frações, foram realizados cultivos em microplacas contendo 24 poços, com capacidade de 10 mL, com 2 mL de meio de produção (Figura 4.2).

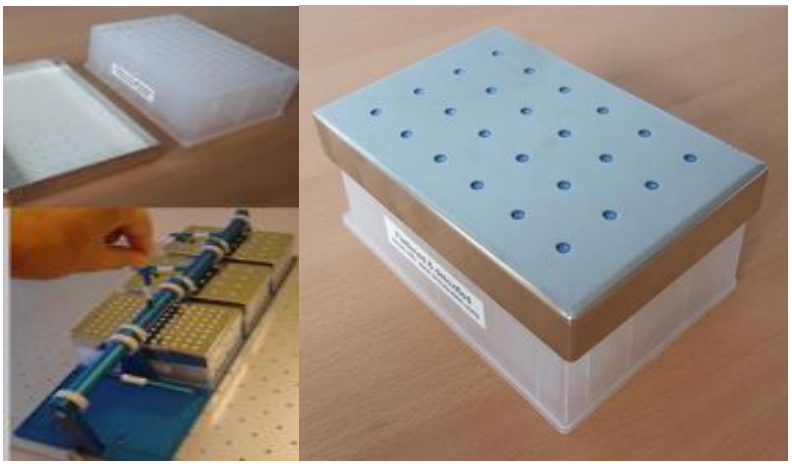


Figura 4.2. Imagens das microplacas utilizadas na cultura.

Meios específicos para cultivos em microplacas:

Emulsão de azeite de oliva ou de ácido oleico

Para adicionar estes componentes oleosos ao meio de cultura para o cultivo em microplacas foi preparada uma emulsão a 20 % (5 mL de azeite de oliva ou ácido oleico; 20 mL de água destilada estéril e 125 µL de Tween 40 estéril). Esta emulsão foi submetida a vórtex por 10 segundos e sonicada por 60 segundos a 80% de potência

acústica, em sonicador com potência nominal máxima de 130 W. Em seguida, diferentes volumes da emulsão foram adicionados ao meio de cultura para obter a concentração desejada do indutor:

- **Meio OOm,** constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e acrescido de emulsão preparada previamente contendo 20 % de azeite de oliva como indutor.
- **Meio AO,** constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e acrescido de emulsão preparada previamente contendo 20 % de ácido oleico como indutor.

As células foram incubadas em agitador rotatório a 250 rpm, 28 ºC por 15 h. As células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de tampão MOPS e submetidas aos métodos de separação das frações intracelulares.

Para a determinação da concentração de células e consumo de ácido oleico 0,5 mL de meio foi adicionado a 0,5 mL de isopropanol para extrair todo o ácido oleico presente nas células. As amostras foram submetidas a vórtex por 30 segundos e centrifugadas a 4 °C, 20627 *g* por 5 minutos e os sobrenadantes foram congelados para determinar a concentração de ácido oleico. As células foram ressuspensas em água destilada para a leitura da absorbância.

4.6.3 Padronização do método para a separação das frações de lipase

Foram estudadas duas metodologias de separação das frações enzimáticas: (i) lise celular mecânica com vórtex e pérolas de vidro e (ii) ultrassom à baixa frequência (20 kHz), com o objetivo de determinar o método mais eficiente para a obtenção de frações de lipase intracelular com atividade enzimática.

Nas duas metodologias estudadas, foi utilizado tampão MOPS (ácido 3-N-morfolino propanosulfônico) 0,1 M, pH 7,0 com 2,0 mM de EDTA e 5,0 mM de β-Mercaptoetanol, para a extração e manutenção das frações enzimáticas.

Extração da Enzima por Ação Mecânica (cultivos em Erlenmeyers)

O procedimento de lise celular com pérolas de vidro e vórtex foi adaptado de Pereira-Meirelles *et al.* (2000). Nesta metodologia, coleta-se uma alíquota do cultivo correspondente a 100 mg p.s. de células em tubo falcon. Em seguida, centrifuga-se a amostra a 4ºC, 4630 *g* por 5 minutos. O sobrenadante (que corresponde à fração de **lipase extracelular - LE**) é separado e congelado a -4 ºC. A seguir, as células

(sedimento obtido) são lavadas com água destilada e depois com tampão MOPS pH 7,0 e centrifugadas nas mesmas condições.

Ao final da lavagem, as células são ressuspensas em 1 mL de tampão MOPS e adiciona-se 3 g de pérolas de vidro 425 - 600µm - Sigma-Aldrich CO (MO, USA). Segue-se o processo de rompimento celular com 3 ciclos de agitação em vórtex, por 1 minuto, intercalados com banho de gelo por 1 minuto.

Ao final dos 3 ciclos de agitação, separa-se o extrato celular com pipeta automática em tubo *eppendorff* e realiza-se centrifugação a 12850 *g* por 5 minutos, a 4ºC. Desta forma, obteve-se o sobrenadante **(lipase liberada - LL)** e ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão MOPS pH 7,0 o qual corresponde à fração de lipase chamada, neste trabalho, de **lipase associada à célula (LA)**. As frações obtidas foram congeladas (-4 ºC) até a determinação da atividade da enzima.

Extração das frações enzimáticas por ultrassom (cultivos em Erlenmeyers)

A metodologia de extração da enzima utilizando ultrassom foi elaborada com base nos resultados obtidos por Kapturowska *et al.* (2012).

Coleta-se 20 mL do cultivo em tubo falcon. Em seguida, centrifuga-se a amostra a 4 ºC, 4630 *g* por 5 minutos. O sobrenadante (que corresponde à fração de **LE**) é separado e congelado. A seguir, as células (sedimento obtido) são lavadas com água destilada e depois com tampão MOPS pH 7,0 e centrifugadas nas mesmas condições.

Ao final da lavagem, as células são ressuspensas em 20 mL de tampão MOPS e levadas ao sonicador Unique (potência máxima de 500 W, micro ponta de titânio de 4 mm) e, em banho de gelo, inicia-se o processo de sonicação das células nas seguintes condições: 2 ciclos de extração, potência de 150 W, por 9 minutos.

Ao final dos 2 ciclos de sonicação, realiza-se centrifugação a 4ºC, 4630 g por 5 minutos. Desta forma, obtém-se o sobrenadante (**LL**) e ressuspende-se o sedimento em 20 mL de tampão MOPS pH 7,0 o qual corresponde à fração de **LA**. As frações obtidas são congeladas até a determinação da atividade da enzima.

Extração das frações enzimáticas obtidas em cultivos em microplacas

O método de extração das frações enzimáticas foi modificado e adaptado para reduzir os volumes de amostra e realizar os experimentos em microplacas. Desta forma, 1 mL do meio de cultura foi centrifugado a 4 °C, 20627 *g* por 5 minutos e o sobrenadante foi congelado para a determinação da atividade hidrolítica (fração **LE**). As

células foram lavadas com água destilada e depois com tampão MOPS pH 7.0 e centrifugadas nas mesmas condições. As células foram suspensas em 1 mL de tampão MOPS e submetidas a um ciclo de extração com vórtex sem pérolas de vidro e/ou ultrassom, em sonicador com potência máxima de 130 W, em banho de gelo, com diferentes potências e tempos de exposição. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 20627 *g* por 5 minutos. O sobrenadante **(LL)** foi separado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão MOPS (**LA**). As frações foram congeladas para posterior medida de atividade.

4.6.4 Viabilidade Celular

Para a determinação da viabilidade celular após submeter as células ao ultrassom, foram misturadas partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metileno 0,25 g/L). A porcentagem ou o número de células viáveis foi determinado transferindo-se com uma pipeta a amostra para a câmara de Neubauer e a quantificação foi realizada em microscópio óptico. A fração de células viáveis é a razão entre o número de células não coradas e o número total de células (PIERCE, 1970).

4.7 Produção de lipases intracelulares em microplacas utilizando ácido oleico como indutor

Visto que o ácido oleico é descrito na literatura como o melhor indutor para a produção de lipases e está presente tanto no azeite de oliva quanto no óleo de fritura residual, este ácido graxo foi usado como modelo para um melhor entendimento da produção das frações intracelulares de lipase por *Yarrowia lipolytica*.

4.7.1 Influência da fonte de nitrogênio na produção de lipases intracelulares

A melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases intracelulares por *Y. lipolytica* 50682 foi investigada. Os experimentos foram realizados em microplacas com 2 mL de meio de cultura (fonte de nitrogênio 2 g/L e ácido oleico 1%). Um experimento controle foi realizado sem qualquer fonte de nitrogênio (**meio = emulsão de ácido**

oleico 1%). As células foram adicionadas para obter DO de 0,1 em cada condição. As microplacas foram incubadas em *shaker* a 250 rpm, 28ºC e amostras foram obtidas em 15 h e 40 h de cultivo. As frações intracelulares foram obtidas através de ultrassom, em banho de gelo, submetidas a um ciclo de exposição a 39 W de potência por 1 minuto. As fontes de nitrogênio testadas foram: ureia, cloreto de amônio, sulfato de amônio, casaminoácidos, peptona bacteriológica, extrato de levedura, triptona de soja, triptona N1 e triptona.

4.7.2 Influência da concentração de ácido oleico

A produção de lipase intracelular por *Y. lipolytica* foi investigada em diferentes concentrações de ácido oleico. Os experimentos foram realizados em microplacas com 2 mL de meio de produção (peptona 0,64%; extrato de lêvedo 1%) e diferentes concentrações de ácido oleico (0,5-5%). As células foram adicionadas para obter DO de 0,1 em cada condição. As microplacas foram incubadas em *shaker* 250 rpm, 28 ºC for 40 h. As amostras foram obtidas em 15 e 40 h de cultivo. As frações de lipase foram separadas através de um ciclo de ondas ultrassônicas em sonicador a 20 % de potência por 1 minuto, em banho de gelo.

4.7.3 Cinética de produção de lipases e consumo de substrato

A produção de lipase intracelular por *Y. lipolytica* foi investigada em 3 % de ácido oleico por 96 h. Foram investigados a produção de biomassa, o consumo de ácido oleico e a de produção das diferentes frações de lipase. Os experimentos foram realizados em microplacas com 2 mL de meio de produção (peptona 0,64%; extrato de lêvedo 1%). As células foram adicionadas para obter OD de 0,1 em cada cultivo. As microplacas foram incubadas em *shaker* 250 rpm, 28 ºC por 15 h. As frações de lipase foram obtidas através de um ciclo de ondas ultrassônicas em sonicador a 20 % de potência por 1 minuto, em banho de gelo.

4.8 Produção de lipases intracelulares de *Yarrowia lipolytica* utilizando óleos como indutores

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 1000 mL com 500 mL de meio OO ou meio OF, agitados em shaker a 250 rpm e 28 ºC. As amostras (20 mL) foram coletadas entre 15 e 24 h de cultivo e submetidas ao protocolo de obtenção das frações intracelulares para posterior quantificação da atividade hidrolítica. Com a finalidade de se confirmar a presença da lipase nos diferentes extratos obtidos, foram realizadas análises de atividade lipolítica através do método titulométrico, utilizando o óleo de oliva como fonte de substrato. Este método permite diferenciar as lipases das demais esterases (JAEGER *et al.*, 1999).

4.9 Caracterização dos extratos enzimáticos obtidos utilizando óleos como indutores

Amostras do meio de cultivo foram separadas e, após o procedimento de extração das frações enzimáticas, foram obtidos dois tipos de amostras de lipase intracelular: a fração de lipase liberada para o tampão durante o procedimento de sonicação e a fração de lipase que permanece associada à célula após a sonicação, as quais foram chamadas, nesta parte do trabalho, de extrato bruto liberado (EBL) e extrato bruto associado à célula (EBA). Os dois tipos de biocatalisadores (EB's) foram submetidos a diferentes reações hidrolíticas e foram adicionados diretamente ao meio reacional.

4.9.1 Especificidade em diferentes substratos

Para avaliar a afinidade dos extratos enzimáticos frente a diferentes substratos, foram realizadas reações de hidrólise de p-nitofenil acetato, butirato, octanoato, laurato e palmitato, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7, a 37 ºC, na concentração de 560 µM.

4.9.2 Determinação de parâmetros cinéticos

Para determinar os parâmetros cinéticos K_M (constante de Michaelis-Menten) e V_{max} (velocidade máxima de reação) do biocatalisador obtido, foram realizadas reações de hidrólise de p-nitofenil laurato em pH 7, 37 ºC, em concentrações de substrato variando entre 50 µM e 2000 µM. Os modelos de mecanismo de cinética para lipases propostos em literatura foram aplicados, a fim de identificar o modelo de melhor ajuste, utilizando o *software* Origin.

4.9.3 Efeitos do pH e da temperatura na estabilidade operacional dos extratos enzimáticos

A estabilidade operacional dos extratos obtidos foi avaliada em diferentes sistemas tamponados: citrato 50 mM (pH 3-6), fosfato de sódio 50mM (pH 7-8), fosfato de potássio 50 mM (pH 7) e bicarbonato de sódio 50 mM (pH 9,2-10,7). Os PEB´s foram incubados a 37 °C e o substrato da reação foi p- NFL (paranitrofenil laurato).

Para a determinação da estabilidade operacional frente a diferentes temperaturas, a atividade hidrolítica foi determinada pelo método espectrofotométrico utilizando paranitrofenil palmitato como substrato e a reação foi testada nas seguintes temperaturas: 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C. Todos os ensaios foram realizados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0.

4.9.4 Estabilidade à Estocagem

A análise da estabilidade à estocagem dos preparados enzimáticos brutos foi realizada da seguinte forma: as amostras foram estocadas às temperaturas de - 4°C, 4°C e 30°C e atividade hidrolítica em p- NFL foi determinada em 0, 15, 30 dias e 60 dias de estocagem.

4.10 Métodos Analíticos

4.10.1 Quantificação da concentração celular

A concentração celular foi acompanhada por medidas de densidade óptica a 570 nm e esses valores convertidos para mg p.s. cél/mL usando-se um fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco. A curva de peso seco foi obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retirou-se uma amostra (10 mL), que foi filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas. Em seguida, mediu-se o valor de absorbância em espectrofotômetro para cada concentração. Esses valores foram colocados em um gráfico para obtenção da curva de peso seco, conforme é apresentado na Figura 4.3.

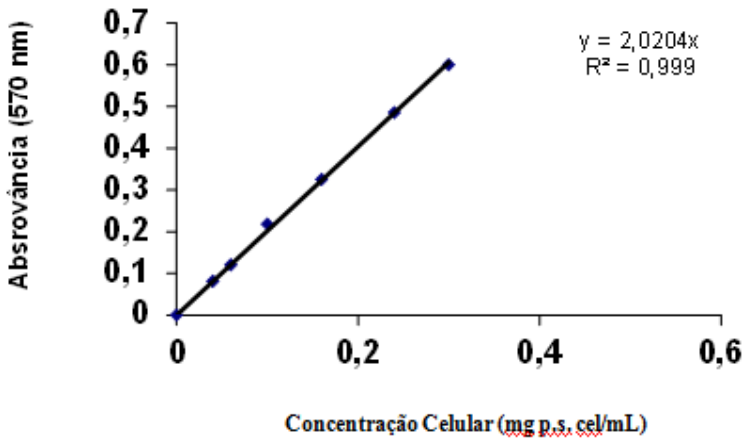


Figura 4.3. Curva de peso seco para quantificação da concentração celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro *Shimadzu* modelo *UV-1800*.

4.10.2 Quantificação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um kit enzimático para medida colorimétrica de glicose (HUMAN GmbH - Germany). Nesse método, a absorbância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 15 µL de amostra e completa-se com 1500 µL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 10 min a temperatura ambiente, sendo a absorbância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao kit enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL-1 e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L-1; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L-1; Fenol 0,75 mmol.L-1; Glicose oxidase 15000 U.L-1; Peroxidase 1500 U.L-1; Mutarotase 2000 U.L-1.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da equação 4.1:

$$C = 100 * \left(\frac{Aa}{Ap} \right) \qquad (4.1)$$

onde:

Aa = Absorbância da amostra;

Ap = absorbância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra ($mg.dL^{-1}$)

4.10.3 Quantificação da concentração de glicerol

A quantificação de glicerol foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Waters®). Para realização desta análise utilizou-se coluna *Aminex*® HPX-87H, 300 x 7,8 mm (*Bio-Rad Laboratories Ltd*) acoplada a uma pré-coluna trocadora de cátions (*Bio-Rad Laboratories Ltd*), detector de índice de refração (Waters 2414), bomba binária (Waters 1525), forno e módulo controlador de temperatura (Waters) e software cromatográfico *Breeze*. A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 5mM com vazão de 0,8 mL/min, e a temperatura da coluna mantida a 60 °C. As amostras foram filtradas em membrana (Waters) com diâmetro de 0,45 µm e injetadas para a quantificação através do uso da curva padrão (Figura 4.4).

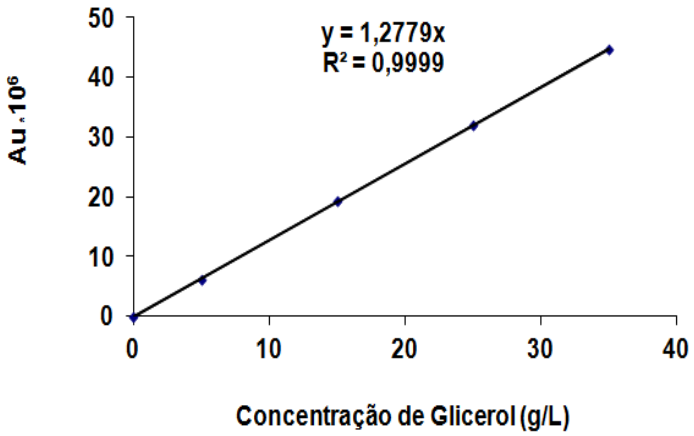


Figura 4.4. Curva padrão para quantificação de glicerol em HPLC.

4.10.4 Quantificação da concentração de Proteína

O método de Bradford foi utilizado para a quantificação de proteínas. 250 µL do reagente de Bradford pronto para uso e 5 µL de amostra foram usados na reação. A reação ocorreu por 5 minutos em temperatura ambiente. Em pH ácido, o corante Coomassie Blue forma um complexo com as proteínas presentes na amostra e este complexo foi quantificado a 595 nm. A curva de calibração foi obtida com padrão de albumina bovina (Fermentas Life Science) (Figura 4.5).

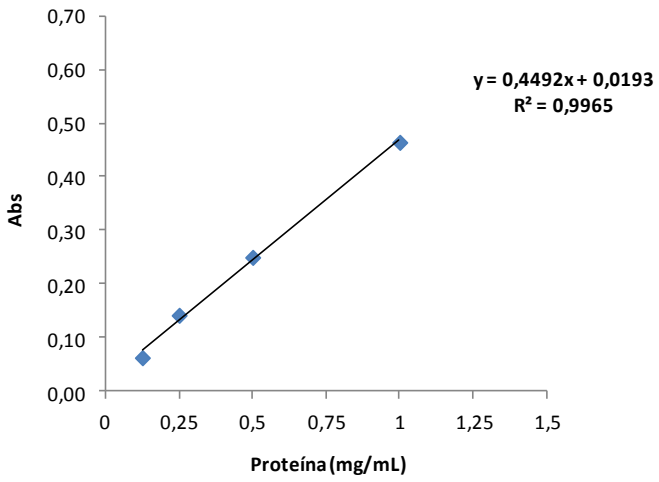


Figura 4.5. Curva padrão para quantificação de proteínas em microplacas.

4.10.5 Determinação de pH

O pH das amostras livres de células dos experimentos foi determinado utilizando-se um pHmetro da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado com tampões padrão 7,0 e 4,0 na temperatura ambiente (25 °C).

4.10.6 Determinação da atividade enzimática

Atividade enzimática pelo método espectrofotométrico

A atividade hidrolítica foi determinada mediante a variação de absorbância a 410 nm em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) devido à oxidação do p-nitrofenil laurato (p-NFL) a uma concentração de 560 µM, em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 7,0 (BRÍGIDA, 2010).

O substrato (p-NFL) foi preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) ou álcool isopropílico e, em seguida, diluído em tampão fosfato de potássio (50 mM).

Para as frações intracelulares, duas metodologias foram utilizadas. Inicialmente, 19 mL da solução de p- NFL foram colocados em um bécker, sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 mL da fração enzimática a ser analisada e a reação foi acompanhada através da leitura da absorbância em intervalos de 1 minuto, por até 10 minutos (adaptado de Brígida, 2010). Para determinar as atividades das 3 frações **LE, LL** e **LA** um tubo de ensaio contendo 1,97 mL do substrato previamente preparado foi aclimatado a 37 ºC por, aproximadamente, 15 minutos. Após

esse tempo, adiciona-se 0,03 mL da fração enzimática a ser analisada e a absorbância foi acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco de reação (0,2 mL do tampão fosfato de potássio, adicionados a 1,8 mL do substrato), por 100 segundos (AMARAL *et al.*, 2006).

O cálculo da atividade da fração extracelular foi realizado utilizando a equação 4.2:

$$A = \frac{\Delta abs * D * f * V_R}{\Delta t * Va} \tag{4.2}$$

Onde:

A = atividade da enzima (U/L), onde 1 Unidade enzimática (1U) é a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de p-nitrofenol por 1 minuto nas condições de ensaio;

Δabs = variação de absorbância no intervalo de tempo Δt (minuto) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorbância;

D = diluição da solução enzimática;

V_R = volume (L) do meio reacional total;

Va = volume (L) da fração enzimática utilizada;

f = o fator de conversão dos valores de absorbância para a concentração de p-nitrofenol, cujo valor é de 189 µmol/L (para cubeta de acrílico) para o espectrofotômetro utilizado; o cálculo da atividade para as frações **LL**, **LA** e para a célula íntegra, foi realizado utilizando a equação 4.3.

$$A = \frac{\Delta abs * D * f * V_R}{\Delta t * ma} \tag{4.3}$$

Onde:

A = atividade da enzima ($U.g^{-1}$), onde 1 Unidade enzimática (1U) é a quantidade de enzima capaz de produzir 1mmol de p-nitrofenol por 1 minuto nas condições de ensaio;

Δabs = variação de absorbância no intervalo de tempo Δt (minuto) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorbância;

D = diluição da solução enzimática;

V_R = volume (L) do meio reacional total;

ma = massa (g) da fração enzimática utilizada;

f = o fator de conversão dos valores de absorbância para a concentração

Atividade hidrolítica em microplacas

O método de determinação da atividade hidrolítica foi também padronizado em microplacas e o volume reacional foi ajustado. Para esta reação, foram usados 190 µL de substrato (p-NFL 560µM /isopropanol/tampão fosfato de potássio 50 mM) e 5 µL do extrato enzimático. A reação foi realizada em 5 minutos, a temperatura ambiente e seu produto foi quantificado a 410 nm e a quantificação da atividade enzimática foi obtida através de curva de calibração (Figura 4.6).

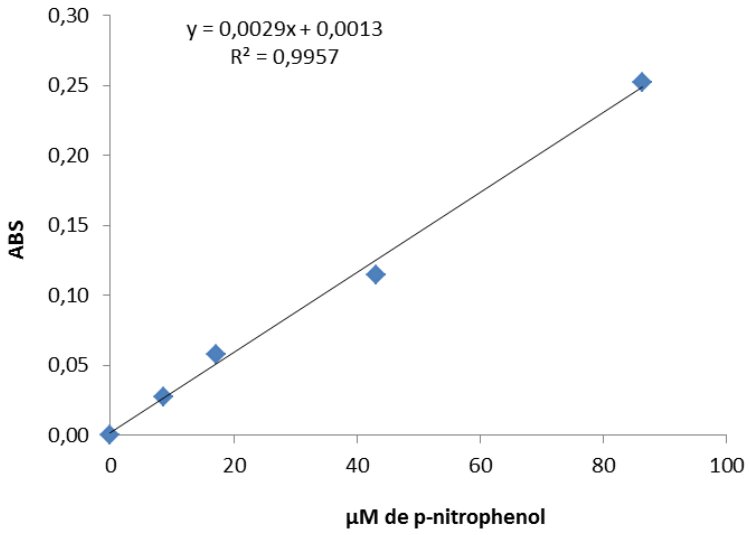


Figura 4.6. Curva padrão de p-nitrofenol em microplacas.

Atividade lipolítica pelo método titulométrico

A atividade lipolítica foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva de acordo com o procedimento adaptado de Amaral *et al*. (2007), com algumas modificações.

A metodologia foi realizada utilizando 10 mL de emulsão de óleo de oliva 20 % (v/v) em goma arábica 5% (p/v) e 4 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. A formação da emulsão ocorre através de agitação em turrax por 3 minutos. O ensaio foi realizado em *Erlenmeyers*, sob agitação em shaker, a 230 rpm e 37 ºC, sendo iniciado pela adição de 6 mL da preparação enzimática, previamente aquecida à

temperatura de ensaio. Após 15 minutos de incubação, a reação foi finalizada pela adição de 20 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1).

Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com NaOH 0,04 N, utilizando titulador automático Methron 869. Os brancos de reação foram determinados para cada tipo de amostra, em duplicata, nos quais, a enzima é inativada por adição prévia da mistura etanol-acetona ao meio reacional.

O cálculo da atividade da fração extracelular é realizado utilizando a equação 4.4:

$$A = \frac{[(Va - Vb) * M * D * 1000.000]}{t * Ve} \tag{4.4}$$

Onde,

Onde,

A = atividade da enzima (U/L), onde 1 U é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação.

Va = Volume de NaOH usado, em L, para titular o sistema reacional após um dado tempo de reação;

Vb = Volume de NaOH usado, em L, para titular o sistema reacional antes da reação - branco;

M = Concentração molar de NaOH usado, mol/L;

D = Fator de diluição da amostra;

t = tempo de reação, em minutos;

Ve = Volume de enzima utilizada, em L;

Para as frações **LL** e **LA**, cálculo da atividade foi realizado utilizando a equação 4.5.

$$A = \frac{[(Va - Vb) * M * D * 1000]}{t * me} \tag{4.5}$$

Onde,

me = massa de célula utilizada, em g;

4.10.7 Análise do teor de ácidos graxos do óleo de fritura residual

A composição dos ácidos graxos no óleo de fritura residual foi determinada por cromatografia em fase gasosa a partir dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) obtidos após transesterificação ácida (LEPAGE & ROY, 1986) no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Instituto de Química. A análise dos EMAG é realizada em triplicata, em cromatógrafo GC-14B (Shimatzu, Japão), equipado com injetor do tipo split/splitless e com detector de ionização por chama (FID). Programa-se a temperatura da coluna da seguinte forma: 160 °C por 2 min., aumentando até 190 °C (2,5 °C/min). Após 5 min, eleva-se a temperatura até 220 °C (3,5 °C/min) e mantém-se a temperatura constante por 15 min. O injetor e detector são operados nas temperaturas de 260 °C e 280 °C, respectivamente. A identificação dos picos correspondentes aos ácidos graxos nas amostras é obtida através de comparação com os tempos de retenção de mistura comercial de padrões de EMAG (FAME mix 37; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). A quantificação é realizada por normalização interna e o conteúdo de ácidos graxos nas amostras expresso em g/100 g de ácidos graxos totais. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos do Instituto de Química, sob a responsabilidade do Prof. Alexandre Torres, realizadas pela aluna de doutorado Vanessa Naciuk.

4.10.8 Quantificação de ácido oleico

A quantificação de ácido oleico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento HP Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Massy, France) e coluna Lichrospher C18 (300 mm, 7,8 mm, 5 µm) a 40 ºC, com solução de acetonotrila/água/ácido acético (98:2:0,5, v/v) como fase móvel, em fluxo de 0.5 mL/min e detector UV 205nm. A curva de calibração para a quantificação de ácido oleico pode ser observada na figura 4.7.

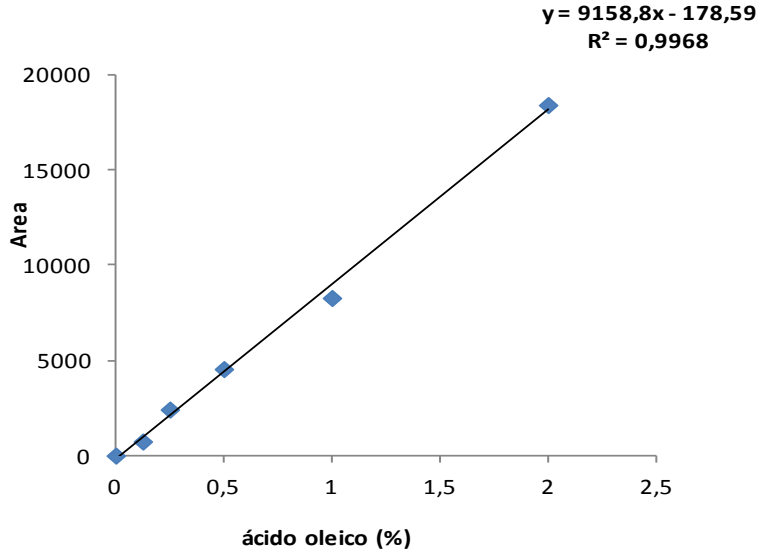


Figura 4.7. Curva padrão de ácido oleico em HPLC.

4.11 Identificação das lípases intracelulares em *Yarrowia lipolytica*

4.11.1 Eletroforese de proteínas

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a extração das diferentes frações de enzima, as amostras para a eletroforese foram liofilizadas e a concentração de proteína foi determinada, com o objetivo de obter de 1 a 5 mg de proteínas para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

No procedimento de liofilização, separou-se 5mL de cada fração enzimática e manteve-se as amostras em ultrafreezer por 20 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas no liofilizador e mantidas por 24 h. Para a realização da eletroforese, as amostras foram ressuspenssas em 500 µL de água Mili Q.

Amostras de extrato rico em lipases, após serem liofilizadas para a concentração da enzima, foram ressuspenssas em água Mili Q. Em seguida, a 100 µL desta suspensão foram adicionados 100 µL de tampão de amostra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M) e a mistura foi submetida a fervura por cinco minutos para posterior aplicação em gel. Os géis de 10 % de SDS-poliacrilamida com 0,75 mm de espessura foram submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante, segundo metodologia adaptada de Da Silva (2012). Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie de acordo com protocolo descrito na literatura (OAKLEY *et al.*, 1980). Marcadores de proteína de baixo peso molecular (14.400 a

97.000 Da) foram utilizados como padrão. A seguir, o gel foi digitalizado em Ettan™ DIGE Imager **(***GE Healthcare*) para observação das bandas formadas.

Eletroforese em gel Bis-Tris 12%

Eletroforese em gel Bis-Tris [Bis (2-hydroxietil) imino-tris (hidroximetil) metano-HCl] foi realizada no sistema NuPAGE® gel Bis-Tris 12% (Novex Life Technologies), o qual proporciona melhor separação e resolução de pequenas e médias proteínas através da utilização de um ambiente de pH neutro, que minimiza as modificações proteicas. A corrida foi realizada em um XCell surelock Mini cell *system*. Nesse protocolo, as amostras (10µL) foram misturadas ao tampão de amostra NuPAGE® LDS (dodecil sulfato de lítio, pH 8,4) e água destilada até um volume final de reação de 20 µL, e aplicadas diretamente no gel após serem expostas a 70ºC por 10 minutos, sem qualquer tratamento prévio de purificação ou concentração. O tampão de corrida utilizado neste sistema foi MOPS SDS (dodecil sulfato de sódio). Os géis foram submetidos a uma corrente de 100 - 125 mA, com voltagem constante, por 50 minutos. Marcadores de proteína Bench Marck™ (Invitrogen) (10.000 a 220.000 Da) foram utilizados como padrão. Os géis foram corados por *Colloidal Blue Satining Kit* e digitalizados em sistema de fotodocumentação de géis Gel DocTM EZ Imager (Bio Rad).

