

Efeito do pH e da temperatura na atividade de lipases produzidas por leveduras isoladas de folhas em decomposição

Effect of pH and temperature on lipase activity produced by yeasts isolated from decomposing leaves

Graziela Barbosa Paludo
Hugo Gabriel Guedes de Oliveira
Thiago Lucas de Abreu Lima
Solange Cristina Carreiro

Universidade Federal do Tocantins – UFT – Palmas – Tocantins - Brasil

Resumo

Lipases microbianas são amplamente utilizadas em diversos setores industriais e podem ser produzidas por leveduras. O presente trabalho avaliou a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática de lipases produzidas por 5 linhagens de leveduras. As linhagens de levedura foram previamente isoladas de folhas em decomposição coletadas em 3 córregos no município de Taquaruçu, estado do Tocantins, Brasil. Para avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática das lipases foi utilizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²), variando a temperatura entre 30 °C a 50 °C e o pH entre 4 e 6. Os resultados observados demonstram que as atividades lipolíticas variaram entre 0,20 U.mL⁻¹ (TAQ 54) e 18,19 U.mL⁻¹ (TAQ 164), sendo a maior atividade observada a 40 °C e pH 5. Os resultados das análises estatísticas mostraram que para a linhagem TAQ 54 apenas a temperatura apresentou efeito significativo, enquanto que para a linhagem TAQ 164 foram significativos o coeficiente quadrático do pH e da temperatura e a interação entre pH e temperatura. Para as demais linhagens não houve influência significativa das variáveis independentes para a reação enzimática.

Palavras-chave

Atividade lipolítica.
Planejamento experimental.
Linhagens. Cerrado.

Abstract

Microbial lipases are widely used in various industrial sectors and can be produced by yeast. The present study evaluated the influence of pH and temperature on the enzymatic activity of lipases produced by 5 strains of decomposing yeasts. The yeast strains were previously defined from decomposing leaves collected in 3 streams in the Municipality of Taquaruçu, state of Tocantins, Brazil. To evaluate the effect of pH and temperature on the enzymatic activity of lipases was applicated the central composite rotational delineation (CCRD 2²), ranging the temperature between 30 °C to 50 °C and a pH between 4 and 6. The observed results suggest that lipolytic activities ranged from 0.20 U.mL⁻¹ (TAQ 54) and 18.19 U .mL⁻¹ (TAQ 164), that highest activity at 40 °C and pH 5. The results of statistical analyses showed the TAQ 54 strain only the temperature had a significant effect, while the TAQ 164 strain was significant the quadratic coefficient of pH and temperature and interaction of pH and temperature. For other strains there was not significant influence of the independent variables on enzymatic reaction.

Keywords

Lipolytic activity. Experimental design. Leaves, savanna.

1. Introdução

As leveduras podem ser encontradas naturalmente em fontes com grande disponibilidade de matéria orgânica, e são uma alternativa na produção de enzimas e outros compostos de interesse industrial, sendo utilizadas por diversos setores comerciais como na produção de alimentos, biocombustíveis, entre outros. O sucesso do uso de leveduras no setor industrial está relacionado à habilidade de se adaptarem e resistirem a condições adversas, à facilidade na manipulação genética e ao rápido desenvolvimento da cultura (Mattanovich et al. 2014, Żymańczyk-Duda et al., 2017).

Uma das enzimas produzidas por leveduras temos a lipase, que são consideradas biocatalisadores eficientes e com propriedades que as diferem das lipases produzidas por outros organismos, apresentando alta especificidade e seletividade, características catalíticas estáveis e altos rendimentos, o que possibilita a ocorrência das reações em condições brandas e facilidade de produção em larga escala (Almeida et al., 2018, Sales et al., 2017).

