



**MELHORAMENTO DE UM MEIO
COMPLEXO PARA AUMENTO DA
PRODUÇÃO DE LIPASE POR
Yarrowia lipolytica VISANDO BAIXO
CUSTO**

Adrian Chaves Beserra Penha

Projeto de Final de Curso

Orientador

**Prof^ª. Priscilla Filomena Fonseca Amaral
Secca, D.Sc.**

Coorientador

Adejanildo da Silva Pereira, D. Sc.

Julho de 2022

**MELHORAMENTO DE UM MEIO COMPLEXO PARA
AUMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Yarrowia
lipolytica* VISANDO BAIXO CUSTO**

Adrian Chaves Beserra Penha

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Aprovado por:

Prof. Ivaldo Itabaiana Júnior, D.Sc.

Jully Lacerda Fraga, D.Sc.

Prof. Karina Moita de Almeida, D.Sc.

Orientado por:

Prof^a. Priscilla Filomena Fonseca
Amaral Secca. D.Sc.

Adejanildo da Silva Pereira, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Julho de 2022

Penha, Adrian Chaves Beserra.

Melhoramento de um meio complexo para aumento da produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* visando baixo custo/ Adrian Chaves Beserra Penha. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2022.

x, 40p.; il.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2022.

Orientadora: Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca.

Coorientador: Adejanildo da Silva Pereira.

1. Lipase. 2. Biotecnologia. 3. Fermentação. 4. Monografia. (Graduação –UFRJ/EQ).
5. Amaral, Priscilla Filomena Fonseca, orient., Pereira, Adejanildo da Silva, coorient., I. Melhoramento de um meio complexo para aumento da produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* visando baixo custo.

Dedicatória

À minha falecida avó Letícia.

“Como todos os que vivem nestes tempos... Tudo o que temos que decidir é o que fazer como o tempo que nos é dado.”

Gandalf em O Senhor dos Anéis, J.R.R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, aos meus pais e a minha irmã por todo apoio e todo o suporte necessário.

Agradeço também aos meus avós que mesmo a distância estiveram sempre presentes e me apoiaram a cada novo passo. Principalmente à minha avó Letícia que custeou todas as minhas idas e vindas ao Fundão, mas não conseguiu ver seu neto se formar.

Gostaria de agradecer também à minha namorada por toda a paciência e companheirismo ao longo dos anos. Obrigada por estar do meu lado.

À Priscilla, melhor professora da Escola de Química e minha orientadora em todos esses anos, por me receber de braços abertos em seu laboratório e paciência de aguentar ter um aluno de IC como eu.

À Jully, que me ensinou tudo o que sei dentro do laboratório, pela amizade, companhia nos engarrafamentos da linha vermelha e, novamente, por aguentar um IC como eu.

À Alanna, que continuou o trabalho, pela amizade e discussões políticas que eu sempre discordava.

Ao Deja, bahiano carioca, pela amizade e perturbação diária.

À todos os professores da UFRJ que participaram da minha formação, uns mais que outros.

Aos amigos dentro e fora da UFRJ que me apoiaram durante esses anos.

Por fim, agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de avaliar este projeto final tão em cima da hora.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

MELHORAMENTO DE UM MEIO COMPLEXO PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Yarrowia lipolytica* VISANDO BAIXO CUSTO

Adrian Chaves Beserra Penha

Julho, 2022

Orientadores:

Prof^ª. Priscilla Filomena Fonseca Amaral Secca, D.Sc.

Adejanildo da Silva Pereira, D. Sc.

Lipases são enzimas com diversas aplicações industriais. O custo do meio de cultivo compõe uma grande parcela do preço de mercado de lipases e muitos dos componentes estão em excesso para garantir alto crescimento celular. *Yarrowia lipolytica* é uma levedura oleaginosa capaz de produzir lipases em meio YPD (do inglês: *Yeast extract*, *Peptone* e *Dextrose*, ou extrato de levedo, peptona e glicose). Contudo, este é um meio de cultivo com um custo relevante e seu melhoramento, visando maximizar produção de lipase, é de grande interesse industrial para tornar o processo viável economicamente. Nesse sentido, este trabalho propõe uma nova formulação de meio de cultivo, após observações da influência do pH, de sais de íons de metais de transição e do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) sobre a produção de lipase extracelular. Um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) em dois níveis, 2^K , com $K=3$, foi utilizado para estudar a influência da concentração de cada componente do meio (extrato de levedo, peptona e glicose) na produção da enzima de interesse. A partir dos resultados encontrados, foi obtido um modelo matemático de segunda ordem que prevê uma produção de lipase de $21725,66 \text{ U.L}^{-1}$ em meio de cultivo tamponado com tampão fosfato 100 mM pH $7,0$, contendo $0,27 \%$ de extrato de levedo, $0,74 \%$ de peptona e $0,77 \%$ de glicose. Apesar de não ter sido obtido um extrato enzimático com a atividade enzimática prevista, obteve-se $111,37 \%$ de aumento da atividade em relação ao meio anteriormente utilizado para produção de lipase e um aumento de $24,98 \%$ na produtividade em $\text{U.R}\$^{-1}$.

ÍNDICE

Capítulo 1 – Introdução	1
Capítulo 2 – Objetivos	3
2.1 – Objetivo geral	3
2.2 – Objetivos específicos	3
Capítulo 3 – Revisão bibliográfica	4
3.1 – Meio de cultivo	4
3.1.1 – Macronutrientes	4
3.2 – Condições de cultivo	5
3.3 – Lipases	8
3.3.1 – Conceito	8
3.3.2 – Aplicações	10
3.3.3 – Frações de lipase em uma célula microbiana	12
3.4 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
3.4.1 – Características	13
3.4.2 – Lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i>	15
3.4.1 – Meio de cultivo para produção de lipase por <i>Yarrowia lipolytica</i>	17
Capítulo 4 – Materiais e métodos	19
4.1 – Preservação e armazenamento da levedura	19
4.2 – Propagação e inóculo	19
4.3 – Ensaios de inibição de lipase por sais metálicos	19
4.4 – Definição do tempo de fermentação	20
4.5 – Planejamento experimental e análise estatística	20
4.6 – Validação do modelo obtido e comparação em diferentes condições	22
4.7 – Métodos analíticos	22
Capítulo 5 – Resultados e discussão	23
5.1 – Influência de sais metálicos na atividade extracelular de lipase	23
5.2 – Definição do tempo de fermentação	24
5.3 – Planejamento experimental e análise estatística	25
5.4 – Validação do modelo obtido e comparação em diferentes condições	29
Capítulo 6 – Conclusão	32
Capítulo 7 – Sugestão de trabalhos futuros	33
Capítulo 8 – Referências bibliográficas	34

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Reação direta de hidrólise completa de uma molécula de triglicerídeo em glicerol de ácido graxo. A reação reversa corresponde a reação de esterificação da molécula de glicerol. Fonte: Adaptado de Messaoudi et al. (2010). 7
- Figura 2** Esquema de representação da localização da lipase durante o cultivo de células de *Yarrowia lipolytica*. I – lipase intracelular; M – lipases associada à membrana celular; E – lipases extracelular. Fonte: adaptado de Pereira-Meirelles et al. (2000). 11
- Figura 3** Morfologia de diferentes cepas da levedura *Yarrowia lipolytica* em meio YPD (extrato de lêvedo, peptona e glicose). (a) Forma leveduriforme. (b) Formação de pseudohifas. (c) Formação de hifas. Fonte: elaboração própria. 12
- Figura 4** Estrutura cristalina de raio-X de Lip2 não glicosilada da mutante *Y. lipolytica* N113Q/N143Q. (a) A figura mostra as principais estruturas secundárias da proteína: em amarelo folha- β e roxo α -hélice. (b) A figura mostra a principais estruturas da lipase: a α -hélice colorida corresponde a tampa da lipase em seu estado fechado do aminoácido 88 até o aminoácido 105; os 3 aminoácidos coloridos correspondem ao sítio ativo, em verde, serina (aminoácido 162), em vermelho, asparagina (aminoácido 230) e em azul, a histidina (aminoácido 289). Fonte: reprodução própria no Software 3D VMD 1.9.3, adaptado de Aloulou (2013). 15
- Figura 5** Perfil de crescimento celular e pH da levedura *Y. lipolytica* durante 72 h em meio composto por 1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona e 2% de glicose. O pH é indicado por uma linha contínua e marcador ●, o crescimento por uma linha tracejada e marcador ▲ e a atividade enzimática por uma linha pontilhada cinza e marcador ■. 23
- Figura 6** Valores de pH final em cada condição de concentração dos meios de cultivo do DCCR em duplicata realizados em microplaca. (a) NBM (meio não-tamponado), (b)PBM (meio tamponado). A linha horizontal indica o pH inicial fixado em 7,0. 24
- Figura 7** Superfícies de resposta baseadas no modelo matemático de segunda ordem obtido para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* após 24 h de fermentação. (a)(b)(c) Atividade enzimática em U.L-1 é dada no eixo Z, enquanto as variáveis independentes codificadas (-1,68; -1,00; 0; 1,00; 1,68), glicose, peptona e extrato de lêvedo são dadas nos eixos X e Y. 28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Aplicações de lipases na Indústria de Biotecnologia. Fonte: adaptado de Hari Krishna & Karanth (2002).	11
Tabela 2	Matriz design do experimento com valores de concentração de glicose, peptona, extrato de lêvedo em cada ensaio. O asterisco indica os pontos centrais do experimento.	21
Tabela 3	Valores médios de atividade de lipase relativa em diferentes sais metálicos após exposição por 1 hora. Atividade do extrato enzimático sem adição de sais foi considerado 100%.	23
Tabela 4	Valores médios de atividade de lipase extracelular produzida por <i>Y. lipolytica</i> após um período de incubação de 24 h em meio NMB (não tamponado) e PBM (tamponado), nos diferentes ensaios do DCCR. Os pontos centrais estão indicados por asteriscos. Valores de k_{La} foram obtidos por literatura (Reynoso-Cereceda et al., 2016; Santos et al., 2018).	26
Tabela 5	Tabela ANOVA para o DCCR em PBM.	27
Tabela 6	Valores obtidos de atividade enzimática e atividade enzimática relativa ao meio YP*D de Amaral (2007) para produção de lipase extracelular de <i>Yarrowia lipolytica</i> após 24h de cultivo nas condições de otimização estudadas. Y, P e D são respectivamente, extrato de lêvedo (yeast extract), peptona (peptone) e glicose (dextrose).	30
Tabela 7	Custos das matérias-primas por litro de meio para produção de lipase por <i>Yarrowia lipolytica</i> após 24h de fermentação nas condições de Amaral (2007) e no obtido pelo pelo DCCR.	31

Capítulo 1. Introdução

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas muito versáteis que catalisam diversas reações químicas cujo equilíbrio depende da atividade de água no meio. Entre essas reações estão incluídas hidrólise, quando há alta atividade de água, esterificação, transesterificação e interesterificação, quando há baixa atividade de água. A hidrólise ocorre em ligações éster obtendo-se mono-, di- e tri- glicerídeos de ácidos graxos (Akil et al., 2016; Treichel et al., 2010). Há grande interesse das indústrias têxtil, farmacêutica, cosmética e de alimentos nesses biocatalisadores (Houde et al., 2004) que podem ser obtidos utilizando diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Dentre as leveduras, a espécie *Yarrowia lipolytica* tem recebido bastante atenção nos últimos anos.

Yarrowia lipolytica é uma levedura não-convencional dimórfica que possui a capacidade de consumir substratos hidrofóbicos durante o crescimento, e nesse processo, produz uma grande quantidade de lipases (Fickers et al., 2005). Muitos resíduos agroindustriais são utilizados na produção de lipase e pode-se citar o tegumento de manga (Pereira et al., 2019), óleo de fritura residual de soja (Nunes et al., 2021) e resíduos de óleo de palma (Fraga et al., 2021) como exemplos de reaproveitamento de coprodutos da indústria. Um meio complexo utilizado para a produção de lipase com essa levedura é o YPD (1% extrato de lêvedo; 2% peptona e 2% glicose) ou sua variação com menor concentração de peptona YP*D (1% extrato de lêvedo; 0,64% peptona e 2% glicose) (Amaral et al., 2007).

Este é um meio rico em nutrientes, com uma fonte de carbono simples e fontes complexas de proteína e vitaminas que garantem um elevado crescimento celular. Entretanto, glicose pode causar repressão catabólica a depender do microrganismo quando utilizada em grandes quantidades (Carlson, 1999) e os outros componentes são custosos para uma produção industrial de lipase (Rodrigues et al., 2006). Fontes de carbono podem representar entre 12 % e 28 % do custo de um meio de cultivo, enquanto fontes de nitrogênio podem representar entre 50 % e 85 % do custo de um meio de cultivo, sendo as fontes mais custosas (Freitas et al., 2021).

Dessa forma, o melhoramento do meio de cultivo YPD, assim como a proposição de diferentes estratégias para garantir alta atividade enzimática é importante para reduzir custos de produção de um produto com tantas aplicações industriais. Neste trabalho, propôs-se para atingir alta atividade enzimática: um delineamento composto central rotacional (DCCR) para

avaliar os efeitos de cada componentes no meio de cultivo; o tamponamento do meio para observar os efeitos do pH durante a produção; observação dos efeitos de sais metálicos, assim como o k_{LA} na produção de lipase.