4.11.2 Extração do DNA genômico (DNAg)

As células foram cultivadas em 30 mL de meio YPD até a fase exponencial. Em seguida as células foram centrifugadas e ressuspensas em 0,5 mL de água estéril. Esta amostra foi transferida para um tubo *eppendorff*, centrifugada e o sobrenadante foi descartado. 0,2 mL do tampão de lise, 0,2 mL fenol/$CHCl_3$ e 0,3g de pérolas de vidro foram adicionadas. Esta mistura foi submetida a vortex por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro *eppendorf* e foi adicionado 1 mL de etanol. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70%. The etanol foi descartado e o *pellet* foi submetido a secagem a 37 ou 55 °C por 15 minutos. 200 µL de água mili Q foram adicionados ao DNA e a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos para dissolver todo o DNA e então foi submetida a vórtex. Este DNA foi usado para a reação em cadeia de polimerase. O mesmo protocolo foi utilizado para obter o

DNAg de *Yarrowia lipolytica* Po1g. O DNAg obtido foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,75 % corada com brometo de etídeo.

4.11.3 Eletroforese de DNA

A separação dos fragmentos de DNA em função do seu tamanho realizou-se mediante electrofórese em geis de agarose 0,75 %. Foram utilizados 5 µL de amostra e 2 µL de padrão de tamanho moleculares GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). A migração realizou-se a corrente constante (84 V). O tampão de corrida utilizado foi TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). Após a corrida, os géis foram colocados em solução de brometo de etídio e TAE durante 10-20 minutos com posterior lavagem com água. Os géis foram iluminados com luz ultravioleta e digitalizados em sistema de fotodocumentação de géis Gel DocTM EZ Imager (Bio Rad).

4.11.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Todos os componentes reacionais foram mantidos em gelo e as reações foram rapidamente transferidas para um termociclador previamente aquecido na temperatura de desnaturação (98°C). Os reagentes foram misturados e centrifugados antes do uso. Os *primers* para Lip 7 e Lip 8 foram desenhados com base nos resultados de Fickers *et al.* (2005a) e são descritos abaixo:

L7P1: AGGGGCTACTTGACTAGTTATGAAACG (5´→ 3`)

L7T1: GTGTTGCTTCTCCCCTGCCTTACACTTT (5´→ 3`)

L8P1: AACAAGCAGCCGTTGCCGGG (5´→ 3`)

L8T1: AACCTCTTCGTGCCCAACAGTCCTCC (5´→ 3`)

Padronização das condições de amplificação

Visando ajustar as condições de PCR para a amplificação dos genes de interesse, dois sistemas de reação foram testados. Utilizou-se como molde da reação o DNAg obtido de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e *Y. lipolytica* Po1g, obtidos através do método descrito no iten 4.11.2. Os produtos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídeo.

<u>Condição de PCR 1:</u>

Amostras de DNAg sem tratamento com RNAse.

Componentes reacionais:

-Taq DNA polimerase 0,2 µL
-Phusion Buffer 5x 4 µL
-dNTPs 10 mM 0,4 µL
-Primer F 10 µM 1 µL
-Primer R 10 µM 1 µL
-Água Mili Q 12 µL
-DNAg 1 µL

Parâmetros de amplificação:

1- 98°C por 3 minutos
2- 98°C por 10 segundos
3- 69°C por 30 segundos
4- 72°C por 1 minuto
5- Etapas 2 a 4 por 35 vezes
6- 72°C por 10 minutos
7- 25°C

Condição PCR 2:

Nesta condição foram realizadas 8 reações: 4 para Lip 7 and 4 para Lip 8. As reações foram realizadas com DNAg tratado e não tratado com RNAse.

Tratamento com RNAse:

A 10 µL de DNAg foram adicionados 0,2 µL de DNAse e a reação enzimática ocorreu a 37 ºC por 30 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela desativação da enzima a 70 ºC por 20 minutos.

Componentes reacionais:

-Taq DNA polimerase 0,3 µL
-10x Taq Buffer NH4 ou KCl 5 µL
-dNTPs 10 mM 1 µL
-Primer F 10 µM 1 µL
-Primer R 10 µM 1 µL
-Água Mili Q 39,2 µL
-DNAg 0,5 µL
-$MgCl_2$ 2 µL

Parâmetros de amplificação:

1- 94°C por 5 minutos
2- 94°C por 20 segundos
3- 48°C por 20 segundos
4- 72°C por 2 minutos e 30 segundos
5- Repetição da etapa 2 a 4 por 35 vezes
6- 72°C por 10 minutos
7- 25°C

4.11.5 Purificação dos produtos da PCR

O isolamento e a purificação dos fragmentos amplificados de DNA foram realizados cortando a banda de agarose que continha o fragmento de interesse. Os fragmentos foram depois submetidos a um tratamento com GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. O gel de agarose contendo o fragmento de DNA foi colocado em um *eppendorff* e solubilizado em um tampão de ligação e aplicado a uma coluna de membrana de sílica. O DNA purificado é eluído em tampão, em condições controladas.

4.11.6 Clonagem e transformação

Clonagem no vetor pJET1.2/blunt

Os produtos da amplificação foram clonados com o CloneJET PCR cloning Kit (Thermo Scientific), que utiliza o vetor pJET1.2/blunt. Este vetor contém um gene letal que é rompido com a inserção de DNA no sítio de clonagem e, como resultado, somente células com plasmídeos recombinantes são capazes de se propagar. O vetor aceita insertos de 6 bp a 10 kb e os produtos do PCR são ligados diretamente ao vetor em 5 minutos atrav´s de 2 etapas:

- *blunting reaction*: a reação apresenta um volume final de 18 µL. Foram testadas 2 condições reacionais, contendo 10 µL de tampão de reação, 1 µL de DNA *blunting enzyme* e 4 µL do produto do PCR e 3 µL de água ou 7 µL do produto do PCR na ausência de água, a reação é preparada em gelo. As misturas reacionais foram submetidas a vortex e centrifugadas por 5 segundos. Em seguida, a reação foi incubada a 70 ºC, por 5 minutos e colocadas novamente no gelo.

- reação de ligação: são misturados 1 µL do vetor pJET1.2/blunt (50 ng/µL) e 1 µL da enzima T4 DNA ligase, a reação é preparada em gelo. A reação foi submetida a vortex e centrifugada por 5 segundos. Em seguida, a reação foi incubada a 22 ºC, por 5 minutos e a temperatura ambiente, por 5 minutos.

Transformação de células competentes por choque térmico

A técnica conhecida como transformação de bactérias permite a introdução de um plasmídeo na célula bacteriana. Este DNA exógeno passa a fazer parte do material genético bacteriano que será herdado pelas novas células à medida que a bactéria se multiplica. A transformação foi realizada com as células competentes de *Escherichia coli* DH5α^{TM}, usando células pUC19 (100 pg/µl) como controle de DNA. As células (no gelo) foram aliquotadas em 50 µl de para cada transformação em tubos de 1,5 ml. 2 e 5 µl (1-10 ng) de DNA foram adicionados às células e misturados gentilmente. Para o controle pUC19, foram adicionados 2.5 µl (250 pg) de DNA. Os tubos foram incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram colocadas por 20 segundos a 42°C e os tubos foram colocados novamente em gelo por mais 2 minutos. Então, foram adicionados 500 µl de meio Luria-Bertani (LB) sem ampicilina pré-aquecido à cada tudo. Os tubos foram incubados a 37 °C por 1 h a 225 rpm. Em seguida, 200 µl de cada

transformação foram inoculadas em placas contendo meio, em triplicata. Para o controle pUC19, foram inoculados 200 µl em cada placa LB_{agar} contendo 100 µg/ml de ampicillina. O restante do produto obtido com a transformação foi estocado a 4°C. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C. Somente colônias portadoras do inserto são capazes de crescer no meio com ampicilina.

-Meios de cultura utilizados na transformação:

LB líquido (triptona bacteriológica 1 g, extrato de lêvedo 0,5 g, NaCl 0,5 g, qsp 100 mL). LB_{agar} (triptona bacteriológica 9 g, extrato de lêvedo 4,5 g, NaCl 4,5 g, agar 13,5 g, qsp 900 mL). O pH dos meios foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH.

Os meios foram autoclavados e a ampicilina foi adicionada quando a temperatura dos meios era inferior a 55 ºC, a partir de uma solução estoque 50 mg/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos preliminares

Azeite de oliva e óleo de fritura residual foram avaliados como indutores da produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 em meios contendo glicose ou glicerina bruta (da produção de biodiesel) como fonte de carbono ou na ausência dos mesmos. A produção de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando azeite de oliva e glicose já foi avaliada em estudos anteriores (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; AMARAL, 2003). Galvagno *et. al* (2011) utilizaram glicerol derivado da produção de biodiesel e azeite de oliva para obter biomassa e lipase utilizando uma cepa desta espécie modificada geneticamente. No entanto, o comportamento de *Y. lipolytica* frente ao resíduo de óleo de fritura ainda não havia sido estudado.

5.1.1 Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento celular

O cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 em meio YPD* que contém, como fonte de carbono, 2 % (p/v) de glicose e em meio YPDO*, contendo adicionalmente 1% (p/v) de azeite de oliva foi realizado sob agitação de 250 rpm e monitorado por 100 h. Pereira-Meirelles (1997) estudou a produção de lipases em diferentes concentrações iniciais de azeite de oliva e observou máxima atividade lipolítica e baixa produção de proteases, quando utilizou azeite de oliva na concentração de 1%. Os resultados são apresentados na Figura 5.1.

Na presença apenas de glicose, nota-se uma fase lag muito discreta para o crescimento celular de *Y. lipolytica* e uma fase exponencial que transcorre até, pelo menos, 30 horas de cultivo. A fase exponencial é seguida por uma fase de desaceleração do crescimento até, aproximadamente, 48 horas, quando a concentração de substrato mostra-se inferior a 25 % da concentração inicial (Figura 5.1). Segue-se, então, a fase estacionária, quando a concentração de glicose já está se exaurindo no meio.

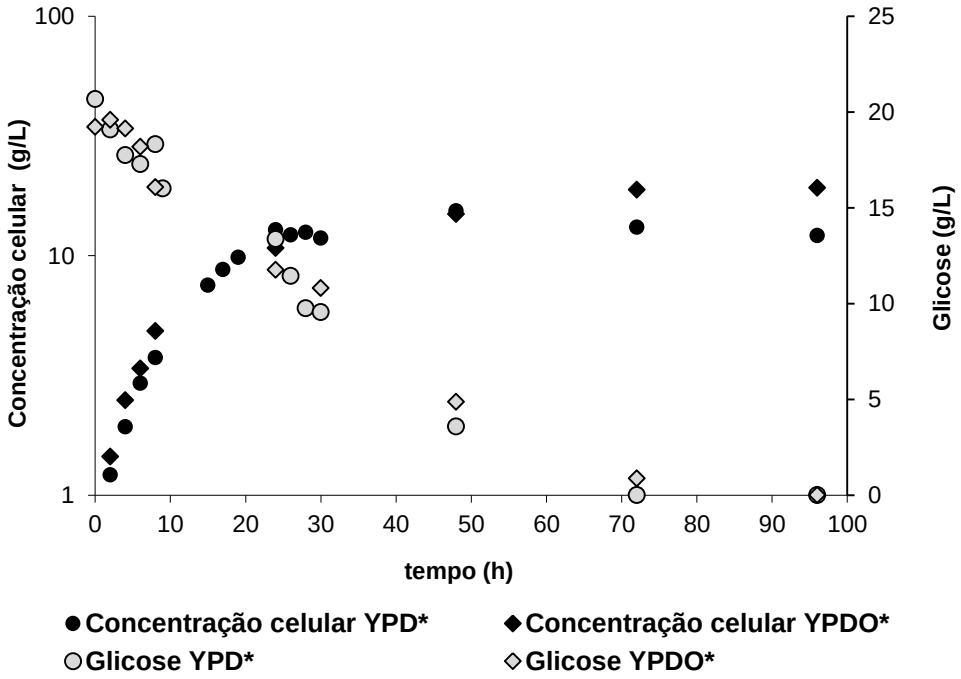


Figura 5.1. Cinética de crescimento celular e de consumo de glicose de *Yarrowia lipolytica* 50682 a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPD* (glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L) ou YPDO* (YPD* acrescido de 1% de azeite de oliva). As curvas representam os perfis de crescimento obtidos com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Quando a combinação glicose/azeite de oliva foi utilizada (meio YPDO*), é possível notar perfis de consumo de glicose e de crescimento celular muito similares ao do meio YPD*. Isso também é evidenciado pela comparação das taxas específicas de crescimento, apresentadas na Tabela 5.1. Porém, após 48 h de cultivo, ainda é possível observar um aumento da concentração de células em meio com azeite de oliva (Figura 5.1). O mesmo perfil de consumo de glicose na presença ou ausência do azeite de oliva mostra a preferência da utilização deste carboidrato como fonte de carbono por esta levedura. A partir de 48 h de cultivo, com a escassez de glicose no meio, as células, provavelmente, estão utilizando glicerol e ácidos graxos, obtidos a partir do azeite de oliva para o crescimento celular, pois ao final de 96 h, a biomassa formada é maior que aquela obtida somente na presença de glicose (Tabela 5.1). *Yarrowia lipolytica* é capaz de utilizar triglicerídeos como fonte de carbono e a primeira etapa deste metabolismo envolve a hidrólise deste substrato através de lipases, produzindo ácidos graxos e glicerol (FICKERS *et al.*, 2005a).

Kamzolova *et al.* (2011) realizaram cultivos com *Y. lipolytica* em meio contendo glicose e ácido oleico (principal ácido graxo que compõe os triacilgliceróis no azeite de oliva). O consumo de ácido oleico só começou a ocorrer quando a glicose tornou-se

escassa no meio de cultivo. Além disso, estes autores relataram que as enzimas lipolíticas foram produzidas desde as primeiras horas de cultivo, enquanto que as enzimas do metabolismo de ácidos graxos tiveram seus níveis rapidamente aumentados (níveis até 10 vezes maiores) após a exaustão de glicose no meio. Esses resultados corroboram com a hipótese do presente trabalho de que os produtos da hidrólise do azeite de oliva (glicerol e ácido oleico) estão sendo consumidos após a exaustão da glicose.

Tabela 5.1. Taxa específica de crescimento celular (μ) e variação de biomassa (Δx) de *Y. lipolytica*, em 24h de crescimento na presença de diferentes fontes de carbono e indutores obtida através da média de pelo menos três cinéticas de crescimento para cada formulação de meio de cultura.

Meio de Cultivo	μ (h^{-1})	Δ_X 24h (mg p.s. cél./mL)
YPD*	0,235	10,3
YPDO*	0,220	9,79
YPG	0,180	8,65
YPGB	0,206	7,77
YPGBO	0,170	7,32
YPGBOF	0,182	6,6
OO	0,310	11,95
OF	0,228	11,42

YPD* (glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L); YPDO* (YPD* acrescido de 1% de azeite de oliva); YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual); OO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L); OF (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e óleo de fritura residual 10g/L).

O cultivo de *Y. lipolytica* foi realizado em meio contendo apenas azeite de oliva (Meio OO) de forma a compreender melhor o consumo desse composto como fonte de carbono, como mostra a Figura 5.2. É possível notar uma fase exponencial logo no início do cultivo e que, provavelmente, se deve ao consumo de ácidos graxos de cadeia longa (principalmente C18) frutos da hidrólise enzimática dos triglicerídeos presentes nesse óleo, como proposto por Pereira-Meirelles *et al.* (2000). A partir de 15 h de cultivo, é possível observar uma fase estacionária seguida de um aumento do crescimento celular a partir de 30 h. É possível que este aumento seja devido à utilização do glicerol disponibilizado no meio pela hidrólise dos triglicerídeos. Portanto, nos meios de cultura contendo o azeite de oliva, foi observado um perfil de crescimento que permite supor que a hidrólise dos triglicerídeos fornece substratos que são consumidos de forma sequencial por esta levedura.

A Figura 5.2 também apresenta o crescimento celular de *Y. lipolytica* em meio OF, contendo óleo de fritura como fonte de carbono, para permitir a comparação com meio OO.

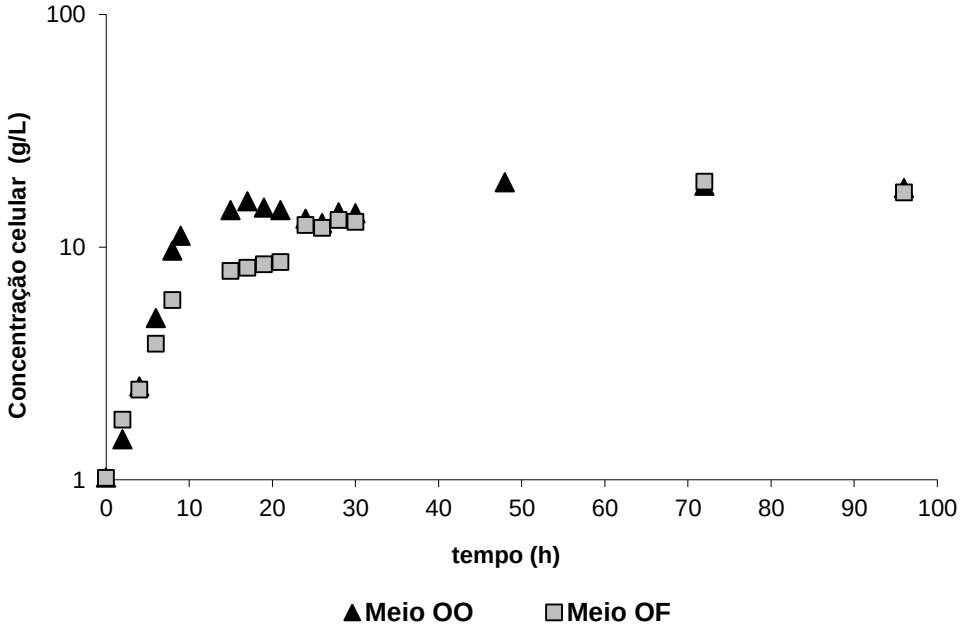


Figura 5.2 Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* a 250rpm, 28°C em meio de cultura OO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L) ou OF (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e óleo de fritura residual 10g/L). As curvas representam o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Observa-se na Figura 5.2 um crescimento diauxico para o meio contendo óleo de fritura residual, similar ao apresentado para o azeite de oliva. Há uma fase exponencial no início do cultivo seguida por uma desaceleração e início de fase estacionária a partir de 15 h de cultivo. Entre 24 h e 70 h de cultivo nota-se um novo aumento da concentração celular, demonstrando um consumo de fonte de carbono de forma sequencial. A diferença para o azeite de oliva é que para o óleo de fritura residual, após a primeira fase exponencial a concentração celular se estabiliza em um valor (cerca de 8 mg p.s cel/mL) correspondente a metade do valor obtido em azeite de oliva (cerca de 16 mg p.s cel/mL). Entretanto, como a segunda fase exponencial em OF é mais longa do que em OO, a concentração de células final é similar (em torno de 18 mg p.s cel/mL). Isso provavelmente se deve às diferenças na composição de ácidos graxos dos dois óleos.

Kamzolova *et al.* (2011) realizaram um estudo do crescimento de *Y. lipolytica* em óleo de canola, no qual não relataram diauxia. Na presença da associação de glicerol e ácido oleico, as células foram capazes de consumir os dois substratos desde o início do cultivo simultaneamente, apesar do glicerol ter sido consumido em maior taxa. As enzimas glicerol quinase, isocitrato liase e malato sintase, enzimas chave do metabolismo de glicerol e de ácidos graxos, foram detectadas em altos níveis de atividade até a exaustão destes substratos no meio de cultivo. Glicerol e ácidos graxos não inibem o metabolismo um do outro.

O óleo de fritura utilizado nesse trabalho foi obtido através do processamento térmico do óleo de soja comercial. De acordo com inúmeros trabalhos na literatura (JORGE *et al.*, 2005; SILVA & GIOELLI, 2006) o óleo de soja apresenta na sua composição triglicerídeos com cerca de 80% de ácido graxos insaturados sendo, aproximadamente, 55% de ácido linoleico (C18:2) e 23% de ácido oleico (C18:1). Para a confirmação da presença dos ácidos oleico e linoleico no resíduo de óleo de soja foi realizada a determinação do teor de ácidos graxos, por cromatografia gasosa, como pode ser observado na tabela 5.2.

Tabela 5.2. Teor de ácidos graxos dos óleos de oliva e soja (obtidos na literatura) e concentração relativa (%) dos ácidos graxos do óleo de fritura residual analisado através de cromatografia gasosa, sendo o teor obtido da média de três análises.

Ácidos Graxos	Azeite de Oliva*	Óleo de Soja*	Óleo de Fritura Residual
Palmítico 16:0	13,7	12,7	13,2
Esteárico 18:0	2,7	4,0	3,9
Oléico 18:1	74,0	23,6	26,2
Linoleico 18:2	12,2	55,3	46,4
Linolênico 18:3	0,3	4,5	5,2

*valores obtidos na literatura

Trabalhos anteriores de utilização de resíduos oleosos como matéria-prima para micro-organismos mostram que bactérias e leveduras são capazes de suportar as alterações resultantes do processamento dos óleos vegetais (HABA *et al.*, 2000; RYWIŃSKA *et al.*, 2008; KAMILAH *et al.*, 2013; MOFTAH *et al.*, 2013). Quando os resíduos do processo de fritura são comparados com seus respectivos óleos vegetais *in natura*, apresentam redução do teor de ácidos graxos. Haba *et al.* (2000) observaram diferenças no teor de ácidos graxos de cadeia curta e uma perda significativa no teor de ácido oleico, após o processo de fritura de azeite de oliva. Porém, essas alterações não

impediram o crescimento celular e o óleo residual foi uma eficiente fonte de carbono para diferentes gêneros de micro-organismos, como *Pseudomonas, Candida, Acinetobacte* e *Staphylococcus.*

A composição do óleo de fritura residual utilizado neste trabalho é bastante similar à do óleo de soja comercial *in natura* (Tabela 5.2). Portanto, não ocorreram alterações significativas no teor de ácidos graxos do óleo de soja após o processo de fritura e o resíduo manteve o perfil de composição de ácidos graxos do óleo original. Ocorreu um discreto aumento no teor de ácido oleico, porém as proporções entre este ácido graxo e o linoleico se mantiveram.

Apesar do processo de fritura degradar o óleo vegetal por reações de hidrólise, oxidação e alteração térmica, estas reações parecem não ter gerado produtos tóxicos para as células da levedura. Desta forma, analisando a curva de crescimento celular (Figura 5.2), sugere-se que *Y lipolytica* também utilizou, de forma sequencial, os ácidos graxos e o glicerol obtido da hidrólise dos triglicerídeos presentes neste resíduo.

O crescimento de *Y. lipolytica* também foi avaliado utilizando como fonte de carbono glicerol P.A. (meio YPG) e glicerina bruta proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol via catálise básica (meio YPGB). Os indutores: azeite de oliva e óleo de fritura residual também foram testados com glicerina bruta, com os meios YPGBO e YPGBOF, respectivamente. As cinéticas de crescimento celular e consumo de substrato, apresentadas nas Figuras 5.3 e 5.4, mostram que o meio contendo somente o glicerol, sem a adição de indutores, apresentou crescimento celular similar aos apresentados na presença de glicerol associado a azeite de oliva ou óleo de fritura residual. Além disso, é possível observar que o glicerol é consumido da mesma forma na presença e na ausência dos indutores e, aparentemente, a degradação dos óleos não está acontecendo.

Portanto, nos meios onde há associação entre glicerol e óleos vegetais, houve o consumo preferencial do glicerol pela levedura e em até 96 h de cultivo não se observou o consumo sequencial dos componentes do meio, como ocorre normalmente na presença de óleos (observado na Figura 5.2). Provavelmente a produção de lipases está inibida na presença do glicerol. Observando a figura 5.4 é possível notar que o glicerol é totalmente consumido em 70 h de cultivo, talvez após este tempo, a levedura passe a consumir os óleos e a produzir lipases. Comportamento similar foi observado por Corzo & Revah (1999) que não detectaram lipase extracelular em 36 h de cultivo de *Y. lipolytica*, quando utilizaram esta fonte de carbono. Isso provavelmente ocorreu pelo

fato do glicerol ser um produto da reação de hidrólise dos triglicerídeos e quando ele está disponível desde o início do cultivo, não há a necessidade de produção imediata de lipases pela célula. Esta idéia difere dos relatos de Papanikolau *et al.* (2003) e Kamzolova *et al.* (2011). Segundo estes autores, quando o glicerol é utilizado associado a ácido oleico, estes dois componentes não apresentam seu metabolismo suprimido e são consumidos ao mesmo tempo, porém, o glicerol é consumido mais rapidamente que o ácido oleico.

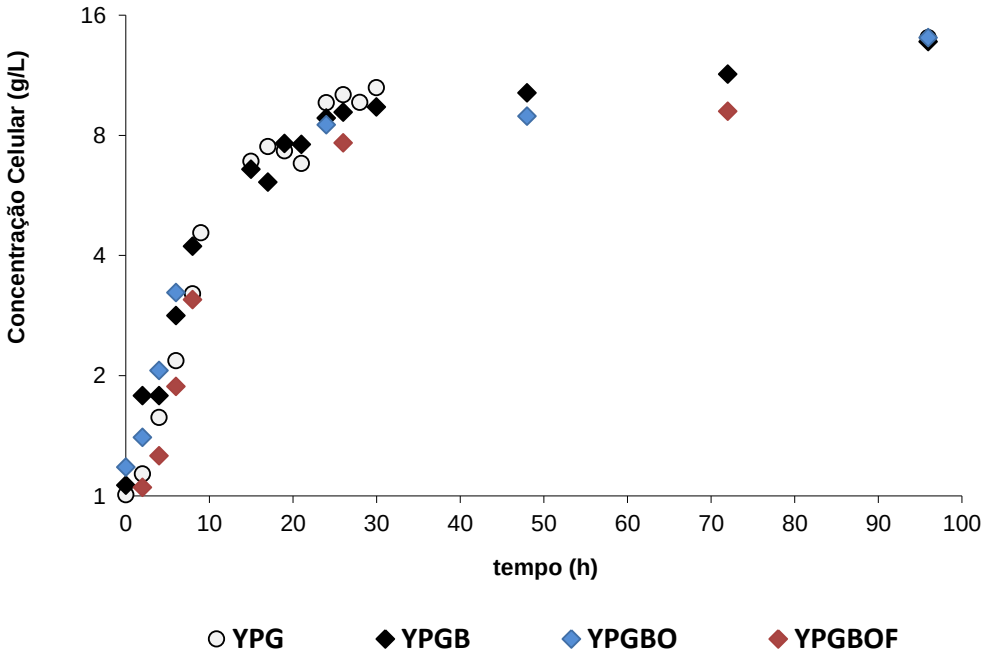


Figura 5.3. Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* em agitador automático a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual). A curva representa o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

As taxas específicas de crescimento celular (μ), calculadas na fase exponencial de crescimento para as cinéticas realizadas na presença das diferentes fontes de carbono testadas e dos indutores estudados, são apresentadas na Tabela 5.1. É possível observar que os cultivos que apresentaram maior μ foram os que continham azeite de oliva e óleo de fritura residual sem a adição de qualquer fonte de carbono adicional. Comparando os resultados, observa-se que o glicerol não favoreceu o crescimento da levedura, mesmo quando foi utilizado associado a qualquer dos indutores testados, o que, mais uma vez, reforça a idéia de que os óleos não estão sendo utilizados pela levedura na presença de glicerol. O óleo de fritura residual parece não possuir compostos de ação inibidora sobre

o crescimento celular desta cepa, apresentando μ e produção de biomassa (Δ_X) muito próximas das observadas na presença do azeite.

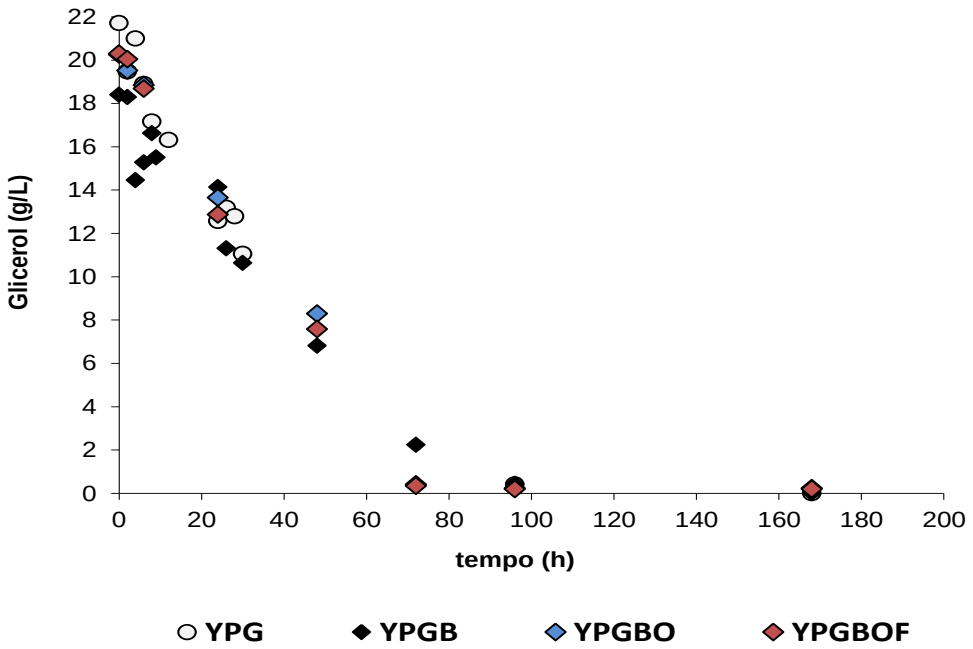


Figura 5.4. Cinética de consumo de substrato por *Yarrowia lipolytica* em agitador automático a 250rpm, 28°C em meio de cultura YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual). A curva representa o perfil de crescimento obtido com pelo menos 3 cinéticas de crescimento celular.

Para avaliar a influência do óleo de fritura residual no crescimento da levedura, foram realizadas medidas de pH no início e ao final de 24 h de cultivo na presença dos indutores. O pH do meio de cultura é um dos fatores que pode alterar a produção de lipases e o crescimento da biomassa (CORZO & REVAH, 1999). O pH mais adequado para a produção de lipases por leveduras é próximo à neutralidade ou levemente ácido (5,5 a 7,0). Os valores de pH observados nos meios contendo azeite de oliva e o óleo residual foram muito similares (Tabela 5.3), o que mostra que as condições de cultivo eram muito próximas nos dois meios, corroborando com o crescimento similar (taxa específica de crescimento e variação de biomassa) apresentado pela levedura na presença dos dois indutores.

Tabela 5.3. Medidas de pH dos meios de cultura contendo azeite de oliva (meio OO) e óleo de fritura residual (meio OF) no início do cultivo e após 24h de experimento.