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases E.C. 3.1.1.3) são classificadas como hidrolises e apresentam função de catalisar as reações de hidrólise total ou parcial de trigliceróis (TAG) em diacilgliceróis (DAG) e monogliceróis (MAG) liberando ácidos graxos livres e glicerol em uma interface óleo-água. São responsáveis por catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação de lipídios, atuando sobre as ligações ésteres dessas moléculas (Barriuso et al., 2016).

As lipases são bastante requeridas para utilização em diversos segmentos industriais devido a suas múltiplas aplicações na indústria de detergente, na produção de biocombustíveis e uso em hidrólise de óleos e gorduras ou como biossensores em tratamento de efluentes, comumente aplicadas como uma mistura heterogênea livre. Quando destinadas a indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos são requeridas nas formas purificada e imobilizada (Almeida et al. 2018, Hanco et al., 2018, Torrelo et al., 2015, Paulová et al., 2013, Tortora et al., 2012).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo definir a melhor faixa de pH e temperatura para a atividade lipolítica de linhagens de leveduras isoladas de folhas em decomposição.

2. Material e métodos

Linhagens de leveduras e obtenção do inóculo

Foram utilizadas 5 linhagens lipolíticas, pertencentes à Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins, previamente isoladas de folhas em decomposição coletadas em 3 córregos no município de Taquaruçu, estado do Tocantins: Ribeirão Taquaruçu (TAQ), Córrego Taquaruçu (BIO) e Ribeirão Água Suja (ABRT). Todas as linhagens estão preservadas a -80 °C e foram reativadas em placas contendo ágar Sabouraud (20 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona e 18 g.L⁻¹ de ágar e 0,02 g.L⁻¹ de cloranfenicol) a 28 °C (±1 °C) por 48 horas.

A biomassa utilizada como inóculo foi obtida a partir da incubação do cultivo da levedura em caldo Gymp (20 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄) por 16 horas a 28°C (±1 °C) sem agitação em frascos Erlenmeyer de 125

mL, sendo que 10 mL desse crescimento foram utilizados para inocular os meios para produção de lipase.

Produção de lipase em cultivo submerso

As linhagens lipolíticas foram inoculadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido composto por 5,0 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de NaCl₂ e 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂ e suplementado com óleo de oliva (20,0 g.L⁻¹) para a indução da lipase. O meio foi esterilizado durante 30 min a 120 °C, e o óleo de oliva, foi esterilizado separadamente por calor seco (180 °C durante 60 min) e assepticamente adicionado ao meio antes da inoculação de acordo com a metodologia de (Bussamara et al., 2010). a 3800 rpm por 1 h em centrífuga refrigerada e o sobrenadante (extrato enzimático bruto – EEB) utilizado para dosagem das atividades enzimáticas.

Medida da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada espectrofotometricamente utilizando p-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato. O pNPP foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluído a 0,5 mM.L⁻¹ com tampão McIlvaine em diferentes valores de pH de acordo com o planejamento experimental proposto e suplementado com 5 g.L⁻¹ de Triton X-100.

A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm (coeficiente de extinção molar para p-nitrofenol (pNP): 1,8 x 10⁷ mol.L⁻¹ cm⁻¹) de acordo com a metodologia de (Almeida, 2012). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de pNP por minuto por mL. A curva de calibração foi preparada utilizando-se p-nitrofenol como padrão.

Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

Para avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das lipases foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²) com 11 ensaios, sendo 4 pontos axiais, 4 fatoriais e 3 repetições no ponto central (Rodrigues e lemma, 2014).

O efeito da temperatura e do pH sobre a atividade das lipases foi determinado através da reação nas temperaturas entre 30 °C a 50 °C, e o pH entre 4 e 6 apresentados na (Tabela 1). Os efeitos foram considerados significativos para $p < 0,05$. Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e com auxílio do software *Protimiza Experimental Design* foram obtidos os modelos matemáticos e os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno.