Capítulo 2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Obter um meio de cultivo melhorado para produção de lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica* visando elevada atividade enzimática e redução de custo.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a influência de sais derivados de metais de transição sobre atividade de lipase extracelular no meio de cultivo e utilização em meio de cultivo para inibição de protease.
- Realizar um Delineamento composto central rotacional a fim de obter um modelo matemático que otimize a produção de lipase num meio composto de extrato de lêvedo, peptona e glicose.
- Avaliar a influência do pH na produção de lipase.
- Comparar o meio que maximiza o modelo matemático obtido com o meio anteriormente utilizado para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. Estudar os impactos na produção de lipase extracelular e custo de produção do meio.

Capítulo 3. Revisão bibliográfica

3.1. Meios de cultivo

3.1.1. Macronutriente

Meio de cultura é o termo utilizado para um ambiente produzido para o crescimento de células de diversos microrganismos ou células complexas como: bactérias, fungos filamentosos, leveduras, microalgas, células animais ou vegetais. A depender do organismo que será desenvolvido no meio de cultivo, ocorrerá uma mudança na demanda nutricional de macro e micronutrientes ou até mesmo de fatores físicos como temperatura, pH, oxigenação, luz e atividade de água, os principais aspectos a serem controlados durante um cultivo necessários para qualquer microrganismo (Pierik, 1997).

Carbono orgânico ou inorgânico é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento de qualquer organismo vivo. O carbono não apenas tem sua utilidade estrutural nas células, já que compõe membrana celular, parede celular, componentes de adesão, entre outros, mas como também é a principal fonte de energia. No ramo da biotecnologia, as fontes orgânicas glicídicas naturais são classificadas em três grupos: fontes sacaríneas, amiláceas ou lignocelulósicas. Além das fontes glicídicas, alguns microrganismos têm a capacidade de metabolizar substrato hidrofóbicos, como hidrocarbonetos, outros, podem utilizar fontes gasosas em metabolismos autotróficos para atingir o mesmo objetivo (Liberato et al., 2019; Nurfarahin et al., 2018).

Na esfera tradicional metabólica de eucariotos, a utilidade das fontes de carbono está na geração de energia, em forma de ATP, durante a glicólise e direta introdução da molécula orgânica resultante deste processo, geralmente Acetil-CoA (acetilcoenzima A), no Ciclo de Krebs para obtenção de esqueleto carbônico importantes para a síntese de diversos aminoácidos. Outra utilidade está na obtenção de NADH (do inglês: nicotinamide adenine dinucleotide, ou dinucleótido de nicotinamida e adenina) ou FADH₂ (do inglês, flavin adenine dinucleotide, ou dinucleótido de flavina e adenina) que funcionam como transportadores de elétrons para a fosforilação oxidativa e a obtenção de ATP (Kim & Winge, 2013; Rich, 2003).

Muitos dos microrganismos conhecidos metabolizam fontes de carbono diferentes dos tradicionais açúcares e isso afeta diretamente os produtos e subprodutos. Da literatura

de leveduras, é possível encontrar como exemplos o gênero *Komagataella* que é capaz de consumir metanol (Zhang et al., 2003) associado a produção de proteínas e ácidos orgânicos ou os gêneros *Candida* e *Yarrowia* que são capazes de consumir substratos hidrofóbicos como ácidos graxo ou óleos (Fickers, Benetti, et al., 2005; Reed & Nagodawithana, 1990) e geralmente têm o seu crescimento associados à produção de lipase. No entanto, em meio rico em açúcar o consumo da fonte de carbono está associado à produção de ácido cítrico (Papanikolaou et al., 2002). Da literatura de bactérias, é possível encontrar o gênero *Clostridium sp.* que é capaz de consumir celulose ou monóxido de carbono (Liberato et al., 2019) associado à produção de álcoois como butanol e etanol ou ácidos orgânicos e o gênero *Nocardia sp.* que é capaz de consumir hidrocarbonetos (Alvarez et al., 1996; Wink et al., 2017) e produzir glicerídeos e substâncias de alto peso molecular como ceras.

Assim como o carbono, o nitrogênio orgânico ou inorgânico é um macronutriente essencial para o crescimento e produção de diversos produtos de interesse industrial. As fontes de nitrogênio são muito variadas. Sais de amônia e aminoácidos são exemplos de fontes simples de nitrogênio, mas comumente fontes de proteínas complexas como o extrato de lêvedo e peptona são utilizados (Hakobyan et al., 2012; Helena et al., 2002).

A complexidade da fonte de nitrogênio afeta diretamente algumas características do produto do meio. A comum formação de H₂S (ácido sulfúrico) por leveduras na fermentação alcoólica de vinho, associada a aromas desagradáveis no produto final, pode ser reduzida com a adição de fontes não-complexas de nitrogênio no mosto fermentativo (Reed & Nagodawithana, 1990; Ugliano et al., 2011). Por outro lado, com a levedura *Yarrowia lipolytica*, a adição de fontes complexas de nitrogênio de origem proteica induzem a formação de produtos como proteases (Ogrydziak, 1988).

3.2. Condições de cultivo

Temperatura e pH são fatores essenciais não apenas para o crescimento microbiano como também para o melhoramento da produção de enzimas. O crescimento microbiano está diretamente relacionado a capacidade da célula de absorver nutrientes que são transformados em biomassa. No contexto de fontes complexas de nutrientes (por exemplo, triglicerídeos, proteínas de alto peso molecular, polímeros naturais de carboidratos), a absorção desses nutrientes está diretamente relacionada com a produção de enzimas como, lipases, proteases,

amilases, celulasas, dentre outros, excretadas para meio de cultivo a fim de degradar moléculas complexas em moléculas menos complexas (Najjar et al., 2011).

A atuação dessas enzimas no meio de cultivo é vinculada a temperaturas e pHs ótimos para a reação enzimática. De modo geral, temperaturas não podem ser exacerbadamente altas a fim de afetar a termoestabilidade ou causar desnaturação, mas também não pode ser tão baixa a ponto evitar que o encontro entre catalisador e substrato ocorra (Santos Aguilar & Sato, 2018; Elias et al., 2014). O meio não pode ser ácido ou alcalino demais a ponto de afetar grupos ionizados da proteína, o que afetaria diretamente a sua atividade no meio de cultivo (Frankenberger & Johanson, 1982). Ambos os fatores são responsáveis diretos pela inativação de enzimas quando em condições extremas.

Da literatura, observam-se diversos microrganismos conhecidos como extremófilos (geralmente archeas e bactérias), ou seja, capazes de atuar em condições de pH e temperatura extremas. Dentre eles, podemos citar: *Thermotoga maritime* e *Aquifex pyrophilus*, capazes de crescer em temperaturas próximas ao ponto de ebulição da água, apresentam enzimas com maior quantidade de estrutura secundária do tipo folha β em proteínas que lhes concede maior termotolerância, além disso, a alteração dos perfil de ácidos graxos que compõem a bicamada fosfolipídica da membrana é outra estratégia observada; os gêneros *Candida*, *Pseudomonas*, *Methanogenium* possuem espécies que se adaptam bem a temperaturas baixas produzindo proteínas de estrutura flexível (Gupta et al., 2014); a espécie *Ferromicrobium acidophilus* é capaz de sobreviver em pHs extremamente baixos e produz enzimas capazes de oxidar o ferro e utiliza-lo como aceptor final de hidrogênio (Johnson, 1998).

Apesar da existência na natureza, esses microrganismos são exceções, e em sua grande maioria, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, têm seu crescimento associado a temperaturas e pHs mais amenos. É por isso que a indústria de alimentos utiliza acidulantes e processos térmicos para a conservação de alimentos e inativação ou indução da bacteriostase nos microrganismos presentes.

Outro fator físico importante em processos de biotransformação é a quantidade de oxigênio dissolvido em meio, diretamente relacionada à aeração e agitação do meio. A agitação, por sua vez, também está relacionada à homogeneidade dos nutrientes. A quantidade de oxigênio disponível no meio de cultivo é importante para atender as demandas metabólicas. Enquanto alguns microrganismos são estritamente aeróbios e seu crescimento

e produção de metabólitos está associada a alta quantidade de oxigênio dissolvido, há microrganismos conhecidos como anaeróbios, geralmente bactérias, cujo efeito inibitório ou dano oxidativo ao DNA é conhecido. Diversos seres podem sobreviver em ambos os ambientes como é o caso de bactérias produtoras de ácido lático (Soleimani et al., 2017) e leveduras cervejeiras (Stewart, 2016), apesar de conseguirem sobreviver em meio sem oxigênio apenas por um número limitado de gerações.

Tratando-se de microrganismos estritamente anaeróbios, foi observado o aumento de 8OHdG (8-hydroxydeoxiguanosina), uma proteína produzida quando há dano ao DNA em células causada por estresse oxidativo em *Prevotella melaninogenica* quando exposta a oxigênio (Takeuchi et al., 2000). O crescimento de *Desulfovibrio gigas* pode ser inibido quando o meio de cultivo é adicionado de oxigênio (Fareleira et al., 2003).

Por outro lado, quando se trata de microrganismos estritamente aeróbios, o k_{LA} (coeficiente de transferência de oxigênio gás-líquido, da bolha de ar para a célula) é um importante fator na produção de metabólitos. Com a levedura *Yarrowia lipolytica*, em biorreator, é possível produzir 960 U/L de lipase quando o k_{LA} é de $8,5 \text{ h}^{-1}$ (100 rpm e vazão específica de ar de 0,8 vvm), mas aumentando-se o k_{LA} para $12,2 \text{ h}^{-1}$ (200 rpm e vazão específica de ar de 0,8 vvm) foi possível obter até 4680 U/L de atividade enzimática (Alonso et al., 2005). García-Ochoa et al. (2000) também mostram os efeitos do k_{LA} sobre a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*, assim como as relações diretas com a viscosidade do meio e taxa de consumo dos substratos (sucrose e fonte de nitrogênio). Guerreiro et al. (2019) mostraram os efeitos do k_{LA} na produção de lipídeos intracelular por *Rhodospiridium toruloides*, evidenciando como a concentração de oxigênio foi o limitante no processo.

A agitação não é um fator intuitivamente relacionado a oxigenação, mas tratando-se de biorreatores, ela afeta o tempo de residência, tamanho da bolha no meio, e conseqüentemente, a superfície de contato com o líquido (Liu et al., 2014). Em frascos agitados orbitalmente em incubadoras, os parâmetros de aeração são controlados pela velocidade de agitação, ou seja, rápida homogeneização do sistema já que não há injeção de ar. Nestes sistemas, a oxigenação ocorre por difusão na superfície de contato entre o gás e líquido (Tunac, 1989).

O aumento da agitação não pode ser uma estratégia usada indiscriminadamente para

aumentar a produtividade de metabólitos. Agitações altas são capazes de causar estresse por cisalhamento em células ou estresse oxidativo, principalmente na ausência de parede celular, como é o caso de células animais, alterando não apenas a viabilidade celular, como também se fungos filamentosos crescerão como micélios soltos ou pellets densos (Böhm et al., 2019). Queda na viabilidade celular pode ser observado na produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* (Santharam et al., 2019; Yépez Silva-Santisteban & Maugeri Filho, 2005). Garcia-Ochoa et al. (2013) mostram dano celular em células de *Xanthomonas campestris* e queda na produção de goma xantana em agitações acima de 500 rpm em biorreator. Ghobadi et al. (2017) observaram os mesmos efeitos com queda de atividade enzimático com *Aspergillus oryzae* quando se altera o impelidor em um biorreator. Os efeitos de agitações altas podem ser vistos na redução na produção de lipase quando se atinge 300 rpm ou 400 rpm no estudo de Alonso et al. (2005), mesmo que isso tenha sido resultado num aumento do k_{LA} de 26,0 h⁻¹ para 54,5 h⁻¹, posteriormente, Brígida et al. (2013) atingiu 650 rpm e 268,3 h⁻¹ sem observar os mesmos efeitos em células de *Yarrowia lipolytica*.

3.3. Lipases

3.3.1. Conceito

Lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3) são proteínas catalíticas. Lipases, especificamente, têm ação em ligações éster, como por exemplo em triacilgliceróis, entre as cadeias de ácidos graxos e a molécula de glicerol. Essas reações são conhecidas como hidrólise, quando há a quebra da molécula de glicerídeos em glicerol e ácidos graxo; esterificação, quando há a formação de glicerídeos a partir de uma molécula de glicerol e ácido graxo; transesterificação quando há a troca do radical proveniente do ácido graxo com uma molécula externa; e interesterificação quando há a troca do entre os radicais proveniente do ácido graxo entre moléculas glicerídicas. A Figura 1 ilustra a principal reação catalisada pela lipase (Oliveira, 2015).