Tempo (h)	Azeite de Oliva	Óleo de Fritura
0	6,67 ± 0,28	6,76 ± 0,07
24	6,57 ± 0,17	6,34 ± 0,18

±: desvio padrão (baseado em três experimentos – triplicatas)

5.1.2 Padronização do protocolo de obtenção das frações de lipase para o cultivo em Erlenmeyers

Como o objetivo do presente trabalho foi estudar as lipases intracelulares de *Y. lipolytica*, foi necessário primeiramente padronizar o protocolo de obtenção das frações de lipase produzidas pela levedura. Para esse estudo as células foram cultivadas em meio OO e OF por 24 h. A técnica de extração das lipases através do rompimento celular com a adição de pérolas de vidro e agitação com vórtex foi primeiramente testada. Esta técnica é bem conhecida e já foi descrita em diversos trabalhos para a obtenção de enzimas intracelulares (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; MATSUMOTO *et al.*, 2002; HERNÁNDEZ-MONTANEZ *et al.*, 2006; JERMSUNTIEA *et al*., 2011). Porém, o procedimento de separação das frações intracelular e associada à célula mostrou-se um pouco mais complexo, pois as células não eram separadas facilmente do meio de cultura e vários problemas foram identificados nos experimentos iniciais:

- Durante o cultivo com óleos, houve a formação de intensa espuma durante a agitação em *shaker* e as células estavam se concentrando na espuma, na superfície do meio de cultura. Isso dificultava o contato entre células e substrato e prejudicava o crescimento das mesmas.
- Em torno de 6 h de experimento, o meio de cultura tornava-se totalmente emulsionado e esta emulsão permanecia até 24 h de experimento.

A superfície celular da levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 apresenta alta afinidade por substratos hidrofóbicos. Além da adsorção direta da levedura a estes substratos, pode ocorrer a interação através de um surfactante. Amaral *et al*. (2006) detectou a produção de agentes emulsionantes no cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, na presença de glicose. Este bioemulsionante, denominado Yansan, é produzido durante a fase exponencial de crescimento e foi capaz de estabilizar emulsões do tipo água em óleo. Possivelmente, a emulsificação do meio de cultura observada neste estudo ocorreu pela produção de um biossurfactante. Fontes *et al.* (2008) relataram que apesar da glicose ser uma fonte de carbono que favorece a produção de biossurfactante por esta levedura, os substratos hidrofóbicos são mais eficientes e a agitação também influencia a sua produção, pois facilita a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa.

Portanto, quando se realizou a extração das frações de lipase por rompimento celular, foram obtidas atividade hidrolíticas em p-nitrofenil laurato muito baixas. Com o

objetivo de tentar melhorar a obtenção da lipase intracelular, outro método foi utilizado para a separação das frações enzimáticas: o uso de ondas ultrassônicas.

Após a realização da separação das frações enzimáticas, utilizando agitação em vortex com pérolas de vidro (3 ciclos de 1 minuto) e ultrassom (2 ciclos de 9 minutos cada), parte das células ainda se apresentava íntegra. Esses resultados podem ser visualizados nas figuras 5.5 e 5.6, onde são comparadas imagens de microscopia óptica das células antes dos procedimentos de separação e após a utilização do vórtex e do ultrassom, separadamente.

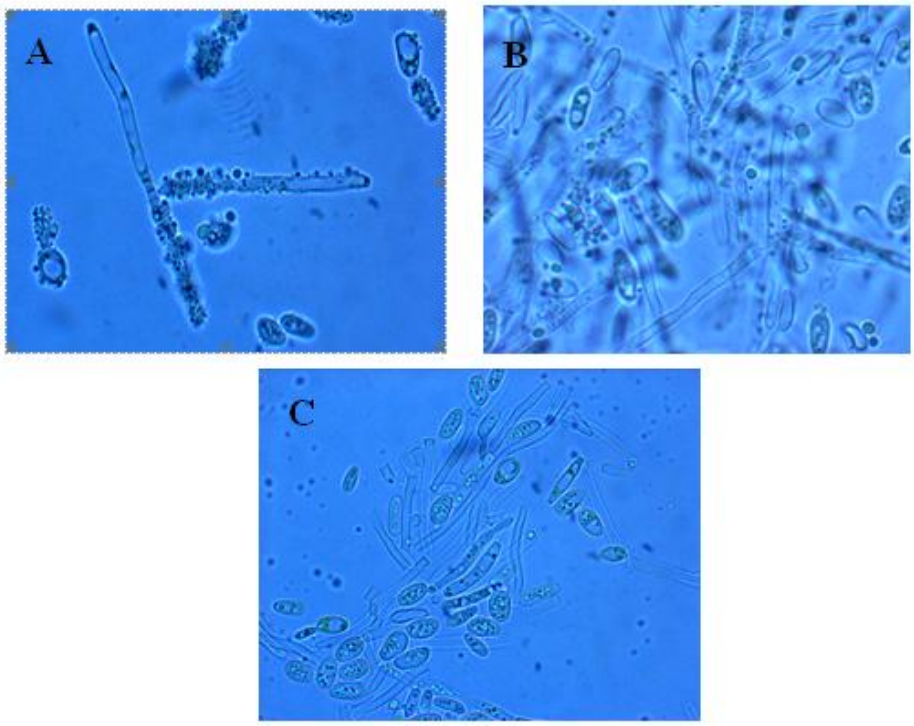


Figura 5.5. **Imagens obtidas a partir de microscópio ótico de amostras contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x). Em (A) observa-se as células na presença de azeite de oliva antes do procedimento de extração, em (B) são visualizadas células após o procedimento com pérolas de vidro e vórtex e em (C) as células após a exposição ao ultrassom.**

A Figura 5.5 mostra que além de íntegras as células de *Y. lipolítica* apresentaram dimorfismo no meio com azeite de oliva, com elevada quantidade de hifas em 24 h de cultivo. É possível notar que as células de *Y. lipolytica* que se apresentavam na forma de hifas são mais sensíveis aos dois processos de extração utilizados. É possível perceber (Figura 5.6) que o interior das hifas encontra-se aparentemente vazio, possivelmente o conteúdo das mesmas permeou pelos poros formados pela ação do ultrassom. Resultados similares foram observados por Kapturowska e colaboradores (2012), que realizaram experimentos com ultrassom e relataram que as células ovais foram mais resistentes às ondas acústicas.

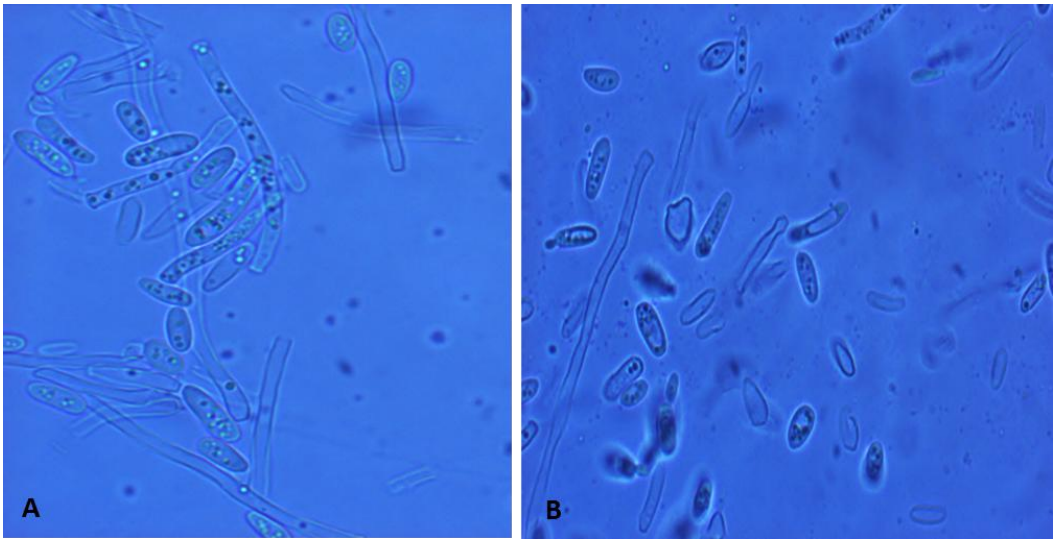


Figura 5.6. **Imagens obtidas a partir de microscópio ótico de amostras contendo *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 (aumento de 400x). Em (A) observa-se as células na presença de azeite de oliva após o procedimento com pérolas de vidro e vórtex e em (B) as células após a exposição ao ultrassom.**

A medida da atividade hidrolítica de cada fração foi realizada para determinar a eficiência de cada método. A tabela 5.4 mostra os resultados de atividade hidrolítica das lipases intracelulares produzidas em experimentos com azeite de oliva e com o óleo de fritura residual.

Tabela 5.4. **Atividade hidrolítica da lipase liberada e da lipase que permanece associada às células de *Y. lipolytica* obtida em azeite de oliva e em óleo de fritura residual, determinada através do método espectrofotométrico, utilizando como substrato paranitrofenillaurato, após extração com vórtex e com ultrassom em 24h de cultivo.**

Método de Extração	Indutor	Atividade	
		Liberada (U/g)	Associada (U/g)
Vórtex	Azeite de Oliva	1,55 ± 0,3	1,97 ± 0,4
	Óleo de Fritura	1,33 ± 0,2	1,3 ± 0,2
Ultrassom	Azeite de Oliva	9,92 ± 0,9	12,14 ± 1,0
	Óleo de Fritura	4,51 ± 0,3	12,19 ± 0,9

As ondas ultrassônicas produzem efeitos térmicos ao atingir as células e interagem mecanicamente com a membrana celular (implosão de bolhas de gás), sem destruí-la, induzindo um aumento de sua permeabilidade, facilitando as trocas entre meio intracelular e extracelular (MAWSON *et al.*, 2011). Portanto, as células não precisam ser rompidas para que a lipase intracelular seja extraída para o sobrenadante. O método de extração através de ultrassom promove a formação de "poros" na membrana celular, através dos quais a lipase intracelular é extraída. Desta forma, o

ultrassom não promove o rompimento das células, mas diferente do processo mecânico com vórtex, favorece a extração da enzima e apresenta maior eficiência, como é mostrado na Tabela 5.4. A atividade hidrolítica apresentou um aumento significante tanto na fração liberada para o sobrenadante (Lipase Liberada - LL), quanto na fração associada (Lipase Associada- LA) e, este resultado, foi observado nas amostras obtidas na presença dos dois indutores estudados.

O incremento da atividade hidrolítica, após a utilização do ultrassom pode estar ocorrendo por dois mecanismos. O aumento da atividade no sobrenadante (LL) deve-se a uma maior eficiência da extração da enzima, porém, também foi observado aumento significativo da fração associada (LA) à célula. Considerando que a maior parte das células manteve-se íntegra, o aumento da atividade da LA também pode ocorrer por uma maior interação entre substrato e enzima, uma vez que ocorre a alteração da permeabilidade da parede celular, o substrato da reação de hidrólise tem sua entrada facilitada na célula. De acordo com Balasundaram & Harrison (2006), o ultrassom promove um fenômeno chamado cavitação, que é causado por alterações químicas e físicas, gerando um grande número de pequenos “poros” na parede celular da levedura, os quais promovem a alteração da permeabilidade celular, porém as células não são rompidas.

O efeito do ultrassom sobre as células foi estudado através da determinação da viabilidade celular utilizando o corante azul de metileno antes e após do processo de extração (Figura 5.7). O ensaio de azul de metileno envolve a mistura do corante com uma amostra de levedura e as células vivas (com potencial redox ativo) podem excluí-lo ou reduzi-lo, de modo a que apenas as células mortas (sem atividade metabólica) são coradas de azul (SAMI *et al*., 1994; BOYD *et al.*, 2003). Em torno de 93% das células mantiveram-se fisiologicamente ativas após a extração com ultrassom. Kapturowska *et al.* (2012) mostraram que as células permanecem íntegras ou parcialmente íntegras mesmo após o tratamento com ultrassom. Portanto, nas condições estudadas, a exposição a ondas ultrassônicas não afetou significativamente a viabilidade das células.

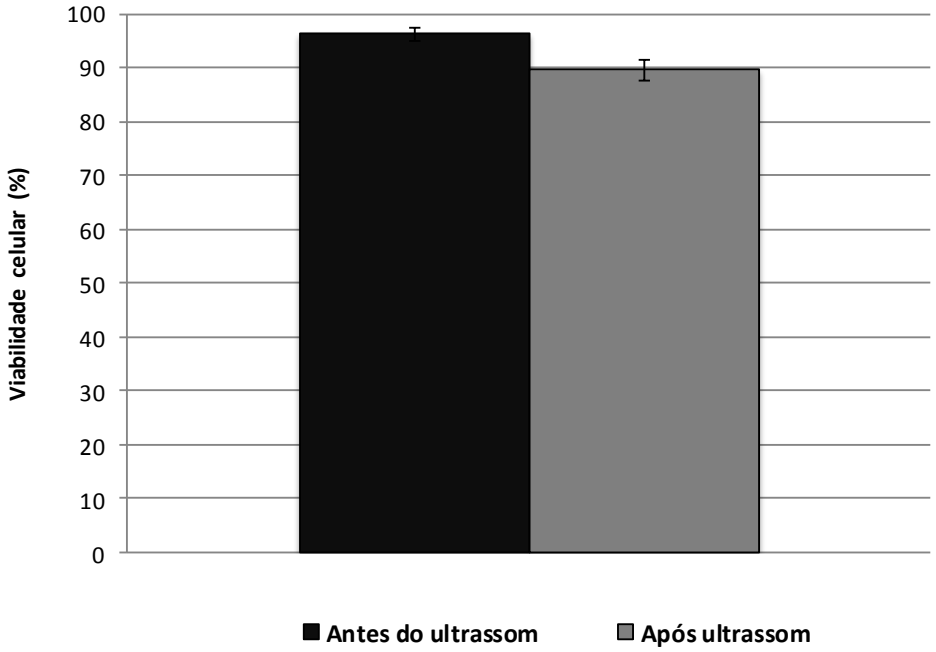


Figura 5.7. **Viabilidade celular de células de *Y. lipolytica* determinada após o procedimento de extração com ultrassom com azul de metileno.**

Como as células após o tratamento com ultrassom mostraram-se viáveis pelo método do azul de metileno, é necessário investigar como a atividade da lipase é maior nas frações LA e LL após esse método de extração (Tabela 5.4). Najjar *et al.* (2011) sugeriram um mecanismo de degradação de lipídeos por *Y. lipolytica*. Segundo esses autores, como, no início do cultivo, grande parte da atividade da lipase está ligada à parede da célula, são observadas pequenas saliências na superfície das mesmas quando cultivadas na presença de óleos e estas saliências são importantes na absorção de lipídeos pela célula. Quanto maior o número de saliências, maior o número de lipídeos ligados à célula, sugerindo que os lipídeos são absorvidos através destas saliências. Porém o mecanismo de ligação das lipases à parede celular ainda é desconhecido, mas a lipase pode ser facilmente extraída das células através da ação de tensoativos e determinados métodos físicos.

5.1.3 Efeito da fonte de carbono e indutores sobre a atividade hidrolítica de lipases intracelulares de *Y. lipolytica*

Devido ao aumento da atividade hidrolítica obtido com o método com ondas ultrassônicas, dentro dos limites estabelecidos na literatura para a manutenção da atividade da enzima, este método foi considerado o mais adequado para a obtenção das

frações liberada e associada de lipases de *Y. lipolytica*. A atividade detectada nas frações intracelulares representa mais de 80 % da atividade presente no cultivo em 24 h (Figura 5.8).

Inicialmente, para a detecção da produção de lipases nas diferentes composições de meio de cultivo, foi utilizado o método espectrofotométrico com o substrato sintético p-nitrofenil laurato (cadeia média - C12) para avaliar a capacidade hidrolítica das frações obtidas. Este método não diferencia lipases de outras esterases, as quais também hidrolisam os ésteres de p-nitrofenol. Apesar de não ser específica para lipases, esta metodologia apresenta facilidade de execução e rápida obtenção de resultados (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; AMARAL *et al.*, 2007).

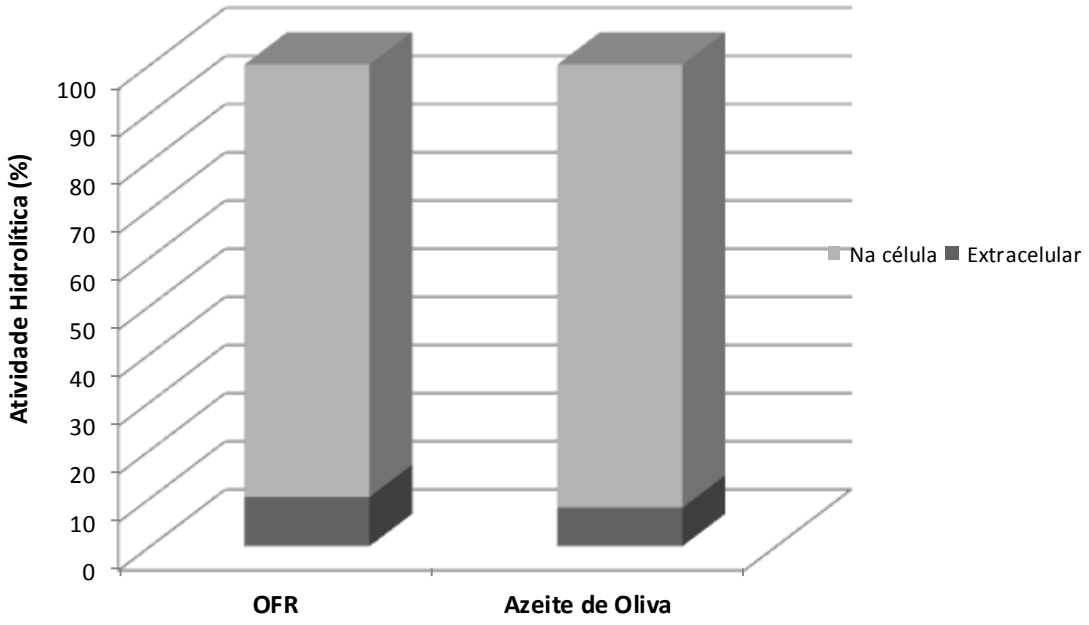


Figura 5.8. Porcentagem de atividade hidrolítica detectada nas frações extracelular e intracelular utilizando os indutores azeite de oliva e óleo de fritura residual (OFR), em 24 h de cultivo.

Comparando os valores de atividade hidrolítica das frações obtidas em 24 h de cultivo, mostrados na Tabela 5.5, observa-se que os meios contendo os indutores, na ausência de glicose e de glicerol, foram os que apresentaram os melhores resultados para a produção de lipase intracelular e associada à célula. O óleo de fritura residual mostrou-se eficiente na indução da produção de lipases intracelulares. Com base nestes

resultados os dois indutores foram utilizados para estudar o perfil de produção de lipases intracelulares por *Y. lipolytica*.

Os resultados apresentados na tabela 5.5 corroboram com os diversos relatos na literatura a respeito da função do glicerol na indução da síntese de lipases. Alguns autores relatam que o glicerol é substrato repressor da síntese de lipases, já que ele é um produto da hidrólise de triglicerídeos (PEREIRA-MEIRELLES *et al*., 1997; FABISZEWSKA *et al.*, 2014). Porém, no mesmo trabalho, Fabiszewska e colaboradores, através do uso de superfície de resposta, observaram que é possível formular um meio que favoreça a produção de lipases extracelulares com glicerol, desde que este componente seja usado, concomitantemente, com azeite de oliva. Alguns autores relatam ainda que *Y. lipolytica* pode produzir lipases extracelulares utilizando glicerol como fonte de carbono desde que mais de 95 % do glicerol já tenha sido consumido, no final da fase estacionária de crescimento (MAKRI *et al*, 2010; GALVAGNO *et al*., 2011). Amaral *et al.* (2007) precisaram utilizar aeração muito intensa ou carreadores de oxigênio para produzir lipase com glicose como fonte de carbono e na ausência de um indutor.

Tabela 5.5. Atividade hidrolítica das lipases liberada para o sobrenadante e associada á célula de *Y. lipolytica* cultivada em diferentes fontes de carbono e indutores, depois de submetidas ao tratamento com ultrassom, em 24 h de cultivo.

Fonte de carbono/Indutor	Atividade Hidrolítica	
	Liberada (U/g)	Associada (U/g)
YPD*	0	0
YPG	2,78	0,00
YPGB	0	0
YPGBO	0,46	0,28
YPGBOF	0,71	0,32
OO	11,84	12,10
OFR	4,34	13,59

YPD* (glicose P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L; YPG (glicerol P.A. 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGB (glicerina bruta 20 g/L; peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e antifoam 204 1g/L), YPGBO (YPGB acrescido de 1 % de azeite de oliva) e YPGBOF (YPGB acrescido de 1 % de óleo de fritura residual); OO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e azeite de oliva 10g/L); OF (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L, antifoam 204 1g/L e óleo de fritura residual 10g/L).

Apesar de ter sido detectada atividade hidrolítica intracelular na presença de glicerol, essa fonte de carbono, não foi boa indutora. Os dados de atividade hidrolítica (Tabela 5.5) confirmam o observado durante o crescimento das células (Figuras 5.3 e 5.4), em que se nota o consumo de glicerol, porém não houve diferenças significativas

na formação de biomassa nos cultivos que continham os óleos indutores e nem foi liberação de glicerol no meio de cultivo pela hidrólise do óleo indutor. Portanto, neste caso, a combinação das 2 fontes de carbono não favoreceu a produção de lipases intracelulares.

Muitos trabalhos na literatura relatam o importante papel dos ácidos graxos na indução de produção de lipases por leveduras. O ácido oleico é o principal ácido graxo envolvido nesta indução, porém os ácidos elaídico e linoleico também podem realizar a indução quando utilizados como fonte de carbono (HADEBALL, 1991; WANG *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais (oliva, soja, girassol, milho, amendoim, etc.), são capazes de produzir altos níveis de atividade lipásica, quando utilizados como fonte de carbono (SHARMA *et al.*, 2001). Corzo & Revah (1999) estudaram a indução da produção de lipase extracelular por diferentes tipos de óleo e relataram que o azeite de oliva, o óleo de milho e o óleo de soja foram capazes de induzir a produção de lipase, porém o azeite de oliva teve o melhor desempenho. Nos experimentos preliminares, o óleo de fritura residual foi capaz induzir a produção das diferentes frações de lipase por *Y. lipolytica*, apresentando valores que se aproximam dos obtidos com o azeite de oliva.

5.2 Extração das Lipases Intracelulares

Para um melhor entendimento de como as ondas ultrassônicas podem alterar a atividade das frações de lipase intracelular (LL e LA), experimentos em microplacas foram realizados variando-se as potências e o tempo de exposição à sonicação.

5.2.1 Influência do ultrassom sobre a atividade hidrolítica das lipases intracelulares

Os experimentos foram realizados em microplacas, utilizando meio OO (azeite de oliva 1 %). As células obtidas por amostragem do cultivo foram ressuspensas em tampão MOPS e submetidas ao procedimento de 1 ciclo de extração em sonicador de baixa frequência (20 kHz), potência máxima de 130 W, em banho de gelo, com diferentes potências acústicas por 30 segundos, 1 e 2 minutos.

Quando a exposição às ondas acústicas foi de 30 segundos, o aumento da potência aplicada aumentou a atividade hidrolítica no tampão (LL) (Figura 5.9). Nessa

condição, a atividade hidrolítica associada (LA) à célula foi bem elevada para todas as potências estudadas. Wu *et al.* (2007) relataram que a ação do ultrassom pode promover a formação de poros na estrutura da parede da célula, que podem aumentar a permeação através da membrana ou podem danificá-la de forma letal. Portanto, como a atividade da lipase associada à células se mantém para todas as potências estudadas, é possível que a exposição de 30 segundos às ondas ultrassônicas esteja promovendo a liberação da lipase presente no citoplasma celular.

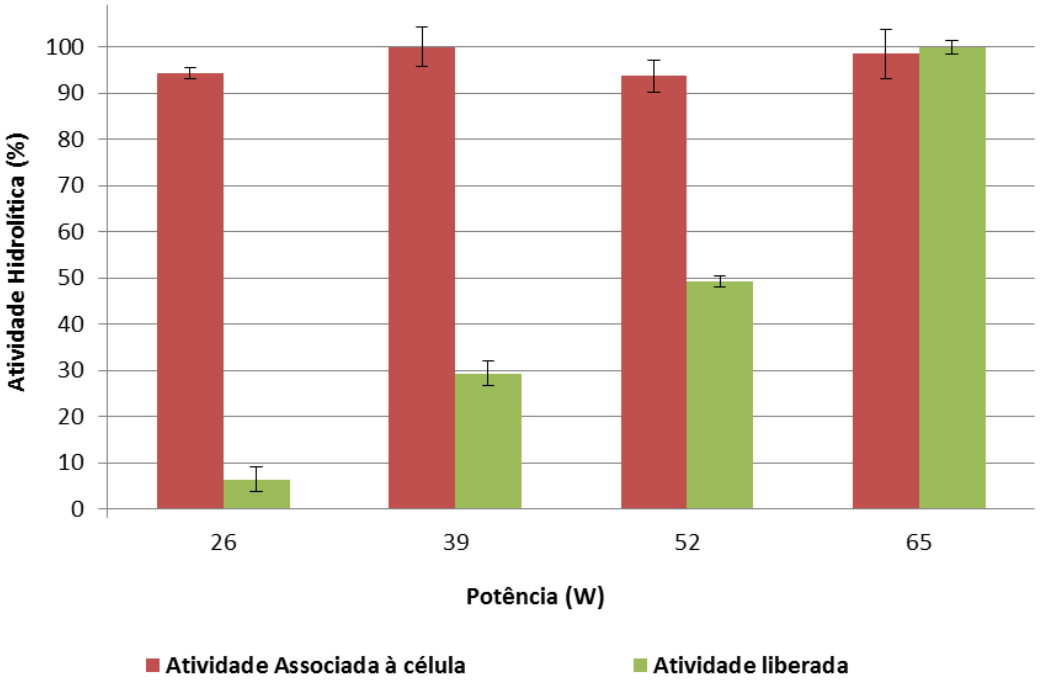


Figura 5.9 Atividade hidrolítica obtida em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 30 segundos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Para a exposição por 1 minuto, observa-se na Figura 5.10 que também houve aumento de lipase liberada para o tampão com o aumento da potência até 65 W. No entanto, como houve redução da atividade da lipase associada à célula, é possível que com o maior tempo de exposição ao ultrassom, os poros formados na parede celular tenham promovido não apenas a liberação da lipase intracelular como também a lipase associada à célula.

Para essa condição (exposição por 1 minuto), aumentou-se a potência e, a partir de 78 W, houve redução da atividade liberada, o que pode ser atribuído ao efeito negativo das ondas ultrassônicas na estrutura da enzima.

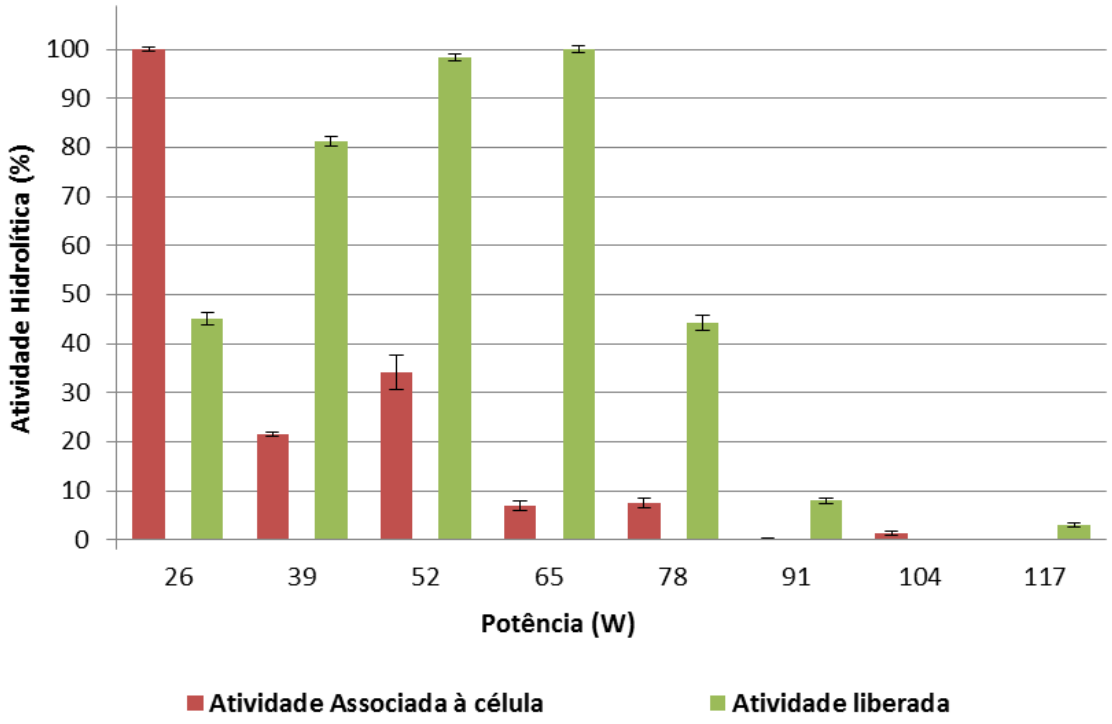


Figura 5.10. Atividade hidrolítica obtida em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 1 minuto em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

A cavitação é a formação de bolhas no meio líquido, contendo quantidades variáveis de gás. Este fenômeno acontece em 3 etapas: formação de núcleos de cavitação próximos às superfícies das partículas suspensas no líquido, crescimento das microbolhas e violenta implosão. O colapso e a implosão de milhões de bolhas libera energia que pode romper as ligações moleculares, aparecendo radicais livres H+ e OH-, causando as alterações químicas (PEDRO, 2008).

O ultrassom pode causar a ativação ou a inativação de enzimas dependendo da intensidade aplicada e também do tipo de enzima (MAWSON *et al.*, 2011). Sabe-se que as reações bioquímicas ocorrem em estreitas faixas de temperatura. A aplicação de ondas acústicas realizada no presente trabalho, utilizando potências superiores 65 W, mesmo em banho de gelo, pode estar elevando a temperatura dentro do sistema, afetando a atividade das enzimas. Balasundaram & Harrison (2005) relataram que o número de cavidades gerado aumenta com a intensidade das ondas sonoras. Além disso,

alguns trabalhos mencionam que os radicais livres gerados durante a sonicação podem contribuir para a inativação de enzimas, como ocorre com a fumarase (BARTERI *et al.*, 2004). Portanto, apesar do aumento da potência ter mostrado um aumento de atividade, a formação de radicais livres e o aumento da temperatura são fatores limitantes que afetam a atividade da enzima.

Quando a exposição foi de 2 minutos (Figura 5.11), observa-se que com baixa potência (20 W) a lipase liberada já apresenta atividade próxima da atividade da lipase associada e com o aumento da potência há uma redução na atividade da lipase associada. Além do aumento da temperatura, o ultrassom pode causar cisalhamento e sob estas condições extremas, a sonicação causa modificações das estruturas secundária e terciária das proteínas e a atividade biológica das enzimas pode ser perdida (MAWSON *et al.*, 2011).

