

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Análise do Efeito de vários Compostos sobre a Atividade da Lipase de *Yarrowia lipolytica* produzida por Fermentação no Estado Sólido utilizando o Farelo de Soja como Matéria-Prima

Carlos Eduardo C. de Souza¹, Bernardo D. Ribeiro² e Maria Alice Z. Coelho²

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Química
Caixa Postal 21941-909 Rio de Janeiro – RJ - E-mail: cae_cecs@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química
Caixa Postal 21941-909 Rio de Janeiro – RJ

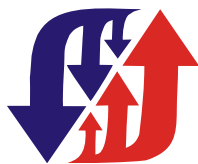
RESUMO

A análise do efeito de diversos compostos como íons metálicos, solventes orgânicos, PMSF e EDTA sobre a atividade da lipase de Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682 foi realizada para caracterizar e avaliar a ação desse biocatalisador produzido por meio da fermentação no estado sólido em farelo de soja. O biocatalisador apresentou ligeira melhora da atividade na presença de 1mM de cloreto de cálcio e 100mM de cloreto de sódio e não foi inibido completamente por nenhum dos íons metálicos testados, PMSF e EDTA. Em contato com solventes orgânicos apresentou ligeira ou nenhuma melhora de atividade quando utilizado álcoois hidrofílicos, no entanto, álcoois hidrofóbicos causaram redução da atividade. O n-hexano foi capaz de aumentar a atividade lipolítica, enquanto que o glicerol não a alterou.

Palavras-chave: Lipase, *Yarrowia lipolytica*, Fermentação no estado sólido

INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol esteracilhidrolases E.C.3.1.1.3) são biocatalisadores bastante estudados dentro da biotecnologia e utilizados em diversas aplicações industriais, principalmente as de origem microbiana. Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações éster de tri- di- e monoglicerídeos de ácidos graxos de cadeias longas, gerando ácidos graxos e glicerol. No entanto, quando presente em um ambiente com baixa quantidade de água, como por exemplo solventes orgânicos, são capazes de realizar reações reversas de síntese como a esterificação (Fickers *et al.*, 2011; Dhake *et al.*, 2013). Catalisadores enzimáticos como as lipases costumam possuir custos elevados, logo a utilização de matérias-primas menos onerosas como resíduos e co-produtos agroindustriais para a sua produção por fermentação no estado sólido é uma alternativa interessante para a redução de seu custo (Thomas *et al.*, 2013). O entendimento do funcionamento dessas biomoléculas por meio de fatores que influenciam positivamente ou negativamente sua atividade é importante como parte da sua caracterização bioquímica, assim como, para questões de aplicabilidade. Visto isso, o presente trabalho realizou o estudo dos efeitos de diferentes íons metálicos, solventes orgânicos, de um agente quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e um inibidor de serina hidrólises Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF) na atividade da lipase de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 5062 produzida por fermentação no estado sólido utilizando farelo de soja como mataria-prima.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Fermentação no estado sólido

Foi utilizado neste trabalho a cepa de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 isolada do estuário da baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil por Haegler e Mendonça-Haegler (1981). O meio de fermentação utilizado foi o farelo de soja obtido a partir da prensagem dos grãos e posterior tratamento com n-hexano para extração do óleo. A umidade do meio foi ajustada para 55% (m/m) e 1,5% de óleo de soja foi utilizado como suplementação. Os biorreatores foram incubados em estufas durante 14 horas com temperatura controlada a 28°C sob umidade aproximada de 99%, de forma a manter a umidade do meio constante.

Obtenção do biocatalisador enzimático

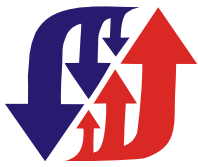
Ao final da fermentação o farelo de soja fermentado foi em sua totalidade liofilizado por 72 horas para eliminar toda a água do sistema. Dessa maneira obteve-se o preparado enzimático sólido (PES). O PES foi utilizado nas reações para medir a atividade da lipase produzida pela *Y. lipolytica*

Determinação da atividade da lipase de *Y. lipolytica* e análise do efeito de diferentes compostos sob suas condições de atuação