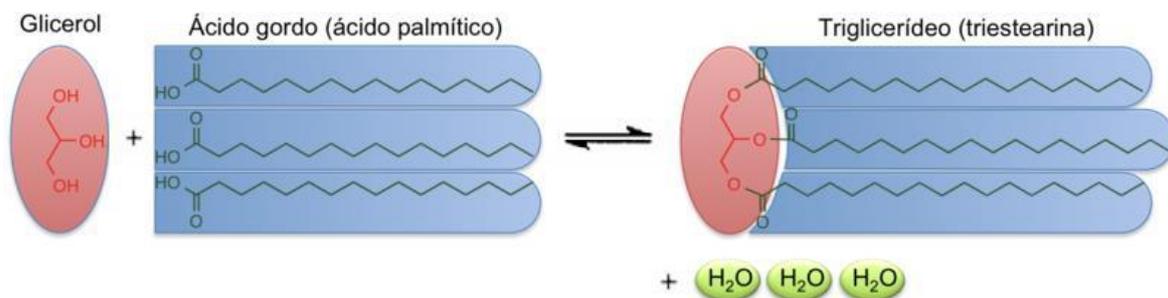


Figura 1. Reação direta de esterificação da molécula de glicerol e formação do triglicerídeo.. A reação reversa corresponde a hidrólise completa de uma molécula de triglicerídeo em glicerol e ácidos graxos. Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

A atividade de água, junto a disponibilidade de substrato, é a principal propriedade físico-química do meio reacional a direcionar a catálise para hidrólise ou esterificação. Muitas lipases tem como característica a presença de uma tampa α -hélice que protege o sítio catalítico. Esta tampa é aberta na presença de interface entre água e substratos hidrofóbicos (Hari Krishna & Karanth, 2002) favorecendo a reação de hidrólise e permanece fechada na ausência de água. Kvittingen et al. (1992) mostram que existe uma quantidade de água necessária para que a enzima mantenha sua atividade, esse mínimo de água é conhecido como camada de solvatação ou hidratação da proteína e tem um papel fundamental na integridade estrutural da enzima e na conformação da molécula que possui atividade.

Na cinética de reações por esterificação, a formação de água, inerente ao processo, tem efeito inibitório na síntese de moléculas, uma vez que o aumento da atividade de água, ao longo do tempo no sistema, tende a induzir a hidrólise (Stergiou et al., 2013) e competir com o substrato da reação no sítio catalítico. O mesmo não ocorre em reação de transesterificação e interesterificação, uma vez que não há a formação da molécula de água no sistema (Hari Krishna & Karanth, 2002).

Lipases e esterases essencialmente catalisam a mesma reação. Apesar de agirem sobre a mesma ligação éster em moléculas, esterases agem sobre ésteres carboxílico de cadeia curta e podem possuir tampa diferente da formação α -hélice observada protegendo o sítio catalítico em lipases. Ésteres agem sobre uma menor gama de substratos tendo ação reduzida sobre ligações éster de ésteres carboxílicos de cadeia longa (Hari Krishna & Karanth, 2002).

3.3.2. Aplicações

As aplicações de lipases são bastante diversas por serem enzimas que catalisam uma grande gama de substrato e por serem enzimas específicas com enantiosseletividade, regiosseletividade e quimiosseletividade. As aplicações podem ter finalidade na obtenção do produto reacional: tratando-se de hidrólises, há o interesse do ácido graxo obtido; para esterificação há interesse em glicerídeos; para transesterificação e interesterificação há o interesse na obtenção de glicerídeos modificados. Outras aplicações estão numa abordagem mais direta, em que há o interesse na remoção do substrato.

Na indústria de laticínios, lipases podem ser utilizadas na obtenção de hidrolisados de gordura de leite para a manipulação de aromas e sabores similares ao queijo. Fraga et al. (2018) e Duan et al. (2019) descrevem um processo de obtenção de gordura de leite lipolisada (LMF, *Lipolyzed milk fat*) para obtenção de aromas artificiais de queijo e utilização na indústria de alimentos. Chen et al. (2021) reportam um processo de redução de aromas não desejados no leite de cabra pela utilização de lipases que agem hidrolisando a gordura do leite seguido de uma esterificação para glicerídeos com aromas mais desejados.

Moujehed et al. (2022) descrevem um processo de tratamento de pele de ovelha para obtenção do couro e Li et al. (2020) a utilidade em pele de porco para obtenção do couro. A utilização da enzima nessa indústria é importante para a redução de poluentes nas efluentes da indústria que comumente utiliza surfactantes e solventes orgânicos para a remoção não apenas de gordura na pele de animais, mas também de pelos, queratina, albuminas e globulinas (Khambhaty, 2020).

Na mesma esfera de aplicação das enzimas para remoção de substrato, tem-se a indústria de detergentes. Abol-Fotouh et al. (2021) e Khmaissa et al. (2022) mostram uma abordagem da aplicação de lipases para incorporação em detergentes e remoção de óleo e manchas provenientes de óleos lubrificantes, batons, manteiga e chocolate. O maior desafio desta indústria está na preservação da atividade enzimática e estabilidade da enzima quando é incorporada ao detergente. Para isso deseja-se lipases com alta tolerância a variações no pH e altas temperaturas, uma vez que comumente se utiliza detergente em conjunto com água morna-quente para aumentar a solubilidade de lipídeos e atividade enzimática (Abol-Fotouh et al., 2021; Phukon et al., 2020).

As indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica utilizam ésteres, que podem ser

obtidos por rota enzimática, para se obter aromas e fragrâncias. Reações de síntese comumente utilizam enzimas em formato imobilizado visando o reaproveitamento do catalisador em reações subsequentes para reduzir custos. Oliveira et al. (2019) reportam a utilização de lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em quitosana para a síntese de metil e etil butirato sendo possível reutilizar a enzima em até sete ciclos. Bayramoglu et al. (2022) descrevem a utilização de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em cápsulas magnéticas de quitosana para a síntese de acetato de isoamila (aroma de banana). Silva Corrêa et al. (2020) estudaram a utilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* imobilizadas para a síntese de ésteres derivados dos terpenos, geraniol e citronelol. A obtenção de ésteres por esterificação enzimática tem como maior vantagem a pureza do produto. A extração direta de ésteres é muito custosa devido à baixa concentração em vegetais e a síntese química gera muito poluentes.

As reações de transesterificação e interesterificação têm objetivos similares aos citados e um resumo das aplicações de lipases na indústria está resumido na Tabela 1 (Hari Krishna & Karanth, 2002).

Tabela 1. Aplicações de lipases na Indústria de Biotecnologia. Fonte: adaptado de Hari Krishna & Karanth (2002).

Indústria	Processo	Produto e aplicação
Laticínios	○ Hidrólise	○ Hidrólise gordura de leite
Óleos naturais	○ Transesterificação de óleos para gorduras	○ Manteiga de cacau
Panificação, cervejeira e alimentícia	○ Hidrólise	○ Melhoramento de sabor e qualidade em bebidas, carne, produtos de peixe
Couro	○ Hidrólise	○ Remoção de gordura de pele de animais
Detergente	○ Hidrólise	○ Remoção de manchas de óleos e gorduras
Aroma, sabor de fragrância	○ Esterificação e transesterificação ○ Interesterificação	○ Síntese de ésteres de sabor natural ○ Lactonas macrocíclicas para perfumaria
Surfactante	○ Glicerólise de gorduras e óleos ○ Acilação de álcoois de açúcar	○ Monoacil gliceróis para surfactantes ○ Monoacil ésteres de açúcar para surfactantes

Fármacos	○ Resolução de álcoois e ésteres racêmicos	○ Fármacos quirais e inseticidas
Polímeros	○ Poliesterificação de diésteres com dióis	○ Oligômeros de alquídicos
	○ Transesterificação de monossacarídeos	○ Ésteres de acrilato

3.3.3. Frações de lipase em uma célula microbiana

Extratos enzimáticos podem ser originados de diversos locais num meio de cultivo. A centrifugação do meio de cultivo é a forma mais rápida para a obtenção desses extratos em nível laboratorial e na indústria pode ser utilizado tanto processos de centrifugação contínua quanto a filtração contínua. A obtenção unicamente deste extrato extracelular, entretanto, é uma perda de potencial biotecnológico de outras porções de lipase que podem estar associadas à membrana celular ou em suspensão no citoplasma (intracelular). A Figura 2 mostra um esquema de localização da lipase numa célula (Pereira-Meirelles et al., 2000).

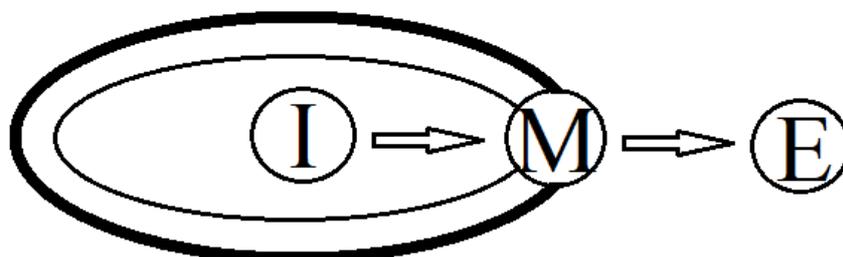


Figura 2. Esquema de representação da localização da lipase durante o cultivo de células de Yarrowia lipolytica. I – lipase intracelular; M – lipases associada à membrana celular; E – lipases extracelular. Fonte: adaptado de Pereira-Meirelles et al. (2000).

O processo de obtenção da porção intracelular de lipase é descrito por Panek et al. (1987) pela lavagem das células, seguido da ruptura da membrana e parede celular (quando existente) pela agitação com pérolas de vidro. A porção intracelular corresponde ao sobrenadante após a centrifugação, enquanto a porção associada à membrana corresponde ao precipitado. Posteriormente, algumas variações do método foram realizadas para obtenção das enzimas. Fraga et al. (2020) utilizaram o tratamento com ultrassom para rompimento e formação de microfuros na superfície da membrana e obtenção da parcela associada à membrana, enquanto Fickers et al. (2005) utilizaram apenas uma lavagem com

tampão Na/K para a remoção da mesma parcela, podendo não ser total o aproveitamento dessa lipase.

3.4. *Yarrowia lipolytica*

3.4.1. Características

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia e não-convencional, ou seja, que possui um maquinário diferente das leveduras tradicionais *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Sendo suas variantes selvagens não capazes de realizar fermentação alcoólica, ela não é utilizada na produção de bebidas alcoólicas ou na indústria de panificação. Desde sua descoberta, já foi nomeada de *Candida lipolytica* (desde sua descoberta), *Endomycopsis lipolytica* (1970), *Saccharomyces lipolytica* (1972) e finalmente *Yarrowia lipolytica* (1980).

A levedura possui o status GRAS (*Generally regarded as safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), ou seja, é segura para a utilização nas indústrias de alimentos e bebidas e farmacêutica. O título também confere ao microrganismo um atrativo para uso ambiental já que pouco ou nenhum impacto ambiental é observado de microrganismos isolados da natureza a depender da quantidade.

É uma levedura modelo de dimorfismo (Nicaud, 2012), podendo se apresentar tanto na forma leveduriforme quanto na forma de hifas e pseudohifas como mostra a Figura 3. A formação de hifas é uma característica de estresse gerado por limitações do meio de cultivo como esgotamento das fontes de nutrientes e pode ser induzida em fermentações com ácidos



Figura 3. Morfologia de diferentes cepas da levedura *Yarrowia lipolytica* em meio YPD (extrato de lêvedo, peptona e glicose). (a) Forma leveduriforme. (b) Formação de pseudohifas. (c) Formação de hifas. Fonte: elaboração própria.

graxos e fontes de nitrogênio como caseína e extrato de carne (Spencer et al., 2002).

O isolamento da *Y. lipolytica* foi historicamente realizado de meios poluídos, despejos e alimentos conhecidos como fontes de hidrocarbonetos e lipídeos: consórcio de microrganismos do estuário da Baía de Guanabara (Hagler; Mendonça-Hagler, 1981), manteiga comercial e comida congelada (Sinigaglia et al., 1994), água poluída de petróleo (Zinjarde et al., 1998) e queijos (Suzzi et al., 2001),

Essa espécie é capaz de utilizar substratos hidrofóbicos como fonte de carbono, entre eles, ácidos graxos, tri-, di- e mono- glicerídeos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. A estratégia que é utilizada pela célula para facilitar a absorção dessas fontes de nutrientes é a produção de biossurfactantes (Albuquerque et al., 2006) que agem reduzindo o a tensão superficial na interface líquido-líquido (hidrofóbico e hidrofílico). Os biossurfactantes produzidos por *Y. lipolytica* podem ser caracterizados como um complexo de lipídeo-carboidrato-proteína com alta atividade de emulsificação e estabilidade em uma ampla faixa de pH (3-9), possuindo a habilidade de formar emulsões óleo-em-água com hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos como perfluorocarbonos (Amaral et al., 2006).

Os ácidos cítrico, isocítrico e alfa-cetoglutárico que são intermediários do ciclo de Krebs, são uns dos diversos metabólitos secretados pela *Y. lipolytica*. A condição de cultivo para produção de ácido cítrico e isocítrico e sua secreção por *Y. lipolytica* é a limitação do crescimento celular pela deficiência de carbono e nitrogênio do meio de cultura (Fickers, Benetti, et al., 2005). O uso desta levedura para produção do ácido cítrico tem vantagem sobre o fungo filamentosos *Aspergillus niger* (tradicionalmente conhecido pela produção de ácido cítrico): o alto grau de conversão, aumento da produtividade e a melhora do controle do processo devido à natureza unicelular da levedura são alguns dos exemplos (Fickers, Benetti, et al., 2005). Por outro lado, a purificação da molécula é dificultada pela presença do ácido isocítrico. É estimado que sejam produzidos 736 mil toneladas de ácido cítrico por ano (Behera et al., 2021) com um aumento anual de 3-4%.