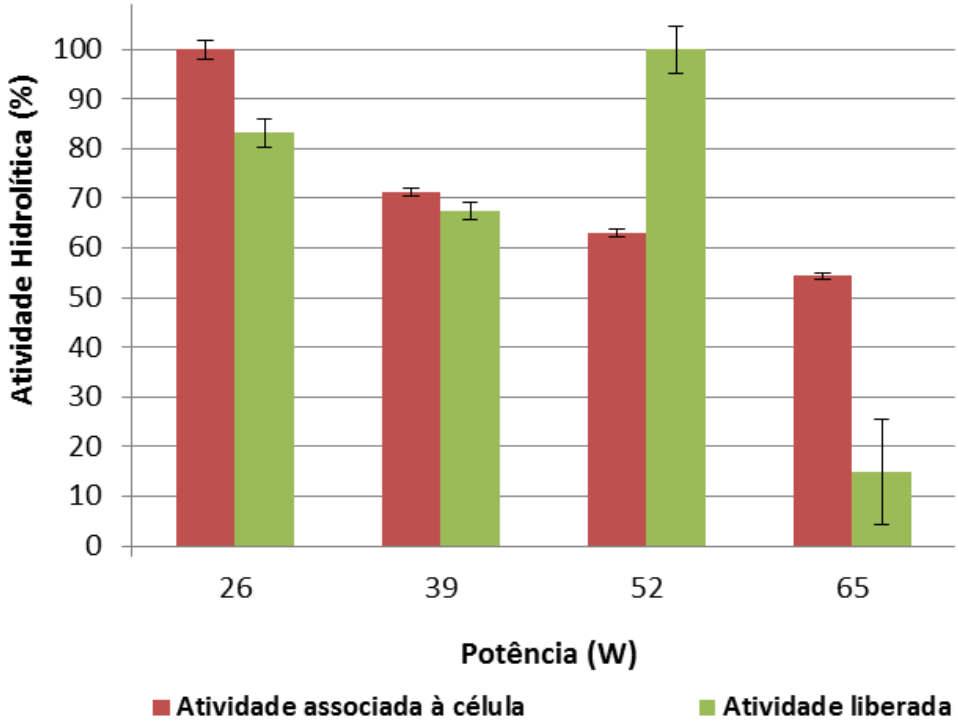


Figura 5.11. Atividade hidrolítica obtida em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

O tempo de exposição tem um efeito negativo sobre a atividade da lipase associada, como pode ser observado na Figura 5.12, em potências maiores que 26 W. Esse efeito está ligado possivelmente à liberação da lipase para o tampão, o que é

confirmado na Figura 5.13. Observa-se que o aumento do tempo de exposição ao ultrassom foi benéfico para a LL até 52 W de potência aplicada.

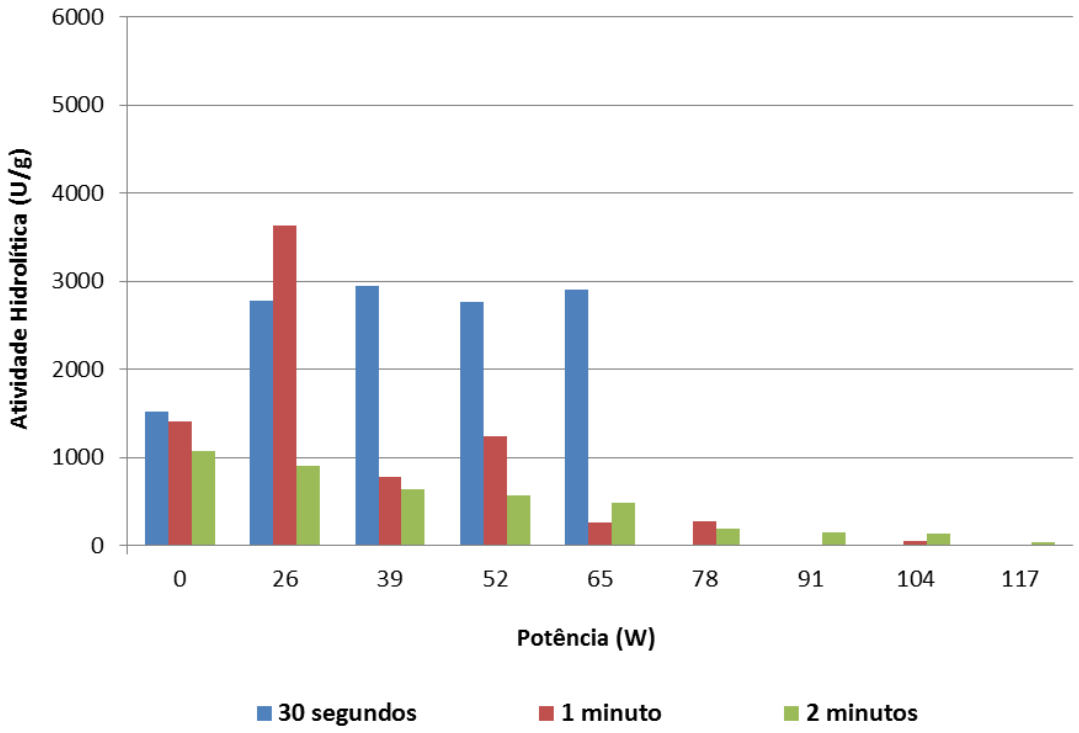


Figura 5.12. Atividade hidrolítica nas células (LA) após sonicação, em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 30 segundos, 1 e 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

Sinisterra (1992) relatou que baixa intensidade ondas ultrassônicas podem modificar ou melhorar a transferência de massa dos reagentes e produtos através da parede celular e da membrana. Para enzimas, ocorre um aumento da transferência de massa que facilita o acesso do substrato ao sítio ativo. Porém, outros fatores físicos são desencadeados pelo ultrassom: aumento da temperatura e cavitação. Além dos efeitos físicos, as ondas ultrassônicas podem causar químicos efeitos, como a formação de radicais livres nas células (LIDA *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a melhor condição para separar as os extratos intracelulares e preservar a atividade das enzimas foi de 26 W de potência, durante 1 minuto.

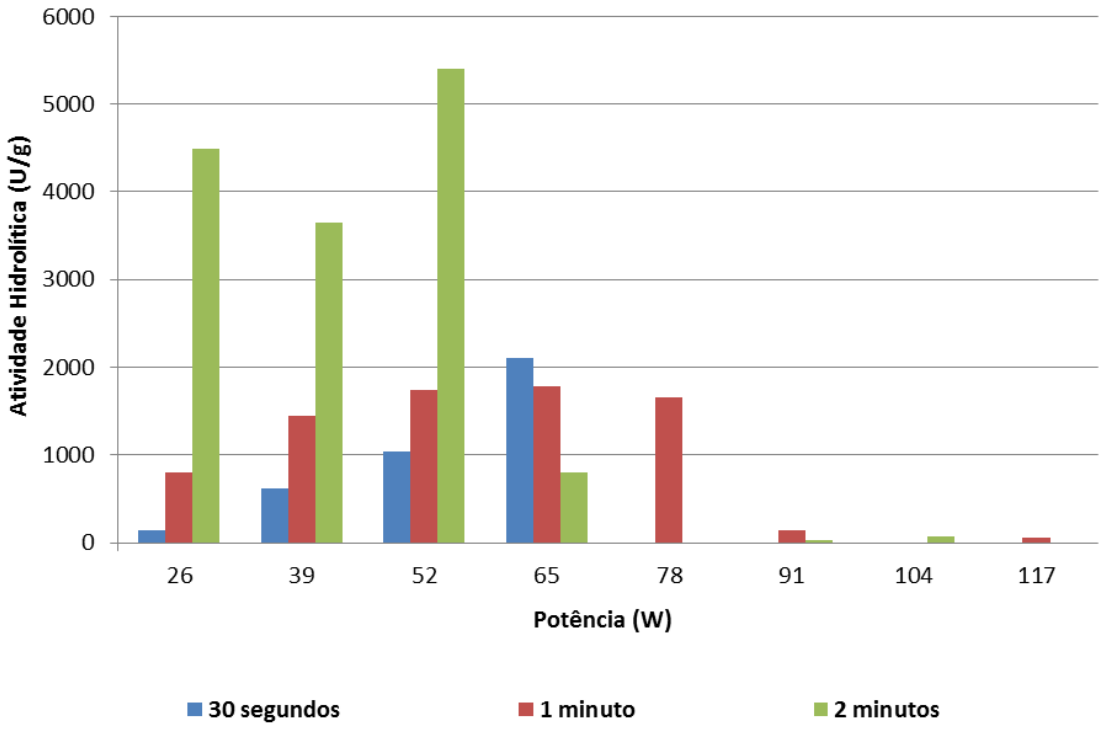


Figura 5.13. Atividade hidrolítica liberada (LL) após sonicação, em cultivo de *Y. lipolytica* realizado em microplaca, em meio OOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de azeite de oliva). Células foram submetidas a diferentes potências acústicas por 30 segundos, 1 e 2 minutos em sonicador, a 20kHz de frequência, com potência ultrassônica máxima de 130 W.

5.2.2 Influência da agitação em vórtex e do ultrassom sobre a atividade hidrolítica das lipases intracelulares

Os resultados apresentados até agora mostram que o ultrassom promove a liberação das enzimas presentes na célula e a utilização do tratamento com ultrassom permite a obtenção de dois extratos intracelulares, um com lipases em tampão e outro com lipases associadas à célula. Porém, pensando em obter um biocatalisador com lipase associada à célula, é necessário que a enzima não seja liberada para o meio reacional durante sua aplicação. Portanto, para verificar se as lipases intracelulares de *Y. lipolytica* seriam liberadas facilmente avaliou-se o efeito da agitação das células em vórtex. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer com 50 mL de meio de produção (Meio AO, contendo 3 % de ácido oleico) e incubados em agitador rotatório a 250 rpm, 28 ºC. Após 15 h de cultivo, 1 mL de meio foi separado para extração e medição da atividade hidrolítica.

Antes da agitação em vórtex não foi detectada atividade hidrolítica ou proteínas no sobrenadante (tampão MOPS) (Tabela 5.6). Após 1 e 3 minutos de agitação em vórtex, não se detecta proteínas no tampão, mas sim uma baixa atividade hidrolítica. O

aumento do tempo de agitação com vórtex (1 a 3 minutos) não influenciou na atividade enzimática extraída para o tampão.

Após a agitação com vórtex, as células foram submetidas a tratamento com ultrassom a 30 % de potência, durante 1 minuto. Foi observado aumento da atividade hidrolítica e da quantidade de proteínas no tampão depois das células serem submetidas ao ultrassom. Portanto, o ultrassom foi um método mais eficaz que o vortex para a liberação das proteínas das células.

Nas células, antes do tratamento com vórtex, foi detectada atividade hidrolítica (Tabela 5.6). Após vórtex, durante 1 e 3 minutos observou-se um pequeno aumento da atividade associada às células. Após o tratamento com vórtex, as células foram submetidas ao ultrassom, a potência de 30 %, durante 1 minuto. A atividade hidrolítica foi ligeiramente mais baixa nas células, após o ultrassom. Foi possível observar que o ultrassom é mais eficiente na extração das enzimas das células. A atividade hidrolítica inferior observada nas células após o tratamento com ultrassom é consistente com a elevada atividade detectada no tampão após a exposição das células a ondas ultrassônicas.

Tabela 5.6. Atividade hidrolítica e concentração de proteínas no tampão em relação ao tempo de agitação com vórtex para células íntegras e após o tratamento com ultrassom a 20kHz de frequência, com potência 39 W, durante 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

	Atividade Hidrolítica (U/g)			Proteínas (mg/ mL)		
Tempo de vortex (min)	Antes vortex	Após vórtex	Após ultrassom	Antes vortex	Após vórtex	Após ultrassom
No tampão de extração						
1	0	8,53 ± 0,6	116,2 ± 4,6	0	0	0,38 ± 0,01
3	0	10,93 ± 1,72	127,57 ± 8,04	0	0	0,36 ± 0,01
Nas células						
1	262,24 ± 12,0	293,74 ± 21,5	266,11 ± 2,9			
3	233,20 ± 9,2	325,02 ± 12,1	268,55 ± 21,3			

Em um segundo experimento variando o tempo de vórtex, foi observado que maiores tempos de vórtex promovem maior extração de lipase (uma maior atividade no sobrenadante) (Figura 5.14). Contudo, mesmo em tempos maiores de extração em vórtex, o ultrassom foi mais eficiente do que o vórtex para extrair a lipase, confirmando os resultados anteriores.

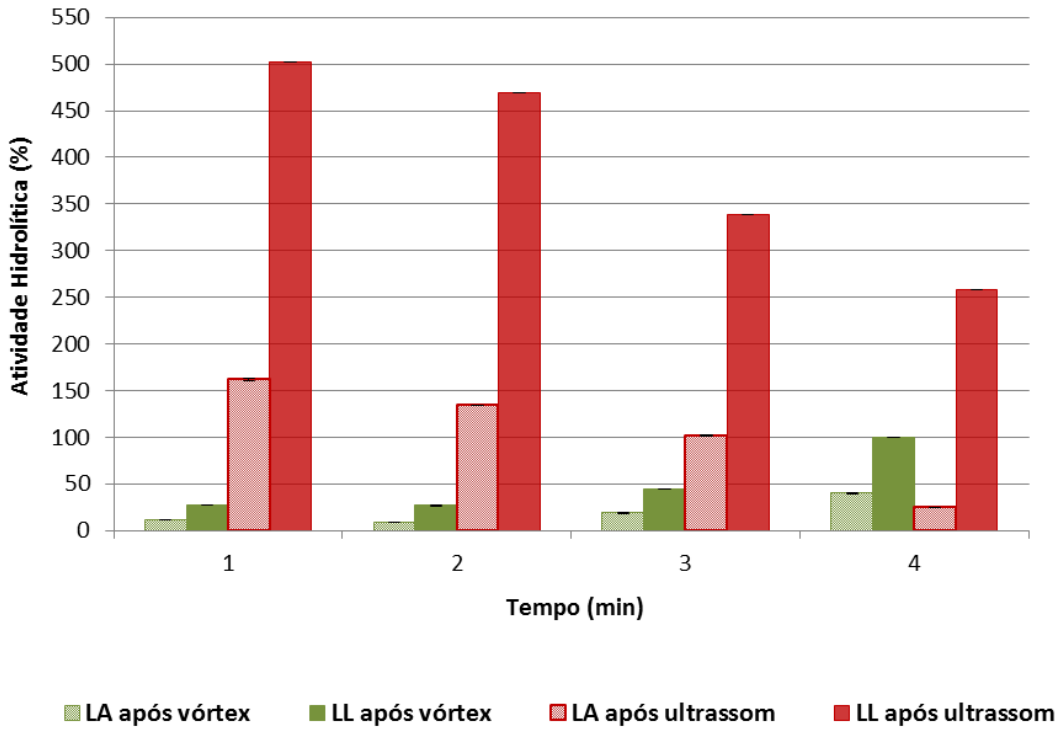


Figura 5.14. Atividade hidrolítica nas células e no tampão em diferentes tempos de agitação com vórtex e após o tratamento com ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W, durante 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Apesar do tratamento com vórtex ter sido menos eficiente, é importante reassaltar que nos experiemntos com microplacas não foram utilizadas pérolas de vidro, devido aos pequenos volumes utilizados. O uso das pérolas de vidro poderia contribuir para a extração da ezimas, como foi observado nos experimentos preliminares em erlenmeyers, porém , mesmo no método utilizando pérolas de vidro, o ultrassom promoveu amior atividade enzimática tanto no sobrenadante quanto nas células. Outro fator que poderia contribuir para a otimização da extração com vórtex seria o aumento do diâmetro das pérolas de vidro. Medeiros *et al.* (2008) observou em células de *Kluyveromyces marxianus* que quanto maior a a relação carga de pérolas-volume de suspensão celular, maior é a detecção da atividade enzimática.

Porém, o ultrassom parece promover a atividade da enzima associada às células, porque após a utilização de ultrassom, a atividade foi significativamente maior do que quando usado apenas o vórtex. Sabe-se que o ultrassom pode promeover a desorganização da parede celular e aumento de sua permeabilidade, e desta forma, estaria promovendo o contato enzima associada/substrato. Aparentemente, a maior parte da lipase está aderida à superfície da célula, porque com a exposição de células por

muito tempo ao vórtex, processo de extração menos eficiente do que a sonicação, mais lipase é libertada após vórtex e, menos lipase é liberada quando o ultrassom é aplicado.

Para estudar o efeito de diferentes tempos de sonicação, um terceiro teste foi realizado com as células ressuspendidas em tampão de MOPS. O tempo de vórtex foi mantido constante (3 minutos) e o tempo de sonicação foi alterado (0,5; 1; 2; 4 minutos). A atividade hidrolítica foi ligeiramente aumentada nas células após submetidas à exposição ao ultrassom por 1 minuto (Figura 5.15). Quando o tempo de exposição foi de 2 minutos, a atividade enzimática foi reduzida, e esta redução foi maior quando aplicado 4 minutos de sonicação.

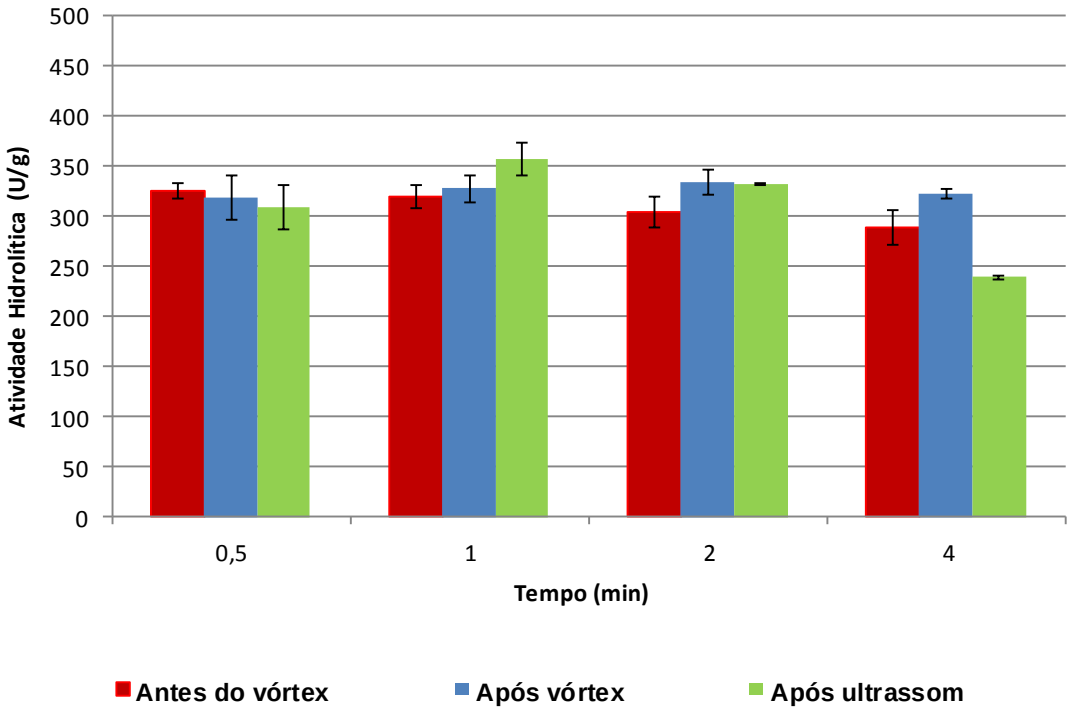


Figura 5.15. Atividade hidrolítica nas células (LA) após serem submetidas a 3 minutos de vórtex e a ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W, por 0,5, 1, 2 e 4 minutos. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Antes do tratamento com vórtex, baixa atividade enzimática foi detectada no sobrenadante (tampão MOPS) (Figura 5.16). A quantidade de proteína foi quantificada no sobrenadante, e antes do tratamento com vórtex, não foram detectadas proteínas no sobrenadante. Após 3 minutos de vórtex, foi observado um aumento da atividade da enzima no tampão, mas não foram detectadas proteínas. Após vórtex, as células foram submetidas ao tratamento com ultrassom. A atividade enzimática foi aumentada no tampão, depois do ultrassom. A quantidade de proteína também foi aumentada no tampão depois da aplicação do ultrassom e parece ser dependente do tempo de

exposição. Após 2 e 4 minutos de exposição ao ultrassom observa-se queda da atividade enzimática, provavelmente devido aos efeitos desnaturantes das ondas ultrassônicas ou da elevação da temperatura gerada durante a sonicação.

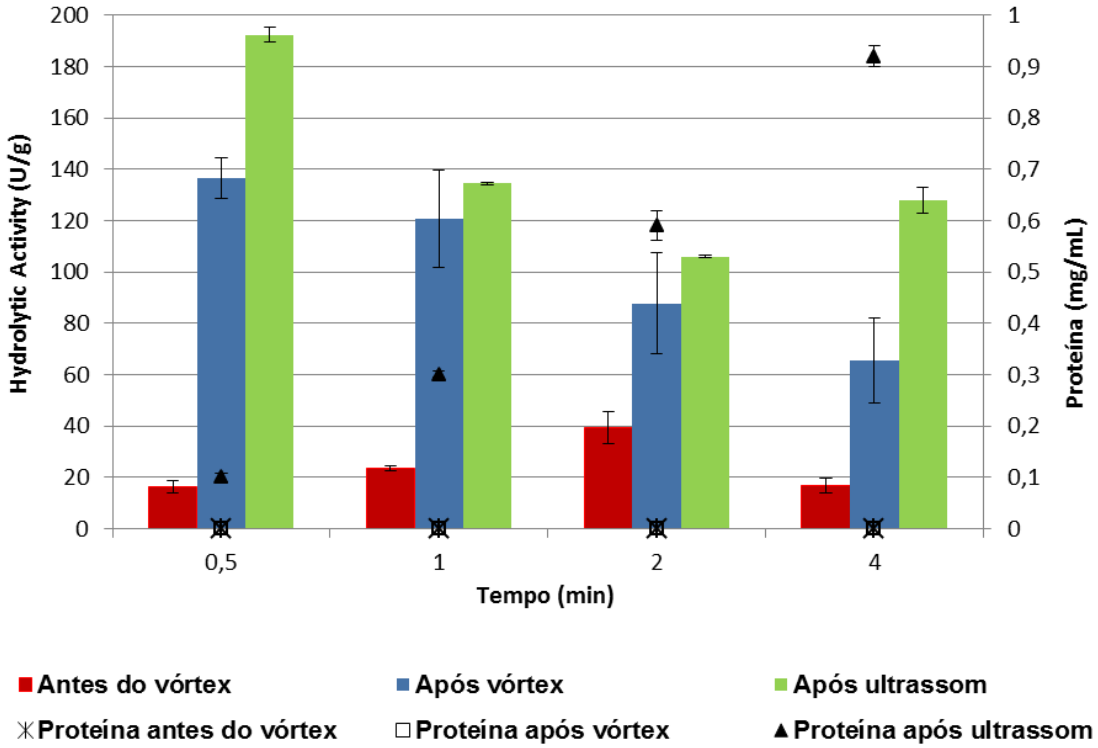


Figura 5.16. Atividade hidrolítica e concentração de proteína no tampão (LL) antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e ultrassom a 20 kHz de frequência, com potência 39 W, durante 0,5, 1, 2 e 4 minutos. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Liu *et al.* (2013) mencionam o ultrassom como um método extensivamente usado para a obtenção de proteínas de células microbianas. Os resultados apresentados aqui mostram a sua eficiência para a obtenção de proteínas quando comparados com o protocolo usando vórtex. Para células de *Sacharomyces cerevisiae*, Liu e colaboradores relataram que a liberação de proteínas está diretamente relacionada com o aumento da potência do ultrassom. Porém, estes autores advertem que tempos prolongados de exposição a ondas acústicas pode levar a degradação das proteínas e perda de sua atividade devido ao aumento de temperatura no sistema. É possível observar, na figura 5.16, nos tempos de exposição 0,5 e 4 minutos, que existe uma realação inversa entre conteúdo proteico e atividade enzimática, a qual pode ser explicada devido à dificuldade de controle de temperatura em maiores tempos de exposição.

A influência do ultrassom na extração de proteínas também foi avaliada através de eletroforese de proteínas (Figuras 5.17 e 5.18) e foi possível observar que a intensidade das bandas de proteína aumentou após as células serem submetidas a maiores tempos de sonicação. E, nestas imagens é possível visualizar a diferença de eficiência dos dois métodos estudados.

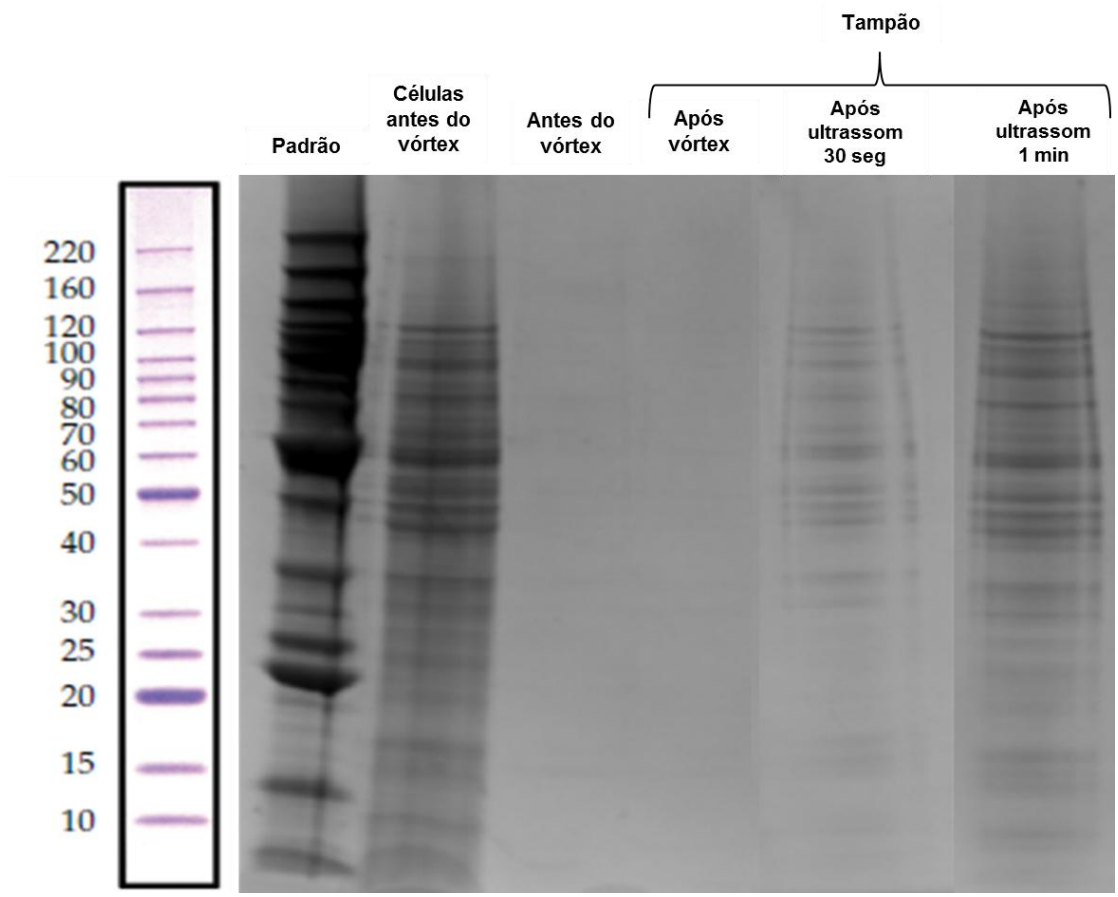


Figura 5.17. Eletroforese de proteínas em gel de Bis-Tris a 12% das células e do sobrenadante (tampão MOPS) antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e tratamento com ultrassom 20 kHz de frequência e a 39 W de potência, durante 30 segundos e 1 minuto. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AO (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

Considerando os resultados apresentados, observa-se que as lipases intracelulares de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 não são facilmente liberadas da célula por agitação. O estudo dos métodos de extração mostrou que o ultrassom é um método eficiente para a extração das lipases associadas à superfície celular e, em condições controladas, permite a manutenção da atividade enzimática nos estratos obtidos. Portanto, o ultrassom é um método adequado para a obtenção dos extratos intracelulares estudados no presente trabalho.

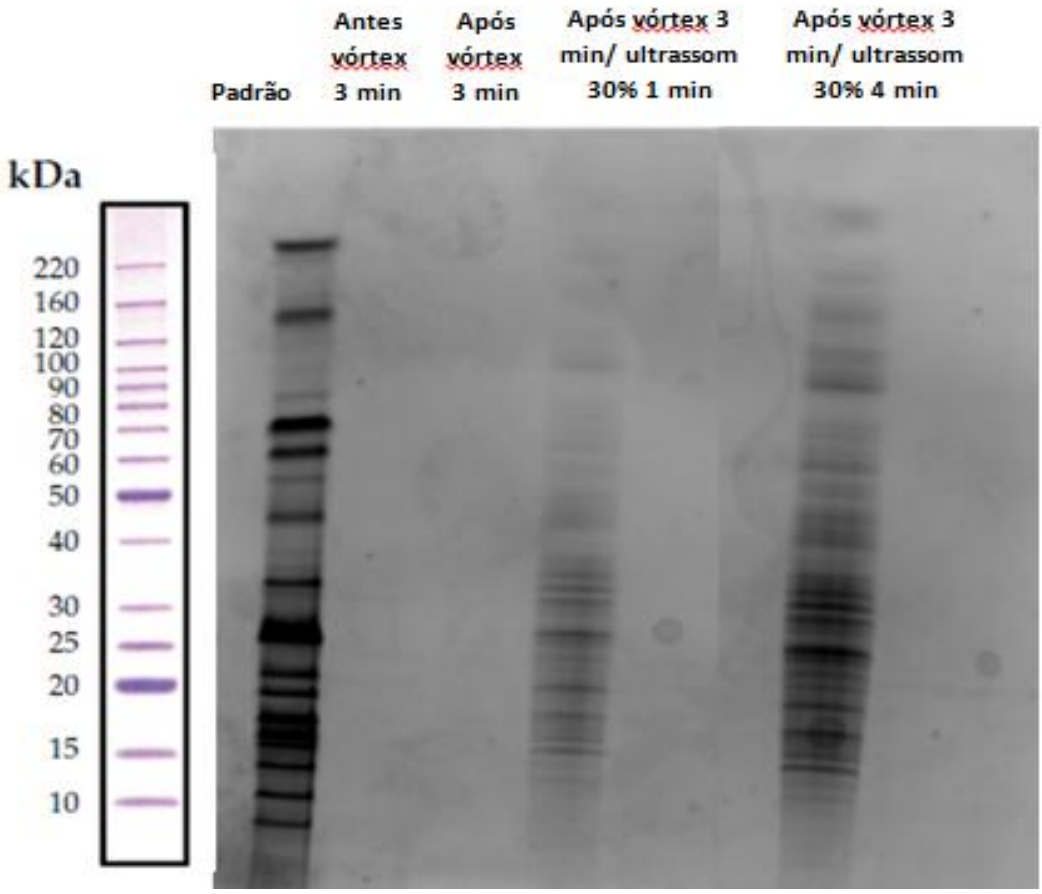


Figura 5.18. Eletroforese de proteínas em gel de Bis-Tris a 12% do sobrenadante (tampão MOPS) antes e após o tratamento com vortex durante 3 minutos e tratamento com ultrassom 20 kHz de frequência e a 39 W de potência, durante 1 e 4 minutos. As células de *Y. lipolytica* foram cultivadas por 15 h, em Erlenmeyer, em meio AOm (peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo 20 % de ácido oleico).