3. Resultados e discussões

Os valores de atividade lipolítica obtidos para as 5 linhagens estudadas estão apresentados na (Tabela 2) e variaram entre 0,20 U.mL⁻¹ e 18,19 U.mL⁻¹. A maior atividade lipolítica foi verificada para a linhagem TAQ 164 e foi de 18,19 U.mL⁻¹ para a temperatura de ensaio de 40 °C e pH 5. A matriz com os dados do planejamento experimental DCCR 2² (valores reais e codificados de pH e temperatura) e os resultados das atividades enzimáticas para os diferentes valores de pH e temperatura encontram-se na (Tabela 2).

Os resultados das análises estatísticas mostraram que para as linhagens BIO 45, TAQ 616 e ABRT 461 não houve influência significativa ($p < 0,05$) das variáveis independentes para a reação enzimática. Para a linhagem TAQ 54 apenas o coeficiente linear da temperatura apresentou efeito significativo e o coeficiente de determinação (R^2) obtido foi de 36,51%, indicando que esse modelo é insuficiente para explicar o comportamento da variável resposta.

Para a linhagem TAQ 164 foram significativos o coeficiente quadrático do pH e da temperatura e a interação entre pH e temperatura com coeficiente de determinação (R^2) de 76,13%, indicando que o modelo é considerado adequado para explicar o comportamento da variável resposta.

Os coeficientes de regressão obtidos para as duas linhagens TAQ 54 e TAQ 164 estão apresentados nas (Tabelas 3 e 4), respectivamente. O modelo matemático, expresso pela equação 1, foi elaborado com os coeficientes de regressão dos parâmetros significativos para a linhagem TAQ 164. Os coeficientes de regressão estatisticamente não significativos ($p < 0,05$) foram excluídos do modelo e incorporados ao resíduo total.

$$U = 17,87 - 2,01 x_1^2 - 1,68 x_2^2 - 1,43 x_1 x_2 \quad (1)$$

Onde: U = Atividade enzimática (U.mL); x_1 = pH; x_2 = Temperatura (°C).

A análise de variância verificada para a linhagem TAQ 164 está representada na (Tabela 5). Com base no modelo obteve-se a superfície de resposta e curva de contorno que descrevem o comportamento da linhagem TAQ 164 apresentados pelas (Figuras. 1A, 1B).

É comum encontrar lipases que tem sua atividade ótima em pH ácido. Patil et al., (2011) analisando 14 tipos de lipases fúngicas (*Aspergillus carneus*, *A. niger*, *A. niger NCIM1207*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida cylindracea*, *C. rugosa*, *Fusarium solani*, *Neurospora crassa*, *Penicillium nitroaeducens*, *Pichia burtonii*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus homothallicus*, *R. oryzae*, *Thermoactinomyces sp.*) o pH ótimo apresentado variou entre pH 4,0 e 11,0, e a temperaturas entre 25 e 60 °C.

Hasan et al., (2006) usando lipase de *Candida viswanathii*, demonstraram que a enzima apresentou atividade e estabilidade em uma ampla faixa ácida de pH, especialmente da forma imobilizada, indicando uma possível aplicação desta enzima nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de aromatizantes.

Em relação à temperatura ótima também há um largo espectro de lipases atuando em várias faixas de temperatura. Os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30 a 40 °C, com exceção das lipases provenientes de fungos termófilos, que são estáveis em temperaturas superiores a 55 °C (Freire, 1996 e Maldonado, 2006). Diversas lipases produzidas por leveduras são mesófilas, apresentando baixa estabilidade térmica em temperaturas acima de 45 °C (Gupta et al., 2015, Pfluck et al., 2018).

Almeida et al., (2014) usando lipase ácida produzida por uma nova linhagem de *Candida viswanathii* utilizando resíduos da agroindústria como substrato mostrou temperatura ótima de 50 °C e pH 5.0, valores estes próximos aos encontrados para a linhagem TAQ 164 com temperatura ótima de 40 °C e pH 5.