Dos aditivos da indústria alimentícia que também são produzidos pela levedura, pode-se destacar os açúcares manitol e eritritol. Ambos são derivados da oxidação da frutose-6P e o equilíbrio entre a produção desses açúcares depende altamente do estresse osmótico do meio de cultivo (da Silva et al., 2018; Yang et al., 2014). O interesse do eritritol é majoritariamente devido a seu poder adoçante, que ao contrário da sucralose, possui sabor

menos acentuado. Já o manitol, tem utilidade na indústria farmacêutica e médica como é descrito por Shawkat et al. (2012). Outros açúcares funcionais produzidos são: xilitol, trealose, isomaltulose, D-treitol, fructooligosacarídeos, galactooligosacarídeos, isomaltooligosacarídeos e eritrulose (Bilal et al., 2020),

Proteínas de microrganismos unicelulares (SCP, *single cell protein*) e óleo de microrganismos unicelulares (SCO, *single cell oil*), foram uns de seus primeiros produtos de valor a terem sua produção considerada atrativa pela indústria. A origem desse interesse estava na abundância de n-alkanos na década de 1960, utilizados como fonte de carbono para a produção de SCP e SCO. Para a produção têm-se o objetivo de obter a maior concentração celular possível em grandes biorreatores para viabilidade do processo (Barth & Gaillardin, 1996) que nunca foi atingida. Atualmente as pesquisas na área são direcionadas na alta produtividade concomitante entre SCP ou SCO e outros metabólitos da *Y. lipolytica* como lipase ou a expressão heteróloga de inulinase (Yan et al., 2018; Zhao et al., 2013).

Dos produtos enzimáticos de maior relevância, destacam-se as diversas frações de lipase.

3.4.2. Lipases de *Yarrowia lipolytica*

Das lipases de *Yarrowia lipolytica* mais estudadas, destacam-se: a Lip2, a lipase majoritariamente produzida pela levedura e que compõe a parcela extracelular com afinidade a ésteres de cadeia longa entre dezesseis e dezoito carbonos derivados de p-nitrofenil (Akil et al., 2016); a Lip7, que compõe parte da lipase de parede celular com maior afinidade a ésteres de cadeia curta-média entre quatro e oito carbonos (Fickers, Fudalej, et al., 2005); a Lip8, que também compõe parte da lipase de parede celular com maior afinidade a ésteres de cadeia média entre oito e doze carbonos (Akil et al., 2016; Fickers, Fudalej, et al., 2005).

Ota et al. (1982) descrevem um método para obtenção da parcela de lipases ligadas a parede celular (Lip7 e Lip8) pela lavagem das células com tampão fosfato 50 mM pH 7,0, mas como pode ser observado no trabalho de Nunes et al. (2014) há atividade residual nas células após a lavagem e tratamento da suspensão de células com ultrassom, indícios de que essa extração não é total. Fraga et al. (2018) mostraram que o resultado desse tratamento pode ser utilizado como biocatalisador naturalmente imobilizado e de alta atividade

catalítica.

O sítio catalítico da lipase Lip 2 de *Y. lipolytica* é semelhante ao das proteases alcalinas produzidas e é constituído de uma serina, uma histidina e uma asparagina, como mostra a Figura 4 (Aloulou et al., 2013). Na figura, é possível observar a característica tampa, observada em lipases, que fecha o sítio catalítico na ausência de substratos hidrofóbicos.

A semelhança entre o sítio catalítico das proteases alcalinas e da lipase Lip2 está na presença do aminoácido serina (Matoba et al., 1997). Alguns produtos químicos como EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e SDS (dodecil sulfato de sódio) são conhecidos por possuir atividade inibitória em enzimas, principalmente o PMSF que é utilizado como inibidor do aminoácido serina em proteases (Bessadok et al., 2017). É possível que a ação inibitória desses compostos e de sais metálicos sejam parecidas na lipase Lip2 e nas proteínas alcalinas (Ma et al., 2007). O melhoramento de um meio de cultivo pode estar no equilíbrio da utilização desses compostos no meio de cultivo, inibindo majoritariamente a protease em comparação com a parcela extracelular de lipase.

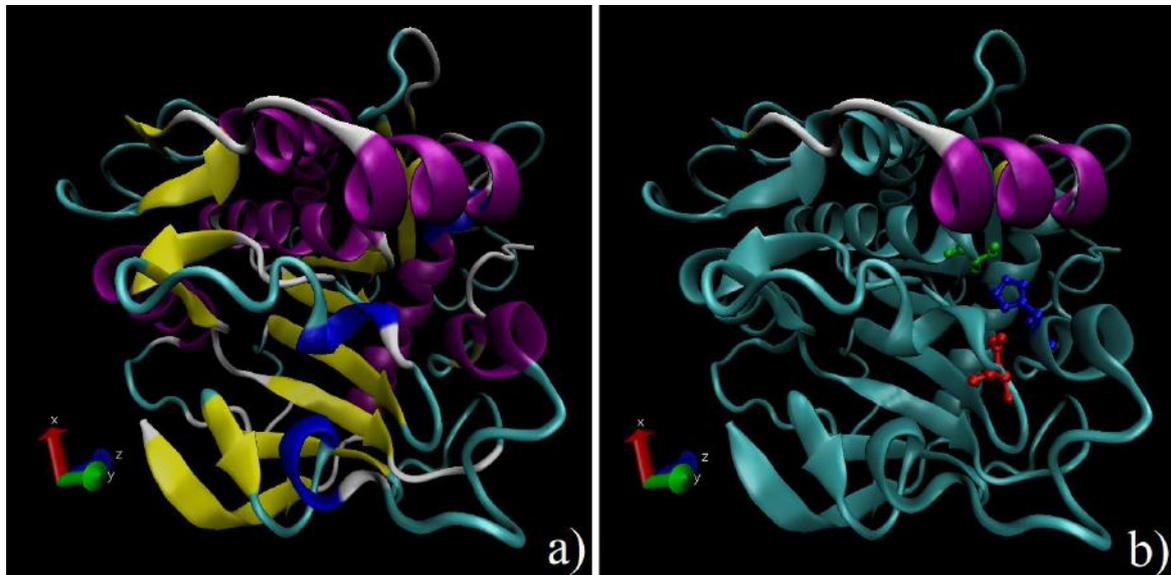


Figura 4. Estrutura cristalina de raio-X de Lip2 não glicosilada da mutante *Y. lipolytica* N113Q/N143Q. (a) A figura mostra as principais estruturas secundárias da proteína: em amarelo folha- β e roxo α -hélice. (b) A figura mostra a principais estruturas da lipase: a α -hélice colorida corresponde a tampa da lipase em seu estado fechado do aminoácido 88 até o aminoácido 105; os 3 aminoácidos coloridos correspondem ao sítio ativo, em verde, serina (aminoácido 162), em vermelho, asparagina (aminoácido 230) e em azul, a histidina (aminoácido 289). Fonte: reprodução própria no Software 3D VMD 1.9.3, adaptado de Aloulou (2013).

Por outro lado, a indução da produção de lipase parece não ser associada a um fator metabólico apenas. Hooker et al. (1997) mostraram que em *Xanthomonas maltophila* NK7 a produção de lipase está associada mais a decapagem da lipase por micelas e emulsões do que pela indução do metabolismo pela utilização de fontes de carbono glicéridicas catabolizadas pela lipase produzida. Em microrganismos como *Y. lipolytica*, o biosurfactante como produto metabólico, e a formação de micelas (Santos et al., 2021), pode ser responsável pela indução da expressão de lipase no meio extracelular sem a utilização de indutores. Isso explica a capacidade de se produzir lipase sem a adição de óleos ou glicérideos no meio de cultivo apenas com fontes simples de carbono como a glicose.

3.4.3. Meio de cultivo para produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*

Trabalhos sobre produção de lipase por *Y. lipolytica*, tratam sobre a utilização de meios complexos. Pereira-Meirelles, (1997) faz um estudo abrangente sobre a utilização de diferentes fontes de nitrogênio (orgânicas e não orgânicas) e diferentes fontes de carbono para obtenção da enzima. Neste trabalho, é observado os efeitos de fontes de nitrogênio no meio de cultivo como: extrato de lêvedo (0,1 %), peptona (0,64 %), sulfato de amônio (0,28%) e ureia (0,14 %); e fontes de carbono como: sucrose (2 %), tributirina (1 %), azeite de oliva (1 %), glicose (2%), trioleína (1 %), ácido oleico (0,96 %) e glicerol (0,1%). Foi observado que fontes de nitrogênio complexas são mais eficazes na produção de lipase, o extrato de lêvedo necessário como fonte de vitaminas e ácidos graxos e triglicérideos de cadeia longa são boas fontes de nitrogênio indutoras de lipase extracelular (Pereira-Meirelles, 1997; Santos et al., 2021).

Trabalhos mais atuais discutem sobre a utilização de coprodutos da indústria como fontes alternativas de ácidos graxo e triglicérideos de cadeia longa como fontes de carbono indutoras na produção de lipase. Pereira et al. (2019) mostram a utilização de cascas e sementes de manga como substrato durante fermentação submersa em meio suplementado unicamente com extrato de lêvedo. Nunes et al. (2021) utilizaram óleo de soja residual de fritura para produção e caracterização de lipase associada à membrana (Lip7p e Lip8p). Fraga et al. (2020 & 2021) mostraram a produção de lipases extracelular e associada à membrana utilizando óleo de palma residual de fritura e resíduos da produção do óleo de palma. Óleo de peixe residual também pode ser utilizado com indutor na produção de lipase

extracelular como mostraram Snopek et al. (2021).

O biocatalizador também pode ser produzido por fermentação em estado sólido. Sales et al. (2020 & 2021) utilizaram casca de maçã e melancia, cortiça comercial e plástico PET (politereftalato de etileno) como indutores para produção de lipase e esterase. Nas condições em que foi utilizado plástico PET também foi observado a formação de BHET (do inglês, bis(2-hydroxyethyl) terephthalate ou tereftalato de bis-hidroxietila), um produto da despolimerização do PET.

Capítulo 4. Materiais e métodos

4.1. Preservação e armazenamento da levedura

Yarrowia lipolytica IMUFRJ 50682/1, originalmente isolada da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (Hagler; Mendonça-Hagler, 1981), e modificada por sucessivas propagações em meio sólido (Silva et al., 2020) foi cultivada durante a noite em meio YPD (1% extrato de levedo, 2% peptona e 2% glicose) a 28° C e 160 rpm. Frascos criogênicos foram preparados pela adição de glicerol ao meio de cultura da levedura na proporção de 1:1 v/v. Os tubos foram estocados a -20° C e utilizados para inocular cada pré-inóculo.

4.2. Propagação e inóculo

No pré-inóculo, células da levedura cresceram por 72 h em frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio YPD a 28° C e 160 rpm. Na etapa de inóculo do meio de produção, células do pré-inóculos foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4 °C e inoculadas com uma densidade celular de 1 g de peso seco de célula L⁻¹.

4.3. Ensaio de inibição de lipase por sais metálicos

Para a obtenção do extrato enzimático com alta concentração de lipase, foi realizado um cultivo de *Y. lipolytica* em reator de bancada (New Brunswick MF-114, Sci. Inc., USA) com volume de 3,5 L de meio, agitação de 550 rpm e temperatura ambiente em meio YPOFR, composto por 1% de extrato de levedo, 2% de peptona e 0,5% de óleo de fritura residual, durante 24 h (Fraga et al., 2018). Dois mililitros de antiespumante (Antifoam – Sigma, UK) foram adicionadas ao cultivo para evitar a formação de espuma. O meio após a batelada em reator foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min e filtrado em filtros 0,22 µm para a remoção de células residuais. Para o estudo de inibição de lipase, foram adicionados sais para obtenção de extratos enzimáticos com concentração final de sal entre 1 e 5 mM, que foram mantidos em um agitador orbital a 250 rpm e 28 °C por 1 hora (adaptado de Bessadok et al., 2017).

Foram utilizados os seguintes sais em solução: sulfato ferroso (FeSO₄), sulfato de zinco (ZnSO₄), cloreto de níquel II (NiCl₂), cloreto de cobalto II (CoCl₂), cloreto de

manganês II (MnCl_2), cloreto de cúprico (CuCl_2) e cloreto férrico (FeCl_3). Após o processo, a atividade enzimática do extrato foi medida conforme descrito no item 4.3.

4.4. Definição do tempo de fermentação

O tempo de fermentação foi definido através do máximo produtividade de lipase extracelular de uma fermentação em meio YP*D, composto de 1% extrato de lêvedo, 0,64% peptona e 2% glicose (Amaral, 2007). A cinética de crescimento foi realizada em microplacas de 24 poços de 10 mL, Axygen®, com 2 mL de meio de produção a 28° C e 250 rpm. Neste teste foi avaliado o crescimento celular por densidade óptica, o pH durante as 72 h de fermentação e a atividade de lipase extracelular.