5.3 Estudo comparativo da produção de lipases intracelulares utilizando ácido oleico, azeite de oliva e óleo de fritura residual como indutores

5.3.1 Cinética da produção de lipases intracelulares utilizando ácido oleico como indutor

Considerando que o ácido oleico está descrito na literatura como o melhor indutor para a produção de lipases e está presente tanto no óleo de oliva como no óleo de fritura residual, este ácido graxo foi usado como um modelo para o estudo inicial da cinética de produção de lipases intracelulares pela cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 cultivada em microplacas.

Para a detecção de produção de lipase, na presença de ácido oleico, o método espectrofotométrico foi usado com o substrato p-nitrofenil laurato para avaliar a

atividade hidrolítica das frações obtidas. As Figuras 5.19 e 5.20 mostram os perfis de consumo de ácido oleico, de crescimento celular e de produção de lipases. Adicionalmente, observa-se uma fase lag de, aproximadamente, 5 horas e uma fase exponencial até cerca de 30 h de cultivo. Em 40 h de cultivo a concentração de ácido oleico no meio de cultura é mínima e o crescimento da levedura se apresenta em fase estacionária (Figura 5.19).

Em relação à produção de lípases, em 15 horas de cultivo, há o máximo de atividade para as frações intracelular (Figura 5.20). Neste momento, metade do ácido oleico já havia sido consumido (Figura 5.19) e a levedura está no final da fase exponencial de crescimento (Figura 5.20). Além disso, existem dois picos de atividade extracelular: um em 15 de cultivo, na fase de desaceleração do crescimento e outro em 40 h de cultivo, quando o ácido oleico estava completamente exaurido do meio de cultivo.

Amaral (2003) estudou a produção de lipases pela mesma cepa em meio YPD e observou também dois picos de atividade extracelular, o primeiro em 15 h de cultivo e o segundo em 20 h, na fase de desaceleração do crescimento celular. Fickers *et al.* (2004) também observaram duas fases de secreção de lipases extracelulares em meio com ácido oleico, apesar da eficiente indução de Lip2. Estas fases sugerem que a produção de lipases pode ser regulada ao nível de sua secreção.

A cinética observada na presença de ácido oleico (Figura 5.20) é similar àquela descrita por Pereira-Meirelles *et al.* (2000) para a produção de lipase por *Y. lipolytica* em meio contendo óleo de oliva como indutor. Segundo estes autores, as lipases basais presentes na célula são suficientes para iniciar a hidrólise do óleo e liberar os ácidos graxos, os quais induzem a produção de lipases. A lipase produzida se acumula na célula, enquanto o substrato é abundante. Quando a disponibilidade de substrato diminui, a enzima é liberada para assimilação do substrato remanescente. Portanto, detecta-se a presença de atividade extracelular máxima durante a fase estacionária do crescimento. É possível observar que no início do cultivo, existe atividade hidrolítica basal na célula e, inclusive, parte dela é liberada para o meio de cultura. O ácido oleico é consumido desde o início do cultivo e induz a produção de lipases (Figura 5.19 e 5.20).

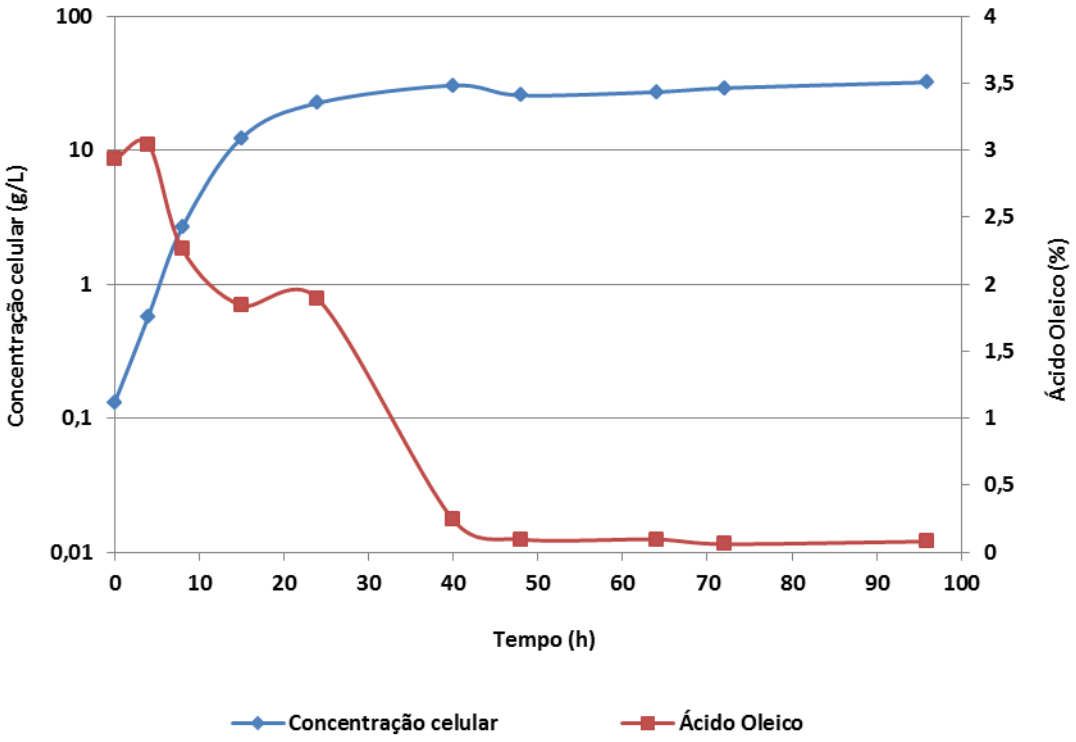


Figura 5.19. Cinética de crescimento celular e consumo de substrato para *Y. lipolytica* em meio com 3% de indutor (meio AO). Os cultivos foram realizados em microplacas com 2 mL de meio de cultura, 250 rpm e 28 ºC.

Segundo Kohlwein & Paltauf (1983), os ácidos láurico e oleico possuem livre difusão através da membrana em concentrações acima de 10 µM. As lipases produzidas têm seu máximo de atividade (1863 U/g para a LA e 1363 U/g para a LL) quando metade do ácido oleico presente no meio já foi consumido, no início da fase de desaceleração do crescimento celular. Bigey *et al*. (2003) relataram resultado semelhante para a atividade obtida com a levedura *C. deformans*, onde 75 % de toda a atividade detectada no cultivo, na fase exponencial de crescimento, estava associada às células. Portanto, no início do cultivo, quando ácido oleico é abundante no meio, detecta-se maior atividade associada às células, pois em alta concentração, o ácido oleico se difunde facilmente para o interior da célula e é suficiente para suprir o crescimento celular. Desta forma, as lipases se acumulam na célula e são liberadas para o meio extracelular apenas quando a concentração de ácido oleico diminui.

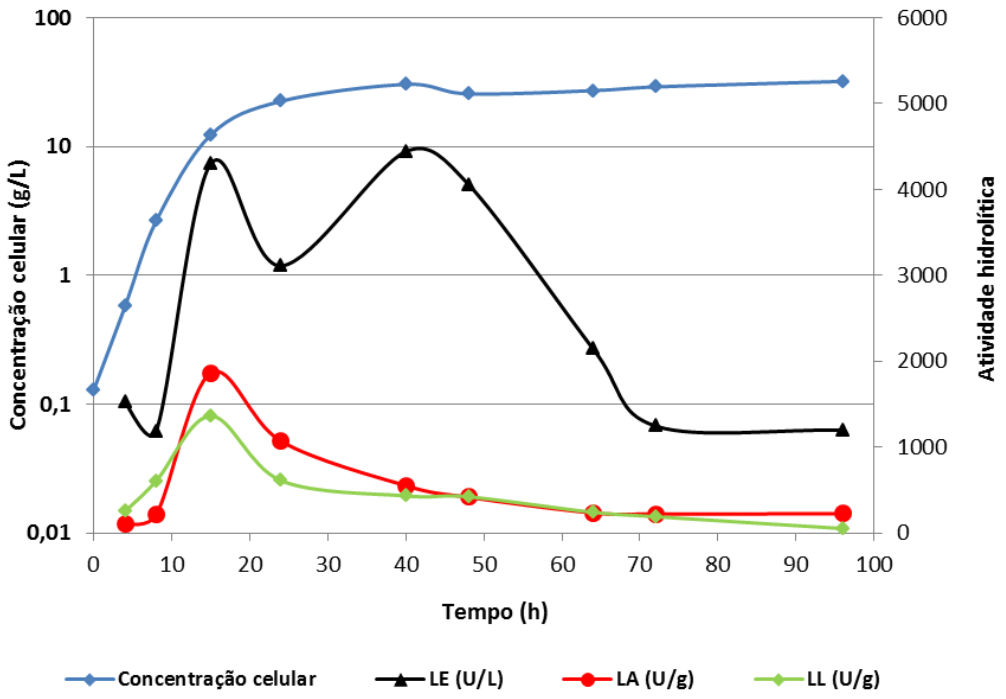


Figura 5.20. Cinética de crescimento celular e produção de lipases de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 3% de ácido oleico, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Esse perfil de atividade corrobora os relatos de Fickers *et al.* (2004) sobre a produção de lipases. Os autores realizaram um estudo da localização de lip2 durante o crescimento de *Y. lipolytica* em meio contendo triptona N1 e ácido oleico e observaram que em 10 h de crescimento, a lipase está principalmente localizada na membrana celular e em 18 h de cultivo a lipase está no citosol e no sobrenadante do cultivo.

5.3.2 Efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipases intracelulares

Investigou-se diferentes fontes de nitrogênio para a produção de lipases intracelulares por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Os experimentos foram realizados com 2 g/L da fonte de nitrogênio, em microplacas, e a fonte de carbono utilizada foi o ácido oleico a 1 %, adicionado ao meio na forma de emulsão (ácido oleico/água destilada/Tween 40). Um experimento controle somente com a emulsão de ácido oleico também foi realizado. Amostras foram obtidas em 15 h (lipases intracelulares) e 40 h de cultivo (lipase extracelular).

A Tabela 5.7 mostra a produção de lipases por fonte de nitrogênio testada. A composição de meio que favoreceu a produção de biomassa foi a associação de peptona bacteriológica e extrato de lêvedo (PEP+EL), que ao final de 40 h chegou a 13,89 g/L.

A associação PEP+EL também foi muito eficiente para a obtenção de atividade hidrolítica das frações intracelulares (LL + LA). Em 15 h de cultivo, a biomassa produzida foi de 9,02 g/L e as atividades hidrolíticas para as frações LL e LA foram, respectivamente, 1217 U/g e 2978 U/g.

Tabela 5.7. Concentração celular e atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio de cultura com 1 % de ácido oleico e diferentes fontes de nitrogênio e em meio contendo somente a emulsão de ácido oleico, cultivadas em microplacas, a 250 rpm/ 28ºC, por até 40h. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Fonte de Nitrogênio	X_{15h} (g/L)	X_{40h} (g/L)	LL (U/g)	LA (U/g)	LE $_{40h}$ (U/L)
Extrato de Lêvedo	3,44	7,14	381 ± 18	1542 ± 142	87 ± 9
Uréia	0,45	1,39	0	89 ± 47	796 ± 128
Triptona de soja	3,03	4,24	494 ± 19	987 ± 89	37 ± 5
Cloreto de Amônio	0,24	0,41	0	154 ± 59	1430 ± 199
Triptona	1,64	1,36	1386 ± 188	971 ± 214	1457 ± 142
Triptona N1	1,1	1,4	970,74 ± 215	122 ± 26	1682 ± 104
Ácido Oleico	0,05	0,05	0	201 ± 19	1316 ± 180
Casaminoácidos	0,64	1,49	325 ± 74	273 ± 7	1480 ± 218
Peptona bacteriológica	0,36	0,07	0	233 ± 39	1124 ± 118
Sulfato de Amônio	0,77	0,96	0	104 ± 6	718 ± 142
Peptona bact./Extrato de lêvedo	9,02	13,89	1217 ± 20	2978 ± 85	1840 ± 114

Pereira-Meirelles *et al.* (1997) relataram que o melhor meio para a produção de lipases utilizando azeite de oliva, foi aquele que contendo extrato de lêvedo e peptona concomitantemente, obtendo-se uma atividade máxima de 2700 U/L.

É possível observar na Tabela 5.7 que, quando somente o extrato de lêvedo foi utilizado como fonte de nitrogênio, excelentes resultados de atividade (LA) e produção de biomasa foram obtidos. Neste caso, o extrato de lêvedo associado ao ácido oleico foi eficiente para a indução da produção de lipases associadas à célula (1542 U/g em 15h de cultivo e 3,44 g/L de biomassa). Galvagno *et al*. (2011) relataram aumento significativo de produção de biomassa e de atividade de lipases extracelulares com extrato de lêvedo ou peptona. Segundo a literatura, o extrato de lêvedo tem efeito positivo sobre produção de lipases e induz o crescimento de biomassa, pois não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas (LI *et al*., 2004).

Quando peptona bacteriológica foi utilizada como única fonte de nitrogênio, não se obteve expressiva produção de biomassa e também não foi detectada atividade enzimática. Resultados obtidos por Corzo e Revah (1999), com a cepa *Y. lipolytica* 681, mostraram que peptona favoreceu a produção de biomassa por esta cepa, porém não foi uma boa fonte de nitrogênio para a produção de lipases.

Pereira-Meirelles *et al.* (1997) e Fickers *et al*. (2004) correlacionam a produção de biomassa e a atividade da enzima extracelular. Esta correlação pode ser evidenciada nesse trabalho também para lipases intracelulares. As fontes de nitrogênio que favoreceram a produção de biomassa são também aquelas onde se detectou maior atividade hidrolítica intracelular. Corzo e Revah (1999) mostraram que o coeficiente de correlação de 0,77 foi estatisticamente significativo entre lipase extracelular e biomassa.

Uréia, emulsão de ácido oleico sem outro componente no meio e casaminoácidos não produziram quantidades relevantes de biomassa e também não foram eficientes para a produção de lipases intracelulares. Os resultados obtidos confirmam as observações de Pereira-Meirelles *et al*. (1997) que encontram baixos valores de atividade lipolítica extracelular quando empregaram uréia no meio de cultivo em comparação com a utilização de peptona. A utilização de triptona e triptona de soja como fontes de nitrogênio produziu resultados menos expressivos de atividade hidrolítica para as frações intracelulares. No entanto, para uma cepa de *Y. lipolytica* mutante superprodutor de lipase, triptona N1 foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção extracelular (FICKERS *et al*., 2004).

As fontes de nitrogênio de origem inorgânica não foram eficientes para a indução de lipases intracelulares. Esses dados corroboram com relatos da literatura de que os micro-organismos fornecem altos rendimentos de lipase extracelular quando se utiliza como fonte de nitrogênio um composto orgânico (SHARMA *et al*., 2001; FICKERS *et al.*, 2004; GALVAGNO *et al.*, 2011). Muitos trabalhos reportam o efeito repressor do sulfato de amônio sobre o crescimento de algumas cepas de *Y. lipolytica* e baixa atividade lipolítica são encontradas quando este composto é utilizado como fonte de nitrogênio (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997; NOVOTNY *et al*., 1988 e CORZO e REVAH, 1999). Entretanto, esta foi a melhor fonte de nitrogênio inorgânico para a produção de lipase de *Candida sp*. (TAN *et al*., 2003).

Portanto, cada cepa apresenta uma resposta específica frente à composição do meio de cultura. Os resultados confirmam a relação entre a produção de biomassa e atividade de lipase e mostram que o mesmo ocorre para as frações intracelulares.

5.3.3 Efeito da concentração inicial do indutor

A produção de lipase extracelular e intracelular por *Y. lipolytica* foi investigada em diferentes concentrações de azeite de oliva. O experimento foi realizado em microplacas com 2 mL de meio de produção (Meio OO: peptona 0,64%; extrato de

levedura 1%) e 1, 3, 5 e 10 % de azeite. As frações de lipase foram separadas com células obtidas em 15 h de cultivo e sonicadas, em banho de gelo, em um ciclo de extração com 26 W de potência, durante 1 minuto.

O crescimento celular não apresentou diferença significativa nas concentrações entre 1 e 10 % de azeite de oliva (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Atividade hidrolítica e concentração celular de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 1, 3, 5 e 10 % de azeite de oliva, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Azeite de Oliva (%)	$X_{máx15h}$ (g/L)	**15 h**		
		LL (U/g)	LA (U/g)	LE (U/g)
1	13,7	1449 ± 255	1811,9 ± 63,1	541,0 ± 34,7
3	16,3	1369,2 ± 233,5	2172,3 ± 170,4	438,3 ± 121,7
5	17,0	955,1 ± 96,9	1147,9± 114,9	650,0 ± 51,6
10	13,9	560,3 ± 43,9	759,0 ± 62,7	1321,1 ± 107,3

Observando a Tabela 5.8 é possível perceber que 1 e 3% de azeite de oliva foram as melhores concentrações para a produção de lipase intracelular, confirmando relatos anteriores da literatura (PEREIRA-MEIRELLES *et al.*, 1997). As frações presentes nas células representam a maior parte da atividade de lipase presente no meio de cultura. Para as lipases extracelulares, maior atividade foi observada com o aumento da concentração de indutor.

O cultivo e produção de lipase também foram avaliados com ácido oleico como indutor e as amostras foram obtidas a 15 e 40 h de cultivo. Em 15 h a produção de células foi similar para todas as concentrações testadas (Tabela 5.9), assim como nos resultados obtidos com azeite de oliva.

Tabela 5.9. Atividade hidrolítica e concentração celular de *Y. lipolytica*, cultivada em meio com 0,5, 1, 3 e 5 % de ácido oleico, em microplacas a 250 rpm e 28 ºC. LE (lipase extracelular), LA (lipase associada) e LL (lipase liberada).

Ácido Oleico (%)	$X_{máx\ 15h}$ (g/L)	$X_{máx\ 40h}$ (g/L)	**15 h**			**40 h**
			LL (U/g)	LA (U/g)	LE (U/L)	LE (U/L)
0,5	6,7	7,9	1226 ± 14	3860 ± 43	789 ± 24	413 ± 99
1	9,0	13,9	1217 ± 20	2978 ± 9	1840 ± 114	3720 ± 142
3	8,0	20,7	234 ± 4	450 ± 0,6	2740 ± 152	5722 ± 550
5	11,5	32,3	110 ± 18	137 ± 10	1733 ± 323	1272 ± 289

Altas atividades de lipases intracelulares foram detectadas com 0,5 e 1 % de ácido oleico. Foi observada uma baixa produção de lipase intracelular nas concentrações

de 3 e 5 % em 15 h de cultura. Em microplacas, o volume final do meio é de 2 ml, uma concentração elevada de azeite de oliva (5 %) pode dificultar a transferência de oxigênio e isto pode influenciar na produção de lipases. Sendo *Y. lipolytica* uma levedura estritamente aeróbia, a concentração de oxigênio dissolvido e a transferência de oxigênio são parâmetros que alteram fortemente seu metabolismo (Amaral *et al.*, 2006).

Diferentes concentrações de ácido oleico também foram testadas na produção de lipase extracelular por Fickers *et al*. (2004). Foi observado que a secreção de lipases para o meio de cultivo ocorre pricipalmente no início do cultivo para 0,5 % de ácido oleico e em uma etapa posterior para 1 e 3 % de ácido oleico. Isso provavelmente se deve à disponibilidade da fonte de carbono no meio, pois a secreção da lipase só vai ocorrer quando esta fonte está escassa. Como maiores concentrações levam mais tempo para serem consumidas, a detecção da lípase extracelular, nessa condição, só se dá em uma etapa posterior. Seguindo esse raciocínio, a lípase intracelular teria seu ápice no início do cultivo.

Atividade extracelular também foi detectada em 15 h de cultivo, sendo que na concentração de 3 % foi observada a maior atividade. Em 40 h de cultivo em diferentes concentrações de ácido oleico, foi observado um aumento progressivo na atividade de lipase extracelular (Tabela 5.9), o que mostra o efeito indutor dessa fonte de carbono. Além disso, confirma que a lipase extracelular começa a ser secretada em uma etapa posterior. Com 5% de ácido oleico todas as frações de lipase apresentaram baixa atividade. Esse fato pode ser relacionado a uma inibição por alta concentração de substrato hidrofóbico (ZARECKUVA, 2012) ou porque, com maior concentração, em 40 h, ainda não se atingiu a concentração de exaustão do ácido oleico para permitir a secreção de lipase. No entanto, para as lipases intracelulares, percebe-se que há uma inibição mesmo, pois desde o início do cultivo observa-se baixa atividade para essas frações. Portanto, com os dados da Tabela 5.9, é possível concluir que as baixas concentrações de ácido oleico favorecem a produção lipases intracelulares.

5.3.4 Produção de lipases intracelulares utilizando azeite de oliva e óleo de fritura residual como indutores

Com o objetivo de estudar a indução das lipases intracelulares na presença dos óleos e verificar o potencial de indução do óleo de fritura residual, foram realizados

experimentos em *shaker*, em Meio OO (peptona 0,64 % e extrato de lêvedo 1 %) com a adição de 1 % do indutor (azeite de oliva ou óleo de fritura residual). Os extratos foram obtidos através de ultrassom, em banho de gelo, potência de 150 W em sonicador 20 Hz, com máxima potência de 500 W, em dois ciclos de extração de 9 minutos e as atividades hidrolíticas foram quantificadas utilizando p-nitrofenil laurato como substrato.

A figura 5.21 mostra o perfil de produção de lipases produzidas em azeite de oliva. É possível observar máxima atividade associada à célula em 6 h de cultivo e máxima atividade de lipases intracelulares liberadas após a sonicação das células em 15 h. Em 6 h de cultivo também é observada atividade extracelular em torno de 100 U/L. Esse perfil é condizente com os relatos da literatura sobre a primeira etapa de degradação dos triglicerídeos (TAG's) (FICKERS *et al*, 2005b; HARZEVILI, 2014).

É importante lembrar que foi utilizado como indutor azeite de oliva extra virgem "in natura", portanto, com alto teor de triglicerídeos (TAG's). Considerando que os triglicerídeos do meio de cultura são utilizados desde o início do cultivo para o crescimento das células e, a primeira fase deste metabolismo se dá pela hidrólise dessas moléculas em ácidos graxos e glicerol, as lipases basais presentes na célula exercem a função de iniciar o consumo dos TAG's. Portanto, em 6h de cultivo se observa uma alta atividade de lipase na célula, as quais, provavelmente, são responsáveis pela hidrólise inicial de TAG's (entre 0 e 6 h de cultivo). A alta atividade intracelular em 15 h é devido à indução da produção destas enzimas pela entrada de ácidos graxos nas células.

Estudos anteriores mostraram que quando o azeite de oliva é a única fonte de carbono, os níveis de triglicerídeos diminuem rapidamente nas primeiras 10 h de cultivo. Em 10 h de cultivo não se encontra mais triglicerídeos no meio, porém se observa o máximo de concentração de ácidos graxos livres, os quais não são mais detectados em 30 h (NAJJAR *et al.*, 2011).

O perfil apresentado na figura 5.21 é bastante similar ao perfil de lipases intracelulares apresentado na mesma figura para a indução somente com ácido oleico (Figura 5.20). Porém, na presença do ácido graxo, não se observa alta atividade de lipases associadas antes de 15 h de cultivo. Neste caso, o ácido graxo já está disponível no meio de cultura desde o início e tem difusão livre pela parede celular. Portanto, os máximos de atividade extracelular e intracelular ocorrem ao mesmo tempo (15 h).

Nesse caso, tanto a fração intracelular quanto a fração associada à superfície celular apresentam o mesmo perfil e a indução é eficiente. O que se observa é o acumulo de lipases no interior e na superfície celular e liberação de lipases para o meio de cultura em duas etapas, a qual está relaciona à diminuição da concentração do substrato.

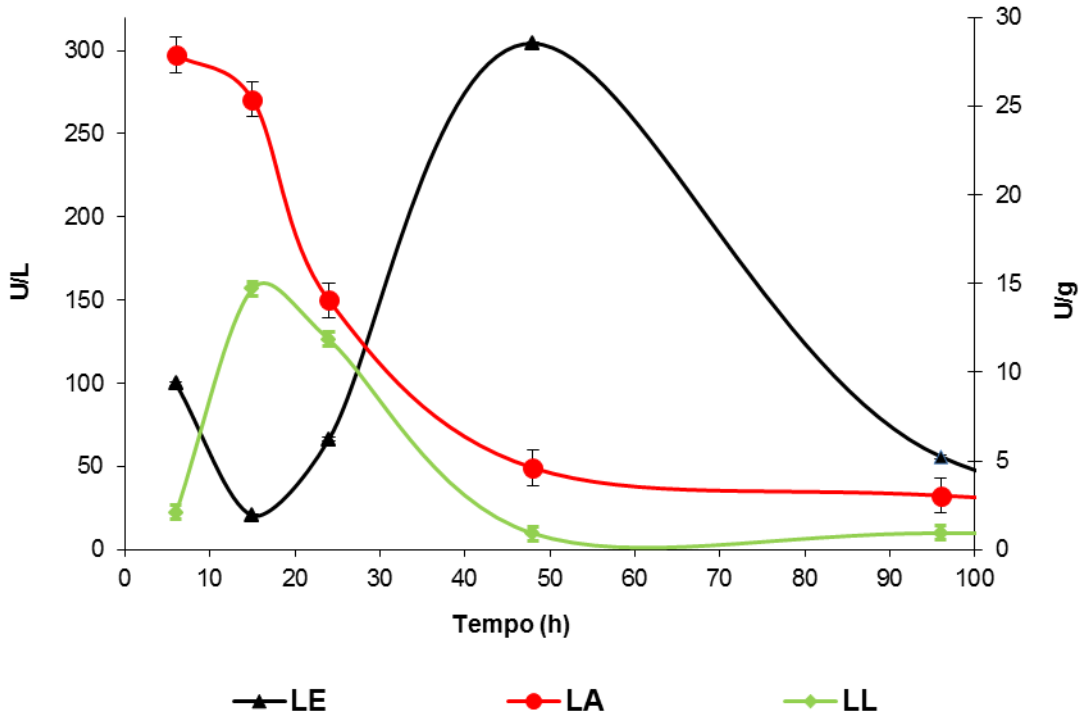


Figura 5.21. Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio OO com 1 % de azeite de oliva, cultivadas em Erlenmeyers, a 250 rpm/ 28ºC, por 168 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dado experimental.

Najjar *et al.* (2011) sugeriram um mecanismo de degradação de lipídeos por *Y. lipolytica*. No início do cultivo, grande parte da atividade da lipase está ligada à parede da célula e são observadas pequenas saliências na superfície celular quando cultivadas na presença de óleos. Essas saliências são importantes na absorção de lipídeos pela célula (Figura 5.22). Quanto maior o número de saliências, maior o número de lipídeos ligados à célula, sugerindo que os lipídeos são absorvidos através destas saliências. Apesar do processo de lipólise ocorrer principalmente na parede celular e ser decorrente do contato das gotas de óleo com as leveduras, o mecanismo de ligação das lipases à parede celular ainda é desconhecido.

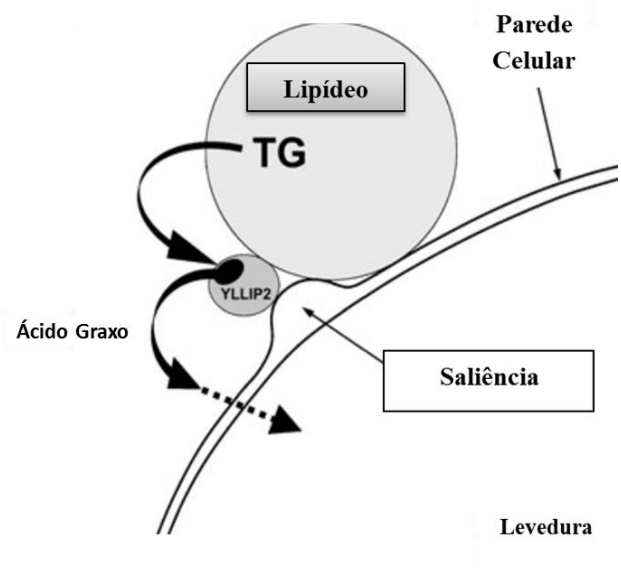


Figura 5.22. **Representação esquemática do mecanismo de lipólise e captação de ácidos graxos em cultivos com *Y. lipolytica* (NAJJAR *et al.*, 2011).**

Em relação à atividade extracelular, os perfis de produção com azeite de oliva (Figura 5.21) e ácido oleico (Figura 5.20) são bem diferentes. Na indução com o azeite de oliva não foi observada a formação dos dois picos de atividade. É importante lembrar que o azeite de oliva fornece duas fontes de carbono diferentes: o glicerol e os ácidos graxos. E trabalhos anteriores mostraram que a lipase extracelular só é secretada quando a concentração de glicerol é mínima no meio de cultivo (GALVAGNO *et al*., 2011). Portanto, é possível que a presença de um único pico de atividade extracelular, seja devido à presença de glicerol no meio de cultivo. O máximo de atividade extracelular (48h) ocorre em função da provável diminuição do consumo de substrato (TAG's). Portanto, a secreção de lipases parece estar diretamente relacionada à concentração de triglicerídeos como foi relatado anteriormente por Pereira-Meirelles *et al.* (2000).

Ainda na figura 5.25, é possível observar que no máximo de atividade extracelular as atividades intracelulares são mínimas. Ou seja, nesta fase o óleo provavelmente já foi quase todo consumido e a expressão de lipases intracelulares diminui e a lipase extracelular foi liberada para a degradação do substrato remanescente.

Portanto, este perfil corrobora com os relatos da literatura de que, nas primeiras horas de cultivo, as lipases associadas à célula são capazes de prover o crescimento celular e a entrada de ácido oleico (FICKERS *et a*l., 2004). Najjar *et al*.(2011), através de técnicas de biologia molecular, observaram que a maior parte da atividade lipolítica

permaneceu associadas às células nas primeiras horas de cultivo. Os TAG's do azeite de oliva foram degradados enquanto a lipase ainda estava ligada à parede celular.

É importante ressaltar que neste trabalho somente foram comparados os perfis de atividade, visto que os valores de atividade obtidos em microplacas e em Erlenmeyers são completamente diferentes. Isto se deve ao fato de que várias condições de cultivo e análises foram alteradas ao longo do trabalho.

Na figura 5.23 observa-se o perfil de produção de lipases na presença do óleo de fritura residual (OFR). Os valores máximos de atividade para as frações intracelulares foram detectados em 15 h de cultivo e o perfil de atividade destas frações foi bastante similar ao obtido com ácido oleico. Baixa atividade extracelular foi detectada nos cultivos com OFR como indutor.

