

PRODUÇÃO DE LIPASE INTRACELULAR POR *Yarrowia lipolytica* UTILIZANDO ÓLEO DE FRITURA RESIDUAL COMO INDUTOR

P. M. B. NUNES¹, P. F. F. AMARAL¹, M. H. M. ROCHA-LEÃO¹ e A. I. S. BRÍGIDA²

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

² Embrapa Agroindústria de Alimentos

E-mail para contato: patymbotelho@yahoo.com.br

RESUMO – Foi avaliado o efeito de diferentes indutores no cultivo de *Y. lipolytica* para a produção de lipases intracelulares. A levedura foi cultivada na presença de dois indutores: azeite de oliva e óleo de fritura residual. Foram obtidos extratos de frações extracelular, intracelular e de *debris* celular através da extração da enzima com ultrassom e, em seguida, os perfis proteicos de cada fração foram obtidos através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). De acordo com a observação dos géis, os dois indutores geraram extratos com bandas mais intensas próximas a 30 kDa e 40 kDa, que indicam a provável presença de diferentes isoformas de lipases nos extratos com frações intracelular e ligada à célula. No extrato da fração intracelular do óleo de fritura também foram visualizadas bandas próximas a 60 kDa que sugerem a presença de lipases.

1. INTRODUÇÃO

Lipases 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. A principal fonte de obtenção de lipases é a partir de microrganismos alguns deles apresentam, além da fração extracelular, frações de lipase que permanecem ligadas à célula (Ota *et al.*, 1982). 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 colza, 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 (Rywińska *et al.*, 2008).

Y. lipolytica tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de secretar diversos metabólitos em grande quantidade, inclusive lipases. Muitos trabalhos com esta levedura utilizam meio contendo óleo de oliva como indutor, e sabe-se que a lipase é produzida no início do cultivo, mas se acumula na parede celular 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, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da localização de lipases em *Yarrowia lipolytica* utilizando dois indutores: azeite de oliva e óleo de fritura residual.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

A levedura empregada é a cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682). As células são 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-agar 2%. Após incubação a 28°C por 48 horas na estufa, as culturas foram refrigeradas a 4°C.

2.2 Materiais

Os componentes dos meios de cultivo utilizados são: peptona bacteriológica e extrato de lêvedo (Oxoid - Hampshire, UK), glicose P.A. (Vetec - RJ, Brasil), agar-agar (Vetec - RJ, Brasil), azeite de oliva (Gallo®, acidez 0,5%), óleo de fritura residual e antifoam 204.

2.3 Condições de Cultivo

O inóculo foi obtido através da inoculação das células, em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL, os quais são incubados em agitador rotatório a 28°C, 160 rpm de agitação por 48 h. Após este período, as células são centrifugadas a 1258 g por 5 minutos e transferidas para obter-se a concentração inicial de massa seca de células de 1,0 mg/mL. A produção de lipases foi realizada utilizando meios contendo peptona, 6,4 g/L; extrato de lêvedo, 10 g/L; antifoam 204, 1 g/L e a presença de um dos dois indutores escolhidos na concentração de 10 g/L: azeite de oliva (Meio OO) ou óleo de fritura residual (Meio OF). Estes experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 500 mL de meio de cultivo, incubados em um agitador rotatório (shaker Tecnal TE – 420) a 250 rpm, 28°C por 24 horas.

2.4 Obtenção das Frações

Foram separados 20 mL do cultivo, os quais foram centrifugados a 4 °C, 4630 g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado a -4°C. A seguir, as células foram lavadas com água destilada e tampão MOPS pH 7,0 e centrifugadas nas mesmas condições. Ao final da lavagem, as células foram resuspendidas em 20 mL de tampão MOPS e levadas ao sonicador Ultrasonic Cleaner e, em banho de gelo, submetidas a 2 ciclos de extração, com potência de 30 W, por 9 minutos. O extrato obtido foi centrifugado a 4°C, 4630 g por 5 minutos. Desta forma, obteve-se o sobrenadante (lipase intracelular) e o sedimento foi resuspendido em 20 mL de tampão MOPS pH 7,0, correspondendo à fração de lipase ligada à célula (*debri* celular). As frações obtidas foram congeladas e liofilizadas.

2.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a obtenção das diferentes frações de enzima, as amostras para a eletroforese foram resuspendidas 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 submetida a fervura por cinco minutos para posterior aplicação em gel. Os géis de 10 % de SDS-poliacrilamida com 0,75 mm de espessura são 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas recentes do genoma de *Y. lipolytica* relatam que esta levedura produz cerca de 25 supostas isoformas de lipases (Kumari & Gupta, 2012) e estas isoformas têm sido identificadas e distribuídas nas frações intracelular, ligada e extracelular. Ota *et al.*, 1982 caracterizou duas lipases ligadas à parede celular de *Y. lipolytica*, Lip1 (39 kDa) e Lip 2 (44 kDa). As lipases Lip2 (38 kDa), Lip 7, Lip 8, Lip 9, Lip 11 (51 kDa) e Lip 12 (48 kDa) são extracelulares (Fickers *et al.*, 2005; Kumari & Gupta, 2012). Brígida (2010) identificou a produção de uma lipase de 66 kDa por esta cepa.