4.5. Planejamento experimental e análise estatística

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^k , com $k=3$, foi realizado para o melhoramento das concentrações dos componentes do meio de cultivo para produção da fração extracelular da lipase de *Y. lipolytica*. Glicose, extrato de lêvedo e peptona foram as variáveis independentes com concentrações descritas na Tabela 2. Cinco níveis de cada fator (-1,68; -1; 0; 1; 1,68) foram utilizados e a combinação entre eles resultou num total de 17 ensaios: 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais (Tabela 2). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio de produção e em microplacas de 24 poços de 10 mL, Axygen®, com 2 mL de meio de produção a 28° C e 250 rpm, em meio com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 (PBM, *phosphate buffered medium*) e em meio sem tampão fosfato (NBM, *non-buffered medium*). Os ensaios em microplaca foram realizados em duplicata. Foi adotado como variável de resposta a atividade de lipase extracelular (U. L^{-1}) após um período de incubação de 24 h (pico de produtividade definido no meio YP*D). O Software Statistica 10.0 foi utilizado para avaliar a melhor composição do meio para máxima produção de lipase após 24 h.

Tabela 2. Matriz design do experimento com valores de concentração de glicose, peptona, extrato de lêvedo em cada ensaio. O asterisco indica os pontos centrais do experimento.

Ensaio	Glicose (%)	Peptona (%)	Extrato de lêvedo (%)
1	0,506 (-1,00)	0,506 (-1,00)	0,3 (-1,00)
2	0,506 (-1,00)	1,994 (1,00)	1,2 (1,00)
3	1,994 (1,00)	0,506 (-1,00)	1,2 (1,00)
4	1,994 (1,00)	1,994 (1,00)	0,3 (-1,00)
5*	1,25 (0,00)	1,25 (0,00)	0,75 (0,00)
6	0,506 (-1,00)	0,506 (-1,00)	1,2 (1,00)
7	0,506 (-1,00)	1,994 (1,00)	0,3 (-1,00)
8	1,994 (1,00)	0,506 (-1,00)	0,3 (-1,00)
9	1,994 (1,00)	1,994 (1,00)	1,2 (1,00)
10*	1,25 (0,00)	1,25 (0,00)	0,75 (0,00)
11	0 (-1,68)	1,25 (0,00)	0,75 (0,00)
12	2,50 (1,68)	1,25 (0,00)	0,75 (0,00)
13	1,25 (0,00)	0 (-1,68)	0,75 (0,00)
14	1,25 (0,00)	2,50 (1,68)	0,75 (0,00)
15	1,25 (0,00)	1,25 (0,00)	0 (-1,68)
16	1,25 (0,00)	1,25 (0,00)	1,5 (1,68)
17*	1,25 (0,00)	1,25 (0,00)	0,75 (0,00)

Um modelo polinomial de segunda ordem foi proposto para avaliar a resposta verdadeira na condi o otimizada. A fun o a que se foi aproximado os dados   dada pela equa o 1:

$$U.L_{24h}^{-1} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Onde, β_0   a interse o como eixo y, β_i são coeficientes lineares, β_{ii} são coeficientes quadráticos, β_{ij} são coeficientes de intera o e variáveis codificadas são X_i e X_j (G para glicose, YE para extrato de lêvedo e P para peptona).

Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para análise estatística dos resultados. A significância de cada termo da equa o foi obtida utilizando o teste de Fisher (F-test)   5% de significância. Os termos que foram considerados insignificantes foram removidos do modelo. O ajuste do modelo aos dados foi testado através do coeficiente de determina o R^2 .

4.6. Validação do modelo obtido e comparação em diferentes condições

A validade do modelo foi confirmada através de fermentação em triplicata em microplacas de 24 poços de 10 mL, Axygen®, com 2 mL de meio de produção a 28° C e 250 rpm com a composição do meio que maximiza a equação 1. Os resultados foram comparados com o meio YP*D de Amaral (2007), utilizado para produção de lipase em biorreator composto por 1% extrato de lêvedo, 0,64% de peptona e 2% de glicose.

4.7. Métodos analíticos

A atividade de lipase extracelular foi medida pela hidrólise do *p*-nitrofenol dodecanoato e a formações de *p*-nitrofenolato durante 100 segundos a 410 nm em espectrofotômetros SpectraMax M Series Microplate Reader ou Shimadzu UV-Vis 1800. A unidade de atividade de lipase (U) foi definida como a quantidade de lipase que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto a 37° C, em tampão fosfato 50 mM pH 7.0 (Pereira-Meirelles, 1997).

O crescimento celular foi medido por turbidimetria com comprimento de onda de 570 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis 1800, utilizando o fator de conversão 0,4941 g de peso seco de células(p.s.).L⁻¹ (R² = 0,9612) obtido por curva de peso seco.

O pH foi medido com pHmetro de bancada DM-22 Digimed.

Capítulo 5. Resultados e discussão

5.1. Influência de sais metálicos na atividade extracelular de lipase

O extrato enzimático obtido pelo cultivo de *Y. lipolytica* em biorreator e em meio contendo óleo de fritura residual (YPOFR) apresentou atividade enzimática de 4907,13 U.L⁻¹. Esse extrato foi utilizado para avaliar a influência dos sais metálicos na atividade da lipase extracelular. A partir da medição da atividade de lipase na presença dos sais metálicos, foram gerados dados de atividade relativa com valores percentuais listados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de atividade de lipase relativa em diferentes sais metálicos após exposição por 1 hora. Atividade do extrato enzimático sem adição de sais foi considerado 100%.

	Atividade enzimática relativa (%)				
	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
CuCl ₂	11,07 ± 0,67	0,00	0,00	0,00	0,00
ZnSO ₄	16,92 ± 0,52	10,93 ± 0,28	8,49 ± 0,22	8,25 ± 0,19	6,73 ± 1,09
FeCl ₃	19,70 ± 0,28	9,08 ± 0,15	5,85 ± 0,24	5,92 ± 0,12	6,53 ± 0,042
FeSO ₄	15,26 ± 0,71	14,57 ± 0,18	10,12 ± 0,45	9,71 ± 0,32	7,63 ± 0,024
NiCl ₂	28,44 ± 0,53	26,36 ± 1,42	25,76 ± 0,33	18,43 ± 0,41	14,86 ± 0,12
MnCl ₂	19,50 ± 2,57	31,30 ± 0,97	29,67 ± 0,00	25,22 ± 0,00	24,93 ± 0,06
CoCl ₂	88,43 ± 2,17	76,51 ± 2,45	70,33 ± 3,61	64,55 ± 3,02	62,18 ± 0,24

Observa-se que CuCl₂ (2 mM) foi capaz de inibir a lipase completamente. Sendo assim, é o sal menos indicado para o estudo de inibição de protease e obtenção de um meio otimizado para a produção de lipase. CoCl₂ apresentou a menor inibição e teve atividade relativa de 62,5% e 88,4% nas concentrações de 5 e 1 mM, respectivamente. Outros sais nas diversas concentrações exploradas apresentaram atividades intermediárias. Através dos resultados observados, CoCl₂ é o sal com maior potencial para o estudo.

Em geral, sais de íons metálicos parecem ter um efeito inibitório maior em lipases do que em proteases pelo que pode ser observado no resultados de inibição de protease obtidos por Bessadok et al. (2017). Neste mesmo trabalho, sais com íons Mn²⁺ e Cu²⁺ tiveram um efeito ativador e estabilizador sendo obtido até 100% de aumento da atividade de

protease no extrato enzimático, enquanto os dados da Tabela 3 mostram uma redução de até 19,50 % e 11,07 %, respectivamente para sais derivados de Mn^{2+} e Cu^{2+} . Por esse motivo, a estratégia de utilização de sais metálicos para inibição da protease no meio de cultivo para obtenção de um meio otimizado para produção de lipase foi descartada no trabalho apresentado, mas a utilização do sal $CoCl_2$ no meio de cultivo foi recomendada como sugestão de trabalho futuro.

5.2. Definição do tempo de fermentação

Os perfis de crescimento celular, pH e atividade enzimática do cultivo de *Y. lipolytica* em meio YP*D são apresentados na Figura 5.

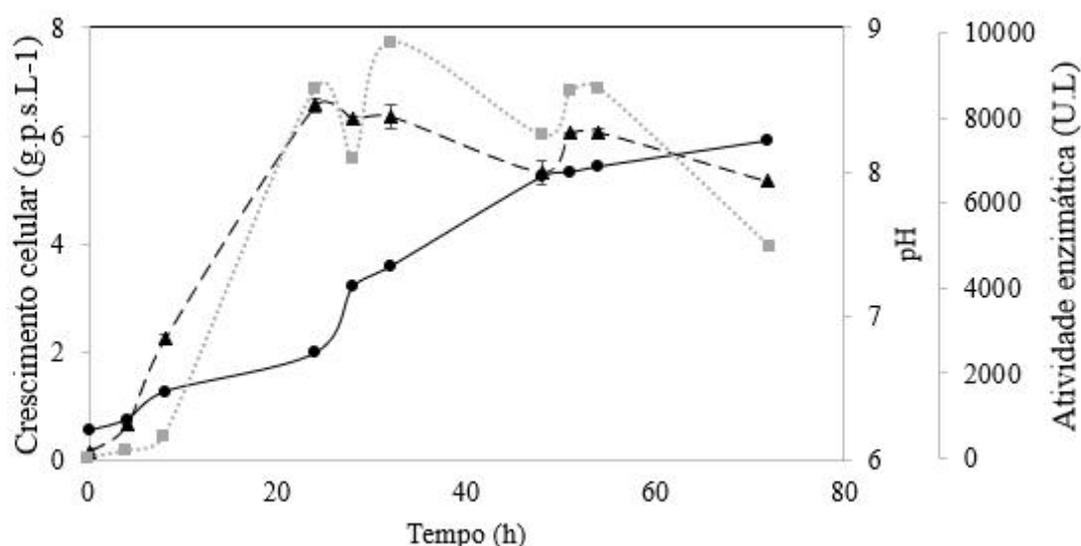


Figura 5. Perfil de crescimento celular e pH da levedura *Y. lipolytica* durante 72 h em meio composto por 1% de extrato de lêvedo, 0,64% de peptona e 2% de glicose. O pH é indicado por uma linha contínua e marcador ●, o crescimento por uma linha tracejada e marcador ▲ e a atividade enzimática por uma linha pontilhada cinza e marcador ■.

Durante a fermentação, foi possível perceber o aumento do pH do meio. Isso ocorre pela formação de amônia no meio pela metabolização de fontes de proteína, principalmente a peptona. Um dos problemas desse aumento do pH está na formação de proteases alcalinas capazes de hidrolisar também a lipase extracelular do meio. Além disso, a lipase de *Y. lipolytica* tem seu pico de atividade em pH próximo a neutralidade (Silva et al., 2020). Por tais motivos, durante o DCCR foi feita a tentativa tamponar o meio de cultivo próximo da neutralidade a fim de aumentar a produção.

O pico de atividade de lipase da fermentação coincide também com o momento em que o pH do meio se encontra próximo a neutralidade, como é observado na Figura 5. O máximo de produtividade foi de 361,83 U/L.h observado após 24 h de fermentação, sendo este definido como o momento em que as microfermentações serão encerradas durante o DCCR. Vale destacar também que apesar de o pico de produção de lipase ser encontrado após 32 h de fermentação, este não corresponde a maior produtividade (302,60 U/L.h).

5.3. Planejamento experimental e análise estatística

Nos cultivos de *Y. lipolytica* em microplaca, nas composições determinados pelo planejamento experimental DCCR, estudou-se a influência do tamponamento do meio. O valor de pH inicial de todos os meios foi fixado em 7,0 antes da esterilização por autoclavagem. O pH final de cada condição do DCCR é apresentado na Figura 6.