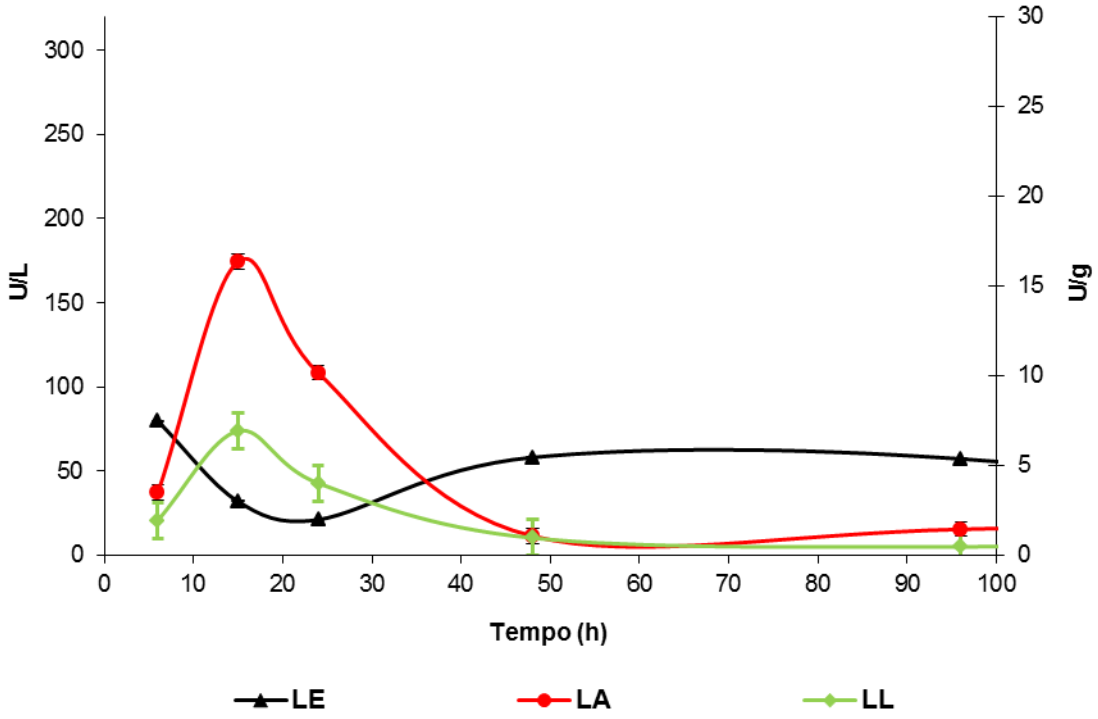


Figura 5.23. Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* 50682 em meio de cultura com 1 % de óleo de fritura residual, cultivadas em Erlenmeyers, a 250 rpm/ 28ºC, por 168 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dado experimental.

Ao comparar os perfis obtidos com ácido oleico e com o óleo de fritura residual, nota-se que são bastante similares em relação à produção de lipases intracelulares. Apesar da composição de ácidos graxos do OFR ser parecida com a composição do óleo de soja "in natura" (dados apresentado na tabela 5.1), o resíduo de óleo de fritura sofreu alterações termoxidativas e hidrolíticas na sua composição de triglicerídeos.

Segundo Cella *et al*. (2002), óleos aquecidos por longos períodos a elevadas temperaturas apresentam mais de 50 % de compostos polares, que são provenientes da degradação dos TAG's, como ácidos graxos livres, ácidos graxos oxidados, diacilglicerídeos, polímeros. Portanto, o alto teor de ácidos graxos livres, provavelmente presente neste resíduo, foi capaz de induzir um perfil de produção de lipases intracelulares similar ao observado na presença unicamente de ácido oleico. Não há a necessidade de disponibilização de lipases extracelulares no início do cultivo para a degradação dos TAG's. De acordo com Jorge *et al*. (2005), a quantidade de ácidos graxos livres nos óleos vegetais aumenta com o tempo de exposição à fritura.

Segundo Desfougeres *et al.*(2010) existem dois sistemas separados de controle genético das vias de hidrólise de TAG's (genes SOA) e de oxidação de ácidos graxos livres (genes POX2). Portanto, as diferenças de perfis de lipases intracelulares observadas nas indução com azeite de oliva, com OFR e com ácido oleico sugerem que a hidrólise de triglicerídeos é necessária no início do cultivo na presença de azeite de oliva, mas não é uma via metabólica importante para o consumo de ácidos graxos na presença do resíduo.

Os perfis de produção de lipases intracelulares também foram estudados por Najjar e colaboradores (2011). Nesse trabalho, foram utilizados azeite de oliva e tributirina como fontes de carbono e nos dois cultivos os máximos de atividade associada às células também foram às 15 h de cultivo.

Muitos trabalhos na literatura relatam o importante papel dos ácidos graxos na indução da produção de lipases por leveduras (THEVENIEAU *et al.*, 2010). Como já mencionado, o ácido oleico é o principal ácido graxo envolvido nesta indução, porém os ácidos eládico e linoleico também podem realizar a indução quando utilizados como fonte de carbono (HADEBALL, 1991; WANG *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais (oliva, soja, girassol, milho, amendoim, etc.), são capazes de produzir altos níveis de atividade lipásica, quando utilizados como fonte de carbono (SHARMA *et al*., 2001). Corzo & Revah (1999) estudaram a indução da produção de lipase extracelular por diferentes tipos de óleo e relataram que o azeite de oliva, o óleo de milho e o óleo de soja foram capazes de induzir a produção de lipase, porém o azeite de oliva teve o melhor desempenho.

Nesse trabalho, o óleo de fritura residual induziu a produção das frações intracelulares de lipase por *Y. lipolytica*, porém apresentou valores menores de atividades hidrolíticas máximas que os obtidos com o azeite de oliva. Esse fato pode ser atribuído ao menor teor de ácido oleico presente no OFR (26 % de ácido oleico e 46 % de ácido linoleico). Sugiura *et al.* (1975) realizaram um estudo comparativo da produção de lipases com diferentes tipos de ácidos graxos e observaram que os ácidos oleico e linoleico foram eficientes na indução da produção das frações associadas às células. Porém, o ácido oleico foi quase 4 vezes mais eficiente que o linoleico. Além disso, na presença de OFR, houve baixa detecção de atividade extracelular, o que pode ser devido a presença de componentes no OFR que possam inibir a produção da lipase extracelular.

Com a finalidade de confirmar a presença da lipase nos diferentes extratos obtidos com os dois indutores, foram realizadas análises de atividade lipolítica em 6, 15 e 24 h de cultivo, tempos em que se detecta maior atividade hidrolítica intracelular. O método utilizado foi o titulométrico, o qual permite diferenciar as lipases (subclasse de esterases capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, com mais de 10 átomos de carbono) das demais esterases (enzimas que hidrolisam triglicerídeos de cadeia curta) (JAEGER *et al.*, 1999). Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 5.24 e 5.25.

Observando a figura 5.24, nota-se que houve máxima indução da produção de lipases intracelulares na presença de azeite de oliva em 24 h de cultivo. A indução ocorreu de forma mais lenta do que com OFR (Figura 5.25) e no início do cultivo (6h), a atividade lipolítica foi maior na lipase associada à célula, reafirmando a idéia de que as LA são as responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos no início do cultivo.

Observando a figura 5.25, nota-se que a indução mais rápida da produção de lipases na presença de OFR, provavelmente por este resíduo apresentar maior quantidade de ácidos graxos livres que o azeite de oliva “in natura”. O OFR apresenta, em sua composição, ácidos graxos e triglicerídeos em quantidade suficiente para induzir a produção de lipases intracelulares (máximo de atividade lipolítica 400 U/g), porém ele se mostrou menos eficiente que o azeite de oliva (máximo de atividade lipolítica 600 U/g). Porém, com o uso do resíduo, obteve-se uma produtividade de 26,7 $Ug^{-1}h^{-1}$, enquanto que na indução com o azeite de oliva foi de 25 Ug-1.h^{-1}, portanto, os dois indutores apresentaram produtividades bem próximas. Considerando que a produção de

lipases intracelulares em OFR ocorreu em tempo menor, este indutor, então, seria o mais adequado para a produção.

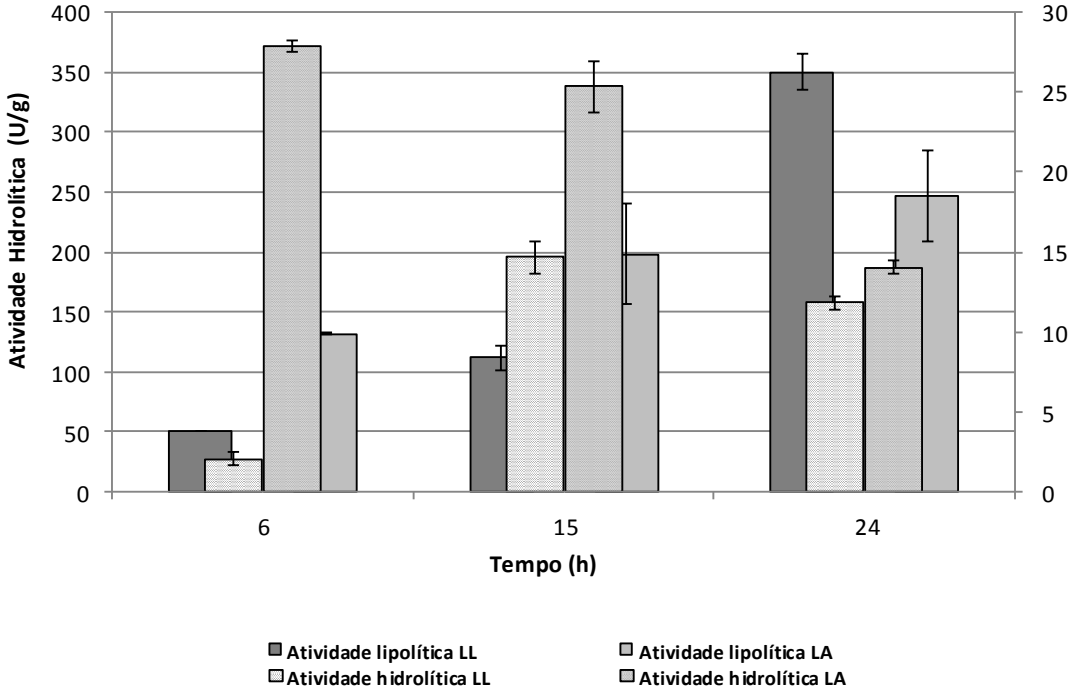


Figura 5.24. **Atividades hidrolítica e lipolítica das fraçoes intracelulares produzidas por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO em cultivos em erlenmeyers, 250 rpm, 28 ºC.**

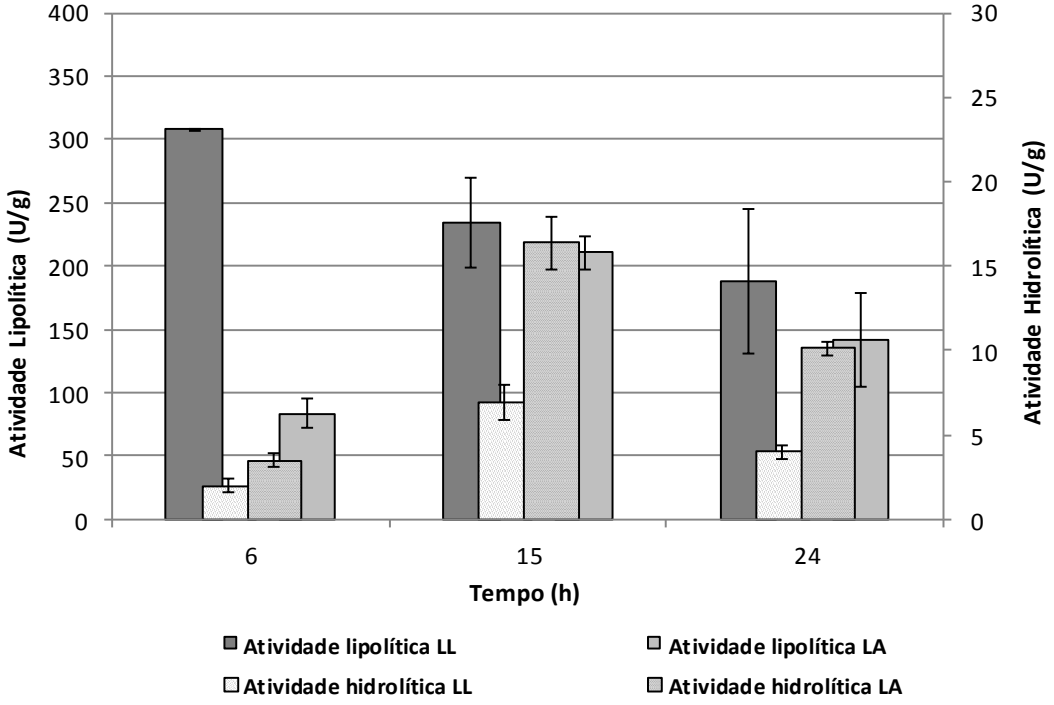


Figura 5.25. **Atividades hidrolítica e lipolítica das fraçoes intracelulares produzidas por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF em cultivos em erlenmeyers, 250 rpm, 28 ºC.**

5.4 Caracterização dos extratos enzimáticos obtidos utilizando óleos como indutores

A caracterização dos extratos intracelulares obtidos é de fundamental importância e base para estudos futuros de investigação das suas possíveis aplicações e para a delimitação das condições ideais de trabalho. Para se obter os extratos enzimáticos as células do meio de cultura foram separadas em 15 h de cultivo e, após o procedimento de extração das frações enzimáticas, foram obtidos dois tipos de extratos para cada indutor utilizado. A fração enzimática obtida no sobrenadante após o procedimento em ultrassom aplicado às células será chamada, nesse trabalho, de extrato bruto liberado (EBL), enquanto que a fração obtida nos pellets celulares após o mesmo procedimento será chamado de extrato bruto associado à célula (EBA). É importante destacar que os resultados referentes a essa caracterização dos extratos são inerentes a um efeito sinergístico de todos os componentes presentes, que podem ser isoformas de lipases (Lip2, Lip7 ou Lip8), proteases, compostos intracelulares, etc.

Especificidade em relação ao substrato

As Figuras 5.26 e 5.27 mostram as atividades hidrolíticas dos extratos de lipases intracelulares de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 obtidos frente a diferentes p-nitrofenil ésteres de cadeias curtas (C2 e C4), médias (C8 e C12) e longa (C16). Comparando os extratos produzidos com azeite de oliva como indutor (Figura 5.26), o extrato bruto associado mostrou elevada atividade percentual tanto para os substratos de cadeias médias, quanto para o de cadeia longa, enquanto que o extrato bruto liberado apresentou afinidade similare para cadeia curta, média ou longa.

Fickers *et al*. (2005a) realizaram a caracterização de lipases Lip7p e Lip8p de *Yarrowia lipolytica* e observaram que Lip7 apresentou maior afinidade por substratos com cadeias curtas (C6), enquanto que Lip8 apresentou maior atividade em ésteres de cadeias médias (C10). Outros trabalhos na literatura também relatam este perfil de especificidade para estas duas lipases (SONG *et al.*, 2006; LIU *et al*., 2010). Kumari & Gupta (2012), através de caracterização de Lip8 expressa em *Escherichia coli*, mostraram que esta lipase apresentou maior atividade sobre óleos vegetais, em seguida em TAG's puros e paranitrofenil ésteres, sugerindo que Lip 8 é uma lipase verdadeira. Com base nestes dados, supõe-se que as diferenças de perfis de especificidade entre

EBL e EBA obtidos com azeite de oliva estejam relacionadas às diferenças quantitativas destas isoformas de lipases nesses extratos. Possivelmente o EBA apresenta maior percentual de Lip8.

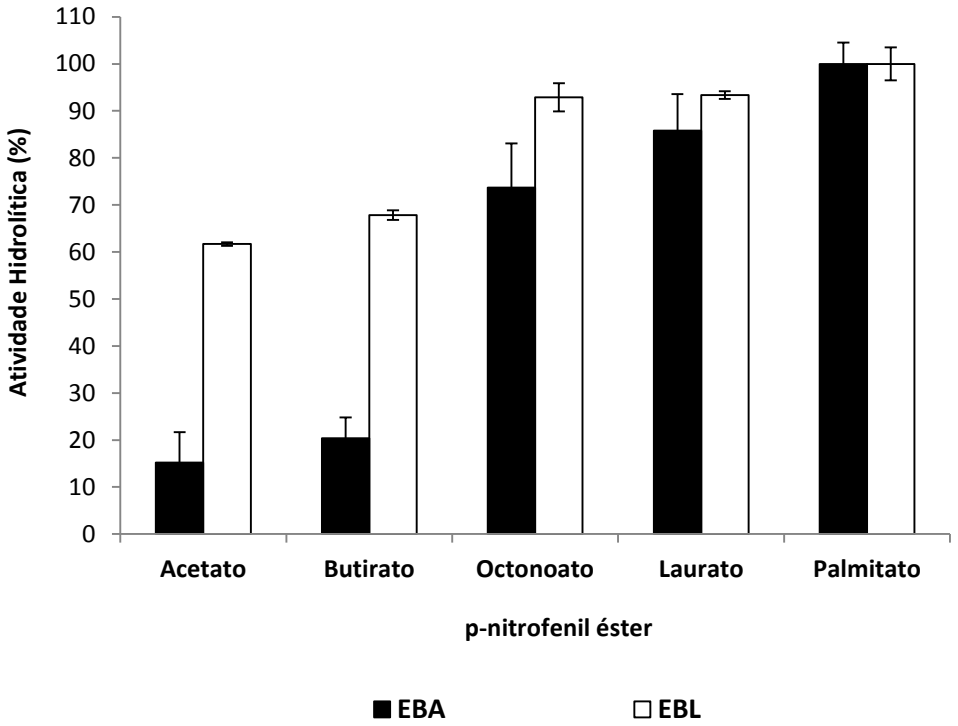


Figura 5.26. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO. Foram utilizados substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. EBL (extrato bruto liberado) apresentou atividade máxima de 16,2 U/g e EBA (extrato bruto associado) apresentou atividade máxima de 169,0 U/g.**

Os EB's associado e liberado induzidos pelo OFR apresentam alta percentagem de atividade quando foram utilizados substrato de cadeia longa (C16) (Figura 5.27). Aparentemente, estes extratos são eficientes para a hidrólise de substratos gordurosos. Esse resultado mostra um perfil de especificidade diferente entre os extratos obtidos com azeite de oliva e o OFR. O resíduo parece ser um indutor mais eficiente que o azeite para a obtenção de um extrato com características de lipase verdadeira.

Os extratos obtidos com o OFR apresentaram especificidade similar ao extrato extracelular produzido por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 que foi caracterizado por Brígida *et al.* (2007) e apresentou grande afinidade por substratos de cadeia longa (C16) e baixa atividade para substrato com cadeia curta (C4).

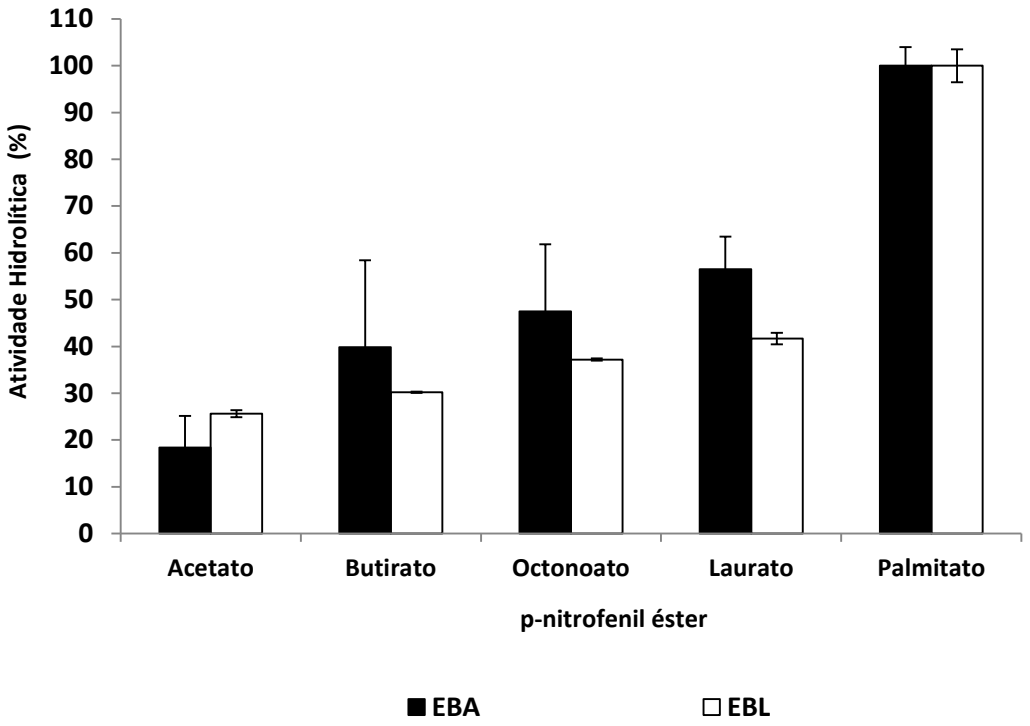


Figura 5.27. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foram utilizados substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7. EBL (extrato bruto liberado) apresentou atividade máxima de 59,4 U/g e EBA (extrato bruto associado) apresentou atividade máxima de 223,4 U/g.**

5.4.1 Efeito da concentração de substrato na hidrólise de para-nitrofenil laurato

As velocidades de reação de hidrólise variaram na faixa estudada de acordo com a concentração de substrato. A determinação dos valores de K_m e $V_{máx}$ foi realizada por ajuste não linear do modelo de Michaelis-Menten aos dados experimentais. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{máx}$) calculada para cada extrato bruto obtido são apresentadas na tabela 5.10.

O EBL obtido com azeite de oliva apresentou o menor K_m, ou seja, maior afinidade pelo substrato, o p-nitrofenil laurato. Isso pode ser justificado pela especificidade mista apresentada por este extrato pelos diferentes tamanhos de cadeias de ésteres (Figura 5.26). O EBA obtido em azeite apresentou o maior K_m, o que confere uma menor afinidade pelo substrato com cadeia média (C12). Esse fato confirma os resultados de elevada especificidade deste extrato por cadeias longas (C16) (Figura 5.26).

Tabela 5.10. Parâmetros cinéticos dos extratos brutos das lipases liberadas para o sobrenadante (EBL) e associadas á célula (EBA) de *Y. lipolytica* cultivada na presença de azeite de oliva ou óleo de fritura residual como indutores.

Extrato Bruto	K_m (µM)	$V_{máx}$ (µmol.min^{-1}.g^{-1})	R^2
EBL Azeite	181,5 ± 159,9	13,9 ± 2,8	0,42
EBL OFR	395,5 ± 99,2	34,2 ± 2,7	0,93
EBA Azeite	621,8 ± 237,2	307,4 ± 49,2	0,91
EBA OFR	307,5 ± 83,6	252,3 ± 83,6	0,69

Os extratos obtidos com o OFR apresentaram K_m muito próximos entre si. O EBL mostrou K_m maior do que EBA, logo este apresenta menor afinidade pelo p-nitrofenil laurato (C12).

Observando as Figuras 5.28 e 5.29, é possível notar várias oscilações na atividade do EBL obtido em azeite de oliva, as quais impediram um bom ajuste do modelo (baixo R^2, Tabela 5.10). Para o EBL obtido a partir de azeite de oliva, assim como para o EBA obtido a partir do OFR, observa-se uma redução da taxa de reação com o aumento da concentração do substrato. Isso sugere que há inibição da enzima pelo substrato.

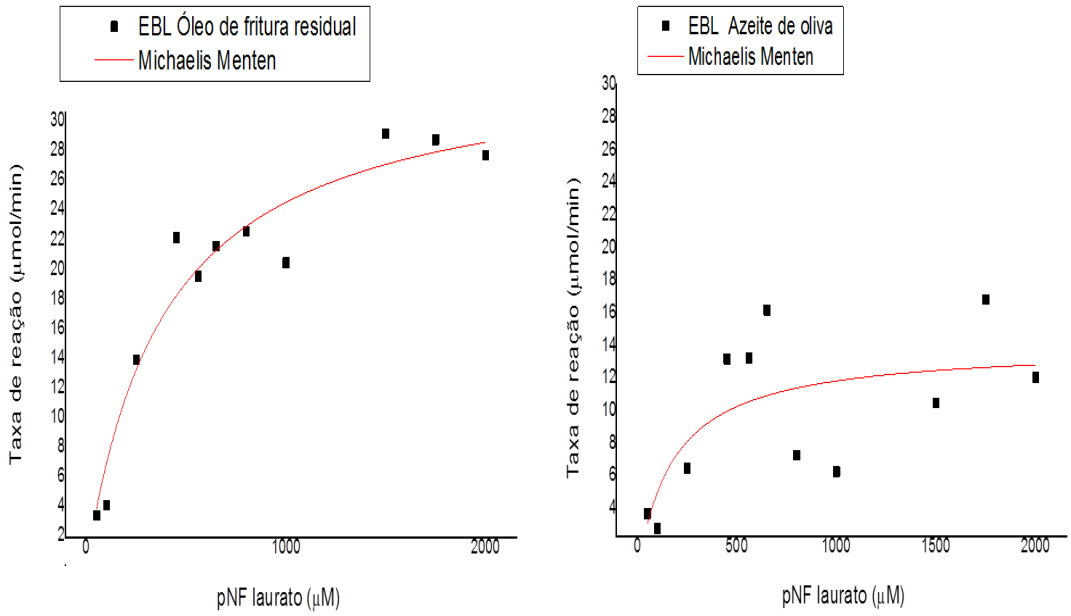


Figura 5.28. Influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise de paranitrofenil laurato, em pH 7, a 37 ºC, catalisada pelo extrato de lipases de *Y. lipolytica* liberadas após sonicação .

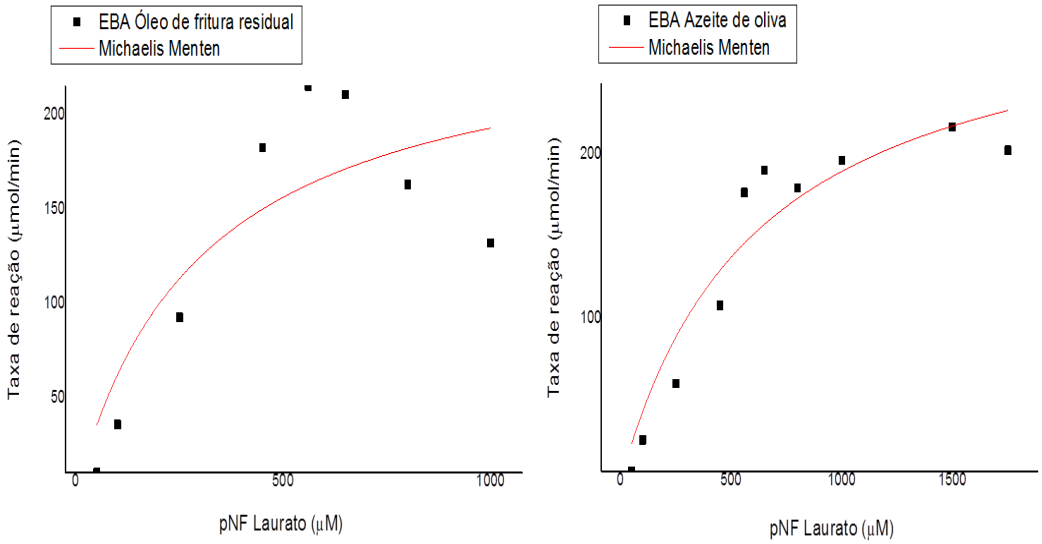


Figura 5.29. **Influência da concentração de substrato na velocidade inicial da reação de hidrólise de paranitrofenil laurato, em pH 7, a 37 ºC, catalisada pelo extrato de lipases de *Y. lipolytica* associadas às células, após sonicação .**

5.4.2 Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade dos extratos enzimáticos

A figura 5.30 mostra o efeito do pH sobre a atividade dos extratos obtidos com OFR como indutor. EBA e EBL mostraram máxima atividade em pH 7. Porém observa-se uma grande diferença de atividade no mesmo valor de pH, quando utilizou-se tampão fosfato de sódio e fosfato de potássio. Diferentes eletrólitos podem interferir na distribuição de cargas na superfície da enzima, no produto e no substrato, o que altera a atividade da mesma (BRÍGIDA, 2010). A atividade das lipases associadas à célula é favorecida por íons sódio e, além disso, estas lipases são levemente ativas em pH 3 e 9. Já as lipases que foram removidas das células (EBL) são mais ativas na presença de íon potássio e não apresentaram atividade em pH 3 ou 9. Essa pequena diferença de atividade entre extrato associado e liberado frente a pH's ácido (3) e alcalino (9) pode ser explicada devido à proteção que o envelope celular confere à enzima. De certa forma, a enzima encontra-se imobilizada na parede/membrana da célula, as quais agem como um material de revestimento e protegem as enzimas (PHAM-HOANG *et al.*, 2013).

Vários relatos na literatura mostram que Lip7 e Lip 8 apresentam pH's ótimos entre 7 e 9,5 (ZAHO *et al.*, 2011; KUMARI & GUPTA, 2012 e KANOUM *et al.*, 2015). Porém, estes valores de pH variam de acordo com as condições de reação e substrato utilizado.

Quando foram testados os extratos brutos associado e liberado obtidos com azeite de oliva, observou-se o mesmo perfil de atividade (Figura 5.31). Os máximos de atividade para os dois extratos foram em pH 7,0. Além disso, foi observado o mesmo efeito positivo do íon potássio sobre a atividade hidrolítica de extrato bruto liberado obtido tanto em azeite quanto em OFR. Portanto, em relação às atividades dos EBL e EBA frente a diferentes pH's, não há diferença entre os extratos obtidos com azeite de oliva e com OFR.

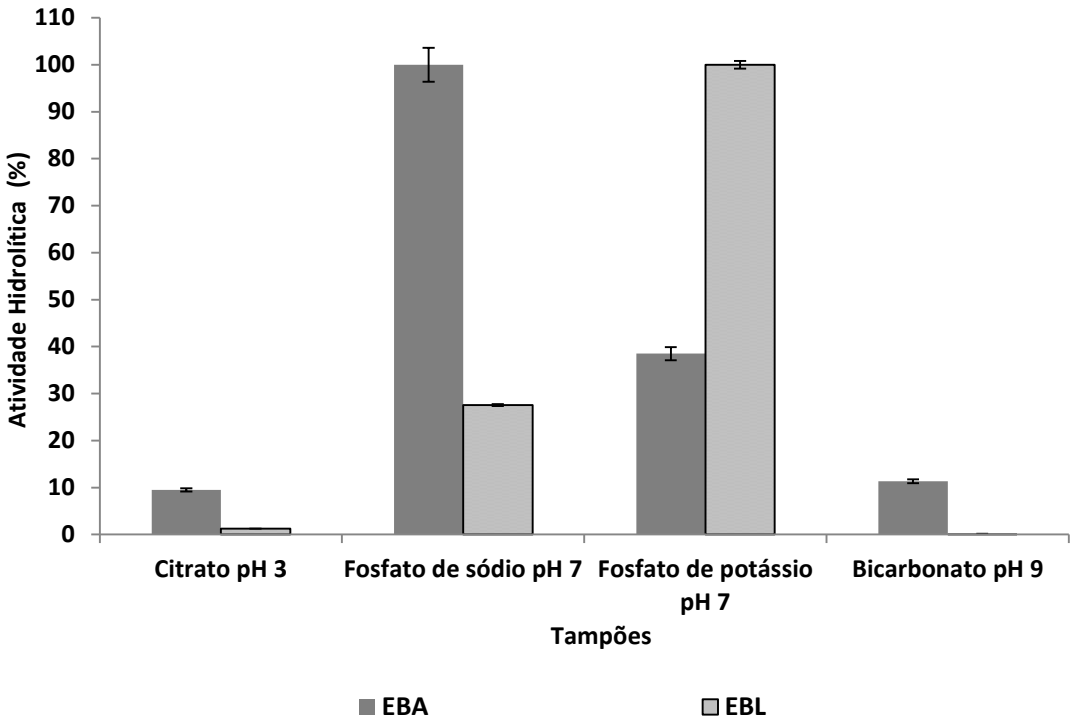


Figura 5.30. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foi utilizado paranitrofenil laurato como substrato, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampões de diferentes pH (3, 7 e 9).**

A influência da temperatura sobre a atividade hidrolítica dos extratos foi avaliada de 25 a 60 ºC, em pH 7 (Fig 5.32 e 5.33). O aumento da temperatura reacional pode levar a um aumento da velocidade de reação ou causar a desativação térmica da enzima. A atividade dos extratos obtidos em azeite de oliva e em OFR aumentou com o incremento da temperatura até 37 ºC e acima desta temperatura observou-se queda na atividade dos mesmos.