A determinação da atividade lipolítica foi realizada a 37°C utilizando o método titulométrico de neutralização de acordo com Freire *et al.*, 1997. Com o intuito de analisar o efeitos de alguns compostos químicos da atividade da lipase de *Y. lipolytica* presente no PES foram adicionados ao meio reacional sais metálicos (CaCl_2 , NaCl , MnCl_2), PMSF e EDTA em diferentes concentrações (mM). Diferentes solventes orgânicos como o metanol, etanol, propanol, butanol, álcool isoamílico, pentanol, hexano e glicerol (9% v/v) também foram testados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi verificado que os íons Ca^{2+} e Na^{2+} nas concentrações de 1mM e 100mM, respectivamente, proporcionaram ligeiro aumento da atividade lipolítica do PES. No entanto em concentrações superiores interferiram negativamente na atividade do biocatalisador (Figura 1). De acordo com a literatura o íon cálcio influencia positivamente a atividade hidrolítica da lipase, pois está envolvido na manutenção de sua estrutura conformacional, na remoção dos ácidos graxos gerados após a hidrólise dos triglicerídeos e também na sua ativação (Brígida *et al.*, 2014). O PES testado não sofreu influência do íon Mg^{2+} a uma concentração de 1 mM, porém apresentou redução da atividade quando utilizado 10 mM desse mesmo íon. De acordo com Fickers *et al.* (2011) a LIP2 de *Y. lipolytica* teve sua atividade levemente aumentada pelos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . Estes autores também abordaram o fato do agente quelante EDTA não ter interferido na atividade dessa enzima, concluindo que essa lipase não é um metaloproteína. Esse fato também foi observado no presente trabalho. Quando utilizado esse quelante na concentração de 1 mM não existiu alteração significativa da atividade lipolítica original, por outro lado, quando utilizado na concentração de 10 mM mais



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de 50% de sua atividade original foi perdida. Essa característica pode estar atribuída a mudança de pH do meio reacional, que passa a ser ácido, logo a lipase presente no PES atua com menos eficiência.

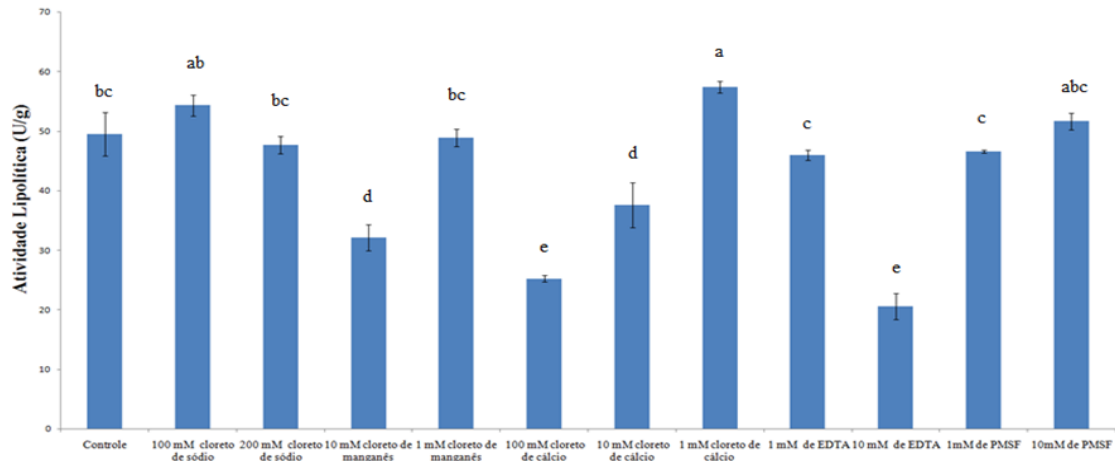


Figura 1. Atividade lipolítica do PES de farelo de soja em contato com diferentes sais e PMSF. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao PMSF, em nenhuma das concentrações utilizadas interferiu significativamente na atividade do PES. Tal fato pode ser justificado devido a dificuldade de acesso ao sítio ativo da lipase, que é protegido por um domínio hidrofóbico (tampa) (Ateşlier e Metin, 2006) ou devido a proteção das lipases pelo farelo de soja, uma vez que estas também estão adsorvidas em sua superfície.

Com relação a atividade do PES em contato com diferentes tipos de solventes (Figura 2) é possível observar que a lipase não foi afetada pelo metanol e ainda sofreu um leve aumento da atividade quando em contato com etanol. Essa característica foi descrita na literatura como incomum, uma vez que solventes polares como o metanol ($\text{LogPo/w} = -0,82$) e etanol ($\text{LogPo/w} = -0,32$) atuam se misturando com água e retirando-a do centro catalítico da enzima, diminuindo sua atividade (Sun *et al.*, 2009). A lipase de *Y. lipolytica* no entanto apresentou uma queda brusca quando os álcoois utilizados aumentaram de tamanho, sendo observada uma perda de atividade a partir do propanol.