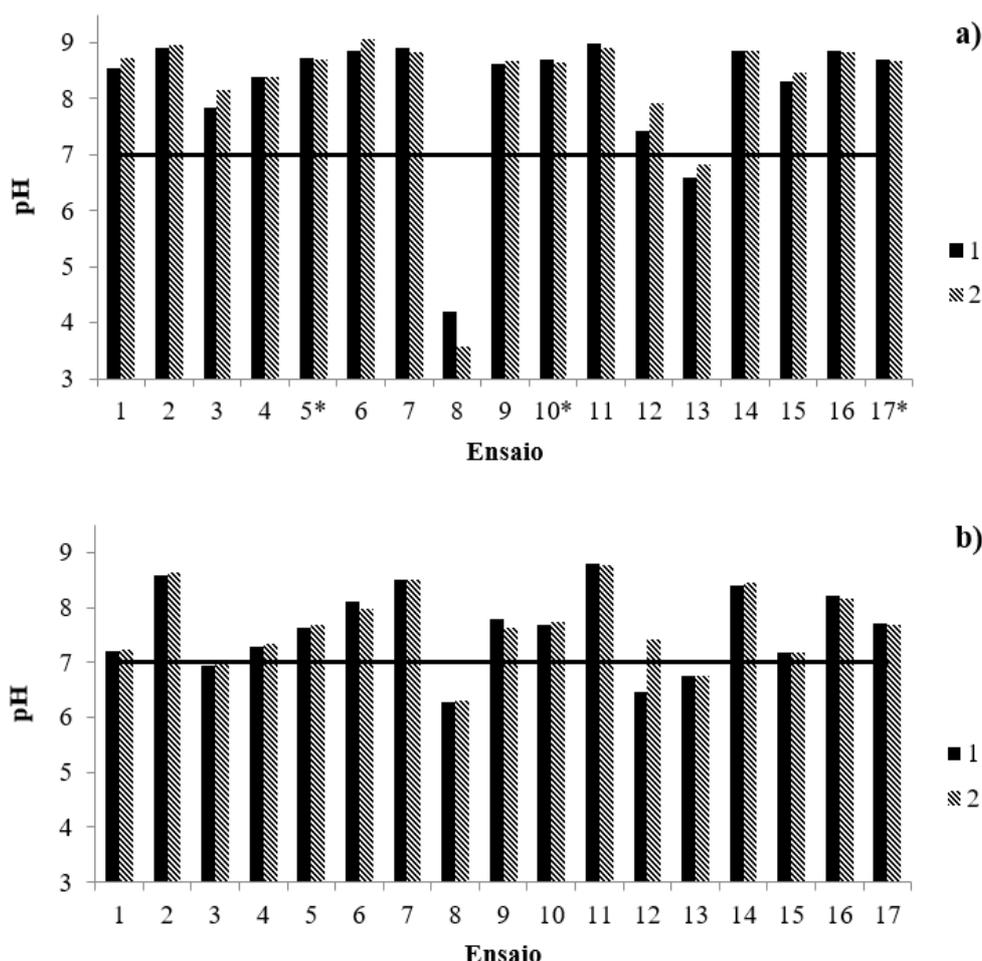


Figura 6. Valores de pH final em cada condição de concentração dos meios de cultivo do DCCR em duplicata realizados em microplaca. (a) NBM (meio não-tamponado), (b)PBM (meio tamponado). A linha horizontal indica o pH inicial fixado em 7,0.

A partir da análise do pH, foi possível perceber que, de forma geral, o pH aumenta no meio de cultivo principalmente nos ensaios em que as fontes de nitrogênio (peptona e extrato de lêvedo) são maiores. Não foi possível fixar o pH próximo a neutralidade após 24 h de fermentação, mas em meios PBM (tamponado) o pH não subiu tanto quando nos meios NBM (não-tamponados), o que pode ter afetado diretamente a atividade enzimática no meio.

A análise do planejamento experimental foi seguida apenas para o DCCR com os meios tamponados (PBM), uma vez que a atuação do tampão fosfato 100 mM pH 7,0 foi essencial para a produção de lipase, como observa-se na Tabela 4. Isso indica que as proteases alcalinas que são produzidas no meio de cultivo podem estar menos ativas quando o pH do meio é controlado em PBM. Assim, é menos provável que elas estejam agindo sobre grandes quantidades de lipase extracelular durante a fermentação.

Tabela 4. Valores médios de atividade de lipase extracelular produzida por *Y. lipolytica* após um período de incubação de 24 h em meio NMB (não tamponado) e PBM (tamponado), nos diferentes ensaios do DCCR. Os pontos centrais estão indicados por asteriscos. Valores de k_{La} foram obtidos por literatura (Reynoso-Cereceda et al., 2016; Santos et al., 2018).

Ensaio	Lipase NBM (U. L ⁻¹) em Erlenmeyer	Lipase NBM (U. L ⁻¹) em microplaca	Lipase PBM (U. L ⁻¹) em microplaca
	k_{La} (h ⁻¹)		
	≈ 60 h ⁻¹	122,9 h ⁻¹	122,9 h ⁻¹
1	0,00	4.469,41	22.941,28
2	0,81	65,66	153,97
3	4,25	5.658,69	14.383,54
4	4,56	2.276,67	28.308,77
5*	3,25	3.165,43	25.056,93
6	1,07	22,24	254,89
7	0,48	66,86	220,12
8	24,86	32,36	3.150,75
9	2,12	620,36	37.876,69
10*	2,89	2.779,48	21.173,26
11	4,14	82,63	294,58
12	1,70	4.426,16	4.284,32
13	1,75	47,23	4.506,83
14	6,65	685,23	3.192,53
15	8,65	14.380,76	13.852,81
16	9,55	177,26	4.330,14
17*	9,56	2.307,84	25.221,45

A influência do k_{LA} do sistema também foi notada. A produção de lipase em Erlenmeyer de 500 mL com 20 % de volume útil ($k_{LA} \cong 60 \text{ h}^{-1}$) foi baixa em relação ao sistema em microplaca ($k_{LA} = 122,6 \text{ h}^{-1}$). Essa diferença é esperada em processos em que se utiliza uma levedura estritamente aeróbia e o k_{LA} não é alto o suficiente para causar estresse oxidativo na célula (Alonso et al., 2005). Resultados similares da influência do k_{LA} em sistema com *Y. lipolytica* foram obtidos por (Santos et al., 2018) em meio não tamponado.

O modelo quadrático foi avaliado a partir da ANOVA (Tabela 5). Foram considerados não significativos os termos em que o valor de $p > 0,05$, sendo estes termos: Peptona linear, Extrato de lêvedo linear, e de interação entre Peptona e Extrato de lêvedo. Tais efeitos foram considerados para o modelo dentro do termo *Lack of fit* (falta de ajuste), o que conseqüentemente afetou o valor do coeficiente de determinação do modelo (R^2) causando sua redução.

Tabela 5. Tabela ANOVA para o DCCR em PBM.

	SQ	gl	MQ	F	valor de p
GL*	3.27 E+08	1	3.27 E+08	62.35	0.015662
GQ*	3.42 E+08	1	3.42 E+08	65.16	0.015002
PQ*	2.77 E+08	1	2.77 E+08	52.77	0.018429
YEQ*	1.09 E+08	1	1.09 E+08	20.67	0.045096
GL by PL*	6.38 E+08	1	6.38 E+08	121.64	0.008121
GL by YEL*	2.37 E+08	1	2.37 E+08	45.17	0.021431
Falta de ajuste	6.77 E+08	8	8.47 E+07	16.13	0.059660
Erro puro	1.05 E+07	2	5.25 E+05		
Total SQ	2.38 E+09	16			

SQ: Soma dos quadrados

gl: grau de liberdade

MS: média dos quadrados

F: valor de Fisher

*: Valores significativos estão indicador por asteriscos.

Observa-se na Tabela 5 que *valor de p* do termo Falta de ajuste (*Lack of fit*) foi não significativo. O valor de $0,059 > 0,050$ justifica, parcialmente, a significância do modelo e a adequação do modelo polinomial de segunda ordem aos valores experimentais.

O coeficiente de determinação foi utilizado como indicação da concordância entre valores experimentais e valores previsto pelo modelo polinômio de segunda ordem. Para o

R^2 são desejáveis valores próximos a 1 e para o modelo estudado, foi obtido uma R^2 de 0,7105. Esse valor indica que o modelo é capaz de explicar 71,05% da variabilidade. Tal valor baixo para o coeficiente de determinação também é um resultado do distanciamento entre os pontos centrais do DCCR, que muito afetam esse indicador.

O modelo polinomial de segunda ordem obtido com variáveis não-codificadas é mostrado na equação 2:

$$U.L_{24h}^{-1} = 23206,8 + 9791,3 G - 11017,1 G^2 - 9913,9 P^2 - 6207,4 YE^2 + 17868,3 G.P + 10888,3 G.YE \quad (2)$$

Onde, G corresponde ao termo glicose linear, G^2 à glicose quadrática, P^2 à peptona quadrática, YE^2 ao extrato de levedo quadrático, G.P à interação entre glicose e peptona e G.YE à interação entre glicose e extrato de levedo. Os valores percentuais p/p que maximizam essa função é de um meio composto por 0,77% de glicose, 0,74% de peptona e 0,27% de extrato de levedo em meio tamponado por tampão fosfato 100 mM pH 7,0, sendo previsto uma produção de 21.725,66 U.L⁻¹ de atividade de lipase extracelular.

A partir da combinação entre as variáveis independentes foram geradas três representações gráficas (superfícies de resposta) da equação 2 e são mostradas na Figura 7.

Na Figura 7.a), pode-se observar maior amplitude no resultado de atividade enzimática para variações de glicose e peptona, o que corrobora o resultado encontrado na ANOVA (Tabela 5) de que a interação entre glicose e peptona é o fator mais significativo do modelo. O mesmo pode ser observado na Figura 7.c) que indica que baixas concentrações de extrato de levedo no meio são suficientes para obtenção de alta atividade enzimática e sendo a interação entre peptona e extrato de levedo não significativa para o modelo, há menor amplitude na variável resposta à medida que se altera essas variáveis independentes. Esse resultado é esperado já que o extrato de levedo funciona majoritariamente no meio como uma fonte de vitaminas necessárias para o crescimento da levedura (Santos et al., 2021).

A alteração dos componentes do meio, comparados ao meio de Amaral (2007) foi de 73,0 % de redução para o extrato de levedo, 15,6 % de aumento para a peptona e 63,0 % de redução para a glicose.

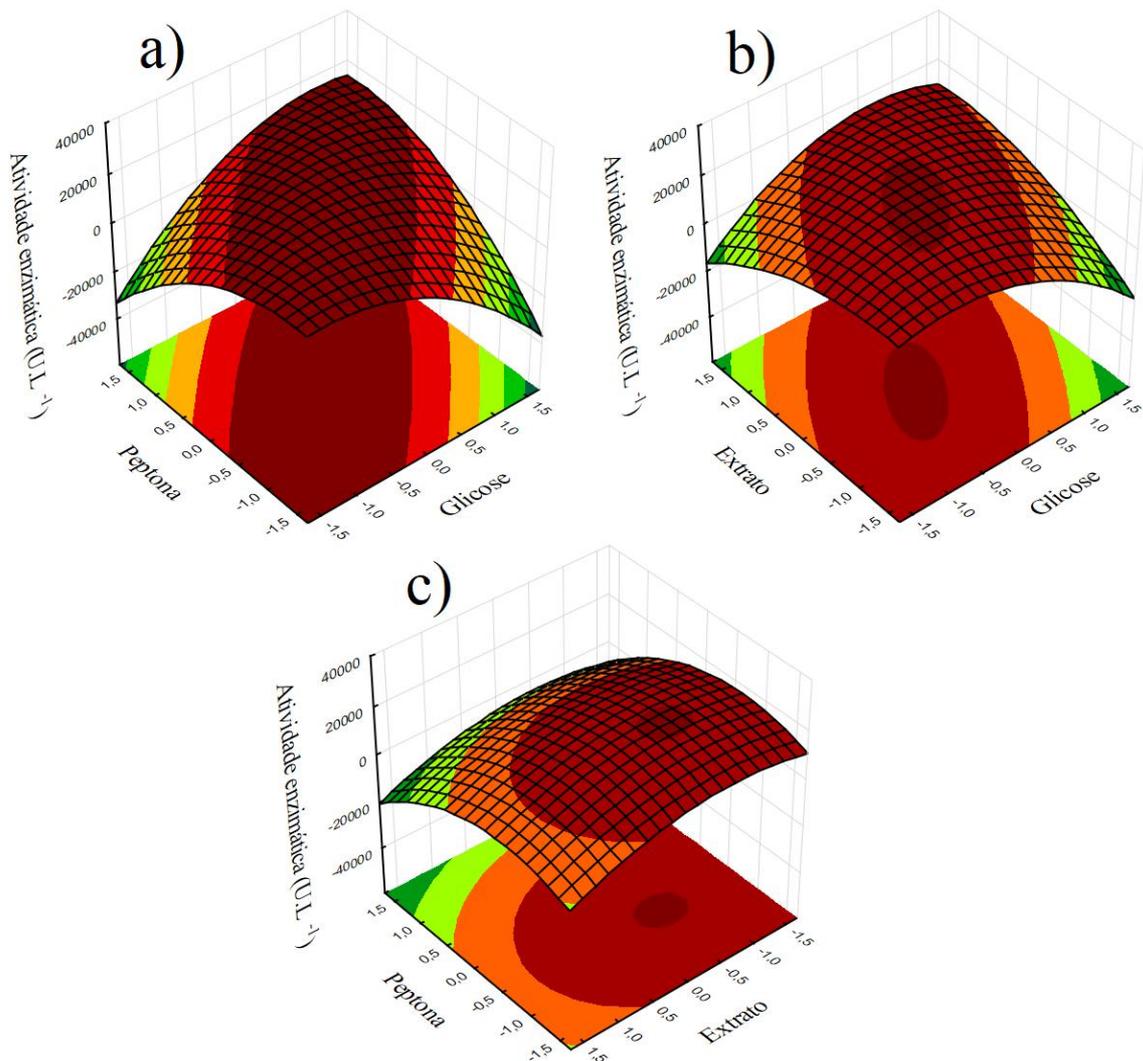


Figura 7. Superfícies de resposta baseadas no modelo matemático de segunda ordem obtido para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* após 24 h de fermentação. (a)(b)(c) Atividade enzimática em $U.L^{-1}$ é dada no eixo Z, enquanto as variáveis independentes codificadas (-1,68; -1,00; 0; 1,00; 1,68), glicose, peptona e extrato de levedo são dadas nos eixos X e Y.