4. Conclusões

Os resultados encontrados para a lipase da linhagem TAQ 164 indicam um potencial de utilização dessa enzima em processos biotecnológicos em indústrias transformadoras, sugerindo que a enzima poderá ser aplicada em processos que utilizem faixas de pH relativamente ácidas, como por exemplo na maturação de queijos, visando aprimorar o aroma do produto.

Agradecimentos

À Professora Dr^a Paula Benevides de Moraes pelas linhagens de leveduras utilizadas no trabalho e ao apoio financeiro da CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Referências

1. ALMEIDA, A. F. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii*. 2012. 216 pag., Tese (Doutorado em ciências biológicas) Programa de pós-graduação em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de biociências, Rio Claro – SP, 2012.
2. ALMEIDA, A. F; TERRASAN, C. R. F; TERRONE, C. C; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochemistry*, n. 65, p. 71–80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.019>.
3. ALVES, M. D; ARACRI, F. M; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal* v. 311, p. 1, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>.
4. BARRIUSO, J; VAQUERO, M. E; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*, n. 34, 2016, p. 874–885.
5. BUSSAMARA, R; FUENTEFRÍA, A. M; DE OLIVEIRA, E; BROETTO, L; SIMCIKOVA, M; VALENTE, P; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*, 2010. 101: 268-275.

6. FABISZEWSKA, A. U; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. *Ann Microbiol*, 2015, n. 65, p. 1495-1503.
7. GUPTA, R., KUMARI, A; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, v. 57 p. 40–54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.12.001>.
8. HANKO, E. K. R; DENBY, C. M; SÀNCHEZ I NOGUÉ, V; LIN, W; RAMIREZ, K. J; SINGER, C. A; BECKHAM, G. T.; KEASLING, J. D. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. *Metabolic Engineering*, 2018, n. 48, p. 52–62.
9. JESUS, M., O; THAYNAH, F; LIMA, R., RODRIGUES, A; FERRAZ, J.; SOUZA, R. C. Produção de lipase utilizando manipueira como fonte alternativa de carbono. *Scientia Plena*, 2016. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2016.054208>.
10. MATTANOVICH, D; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast technology: teaching the old dog new tricks. *Microbial Cell Factories*, v. 13, n. 34, p. 1-5, 2014.
11. MENDES, D. B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com potencial de aplicação para a produção de biodiesel por catálise enzimática. 2019. 133f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede Bionorte, Palmas – TO, 2019.
12. PAULOVÁ, L; PATÁKOVÁ, P.; BRÁNYIK, T. Advanced Fermentation Processes. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, n. August, 2013, p. 89–110.
13. PFLUCK, A. C. D; BARROS, D. P. C; FONSECA, L. P.; MELO, E. P. Stability of lipases in miniemulsion systems: Correlation between secondary structure and activity. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 114, p. 7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.03.003>.
14. RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Campinas: Cárita Editora, 2014, p. 357.
15. SALES, P. S. C; FONSECA, T. C. S; AMARAL, F. A. P. C.; SILVA, C. A. A. Production of lipase by *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 in through submerged fermentation in different culture media. *Engevista*, v. 19, 2017, n. 5, p. 1340-1351.
16. TORRELO, G; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. Catalysis Letters, v. 145, n. 1, p. 309-345, 2015.
17. ŻYMAŃCZYK-DUDA, E; BRZEZIŃSKA-RODAK, M., KLIMEK-OCHAB, M; DUDA, M.; ZERKA, A. Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology, 2017. 10.5772/intechopen.7013.

Lista de tabelas:

Tabela 1. Valores das variáveis independentes em cada nível do planejamento experimental DCCR 2².