Conforme mostra a Figura 1, é possível observar o aumento de intensidade das bandas próximas a 40 kDa no extrato intracelular obtidos em azeite de oliva e óleo de fritura. Na Figura 2 é possível observar com mais clareza as bandas nas frações intracelular e ligada. No gel com extratos obtidos com azeite de oliva bandas próximas a 40 e 30 kDa foram observados nas frações intracelular e ligada. No gel com frações induzidas com óleo de fritura residual observa-se as bandas referentes a 60, 40 e 30 kDa concentradas no extrato intracelular.

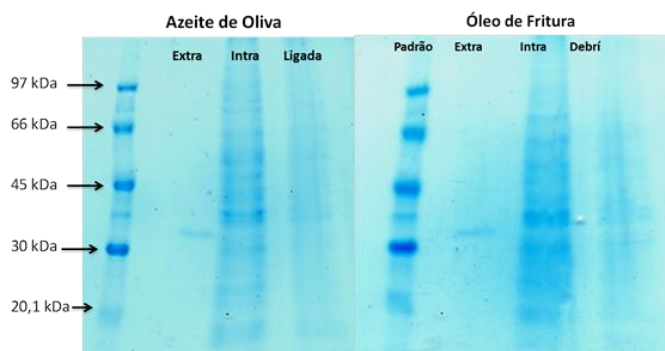


Figura 1. Eletroforese de extratos das diferentes frações enzimáticas obtidos em 24h de cultivo de *Y. lipolytica*, na presença de azeite de oliva e óleo de fritura residual, revelada com *Coomassie*.

Estes resultados mostram que há várias bandas de proteínas nas frações presentes na célula de *Y. lipolytica* que apresentam massa molecular próximas das relatadas na literatura para as lipases desta levedura. É possível que cada fração obtida contenha em conjunto de isoformas de lipases, com diferentes massas moleculares.

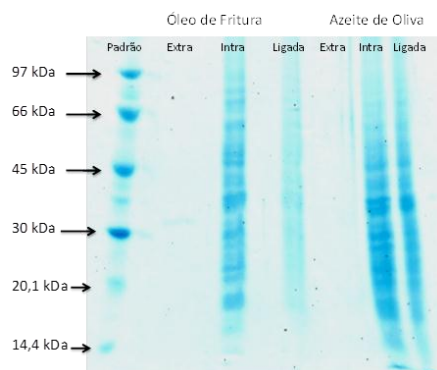


Figura 2. Eletroforese de extratos das diferentes frações enzimáticas obtidos em 24 h de cultivo de *Y. lipolytica*, na presença de azeite de oliva e óleo de fritura residual, revelada com Coomassie.

4. CONCLUSÃO

Tanto o azeite de oliva, quanto o óleo de fritura residual foram eficientes na indução da produção de lipases intracelulares. Em 24 h de cultivo as lipases produzidas por *Y. lipolytica* nas condições de cultivo estavam em sua maioria localizadas intracelularmente e no *debr*i celular. Apesar do extrato enzimático intracelular proveniente da indução com o azeite ter mostrado bandas tanto na fração ligada, quanto na fração intracelular, o óleo de fritura residual apresentou elevado potencial para ser utilizado para a produção de lipases intracelulares por *Y. lipolytica*. A sua utilização para a produção de lipases pode contribuir para a diminuição dos custos relacionados com a produção e, além disso, traz o benefício da reutilização deste rejeito industrial e comercial.

5. REFERÊNCIAS

- BRIGIDA, A. I. S. Imobilização de lípases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais; Tese de Doutorado, Escola de Química- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010.
- DA SILVA, R. L. Efeito do oxigênio dissolvido na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e sua ação na obtenção de carotenóides naturais. Dissertação, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2012.
- FICKERS, P., FUDALEJ, F., NICAUD, J., DESTAIN, J. E THONART, P. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*; *Journal of Appl. Microb.*, v. 115, p. 379–386, 2005.
- HABA, E., BRESKOA, O., FERRERA, C., MARQUE´SA, A., BUSQUETS, M., MANRESAA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate; *Enz. and Microbial Technol.*, v. 26, p. 40–44, 2000.
- KUMARI, A. & GUPTA, R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases LIP8, LIP14 and LIP18 from *Yarrowia lipolytica*; *Biotechnol. Lett.*, v.34, p.1733–1739, 2012.



**XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
X SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**

30 de julho-02 de agosto de 2013
Foz de Iguaçu, PR, Brasil



- 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.
- 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, n.12, p.2885-2893, 1982.
- PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*; Tese (Doutorado em Ciências), IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- 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, n. 6, p. 925-931, 2008.