5.4. Validação do modelo obtido e comparação em diferentes condições

Devido a pandemia de COVID-19 que se iniciou no ano de 2020, há um intervalo de 2 anos entre a construção do DCCR e a validação do modelo proposto através dos resultados. Após este período, foi necessário a reativação da cepa *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682/1 (Silva et al., 2020) a partir de um dos frascos criogênicos com meio de cultivo e glicerol na proporção de 1/1. Após a reativação da cepa, foi observado que ocorreu uma queda na produção de lipase pelo microrganismo, então para a validação do modelo foi realizada uma

avaliação comparativa de atividade relativa tendo como base o meio anteriormente utilizado para produção de lipase extracelular de Amaral (2007). O resumo dos dados obtidos e custo dos meios pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores obtidos de atividade enzimática e atividade enzimática relativa ao meio YP*D de Amaral (2007) para produção de lipase extracelular de *Yarrowia lipolytica* após 24h de cultivo nas condições de otimização estudadas. Y, P e D são respectivamente, extrato de lêvedo (yeast extract), peptona (peptone) e glicose (dextrose).

Ensaio	Y (%)	P (%)	D (%)	Atividade enzimática (U.L ⁻¹)	Atividade relativa (%)
Amaral, 2007	1	0,64	2	3.654,97 ± 875,83	-
Condição ótima do DCCR	0,27	0,74	0,77	7.725,67 ± 891,98	111,37
Condição 9 do DCCR	1,2	1,994	1,994	4.136,50 ± 157,06	13,17

Na condição que maximiza o modelo obtido no DCCR em PBM foi possível obter até 7725,67 U.L⁻¹, um aumento de até 111,37 % em relação ao meio de Amaral, (2007). O ensaio 9 do DCCR também foi testado como possível condição do meio uma vez que foi obtido uma produção de lipase de 37.876,69 U.L⁻¹ durante os experimentos, muito superior ao previsto na condição ótima do modelo. Entretanto, o aumento em relação do meio de Amaral (2007) foi de apenas 13,17 % sendo obtido apenas 4136,50 U.L⁻¹ de atividade enzimática. Tal diferença de valores pode ser explicada pela alteração no metabolismo do microrganismo após a reativação e talvez a seleção de uma colônia do microrganismo num meio seletivo sólido para produção de lipase reduza a queda na produção.

Dessa forma, a condição de 0,27 % de extrato de lêvedo, 0,74% peptona e 0,77% de glicose em meio PBM (*phosphate buffered medium*) após 24 h de fermentação, foi definida como a nova condição otimizada para produção de lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica*.

Uma comparação de custo por litro de meio de cultivo foi realizada e os resultados mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Custos das matérias-primas por litro de meio para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* após 24h de fermentação nas condições de Amaral (2007) e no obtido pelo pelo DCCR.

	Massa (g. L ⁻¹)	Preço (R\$. g ⁻¹) *	Custo (R\$. L ⁻¹)
Amaral, 2007			
Y (extrato de lêvedo)	10	1,10	11,04
P (peptona)	6,4	0,83	5,33
D (glicose)	20	0,39	7,74
Custo total (R\$. L ⁻¹)	-	-	24,11
Produtividade (U.R\$. ⁻¹)	-	-	151,58
Condição ótima do DCCR – tampão fosfato de potássio			
Y (extrato de lêvedo)	2,7	1,10	2,98
P (peptona)	7,4	0,83	6,17
D (glicose)	7,7	0,39	2,98
KH ₂ PO ₄	13,6	0,78	10,54
K ₂ HPO ₄	17,4	1,04	18,11
Custo total (R\$. L ⁻¹)	-	-	40,78
Produtividade (U.R\$. ⁻¹)	-	-	189,45
Condição ótima do DCCR – tampão fosfato de sódio			
Y (extrato de lêvedo)	2,7	1,10	2,98
P (peptona)	7,4	0,83	6,17
D (glicose)	7,7	0,39	2,98
NaH ₂ PO ₄	12,0	0,56	6,75
Na ₂ HPO ₄	14,2	0,69	9,78
Custo total (R\$. L ⁻¹)	-	-	28,65
Produtividade (U.R\$. ⁻¹)	-	-	269,62

*Preços em reais (R\$) de extrato de lêvedo e glicose fornecidos pela empresa Merck e peptona pela empresa Kasvi em 04 de julho de 2022.

Considerando a preparação do tampão fosfato feita com sais de fosfato de potássio monobásico e dibásico, a condição ótima do DCCR teve aumento de 24,98 % na produtividade de U por real gasto (quantidade de lipase que libera 1 µmol de p-nitrofenolato à 37 °C por um minuto por real gasto) em relação ao meio de Amaral (2007). Este valor pode chegar a 269,62 U.R\$.⁻¹ quando utiliza-se sais de fosfato de sódio monobásico e dibásico na preparação do tampão, um aumento de 77,87 % na produtividade de lipase por real gasto. Esse resultado expressivo no aumento da produtividade, majoritariamente, a grande redução na concentração de extrato de lêvedo, que é o componente do meio de cultivo mais oneroso, seguido da peptona e glicose.

A viabilidade econômica do processo pode ser avaliada em estudos futuros para produção de lipase extracelular em biorreator.

Capítulo 6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no trabalho de melhoramento de em meio complexo para aumento da produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, foi possível obter as seguintes conclusões:

- A utilização do tampão 100 mM fosfato pH 7,0 foi essencial para a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*;
- Sais derivados de metais de transição tiveram alta influência na atividade enzimática de lipases extracelulares de *Yarrowia lipolytica* mesmo em concentrações baixas entre 1 e 5 mM e sua utilidade no meio de cultivo pode ser avaliada posteriormente;
- A partir do DCCR, foi obtido um modelo matemático de segunda ordem que maximiza a produção de lipase prevendo atividade enzimática de 21.725,66 U.L⁻¹ após 24 h de fermentação num meio composto por: 0,27 % de extrato de lêvedo, 0,74% de peptona e 0,77% de glicose em tampão 100 mM fosfato pH 7,0;
- Foi possível ter um aumento de até 111,37 % na atividade de lipase utilizando o meio de cultivo proposto. Esse resultado foi obtido com 73,0 % de redução do extrato de lêvedo, 15,6 % de aumento da peptona e 63,0 % de redução da glicose, em comparação com o meio anteriormente utilizado para produção de lipase extracelular. Essa alteração resultou numa redução de 49,7 % no custo de produção do litro de meio de cultivo.

Capítulo 7. Sugestão de trabalhos futuros

Durante o trabalho, foi possível observar melhorias e lacunas que podem ser abordadas em trabalhos futuros para obtenção de um meio de cultivo otimizado:

- A seleção de uma colônia produtora de lipase em meio seletivo sólido poderia ter sido realizada após a reativação da cepa e isto poderia resultar em resultados mais próximos ao esperado pelo DCCR.
- A influência da utilização de sais contendo Co^{2+} no meio de cultivo pode ser avaliada para a produção de lipase.
- O trabalho aborda uma aplicação direta de um Delineamento composto central rotacional acreditando-se que os fatores estudados são significativos e proximidade das regiões ótimas sem antes ter sido feito avaliações prévias das variáveis por experimentos fatoriais completos. Isto pode ser a explicação pela qual não se obteve um melhoramento quanto a utilização de glicose no meio, uma vez em que não se foi avaliado seus efeitos em concentrações mais elevadas a ponto de induzir a repressão catabólica. Um estudo com o aumento da concentração de glicose no meio pode ser realizado.
- Um estudo sobre a viabilidade econômica da produção da lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica* em biorreator no meio proposto pode ser realizado.

Capítulo 8. Referências bibliográficas

- Abol-Fotouh, D., AlHagar, O. E. A., & Hassan, M. A. (2021). Optimization, purification, and biochemical characterization of thermoalkaliphilic lipase from a novel *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 for detergent formulations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 125–135.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.111>
- Akil, E., Carvalho, T., Bárea, B., Finotelli, P., Lecomte, J., Torres, A. G., Amaral, P., & Villeneuve, P. (2016). Accessing regio- and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, *109*, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.12.019>
- Albuquerque, C. D. C., Filetti, A. M. F., & Campos-Takaki, G. M. (2006). Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(6), 575–583.
<https://doi.org/10.1139/W06-002>
- Alonso, F. O. M., Oliveira, E. B. L., Dellamora-Ortiz, G. M., & Pereira-Meirelles, F. V. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *22*(1), 9–18.
<https://doi.org/10.1590/S0104-66322005000100002>
- Aloulou, A., Bénarouche, A., Puccinelli, D., Spinelli, S., Cavalier, J. F., Cambillau, C., & Carrière, F. (2013). Biochemical and structural characterization of non-glycosylated *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*(4), 429–441. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201200440>
- Alvarez, H. M., Mayer, F., Frabritius, D., & Steinbüchel, A. (1996). Formation of intracytoplasmic lipid inclusions. *Arch. Microbiol*, *165*, 377–386.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002030050341>
- Amaral, P., da Silva, J. M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., & Coutinho, J. A. P. (2006). Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, *41*(8), 1894–1898.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.029>

- Amaral, Priscilla F.F. (2007). *Produção de lipase de Yarrowia lipolytica em biorreator multifásico*.
- Amaral, Priscilla F.Fonseca, De Almeida, A. P. R., Peixoto, T., Rocha-Leão, M. H. M., Coutinho, J. A. P., & Coelho, M. A. Z. (2007). Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 339–344.
<https://doi.org/10.1007/s11274-006-9229-y>
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, 313–388. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_10
- Bayramoglu, G., Celikbicak, O., Kilic, M., & Yakup Arica, M. (2022). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. *Food Chemistry*, 366(April 2021), 130699.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699>
- Behera, B. C., Mishra, R., & Mohapatra, S. (2021). Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. *Food Frontiers*, 2(1), 62–76.
<https://doi.org/10.1002/fft2.66>
- Bessadok, B., Masri, M., Breuck, T., & Sadok, S. (2017). Characterization of the Crude Alkaline Extracellular Protease of *Yarrowia lipolytica* YITun15. *Journal of Fisheries Sciences.Com*, 11(4). <https://doi.org/10.21767/1307-234x.1000137>
- Bilal, M., Xu, S., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2020). *Yarrowia lipolytica* as an emerging biotechnological chassis for functional sugars biosynthesis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1739000>
- Böhm, L., Hohl, L., Bliatsiou, C., & Kraume, M. (2019). Multiphase Stirred Tank Bioreactors – New Geometrical Concepts and Scale-up Approaches. *Chemie-Ingenieur-Technik*, 91(12), 1724–1746. <https://doi.org/10.1002/cite.201900165>
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2), 202–207. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80035-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80035-6)
- Chen, X., Wang, J., Stevenson, R. J., Ang, X., Peng, Y., & Quek, S. Y. (2021). Lipase-catalyzed modification of milk fat: A promising way to alter flavor notes of goat milk products. *Lwt*, 145(November 2020), 111286.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111286>

- da S. Pereira, A., Fontes-Sant'Ana, G. C., & Amaral, P. F. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioproducts Processing*, *115*, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>
- da Silva, L. V., Coelho, M. A. Z., Amaral, P. F. F., & Fickers, P. (2018). A novel osmotic pressure strategy to improve erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *41*(12), 1883–1886. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2001-5>
- de Freitas, M. de F. M., Cavalcante, L. S., Gudiña, E. J., Silvério, S. C., Rodrigues, S., Rodrigues, L. R., & Gonçalves, L. R. B. (2021). Sustainable Lipase Production by *Diutina rugosa* NRRL Y-95 Through a Combined Use of Agro-Industrial Residues as Feedstock. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(2), 589–605. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03431-6>
- dos Santos Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, *103*, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Duan, X., Xiang, M., Wang, L., Yan, Q., Yang, S., & Jiang, Z. (2019). Biochemical characterization of a novel lipase from *Malbranchea cinnamomea* suitable for production of lipolyzed milkfat flavor and biodegradation of phthalate esters. *Food Chemistry*, *297*(May), 124925. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.199>
- Elias, M., Wiczorek, G., Rosenne, S., & Tawfik, D. S. (2014). The universality of enzymatic rate-temperature dependency. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.11.001>
- Fareleira, P., Santos, B. S., António, C., Moradas-Ferreira, P., LeGall, J., Xavier, A. V., & Santos, H. (2003). Response of a strict anaerobe to oxygen: Survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiology*, *149*(6), 1513–1522. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26155-0>
- Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and

- its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5(6–7), 527–543.
<https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M. T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P., & Nicaud, J. M. (2005). 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.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.12.003>
- Fraga, J. L., Penha, A. C. B., Pereira, A. da S., Silva, K. A., Akil, E., Torres, A. G., & Amaral, P. F. F. (2018). Use of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized in cell debris for the production of lipolyzed milk fat (Lmf). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). <https://doi.org/10.3390/ijms19113413>
- Fraga, J. L., Souza, C. P. L., Pereira, A. da S., Aguiéiras, E. C. G., de Silva, L. O., Torres, A. G., Freire, D. G., & Amaral, P. F. F. (2021). Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse. *3 Biotech*, 11(4), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02748-1>
- Fraga, J., Penha, A. C. B., Akil, E., Silva, K. A., & Amaral, P. F. F. (2020). Catalytic and physical features of a naturally immobilized *Yarrowia lipolytica* lipase in cell debris (LipImDebri) displaying high thermostability. *3 Biotech*, 10(10), 1–12.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02444-6>
- Frankenberger, W. T., & Johanson, J. B. (1982). Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 14(5), 433–437. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(82\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(82)90101-8)
- García-Ochoa, F., Castro, E. G., & Santos, V. E. (2000). Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(9), 680–690.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00272-6)
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Alcon, A., & Santos, V. E. (2013). The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(7), 911–925.
<https://doi.org/10.1007/s00449-012-0825-y>
- Ghobadi, N., Ogino, C., Yamabe, K., & Ohmura, N. (2017). Characterizations of the