Variáveis Independentes	Símbolo	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
pH	X	4	4,3	5	5,7	6
Temperatura (°C)	Y	30	33	40	47	50

Tabela 2. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade lipolítica (U.mL-1) para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X ₁)	°C (X ₂)	BIO 45	TAQ 54	TAQ 616	TAQ 164	ABRT 461
1	4,3 (-1)	33 (-1)	0,56	0,43	2,74	14,80	5,98
2	5,7 (+1)	33 (-1)	0,35	0,50	5,16	15,74	9,07
3	4,3 (-1)	47 (+1)	1,02	1,08	6,13	15,00	7,50
4	5,7 (+1)	47 (+1)	0,68	0,62	3,56	10,23	5,38
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,65	0,44	1,62	14,09	7,44
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,45	0,56	3,59	14,10	6,97
7	5 (0)	30 (-1,41)	2,66	0,20	3,40	15,11	10,53
8	5 (0)	50 (+1,41)	0,78	0,59	2,57	14,41	5,52
9	5 (0)	40 (0)	0,58	0,23	2,96	18,17	5,80
10	5 (0)	40 (0)	0,54	0,24	3,30	17,25	9,00
11	5 (0)	40 (0)	0,49	0,41	3,73	18,19	6,88

°C – Temperatura de atividade enzimática.

Tabela 3: Coeficientes de regressão para a produção de lipase pela linhagem TAQ 54.

Parâmetro	Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	0,48	0,06	7,68	0,0000
x ₂	0,17	0,07	2,28	0,0490

Tabela 4: Coeficientes de regressão para a produção de lipase pela linhagem TAQ 164.

Parâmetro	Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	17,87	0,76	23,64	0,0000
x ₁ ²	-2,01	0,55	-3,65	0,0082
x ₂ ²	-1,68	0,55	-3,05	0,0187
x ₁ · x ₂	-1,43	0,65	-2,18	0,0652

Tabela 5: Análise de variância no estudo do efeito do pH e da temperatura na produção de lipase pela linhagem TAQ 164.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	38,3	3	12,8	7,4	0,01395
Resíduos	12,0	7	1,7		
Falta de Ajuste	11,4	5	2,3	8,0	0,11485
Erro Puro	0,6	2	0,3		
Total	50,3	10			

Lista de figuras:

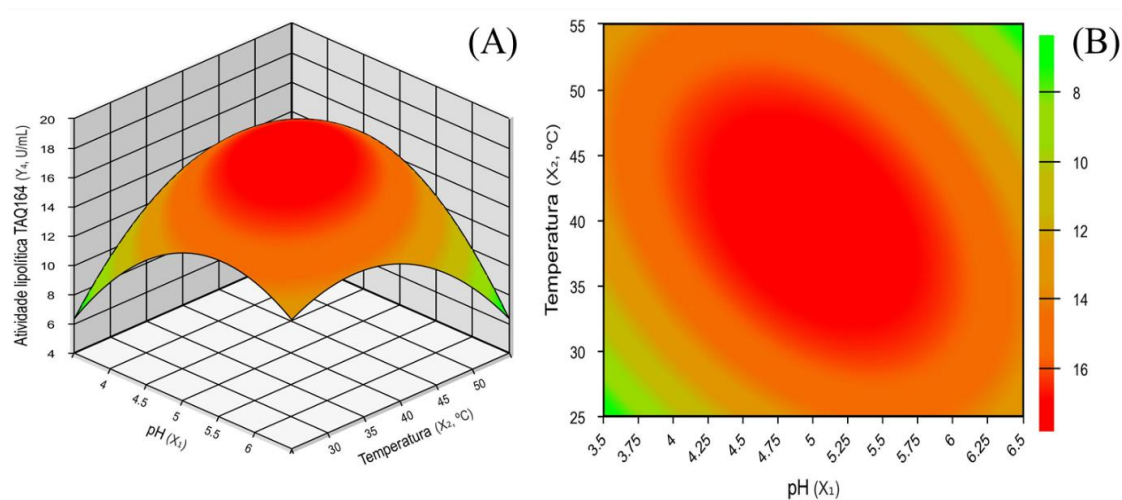


Figura 1: Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) representando a influência do pH e da temperatura na atividade lipolítica da linhagem TAQ 164.