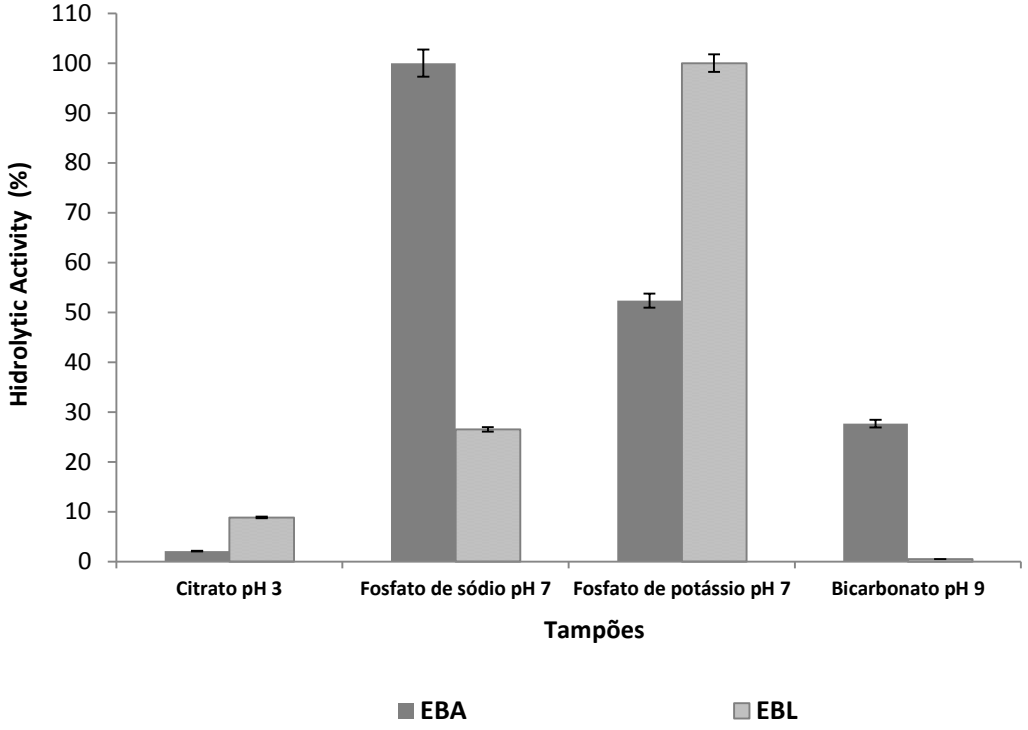


Figura 5.31. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO. Foi utilizado paranitrofenil laurato como substrato, as reações ocorreram a 37 °C, em tampões de diferentes pH (3, 7 e 9).**

A lipase extracelular de *Y. lipolytica* já foi bem caracterizada e sua temperatura ótima é de 37 ºC (CORZO & REVAH, 1999; Brígida *et al*., 2007). Porém, Pereira-Meirelles *et al.* (1999) caracterizaram um extrato extracelular obtido com a cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 com máxima atividade a 55 ºC. Essas diferenças de temperatura ótima de atividade podem ser atribuídas à presença de diferentes isoformas de lipase no extrato enzimático. É interessante observar que os EBA's apresentaram os menores valores de atividade a 60 ºC e foram mais sensíveis ao aumento de temperatura que os EBL's. Liu *et al* (2010), Zhao *et al*. (2011) e Kumari *et al*. (2012) caracterizaram as lipases Lip7 e Lip8 de *Yarrowia lipolytica*, expressas em diferentes micro-organismos, e observaram que seus máximos de atividade foram a 40 ºC. Porém, existem alguns relatos de que Lip8 também apresentou máximo de atividade em 45 ºC (SONG *et al*., 2006; LIU *et al.*, 2010). O extrato bruto liberado de azeite de oliva é bem estável e manteve sua atividade a 60 ºC. Song *et al*. (2006) relataram que Lip7 e Lip8 apresentam alta estabilidade a 60 ºC e mantiveram 85 % de sua atividade inicial após três horas de incubação, em pH 7,0. Portanto, o EBL obtido com azeite de oliva parece conter quantidades significativas e Lip8.

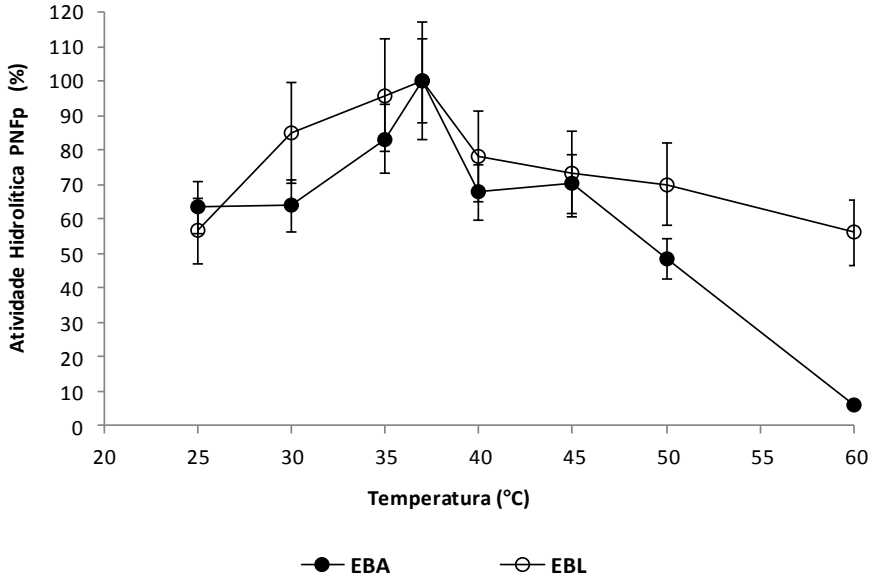


Figura 5.32. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OF. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram em pH 7,0, diferentes temperaturas (25 a 60 ºC).**

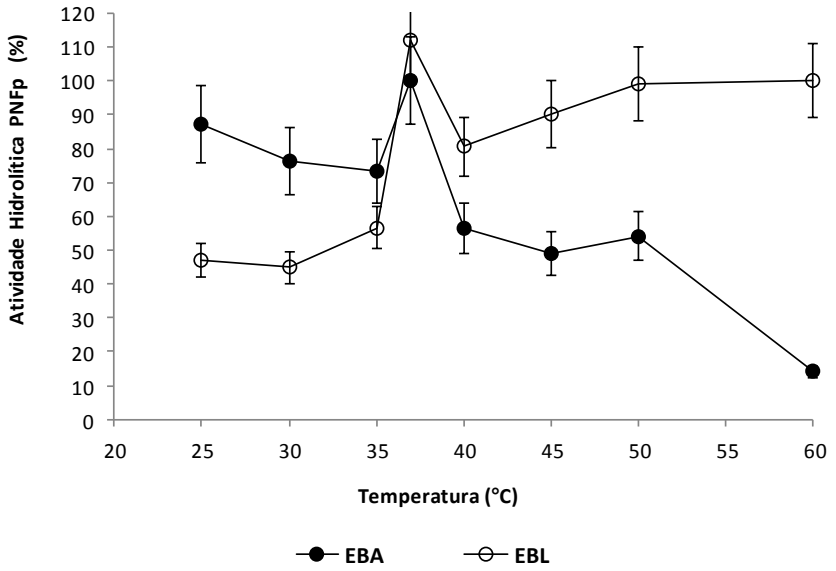


Figura 5.33. **Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram em pH 7,0, diferentes temperaturas (25 a 60 ºC).**

5.4.3 Estabilidade à estocagem

A estabilidade dos extratos obtidos foi avaliada (Figura 5.34). Os extratos brutos estocados a 4 e - 4 ºC apresentaram maior estabilidade à estocagem do que os extratos mantidos a 30°C. É importante ressaltar que não houve uma manutenção ideal de temperatura durante todo o período de estocagem nos estudos a 4 e - 4 ºC e, por isso,

existem algumas oscilações incoerentes de atividade ao longo do tempo. Porém, é possível avaliar que a 30 ºC, os extratos obtidos com azeite de oliva tiveram a sua atividade afetada em 15 dias de armazenamento. EBL e EBA obtidos com o OFR foram mais estáveis por 15 dias a 30 ºC, porém em 30 dias já tinham perdido quase que a totalidade da atividade inicial. Extratos extracelulares produzidos por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 são estáveis a baixas temperaturas. Pereira-Meirelles *et al.* (1997) observaram 100 % da atividade inicial foi mantida após 370 dias a 5 ºC. Brígida *et al.* (2007) relataram o extrato bruto de lipases extracelulares manteve sua atividade inicial por 7 meses a – 10 ºC. Apesar das temperaturas de armazenamento não terem sido adequadamente mantidas ao longo dos 60 dias, é possível observar que a -4 e 4 ºC, após 2 meses de estocagem, os extratos mantiveram mais de 70 % de suas atividades iniciais. Portanto, os EB's obtidos no presente trabalho também apresentam certa estabilidade a baixas temperaturas.

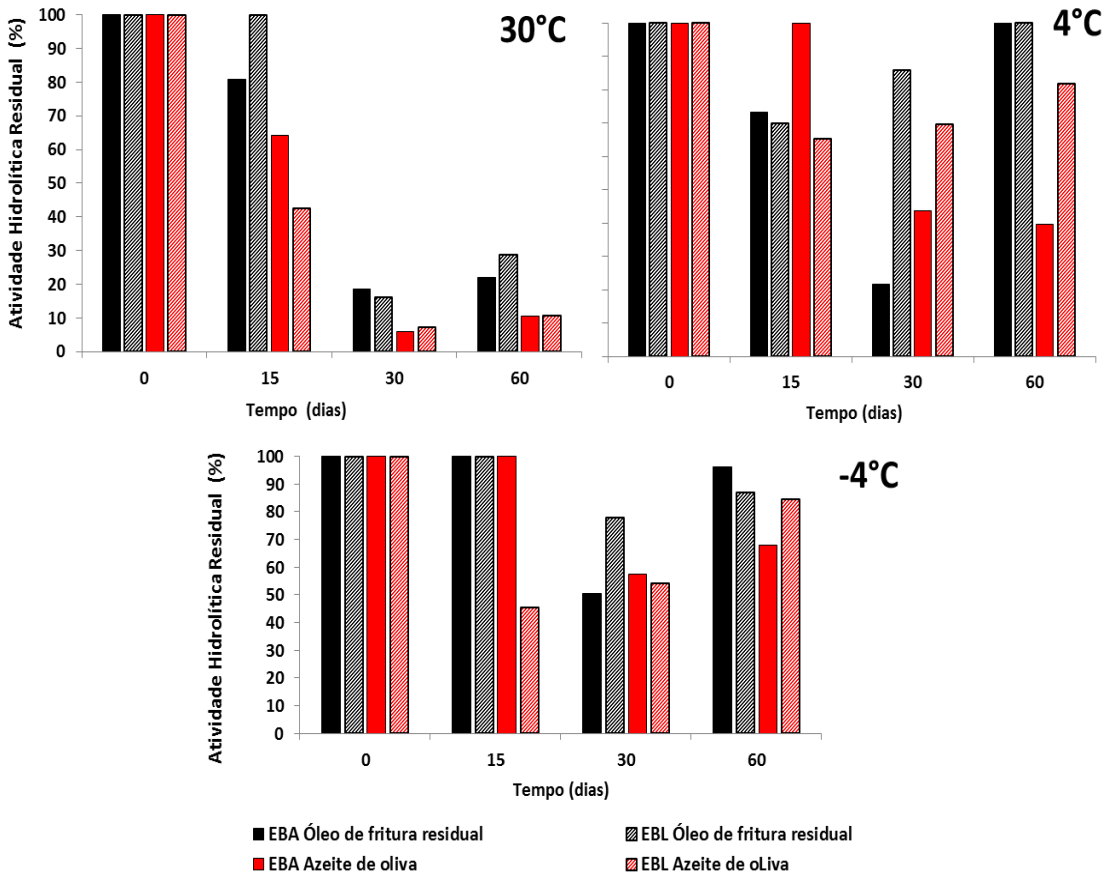


Figura 5.34. Atividades hidrolíticas dos extratos intracelulares produzidos por *Y. lipolytica* 50682, em meio OO e meio OF, armazenados a 30, 4 e -4 ºC, por até 60 dias. Foi utilizado paranitrofenil palmitato como substrato, as reações ocorreram a 37 ºC, em tampão pH 7.

5.5 Identificação das lipases nos extratos brutos obtidos

Pesquisas recentes do *Génolevures consortium* (http://www.genolevures.org/) determinaram o sequenciamento completo do genoma de *Y. lipolytica* E150 (CLIB99) e descreveram genes para a produção de 16 isoformas de lipases as quais têm sido identificadas nas frações intracelular, ligada à célula e extracelular e são eles: LIP2 (YALI0A20350g), LIP4 (YALI0E08492g), LIP5 (YALI0E02640g), LIP7 (YALI0D19184g), LIP8 (YALI0B09361g), LIP9 (YALI0E34507g), LIP10 (YALI0F11429g), LIP11 (YALI0D09064g), LIP12 (YALI0D15906g), LIP13 (YALI0E00286g), LIP14 (YALI0B11858g), LIP15 (YALI0E11561g), LIP16 (YALI0D18480g), LIP17 (YALI0F32131g), LIP18 (YALI0B20350g) e LIP19 (YALI0A10439g). Além disso, foram descritos genes que codificam quatro esterases: LIP1(YALI0E10659g), LIP3 (YALI0B08030g), LIP6 (YALI0C00231g) e LIP20 (YALI0E05995g) (FICKERS *et al.*, 2011).

Ota *et al*., 1980 caracterizaram duas lipases ligadas à parede celular de *Y. lipolytica*, Lip I (39 kDa) e Lip II (44 kDa). Lip 7 e Lip 8 são associadas à célula, porém são facilmente liberadas com a lavagem das células com tampão fosfato (FICKERS *et al*, 2005a). As lipases Lip2 (38 kDa), Lip 9, Lip 11 (51 kDa), Lip 12 (48 kDa), Lip 14 e Lip18 são extracelulares (KUMARI *et al.*, 2012; ZAOH *et al*., 2011; NAJJAR *et al*., 2011; KUMARI & GUPTA, 2012).

Com o objetivo de conhecer o perfil das enzimas nos extratos obtidos, foram iniciadas análises para a determinação do perfil eletroforético das proteínas intracelulares. Também foram utilizadas técnicas de biologia molecular para iniciar os protocolos necessários à identificação de lipases nos extratos obtidos utilizando anticorpos específicos que serão aplicados em métodos imunológicos de identificação como a imunofluorescência e o *western blot*. Os métodos de biologia molecular são ferramentas extremamente úteis para a determinação da localização de lipases em diferentes micro-organismos e a caracterização das mesmas (FICKERS *et al.*, 2004; HAMA *et al*, 2006; DARVISHI, 2013; KAMOUN *et al.*, 2015).

5.5.1 Eletroforese de proteínas nas frações obtidas utilizando os óleos como indutor

A Figura 5.35 mostra o resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos enzimáticos obtidos em azeite de oliva e em óleo de fritura residual em 24 h de

cultivo em Erlenmeyers e os resultados foram analisados comparando-se as bandas com marcadores de proteínas de diferentes pesos moleculares. É possível observar as bandas próximas a 40 kDa nos extrato brutos liberados obtidos no cultivo em azeite de oliva e óleo de fritura. É possível que estas bandas representem as lipases Lip 7 e Lip 8, relatadas na literatura com massa molecular em torno de 41 kDa (FICKERS *et al.*, 2005a; SONG *et al.*, 2006). Portanto, provavelmente cada extrato obtido contém um conjunto de isoformas de lipases, em diferentes proporções.

Apesar de Lip 7 e 8 serem parcialmente secretadas para o meio de cultura, estas isoformas representam somente 3 % da atividade extarcelular detectada no meio de cultivo, sendo Lip 2 a principal enzima responsável pela atividade extracelular. Lip 7 e Lip 8 estão principalmente associadas à parede celular (PINGDENE *et al.*, 2000; FICKERS *et al.*, 2005a).

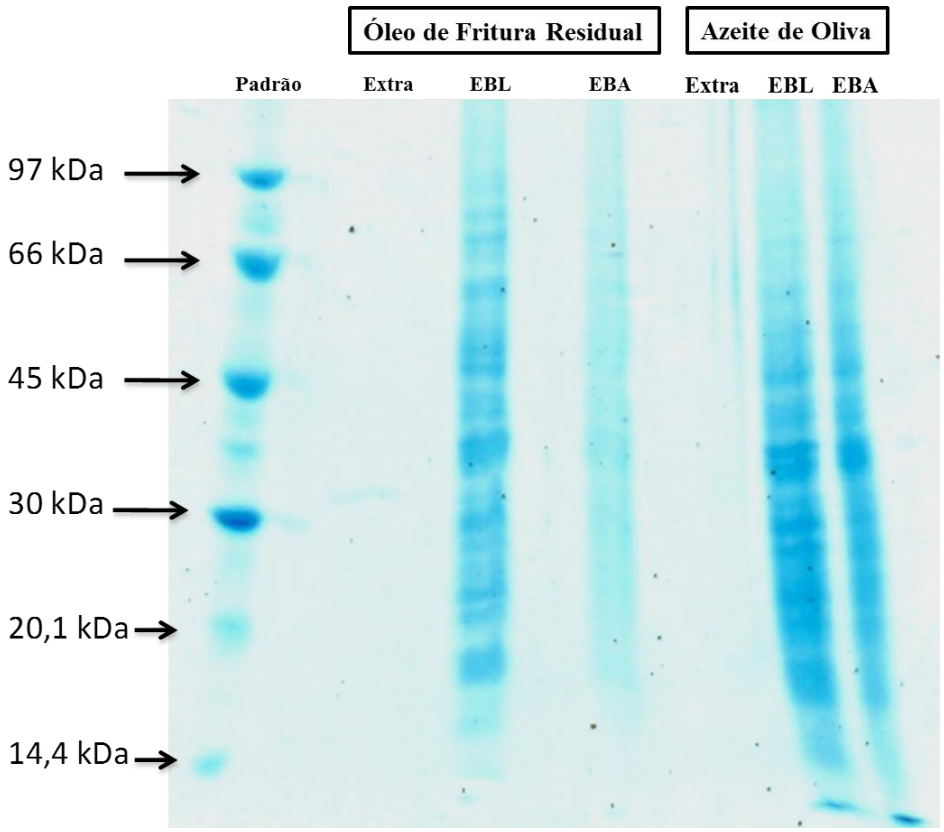


Figura 5.35. Eletroforese de extratos brutos enzimáticos obtidos através de sonicação, em 24h de cultivo de *Y. lipolytica*, na presença de azeite de oliva e óleo de fritura residual, revelada com Coomasie.

5.5.2 Extração do DNA genômico e reação da cadeia de polimerase (PCR) de *LIP 7* e *LIP 8* de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682

A extração e purificação do DNA é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase

(PCR). Com o objetivo de identificar as lipases intracelulares produzidas, foi realizada a extração de DNA genômico da cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, utilizando solução de fenol/clorofórmio como desnaturante das proteínas contidas na amostra e a qualidade do DNAg obtido pode ser visualizada através de eletroforese em gel de agarose 0,75% (Figura 5.36). O DNA genômico obtido foi utilizado como um molde para a amplificação dos genes Lip7 e Lip 8 *in vitro* por PCR. A cepa Po1g foi utilizada para avaliar a eficiência do método de extração.

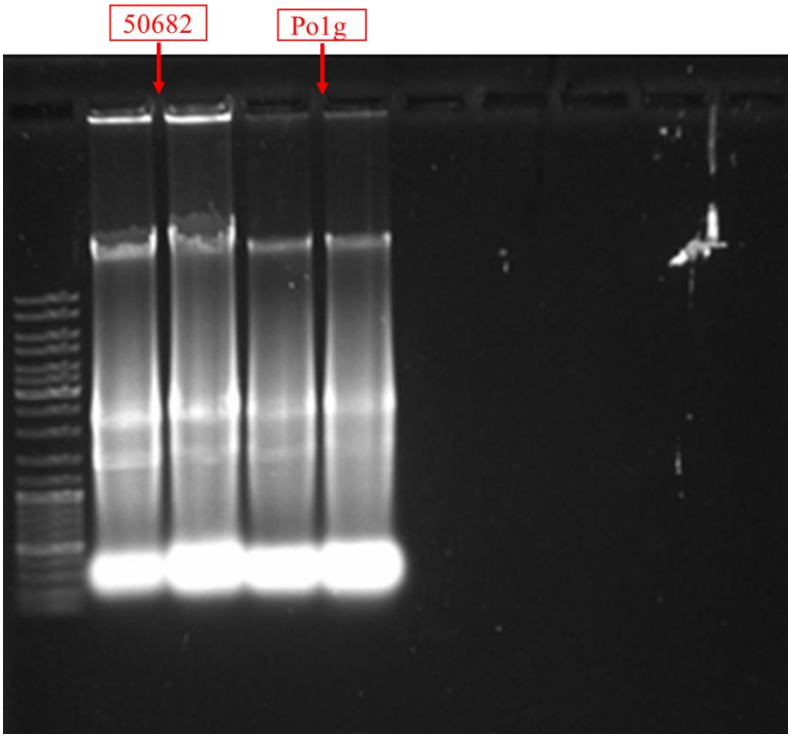


Figure 5.36. Imagem obtida da eletroforese em gel de agarose 0,75 % do DNA genômico extraído de *Yarrowia lipolytica* 50682 e *Yarrowia lipolytica* Po1g. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta.

Após a obtenção do DNA das duas estirpes, diferentes reações de amplificação foram testadas para escolha da melhor condição reacional, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para Lip 7 e Lip 8 desenhados anteriormente por Fickers *et al.* (2005a).

A condição PCR 1 não promoveu a amplificação dos genes Lip 7 e Lip 8 e gerou bandas inespecíficas. Isto pode ter ocorrido por contaminação da amostra com RNA ou insuficiente volume dos componentes reacionais. Em vista deste primeiro resultado, foi necessária a otimização das condições da PCR.

Para melhorar o desempenho da amplificação foi necessário tratar as amostras com RNAse. Desta forma, um novo ensaio para a amplificação de Lip 7 e Lip 8 foi

realizado, com amostras tratadas e não tratadas com RNAse e também alterando a concentração de alguns componentes da reação, como: a enzima Taq polimerase (responsável pela síntese de novas fitas de DNA), o DNAg utilizado na reação, a mistura dos nucleotídeos (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs e dGTPs) necessários para a síntese das fitas de DNA e concentração do co-fator da reação $MgCl_2$. Foram testados também dois tipos de tampões, KCl e NH_4 e, além disso, foram alterados os parâmetros da reação: a Tm (*melting temperature*), a qual varia de acordo com o primer utilizado e a temperatura em que ocorre a desnaturação do DNA; a temperatura de anelamento e o tempo de incubação a 72 ºC, temperatura na qual a emzima Taq-DNA polimerase está ativa.

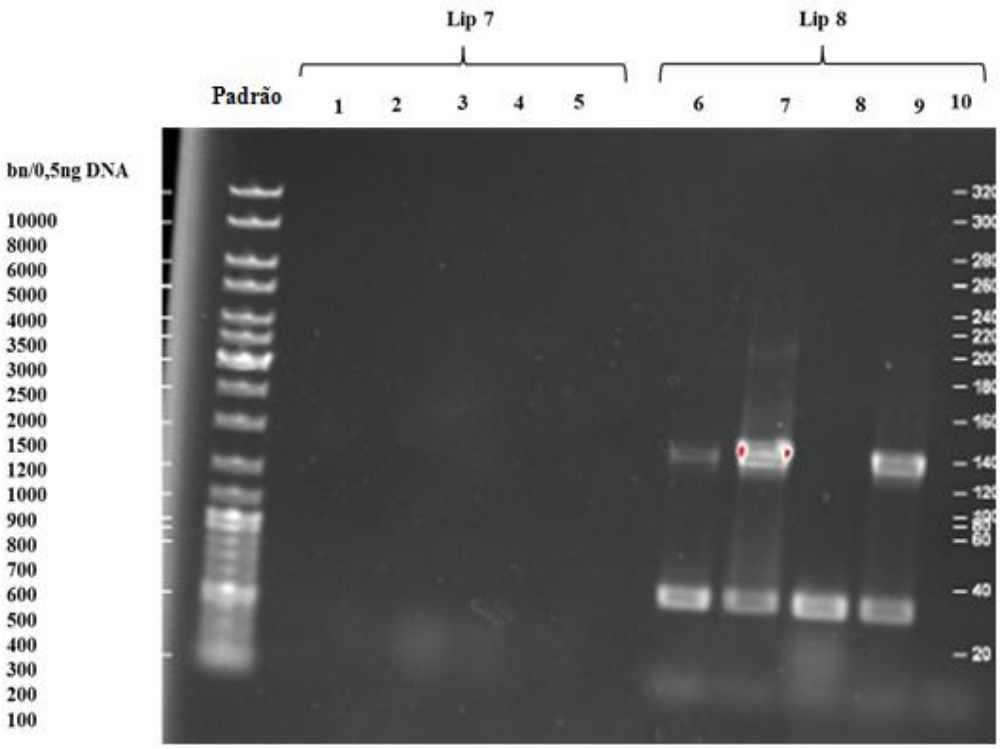


Figura 5.37. Imagem do gel de eletroforese em agarose dos produtos de PCR obtidos com a condição 2 em tampão NH_4: (1) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 7 RNAse +, (2) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 7 RNAse +, (3) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 7 RNAse -, (4) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 7 RNAse -, (5) Controle sem DNA, (6) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 8 RNAse +, (7) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse +, (8) *Yarrowia lipolytica* Po1g Lip 8 RNAse -, (9) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse -, (10) Controle sem DNA.

Segundo Fickers *et al*. (2005a), Lip 7 apresenta 2173 bp e Lip 8, 2092 bp. Na figura 5.37 pode-se observar o resultado obtido com a condição PCR 2, visualizado através de eletroforese em gel de agarose. A condição PCR 2 foi a melhor para a amplificação de Lip 8 e gerou produto de 2000 pares de bases. Não houve amplificação de Lip 7 nas condições testadas. Bons resultados de amplificação foram obtidos para Lip 8 da cepa *Y. lipolytica* 50682 usando DNA genômico tratado (reação 7) e não

tratado (reação 9) com RNAse. Para a cepa *Y. lipolytica* Po1g, os melhores resultados de amplificação foram obtidos com amostras tratadas com RNAase (reaçao 6). Novos ensaios para o estudo das condições de amplificação de Lip 7 são necessários.

Após a amplificação de Lip 8, os produtos de PCR foram purificados para serem utilizados no processo de clonagem. Os fragmentos de DNA (reacções 7 e 9) foram extraídos a partir do gel de agarose e purificados com membrana de sílica. O resultado da purificação é observado na Figura 5.38.

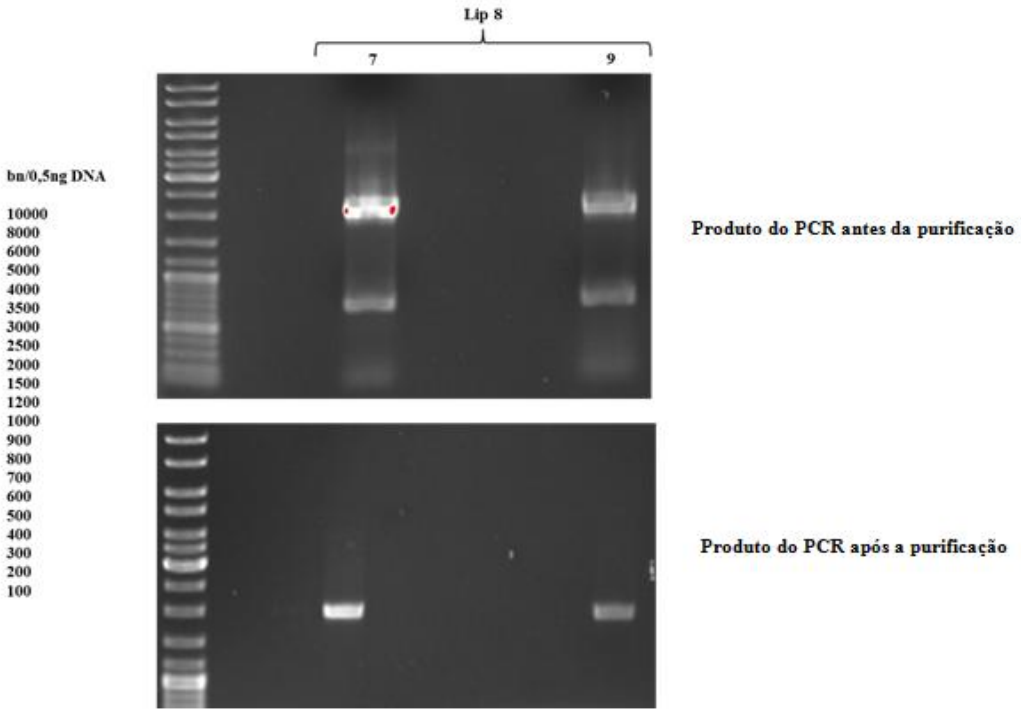


Figura 5.38. Imagem dos géis de eletroforese em agarose 0,75 % dos produtos da PCR não purificado e purificado obtidos com a condição 2 em tampão NH_4: (7) *Yarrowia lipolytica* 50682 Lip 8 RNAse + e (9) *Yarrowia lipolyt*ica 50682 Lip 8 RNAse -.

Após a purificação dos produtos da PCR de Lip 8 de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682, foi iniciado o processo de clonagem. O vetor de clonagem utilizado foi pJET1.2/blunt (Figura 5.39), fornecido sob a forma linearizada, híbrida com elevada especificidade com os produtos PCR gerados pelo uso de Taq contida no PCR *Cloning Kit*. Este vetor contém o gene de resistência à ampicilina e um gene letal eco471R, que é interrompido pela ligação do fragmento de DNA exógeno (*insert*) e que possibilita a seleção das células transformantes, uma vez que só as células com o plasmídeo recombinante conseguem multiplicar-se em meio de cultura suplementado com ampicilina *(Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit)*. Portanto, se a

transformação for bem sucedida (isto é, se o plasmídeo entra e replica-se na célula hospedeira), a célula hospedeira crescerá na presença do antibiótico. A mistura resultante da ligação foi utilizada para transformar células bacterianas competentes (*Escherichia coli* DH5α^{TM}) aptas a incorporar DNA exógeno, de acordo com o protocolo de transformação descrito no iten 4.11.6 .