- submerged fermentation of *Aspergillus oryzae* using a Fullzone impeller in a stirred tank bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(1), 101–108.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.07.001>
- Guerreiro, F., Constantino, A., Lima-Costa, E., & Raposo, S. (2019). A new combined approach to improved lipid production using a strictly aerobic and oleaginous yeast. *Engineering in Life Sciences*, 19(1), 47–56. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800115>
- Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014). Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00258.7>
- Hagler; Mendonça-Hagler, L. C. (1981). Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 173–178. <https://doi.org/10.1128/aem.41.1.173-178.1981>
- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- Hari Krishna, S., & Karanth, N. G. (2002). Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews - Science and Engineering*, 44(4), 499–591. <https://doi.org/10.1081/CR-120015481>
- Helena, S., Helena, S., Cilli, E. M., Cilli, E. M., Ernandes, R., & Ernandes, R. (2002). Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation. *Yeast*, 108(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00124.x>
- Hooker, A. D., Hardy, J., & Stacey, K. A. (1997). Is induction of the exocellular lipase of *Xanthomonas maltophilia* NK7 by fats and detergents simply the result of continual detachment from the cell surface? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6), 677–681. <https://doi.org/10.1023/A:1018575022477>
- Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications:

- An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 118(1–3), 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- I.S. Brígida, A., F.F. Amaral, P., R.B. Gonçalves, L., M. da Rocha-Leão, M. H., & A.Z. Coelho, M. (2013). *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase Production in a Multiphase Bioreactor. *Current Biochemical Engineering*, 1(1), 65–74. <https://doi.org/10.2174/22127119113019990005>
- Johnson, D. B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), 307–317. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00079-8)
- Khambhaty, Y. (2020). Applications of enzymes in leather processing. *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 747–769. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00971-5>
- Khmaissa, M., Hadrich, B., Chamkha, M., Sayari, A., & Fendri, A. (2022). Production of a halotolerant lipase from *Halomonas* sp. strain C2SS100: Optimization by response-surface methodology and application in detergent formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 25(3), 361–376. <https://doi.org/10.1002/jsde.12563>
- Kim, H. J., & Winge, D. R. (2013). Emerging Concepts in the Flavinylation of Succinate Dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 23(1), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.01.012>
- Kvittingen, L., Sjursnes, B., & Anthonsen, T. (1992). USE OF SALT HYDRATES TO BUFFER OPTIMAL SYNTHESIS WATER LEVEL DURING MEDIA : CATALYSED IN ORGANIC A PRACTICAL PROCEDURE FOR ORGANIC Lise Kvittingen , Birte Sjursnes , and Thorleif Anthonsen Peter Hailing. *Tetrahedron*, 48(13), 2793–2802. [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(01\)88537-9](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(01)88537-9)
- Li, S., Luo, F., Chattha, S. A., Zhang, C., Peng, B., & Mu, C. (2020). Surfactant-free beamhouse technology of leather manufacturing: Removing constraints for the breakdown of natural fats catalyzed by lipase. *Journal of Cleaner Production*, 261, 121187. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121187>
- Liberato, V., Benevenuti, C., Coelho, F., Botelho, A., Amaral, P., Pereira, N., & Ferreira, T. (2019a). Chemicals Production in a Biorefinery Context. *Catalysts*, 9, 1–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal9110962>

- Liberato, V., Benevenuti, C., Coelho, F., Botelho, A., Amaral, P., Pereira, N., & Ferreira, T. (2019b). Clostridium sp. As bio-catalyst for fuels and chemicals production in a biorefinery context. *Catalysts*, 9(11), 1–37.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/catal9110962>
- Liu, Y., Zhang, Z. mu, Masamichi, S., Zhang, J., Shao, P., & Zhang, T. an. (2014). Improvement of impeller blade structure for gas injection refining under mechanical stirring. *Journal of Iron and Steel Research International*, 21(2), 135–143.
[https://doi.org/10.1016/S1006-706X\(14\)60022-4](https://doi.org/10.1016/S1006-706X(14)60022-4)
- Ma, C., Ni, X., Chi, Z., Ma, L., & Gao, L. (2007). Purification and characterization of an alkaline protease from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* for bioactive peptide production from different sources. *Marine Biotechnology*, 9(3), 343–351.
<https://doi.org/10.1007/s10126-006-6105-6>
- Matoba, S., Morano, K. A., Klionsky, D. J., Kim, K., & Ogrydziak, D. M. (1997). Dipeptidyl aminopeptidase processing and biosynthesis of alkaline extracellular protease from *Yarrowia lipolytica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 143, 3263–3272. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3263>
- Moujehed, E., Zarai, Z., Khemir, H., Miled, N., Bchir, M. S., Gablin, C., Bessueille, F., Bonhommé, A., Leonard, D., Carrière, F., & Aloulou, A. (2022). Cleaner degreasing of sheepskins by the *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase as a chemical-free alternative in the leather industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 211(September 2021).
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112292>
- Najjar, A., Robert, S., Guérin, C., Violet-Asther, M., & Carrière, F. (2011). 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 1947–1962.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2993-5>
- Nicaud, J.-M. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29, 409–418. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Nunes, P. M. B., Fraga, J. L., Ratier, R. B., Rocha-Leão, M. H. M., Brígida, A. I. S., Fickers, P., & Amaral, P. F. F. (2021). Waste soybean frying oil for the production, extraction, and characterization of cell-wall-associated lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(4), 809–818.

<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02489-0>

Nunes, P. M. B., Martins, A. B., Brígida, A. I. S., Da Rocha-Leão, M. H. M., & Amaral, P. (2014). Intracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using different carbon sources. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 421–426.

<https://doi.org/10.3303/CET1438071>

Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. *Molecules*, 23(5), 1–26.

<https://doi.org/10.3390/molecules23051049>

Ogrydziak, D. M. (1988). Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8(3), 177–187.

<https://doi.org/10.3109/07388558809147555>

Oliveira, E. (2015). Triglicerídeos. *Revista de Ciência Elementar*, 3(2), 24927.

<https://doi.org/10.24927/rce2015.134>

Oliveira, U. M. F., Lima de Matos, L. J. B., de Souza, M. C. M., Pinheiro, B. B., dos Santos, J. C. S., & Gonçalves, L. R. B. (2019). Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 597–608. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4514-z>

Ota, Y., Gomi, K., Kato, S., Sugiura, T., & Minoda, Y. (1982). Purification and Some Properties of Cell-bound Lipase from *Saccharomyces lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(12), 2885–2893. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.46.2885>

Panek, A. C., de Araujo, P. S., Moura Neto, V., & Panek, A. D. (1987). Regulation of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces* - I. Interconversion of forms by phosphorylation. *Current Genetics*, 11(6–7), 459–465.

<https://doi.org/10.1007/BF00384607>

Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., & Marc, I. (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 737–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01577.x>

Pereira-Meirelles, F. V. (1997). A stable lipase from *Candida lipolytica* cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*

- *Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 63–65(1), 73–85.
<https://doi.org/10.1007/bf02920414>
- Pereira-Meirelles, F. V., Rocha-Leão, M. H. M., & Sant’Anna, G. L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology Letters*, 22(1), 71–75.
<https://doi.org/10.1023/A:1005672731818>
- Phukon, L. C., Chourasia, R., Kumari, M., Godan, T. K., Sahoo, D., Parameswaran, B., & Rai, A. K. (2020). Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource Technology*, 309(March), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123352>
- Pierik, R. L. M. (1997). Preparation and composition of nutrient media. In *In Vitro Culture of Higher Plants* (pp. 45–82). https://doi.org/10.1007/978-94-017-1854-7_5
- Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1990). Yeast Technology. In *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1007/978-94-011-9771-7>
- Reynoso-Cereceda, G. I., Garcia-Cabrera, R. I., Valdez-Cruz, N. A., & Trujillo-Roldán, M. A. (2016). Shaken flasks by resonant acoustic mixing versus orbital mixing: Mass transfer coefficient k_{La} characterization and *Escherichia coli* cultures comparison. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 379–390.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.015>
- Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin’s respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1095–1105. <https://doi.org/10.1042/bst0311095>
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.012>
- Sales, Julio Cesar S., de Castro, A. M., Ribeiro, B. D., & Maria, M. A. (2020). Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(6), 457–468.
<https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1782387>

- Sales, Julio Cesar Soares, de Castro, A. M., Ribeiro, B. D., & Coelho, M. A. Z. (2021). Improved production of biocatalysts by *Yarrowia lipolytica* using natural sources of the biopolyesters cutin and suberin, and their application in hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) (PET). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *44*(11), 2277–2287. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02603-w>
- Santharam, L., Easwaran, S. N., Subramanian Mohanakrishnan, A., & Mahadevan, S. (2019). Effect of aeration and agitation on yeast inulinase production: a biocalorimetric investigation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *0*(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02101-0>
- Santos, A. G., Ribeiro, B. D., do Nascimento, F. V., & Coelho, M. A. Z. (2018). Culture Miniaturization of Lipase Production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Biochemical Engineering*, *5*(1), 12–20. <https://doi.org/10.2174/2212711905666180730101010>
- Santos, F. F. dos, Freitas, K. M. L. de, Pereira, A. da S., Fontes-Sant’Ana, G. C., Rocha-Leão, M. H. M. da, & Amaral, P. F. F. (2021). Butter whey and corn steep liquor as sole raw materials to obtain a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica* for food oil-in-water emulsions. *Ciência Rural*, *51*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200323>
- Shawkat, H., Westwood, M. M., & Mortimer, A. (2012). Mannitol: A review of its clinical uses. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, *12*(2), 82–85. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkr063>
- Silva, A. P., Penha, A. C. B., Fraga, J. L., & Amaral, P. F. F. (2020). Avaliação da influência de insumos de alto e baixo custo na produção de diferentes metabólitos por *Yarrowia lipolytica* para emprego na indústria de alimentos. *Brazilian Journal of Development*, *6*(4), 20544–20553. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-288>
- Silva Corrêa, L., Henriques, R. O., Rios, J. V., Lerin, L. A., de Oliveira, D., & Furigo, A. (2020). Lipase-Catalyzed Esterification of Geraniol and Citronellol for the Synthesis of Terpenic Esters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *190*(2), 574–583. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03102-1>
- Sinigaglia, M., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (1994). Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Canadian Journal of Microbiology*, *40*(1), 54–59. <https://doi.org/10.1139/m94-008>

- Snopek, P., Nowak, D., Zieniuk, B., & Fabiszewska, A. (2021). Aeration and stirring in *Yarrowia lipolytica* lipase biosynthesis during batch cultures with waste fish oil as a carbon source. *Fermentation*, 7(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020088>
- Soleimani, S. S., Adiguzel, A., & Nadaroglu, H. (2017). Production of bioethanol by facultative anaerobic bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(3), 402–406. <https://doi.org/10.1002/jib.437>
- Spencer, J., Ragout de Spencer, A., & Laluece, C. (2002). Non-conventional yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>
- Stergiou, P. Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., & Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1846–1859. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.006>
- Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces* species in the production of beer. *Beverages*, 2(4). <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>
- Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2), 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00574-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00574-8)
- Takeuchi, T., Kato, N., Watanabe, K., & Morimoto, K. (2000). Mechanism of oxidative DNA damage induction in a strict anaerobe, *Prevotella melaninogenica*. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00423-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00423-7)
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182–196. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- Tunac, B. T. (1989). High-Aeration Capacity Shake-Flask System. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(2), 157–159. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(89\)90068-8](https://doi.org/10.1016/0922-338x(89)90068-8)

- Ugliano, M., Kolouchova, R., & Henschke, P. A. (2011). Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: Influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(3), 423–429. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0786-6>
- Wink, J., Mohammadipanah, F., & Hamedi, J. (2017). Biology and Biotechnology of Actinobacteria. In *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (1st ed.). Springer International Publishing AG 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1>
- Yan, J., Han, B., Gui, X., Wang, G., Xu, L., Yan, Y., Madzak, C., Pan, D., Wang, Y., Zha, G., & Jiao, L. (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19238-9>
- Yang, L. B., Zhan, X. B., Zheng, Z. Y., Wu, J. R., Gao, M. J., & Lin, C. C. (2014). A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresource Technology*, *151*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.031>
- Yépez Silva-Santisteban, B. O., & Mauger Filho, F. (2005). Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(5–6), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.008>
- Zhang, W., Hywood Potter, K. J., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: Growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(4), 210–215. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0035-3>
- Zhao, M. X., Chi, Z., Chi, Z. M., & Madzak, C. (2013). The simultaneous production of single-cell protein and a recombinant antibacterial peptide by expression of an antibacterial peptide gene in *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, *48*(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.003>
- Zinjarde, S. S., Pant, A., & Deshpande, M. V. (1998). Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* isolated from oil-polluted sea water. *Mycological Research*, *102*(5), 553–558. <https://doi.org/10.1017/S0953756297005418>