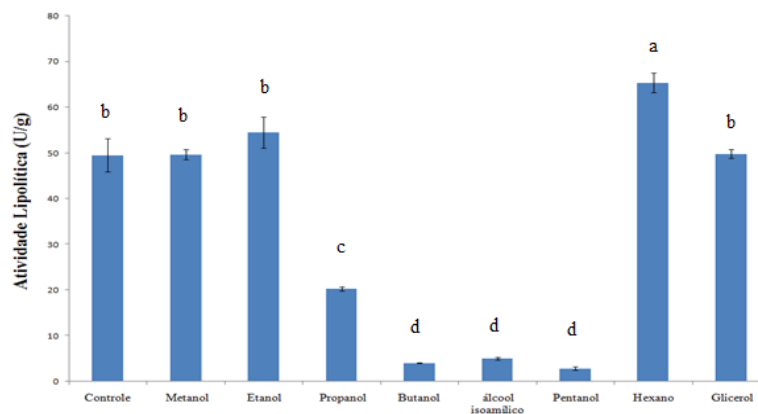
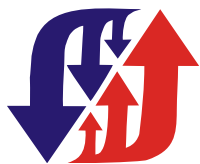


Figura 2. Atividade lipolítica do PES de farelo de soja em contato com diferentes solventes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Foi observado portanto, que o PES não perdeu atividade apenas quando em contato com os álcoois hidrofílicos ($-0,76 < \log P_o/w < 0$). Essa característica pode estar associada com as interações que esses compostos realizam com a lipase, onde a tampa que cobre o seu sítio catalítico pode estar proporcionando proteção a desidratação causada pelo metanol e etanol, mas em contra partida o aumento do tamanho do álcool pode interagir com essa molécula de forma a desestabiliza-la. É interessante observar que esse fato não necessariamente se aplica a qualquer outro solvente hidrofóbico, uma vez que o hexano ($\log P_o/w=3,9$) não afetou de maneira negativa a atividade do PES. O glicerol não interferiu na atividade da lipase estudada, o que seria um indicativo de sua aplicação para a síntese de biodiesel.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos conseguiram demonstrar características importantes da lipase de *Y. lipolytica* produzida por FES em farelo de soja com relação ao seu aspecto bioquímico e condições de atuação. Quando em contato com íons metálicos foi observado um ligeiro aumento de sua atividade em 100mM de NaCl e 1mM de CaCl₂. Nenhuma das concentrações testadas para os sais metálicos, PMSF e EDTA foi capaz de inativar totalmente a atividade lipolítica do PES. Em solventes orgânicos apresentou boa estabilidade em metanol e etanol, no entanto álcoois hidrofóbicos foram prejudiciais para a atividade. Quando avaliada em n-hexano apresentou atividade superior a do controle. Tais características apontam seu uso como um bom biocatalisador em sistemas de síntese, como pro exemplo em reações de bioconversão em meios não aquosos, característica de bastante relevância biotecnológica. O PES demonstrou ser um biocatalisador versátil para ser utilizado em diversas ocasiões. A utilização de uma matéria-prima de baixo e um processo de produção pouco oneroso é economicamente atrativo para a produção de um biocatalisador de alto valor agregado. Outras análises complementares precisam ser realizadas para entender melhor essa enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brígida, A. I., Amaral, P. F., Coelho, M. A., Gonçalves, L. R. 2014. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. Mol Catal B: Enzym 101:148-158.
- Dhake, K. P., Thakare, D. D., Bhanage, B. M. 2013. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. Flavour Frag J 28(2):1-83.
- Fickers, P., Marty, A., Nicaud, J. M. 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnol adv 29(6):632-644.
- Freire, D. M., Teles, E. M., Bon, E. P., Sant'Anna, G. L. 1997. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. Appl Biochem Biotechnol 63(1):409-421.
- Hagler, A. N., Mendonça-Hagler, L. C. 1981. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Appl Environ Microbiol 41(1):173-178.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. Biochem Eng J 81:146-161.
- Sun, S. Y., Xu, Y., Wang, D. 2009. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. Bioresour technol 100(9):2607-2612.