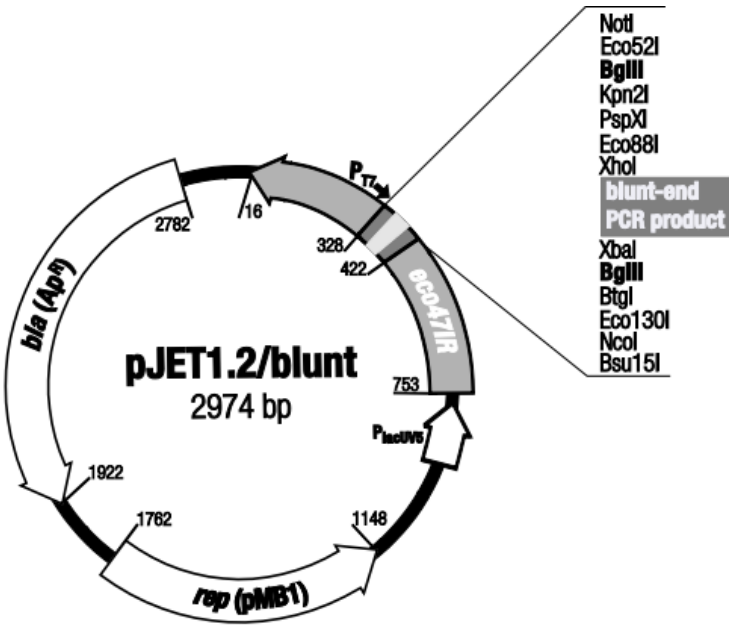


Figura 5.39. Vector de clonagem pJET1.2/blunt com a lista das endonucleases de restrição que possuem locais de reconhecimento únicos que ladeiam o local de inserção do DNA clonado (MCS) (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit).

As bactérias transformadas foram inoculadas em meio LB agar, contendo ampicilina. Porém, nenhum crescimento foi obtido nas plascas após 12 h de incubação. Portanto, a seleção dos transformantes não foi bem sucedida, provavelmente devido às células de *E. coli* não estarem mais competentes. Novo procedimento de transformação deve ser relaizado para a obtenção de *E. coli* transformadas para a extração do DNA plasmidial.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

Glicose e glicerol não favorecem a produção de lipases intracelulares.

Os dois métodos de obtenção dos extratos intracelulares (vórtex e sonicação) não causaram o rompimento celular, de forma que 93 % das células permaneceram viáveis após a sonicação. O ultrassom foi mais eficiente na extração das proteínas das células e sua ação tem efeito positivo sobre a atividade das enzimas liberadas e das enzimas que permanecem associadas às células, desde que sejam aplicações sob condições controladas. Além disso, baixas potências ultrassônicas (26 W) e curtos períodos de exposição (30 segundos e 1 minuto) favorecem a atividade nos extratos intracelulares. Portanto, desenvolveu-se um método para se obter extratos brutos de lipases intracelulares sem comprometer a atividade das mesmas.

O óleo de fritura residual utilizado no presente trabalho não apresenta substâncias que inibem o crescimento da cepa *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ou que afete a produção de lipases intracelulares.

Azeite de oliva e óleo de fritura residual foram capazes de induzir a produção de lipases intracelulares por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 na ausência de outras fontes de carbono. A atividade intracelular detectada na presença dos óleos correspondeu a 80 % de toda a atividade detectada no cultivo.

A produção de lipases intracelulares de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 foi eficiente na presença de fontes de orgânicas de nitrogênio. A melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases intracelulares foi o extrato de lêvedo ou este associado à peptona bacteriológica.

O OFR apresenta, em sua composição, ácidos graxos e triglicerídeos em quantidade suficiente para induzir a produção de lipases intracelulares (máximo de atividade lipolítica 400 U/g), porém ele se mostrou menos eficiente que o azeite de oliva (máximo de atividade lipolítica 600 U/g). Sendo o OFR um resíduo, tem-se provavelmente uma redução nos custos de produção dos extratos enzimáticos.

Os extratos brutos associado e liberado obtidos com o OFR apresentaram maior especificidade por substratos de cadeias longas. Enquanto que os extratos obtidos com o azeite de oliva apresentam maior afinidade por substratos mistos (cadeias médias e longas. Os extratos obtidos com OFR e com azeite de oliva apresentaram pH e temperatura ótimos para a hidrólise de p-nitrofenil laurato a pH 7,0 e a 37 ºC. Tem-se portanto, dois tipos de biocatalisador com potenciais aplicações distintas.

Os extratos associado e liberado produzidos com os dois indutores sofrem influência dos íons sódio e potássio em sua atividade. O íon sódio favorece a atividade associada à células, enquanto que o íon potássio favorece a atividade das enzimas que

foram liberadas pelo ultrassom. As enzimas que se mantiveram associadas às células são mais resistentes a pH ácido e alcalino.

Apesar das dificuldades de se obter a amplificação de Lip 7 e Lip 8 de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, o protocolo foi ajustado e foi padronizado para a amplificação de Lip 8.

Esse é o primeiro trabalho de obtenção de extratos de lipases intracelulares de *Y. lipolytica* produzidos com resíduo oleoso da indústria de alimentos, fornecendo conhecimento sobre a produção de lipases intracelulares e sobre o potencial de aplicação do resíduo para este fim. Sendo assim, os resultados evidenciam a importância de se aprofundar os estudos com os extratos obtidos e realizar identificação molecular das isoformas de lipases que estão sendo produzidas, fornecendo mais informação sobre consumo de substratos hidrofóbicos por esta cepa.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A produção de lipases intracelulares com óleo de fritura residual mostrou resultados interessantes de acordo com o que foi estudado. Os extratos obtidos apresentam características que precisam ser estudadas para verificar potencial de utilização. Em vista disso, existem pontos que ainda podem ser explorados:

- Identificar e quantificar as isoformas de lipases liberadas após a sonicação e que permanecem associadas à célula através de técnicas de biologia molecular;

- Avaliar da estabilidade operacional das lipases associadas à célula e verificar a possibilidade de utilização destas células em reações consecutivas;

- Verificar a possibilidade de utilização destas lipases intracelulares em reações de esterificação e transesterificação;

- Verificar a produção de lipases intracelulares por *Yarrowia lipolytica* utilizando outros resíduos com relevante composição lipídica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M. e BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Proc. Biochem.*, v. 39(11): 1347-1361, 2004.

ALCANTARA, R.; AMORES, J.; CANOIRA, L.; FIDALGO, E.; FRANCO, M.J.; NAVARRO, A. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. *Biomass and Bioenergy*, v. 18: 515-527, 2000.

AMARAL, P.F.F. Emprego de carreador de oxigênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

AMARAL, P.F.F. Produção de Lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

AMARAL, P.F.F.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; COELHO, M.A.Z.; COUTINHO, J.A.P. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*, v. 23(12): 867-877, 2006.

AMARAL, P. F. F., DE ALMEIDA, A. P. R., PEIXOTO, T., ROCHA-LEAO, M. H. M., COUTINHO, J. A., & COELHO, M. A. Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(3), 339-344, 2007.

AMORIM, A.L.D.S. Biodiesel a partir de óleo alimentar usado: estudo de catalisadores. Dissertaçãode Mestrado. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Universidade de Aveiro, 2009.

ANDREISHCHEVA, E.N.; SOARES, M.I.M.; ZVYAGIL'SKAYA, R.A. Energy metabolism of *Candida* (*Yarrowia*) *lipolytica* yeast under nonstress and salinity stress conditions. *Russian J. of Plant Physiol.*, v. 44 (5): 568-574, 1997.

ANDUALEMA, B. e GESSESSE, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications. *Review. Biotechnology*, v. 11: 100-118, 2012.

ARAÚJO, C. D. M., DE ANDRADE, C. C., E SILVA, E. D. S., & DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 27, 445-452, 2013.

BALASUNDARAM, B.; & HARRISON, STL. Disruption of Baker's yeast by hydrodynamic cavitation: process variables and their influence on selective release. *Biotechnol. Bioeng.*, 94(2): 303-311, 2006.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDAC, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17: 157–165, 2002.

BARTERI, M., DIOCIAIUTI, M., PALA, A., & ROTELLA, S.. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. Biophysical chemistry, 111(1), 35-42, 2004.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 19: 219-237, 1997.

BIGEY, F.; TUERY, K.; BOUGARD, D.; NICAUD, J.-M.; MOULIN, G. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast*, 20: 233–248, 2003.

BORDES, F.; BARBE, S.; ESCALIER, P.; MOUREY, L.; ANDRÉ, I.; MARTY, A.; TRANIER, S. Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical journal*, v. 99(7): 2225-2234, 2010.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26 (1): 73–81, 2002.

BOSKOU, D. 9 Olive oil. Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses, 244, 2011.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília/DF, 23 set. 2005.

BRIGIDA, A. I. S., AMARAL, P. F., GONÇALVES, L. R., & COELHO, M. A. Z. Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. In Proceedings of the European Congress of Chemical Engineering 6,(ECCE'07) (Vol. 2), 2007.

BRIGIDA, A.I.S. Imobilização de lípases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte. para aplicações industriais". Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

BRÍGIDA, A. I., AMARAL, P. F., COELHO, M. A., & GONCALVES, L. R. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an

industrial biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 101, 148-158, 2014.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. *Bioresource Technology*, v. 91: 77–84, 2004.

CARVALHO, P.D.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.D.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R.; MACEDO, G.A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim. Nova*, 28(4): 614-621, 2005.

CASTELLANELLI, C.A. Estudo da viabilidade de produção do biodiesel, obtido através de óleo de fritura usado, na cidade de Santa Maria-RS. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2008.

CELLA, R.; REGITANO-D'ARCE, M.; SPOTO, M. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Ciênc. Tecnol. Aliment*., 22(2): 111-116, 2002.

CIRIGLIANO, M.C. e CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4):747-750, 1984.

COELHO, M.A.Z. e SALGADO, A.M. *Tecnologia enzimática*. Editora EPUB, 2008.

CORZO, G. e REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technol., v. 70: 173-180, 1999.

COSTA, V. E. U., & AMORIM, H. D.. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. Química Nova, 22(6), 863-873, 1999.

DA SILVA, R.L. Efeito do oxigênio dissolvido na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e sua ação na obtenção de carotenóides naturais. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Programade Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

DALMAU, E., MONTESINOS, J. L., LOTTI, M., & CASAS, C.. Effect of different carbon sources on lipase production by Candida rugosa. Enzyme and Microbial Technology, 26(9), 657-663, 2000.

DARVISHI, F.. Microbial biotechnology in olive oil industry. INTECH Open Access Publisher, 2012.

DE ROSA, R.M.C. Critérios de Armonização de Azeites e Alimentos. Monografia (especialização). Universidade de Brasília. Brasília, 2009.

DESFOUGÈRES, T., HADDOUCHE, R., FUDALEJ, F., NEUVÉGLISE, C., & NICAUD, J. M.. SOA genes encode proteins controlling lipase expression in response to triacylglycerol utilization in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS yeast research, 10(1), 93-103, 2010.

DEL RIO, J.L.; SERRA, P.; VALERO, F., POOH, M.; SOLA, C. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. *Biotechnologu Letters*, v. 12 (ll): 835-838, 1990.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.*, v. 45: 1–52, 1994.

DRUET, D.; ABBADI, N.E.; COMEAU, L.C. Purification and Characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 37: 745–749, 1992.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., & STRAUB, M. L.. Genome evolution in yeasts. Nature, 430(6995), 35-44, 2004.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; EADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger. Proc. Biochem.*, v. 39: 525–528, 2004.

ERICKSON, L.E. e NAKAHARA, T. Growth in cultures with 2 liquid-phases – hydrocarbon uptake and transport. *Process. Biochem*., v. 10, 1975

FABISZEWSKA, A.U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Ann. Microbiol.*, 2014.

FARRELL, A. M., FOSTER, T. J., & HOLLAND, K. T.. Molecular analysis and expression of the lipase of Staphylococcus epidermidis. Journal of general microbiology, 139(2), 267-277, 1993.

FERRATO, F.; CARRIERI, F.; SARDA, L.; VERGER, R.; A critical reevaluation of the phenomenum of interfacial activation. *Methods in Enzimology*. v. 286: 327-347, 1997.

FICKERS, P.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96: 742–749, 2004.

FICKERS, P., FUDALEJ, F., LE DALL, M. T., CASAREGOLA, S., GAILLARDIN, C., THONART, P., & NICAUD, J. M.. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast Yarrowia lipolytica. Fungal genetics and biology, 42(3), 264-274, 2005a.

FICKERS, P.; BENETTI, P.H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S.; NICAUD, J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, v.5(6-7):527-543, 2005b.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. The lipases from Yarrowia lipolytica: geneticas, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, v. 29: 632–644, 2011.

FLORES, C.L.; RODRÍGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev*., v. 24 (4): 507-529, 2000.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., & COELHO, M. A. Z.. Produção de biossurfactante por levedura. Quimica Nova, 31(8), 2091-2099, 2008..

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends in Biotechnology*, v. 26 (12): 668-673, 2008.

GALVAGNO, M.A.; IANNONE, L.J.; BIANCHI, J.; KRONBERG F.; ROST, E.; CARSTENS, M.R.; CERRUTTI, P. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol *Revista Argentina de Microbiología*, v. 43: 218-225, 2011.

GARCIA, C.M. Transesterificação de óleos vegetais. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 2006.

HA, S.H.; LAN, M.N.; LEE, S.H.; HWANG, S.M.; KOO, Y.M. Lipasecatalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41: 480-483, 2007.

HABA, E.; BRESCO, O.; FERRERA, C.; MARQUES, A.; BUSQUETS, M.A Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26: 40–44, 2000.

HAEGLER, A.N. e MENDONÇA-HAEGLER, L.C. Yeast from marine and astuarine waters with different levels of pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol*., v. 41 (1): 173-178, 1981.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.M.; KONDO, A.; FUKUDA. H. Lipase localization in Rhizopusoryzae cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101: 328-333, 2006.

HARZEVILI, F. D.. Biotechnological Applications of the Yeast *Yarrowia Lipolytica*. Springer, 2014.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39 (2): 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (31): 4836-4844, 2010.

HASHEMIZADEH, S.N.; TAVAKOLI, O.; TABANDEH, F.; KARKHANE, A. A.; FORGHANIPOUR, Z. A Comparative Study of Immobilized-Whole Cell and Commercial Lipase as a Biocatalyst for Biodiesel Production from Soybean Oil. *World Renewable Energy Congress*. Suécia, 2011.

HERNÁNDEZ–MONTAÑEZ, Z., ARAUJO–OSORIO, J., NORIEGA–REYES, Y., CHÁVEZ–CAMARILLO, G. AND VILLA–TANACA, L. 2007. The intracelular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. *FEMS Microbiology Letters*, 268: 178–186, 2007.

HOFFMANN, I. Imobilização de lipases em filmes de amido: preparação de ésteres de aroma derivados do geraniol e resolução enzimática do (R,S)-1-feniletanol. Dissertação submetida na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2010.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010 Dados de cidades. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php.> Acessado em: 12 de maio de 2013.

IFTKAR, T.; MUBASHIR, N.; MUNAZZA, A.; IKRAM-UL-HAQ, R.M.I. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: A kinetic study. *Food Technol. Biotechnol*, v.46:402-412, 2008.

ISMAIL, S.A.S.; DEAK, T.; ABD EL-RAHMAN, H.A.; YASSIEN, M.A.M.; BEUCHAT, L.R. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 64 (1-2): 13-19, 2001.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 53: 315-351, 1999.

JAEGER, K.E. e REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*., v. 16: 396-403, 1998.

JERMSUNTIEA, W.; AKI, T.; TOYOURA, R.; IWASHITA, K.; KAWAMOTO, S.; ONO, K. Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producingfungus *Mortierellaalliacea*. *New Biotechnology*, v. 28 (2):158-164, 2011.

JIANG B.Z.; SONG, H.; GUPTAD, N.; MAA, L., WUC, Z. Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris. Protein Expression and Purification*, v. 56 (1): 35–39, 2007.

JORGE, N.; SOARES B.B.P.; LUNARDI, V.M.; MALACRIDA, C.R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Quim. Nova*, v. 28 (6): 947-951, 2005.

JUNIOR, M.A.S. Análise das características físico-químicas, organolépticas e recicláveis dos óleos e gorduras residuais e seu gerenciamento no Brasil. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Salvador, BA, Brasil, 2011.

KAMILAH, H.; TSUGE, T.; YANG, T.A.; SUDESH, K. Waste cooking oil as substrate for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): Turning waste into a value-added product. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 9 (1): 51-59, 2013.

KAMOUN, J., SCHUÉ, M., MESSAOUD, W., BAIGNOL, J., POINT, V., MATEOS-DIAZ, E. & ALOULOU, A.. Biochemical characterization of *Yarrowia lipolytica* LIP8, a secreted lipase with a cleavable C-terminal region.Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids,1851(2), 129-140, 2015.

KAPTUROWSKA, A.U.; STOLARZEWICZ, I.A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIAŁECKA-FLORJANCZYK, E. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19: 186–191, 2012.

KOHLWEIN, S.D. & PALTAUF, F. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, 792: 310-317, 1983.

KUMARI, A. e GUPTA, R. Extracellular expression and characterizationof thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, v.34:1733-1739, 2012.

KUMARI, A., VERMA, V. V., & GUPTA, R. Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(11), 3103-3111, 2012.

LÉGIER, V. e LOUIS C. Continuous synthesis of esters by cell-bound fungal lipases in an organic solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37 (6): 732-736. 1992.

LEPAGE, G. e ROY, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, v. 27 (1): 114-120, 1986.

LI, C.Y.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19: 25–31, 2004.

IIDA, Y., TUZIUTI, T., YASUI, K., KOZUKA, T., & TOWATA, A. Protein release from yeast cells as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. Ultrasonics sonochemistry, 15(6), 995-1000, 2008.

LIU, W.; PAN, X.; JIA, B.; ZHAO, H.; XU, L.; LIU, Y.; YAN, Y. Surface display of active lipases Lip7 and Lip8from *Yarrowia lipolytica* on *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol*., v. 88: 885–891, 2010.

LIU, D., ZENG, X. A., SUN, D. W., & HAN, Z.. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 18, 132-137, 2013.

LONG, K.; GHAZAL, H.M.; ARIFF, A.; BUCKE, C. Acidolysis of several vegetable oils by mycelium-bound lipase of *Aspergillus flavus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74 (9): 1121-1128, 1997.

MAKRI, A.; FAKAS, S. AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technol.*, 101: 2351-2358, 2010.

MANOEL, E.A.; PAIS, K.C.; FLORES, M.C.; MIRANDA, L.S.M.; COELHO, M.A.Z.; SIMAS, A.B.C.; FREIRE, D.M.G.; SOUZA, R. Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic*, v. 87:139–143, 2012.

MARCHETTI, J.M. e ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production Renewable and Sustainable. *Energy*, v. 11: 1300-1311, 2007.

MATSUMOTO, T.; FUKUDA, H.; UEDA, M.; TANAKA, A.; KONDO, A. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68 (9): 4517–4522, 2002.

MATSUMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; KAIEDA, M.H.; UEDA, M.; FUKUDA, A.; KONDO, A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of Rhizopusoryzae lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., v.57: 515–520, 2001.

MAUGARD, T., REJASSE, B., & LEGOY, M. D.. Synthesis of Water-Soluble Retinol Derivatives by Enzymatic Method. Biotechnology progress, 18(3), 424-428, 2002.

MAURÌCIO, S.S.S. Departamento de Ambiente e Ordenamento. A Produção de Biodiesel a partir de Óleos Alimentares Usados. Dissertação submetida na Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2008.

MAWSON, R., GAMAGE, M., TEREFE, N. S., & KNOERZER, K.. Ultrasound in enzyme activation and inactivation. In Ultrasound technologies for food and bioprocessing (pp. 369-404). Springer New York, 2011.

MEDEIROS, F. O. D., ALVES, F. G., LISBOA, C. R., MARTINS, D. D. S., BURKERT, C. A. V., & KALIL, S. J.. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. Química Nova, 31(2), 2008.

MENDONÇA, M.A. Efeito do Binômio Tempo/Temperatura sobre a Fração Lipídica de Óleos Vegetais Submetidos a Processos de Fritura. Dissertação submetida na Universidade de Brasília, Brasil, 2008.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; 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*, v. 32 (2): 213-234, 2011.

MLADENOSKA, I. & DIMITROVSKI, A. Microbial Production of Lipases on Media Containing Vegetable Oil Waste: Process Development. *Chem. Eng. Trans.*, 34: 103-108, 2013.

MOFTAH, O.A.S.; GRBAVČIĆ, S.Ž.; MOFTAH, W.A.S.; LUKOVIĆ, N.D.; PRODANOVIĆ, O.L.; JAKOVETIĆ, S.M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.D. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. *J. Serb. Chem. Soc.* v. 77: 1–20, 2013.

MONTEIRO, C.B.; SCORALICK, R.R.; SIMÕES, D.C.; BRÍGIDA, A.I.S.; GONÇALVES, L.R.B.; COELHO, M.A.Z. Otimização da funcionalização de suportes lignocelulósicos com 3-glioxidopropil trimetóxi-silano. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2010.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 59: 25-37, 1996.

MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 1998.

MULLER, S.; SANDAL, T.; KAMP-HANSEN, P.; DALBOGE, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorph*a, *Kluyveromyces lacti*s, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytic*a. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytic*a. *Yeast*, v. 14: 1267-1283, 1998.

NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89: 1947–1962, 2011.

NAKASHIMA, T.; KYOTANI, S.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Cell aggregation as a trigger for enhancement of intracellular lipase production by a *Rhizopus* species. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70 (2): 85-89, 1999.

NICAUD, J-M.; FABRE, E.; GAILLARDIN, C. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, v.16: 253-260, 1989.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D.; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica. FEMS Yeast Research*, v. 2 (3): 371-379, 2002.

NOVOTNÝ, Č., DOLEŽALOVÁ, L., MUSIL, P., & NOVÁK, M.. The production of lipases by some Candida and Yarrowia yeasts. Journal of basic microbiology, 28(4), 221-227, 1988.

OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 105 (2): 361-363, 1980.

OLIVEIRA, B.S. Eficiência de uma lipase na transesterificação de óleo alimentar usado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Departamento de Ambiente e Ordenamento. 2012.

OLIVEIRA, L.G. e MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 32 (3): 742-756, 2009.

OTA, Y.; GOMI, K.; KATO, S.; SUGIURA, T.; MINODA, Y. Purification and some properties of cell-bond lipase from *Saccharomycopsis lipolytica. Agr. Biol. Chem.*, v. 46, 1982.

OTA, Y.; NAKAMIYA, T.; YAMADA, K. Lipase from *Candida paralipolytica. Agr. Biol. Chem.*, v. 34: 1368-1374, 1970.

PALMER, T., & BONNER, P. L. Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry. Elsevier, 2007.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues. *Curr. Microbiol.*, 46: 124-130, 2003.

PAQUES, F.W. e MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quimica Nova*, v. 29(1): 93-99, 2006.

PEDRO, C. R. L. Ação de ultra-som em leveduras no processo de fermentação etanólica, 2008.

PEREIRA, A.M. Produção de Sabões Líquidos com Aroma e Esfoliante a partir de Óleos Usados da cantina da FEUP. Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal. 2008.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*", Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V., ROCHA-LEÃO, M. H. M., & SANT'ANNA JR, G. L. A stable lipase from *Candida lipolytica*. In Biotechnology for Fuels and Chemicals (pp. 73-85). Humana Press, 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.; SANT'ANNA, G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.*, v. 22 (1): 71-75, 2000.

PÉREZ-CAMPOS, F.M. e DOMINGUES, A. Factors Affecting the Morphogenetic Switch in *Yarrowia lipolytica*. *Cur. Microbiol.*, v. 43: 429–433, 2001.

Pham-HOANG, B. N., ROMERO-GUIDO, C., PHAN-THI, H., & WACHÉ, Y.. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. Applied microbiology and biotechnology, 97(15), 6635-6645, 2013.

PIGNÈDE, G., WANG, H., FUDALEJ, F., GAILLARDIN, C., SEMAN, M., & NICAUD, J. M.. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in Yarrowia lipolytica. Journal of bacteriology, 182(10), 2802-2810, 2000.

PIERCE, J.S. Institute of Brewing: analysis committee measurement of yeast viability. *J. Inst. Brew*, v. 76: 442-443, 1970.

PINTO, J.M. Proposta de localização de uma unidade de tratamento de óleo e gordura residual de fritura na cidade do Natal/RN para produção de biodiesel. Dissertação submetida ao Corpo Docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2009.

POUDEROYEN, G.V.; THORSTEN, E.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. *J. Mol. Biol*., v. 309: 215-226, 2001.

PROGRAMA DE GESTÃO AMBIENTAL – PGA. Sabão feito com óleo de cozinha: uma forma de diminuir o efeito estufa e a contaminação das águas. 2012. Disponível em: http://pga.pgr.mpf.gov.br/praticas-sustentaveis/ sabao. Acesso em 15.03.2015.

QIN, H. E., Yan, X. U., Yun, T. E. N. G., & Dong, W. A. N. G.. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from Rhizopus chinensis. Chinese Journal of Catalysis, 29(1), 41-46, 2008.

REDA, S.Y. e CARNEIRO, P.I.B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. *Revista Analytica*, v. 27 (2): 60-67, 2007.

REIS, M. F. P., ELLWANGER, R. M., & FLECK, E. Destinação de óleos de fritura. 2007. In IN: 24º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITáRIA E AMBIENTAL, 2007.

RIBEIRO, B.D.; De 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 Researche*, 2011.

RYWIŃSKA, A.; WITKOWSKA, D.; JUSZCZYK, P.; RYMOWICZ, W.;. KITA, A. Waste Frying Oil as Substrate for Lipase Production by *Geotrichum candidum* Strains. *Polish. J. of Environ. Stud.*, v. 17 (6): 925-931, 2008.

SÁ-PEREIRA, P.; DUARTE, J.C.; FERRARA, M.A.; DE LACERDA, P.S.B.; ALVES, F.C. Biocatálise: Estratégias de Inovação e Criação de Mercados. *En:* Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Editor: Interciências. Rio de Janeiro, Brasil, pp: 431-462, 2008.

SABESP. Programa de Reciclagem de Óleo de Fritura (PROL), 2008. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=82> e http://site.sabesp.com.br/

uploads/file/asabesp_doctos/programa_reciclagem_oleo_completo.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2013.

SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; ABDULKARIMA, M.I.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour. Conserv. Recy.*, 58: 36–44, 2012.

SALUM, T.F.C. Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* lteb11 para a síntese de ésteres etílicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

SAMI, M., IKEDA, M., & YABUUCHI, S.. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. Journal of fermentation and bioengineering, 78(3), 212-216, 1994.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial Lipases as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. *Research Journal of Microbiology*, v. 6: 1-24, 2011.

SANTOS, R.R. Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro. Instituto de Tecnologia. 2012.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19: 627-662, 2001.

SHARMA, S., & KANWAR, S. S.. Organic solvent tolerant lipases and applications. The Scientific World Journal, 2014.

SHUHONG Y.; GUANGQING M.; WANG J.; WAN H.; REN X.; ZHANG Y. Solid state culture for immobilization of *Bacillus marinus* cells bound intracelluar lipase within biomass support particles. *In Educational and Network Technology* (ICENT), *International Conference*, p.327-329), 2010.

SILVA, G.S.; BRUNO, L.M.; DE CASTRO, H.F. Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular. XVII Simpósio Internacional de Bioprocessos. Natal, RN, 2009.

SILVA, R. & GIOIELLI, L.A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. *Rev. Brasil. Ciências Farmac.*, 42 (2): 223-235, 2006.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, 30: 180-185, 1992

SUGIURA, T.; OTA, Y.; MINODA, Y. Effects of Fatty Acids, Lipase Activator, Phospholipids and Related Substances on the Lipase Production by *Candida paralipolytica*. Agr. Biol. Chem., 39(9): 1689-1694, 1975.

SZABO, R. Dimorphism in *Yarrowia lipolytica*: filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiol*., v. 44 (1): 19-24, 1999.

SZCZ¢-ESNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; PIOTROWICZ-WASIAK, M.; RZYSKA, M.; BINKOWSKA, N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two Mucor strains. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39: 1214–1222, 2006.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Proc. Biochem*., v. 39: 459-465, 2003.

TANAMATI, A.A.C.; GODOY, H.T.; COTTICA, S.M.; OLIVEIRA, C.C.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Parâmetros físico-químicos e quantificação de ácidos graxos cis-trans no óleo de soja e mandioca palito, submetido à fritura descontínua. *Acta Scientiarum, Technology*, v. 32 (4): 427-434, 2010.

TENG, Y. & XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technol*., 99: 3900–3907, 2008.

THEVENIEAU, F., BEOPOULOS, A., DESFOUGERES, T., SABIROVA, J., ALBERTIN, K., ZINJARDE, S., & NICAUD, J. M.. Uptake and assimilation of hydrophobic substrates by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (pp. 1513-1527). Springer Berlin Heidelberg, 2010.

THUREN, T. A model for the molecular mechanism of interfacial activation of phospholipase A2 supporting the substrate theory. *FEBS Lett*., v. 229: 95–99, 1988.

TREICHEL, H., DE OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M., & OLIVEIRA, J. V.. A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology, 3(2), 182-196, 2010.

TSUGAWA, R.; NAKASE, T.; KOYABASHI, T.; YAMASHITA, K.; OKUMURA, S. Fermentation of n-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts. *Agr. Biol. Chem.*, v. 33: 929-938, 1969.

VENTURA, M. M.; De FREITAS, S.M.; FREIRE, A.P. Catálise Enzimática: Alguns Destaques na Evolução da Enzimologia. *En:* Enzimas em Biotecnologia:

Produção, Aplicações e Mercado. Editor: Interciências. Rio de Janeiro, Brasil, pp: 431-462, 2008.

WANDERLEY, M. D., NEVES, E., & DE ANDRADE, C. J.. Aspecto da produção industrial de enzimas. Rev. Citino (Hestia), 1(1), 30-36, 2011.

WANG, D.; XU, H.; TENG, Y. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. *Bioprocess Biosyst. Eng*., v. 30: 147–155, 2007

WANG, D.; YAN, X.; TIANYU, S. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal*, v. 41 (1): 30-37, 2008.

WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microrganisms; cultural conditions and someproperties of crude enzyme. *Agr. Biol. Chem.*, v. 41: 1353-1358, 1977.

ZAREVÚCKA, M. Olive Oil as Inductor of Microbial Lipase. *En:* Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Editor: Boskou, D. Shanghai, China. Dísponivel em: http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/olive-oilas- inductor-of-microbial-lipase. 2012.

ZHAO, H.; ZHENG, L.; WANG, X.; LIU, Y.; XU, L.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of new lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.*, v. 33: 2445–2452, 2011

ZINJARDE, S.S. e PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42:6. 2002.

ZUCATTO, L. C., WELLE, I., & SILVA, T. N. D. Cadeia reversa do óleo de cozinha: coordenação, estrutura e aspectos relacionais. RAE-Revista de Administração de Empresas, 53(5), 442-453, 2013.