



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR *Yarrowia lipolytica*
COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS**

Bruno Roswag Machado

Prof^a. Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Susan Hartwig Duarte

Co-orientadora

RIO GRANDE - RS

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR POR *Yarrowia lipolytica*
COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS**

Bruno Roswag Machado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof^a. Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Susan Hartwig Duarte
Co-orientadora

RIO GRANDE - RS

2022

Ficha Catalográfica

M149p Machado, Bruno Roswag.

Produção de lipase extracelular por *yarrowia lipolytica* com aplicação de campos magnéticos / Bruno Roswag Machado. – 2022. 99 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2022.

Orientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.

Coorientadora: Dra. Susan Hartwig Duarte.

1. Biotecnologia 2. Enzimas 3. Fermentação 4. Leveduras
5. Planejamento experimental I. Santos, Lucielen Oliveira dos
II. Duarte, Susan Hartwig III. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

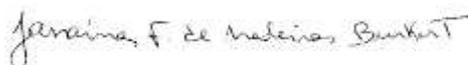
Dissertação defendida por Bruno Roswag Machado, com orientação da Prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos, aprovada em 25 de março de 2022, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



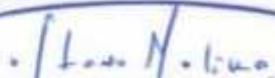
Prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG



Prof.^a Dr.^a Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG



Prof. Dr. Gustavo Molina - UFVJM

Dedico esse trabalho aos meus pais, Ewerson Tunes Machado e Sueli Roswag Machado, que com muito amor e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e aos amigos e colegas pelo incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande e Programa de Pós-Graduação, pelo ensino de qualidade, pela estrutura e recursos disponibilizados.

A minha orientadora prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos e Co-orientadora prof.^a Dr.^a Susan Hartwig Duarte, pelo suporte, atenção e carinho no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Ao Laboratório de Biotecnologia (Biotec) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), por ceder o espaço para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MiBi) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), por ceder o espaço para o desenvolvimento desse trabalho.

A técnica do laboratório de Biotecnologia Luisa Sala e demais colegas de laboratório pelo suporte, atenção e por tirarem as minhas dúvidas e disponibilidade de tempo.

Aos integrantes da banca da qualificação, Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert e Prof.^a Dr.^a Jaqueline Garda Buffon, pelas contribuições e sugestões para o andamento do trabalho.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert, Prof.^a Dr.^a Janaina Fernandes de Medeiros Burkert e Prof. Dr. Gustavo Molina, por aceitarem o convite para compor a banca e por todas as considerações feitas para o fechamento do trabalho.

Aos professores e funcionários da FURG, que direta ou indiretamente auxiliaram nessa jornada. E a todos que de alguma forma fizeram parte da minha jornada, o meu muito obrigado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilidade da bolsa durante o período de mestrado.

"A ciência é muito mais do que um corpo de conhecimento. É uma forma de pensar. Uma maneira cética de interrogar o universo com pleno entendimento da falibilidade humana."

Carl Sagan

RESUMO

As leveduras apresentam vantagens para a produção de lipases, pois são facilmente cultivadas em meios líquidos, proporcionando melhor controle das variáveis de processo. O emprego de campos magnéticos (CM) em cultivos microbianos tem se mostrado uma técnica viável e de baixo custo para incrementar a produção de enzimas e outras biomoléculas. Estudos sugerem que o CM pode modificar a permeabilidade da membrana celular, causar alterações na transcrição do DNA, influenciando desta forma os parâmetros cinéticos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estabelecer a melhor composição de meio de cultivo e investigar os efeitos de CM na produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095. Primeiramente, um delineamento composto central (DCC) 2^3 foi feito para estudar as condições do meio de cultivo para a produção de lipase, sendo as variáveis independentes: concentração de glicose (10 a 30 g L⁻¹), azeite de oliva (5 a 15 g L⁻¹) e Triton X-100 (2 a 8 g L⁻¹). Os cultivos foram conduzidos à 28 °C, pH inicial 6, 180 rpm durante 120 h, sendo a atividade de lipase extracelular a principal resposta avaliada. Estabelecidas as melhores condições para a produção de lipase, o CM de 30 mT foi aplicado nos cultivos por ímãs de ferrite, em diferentes períodos: 0 a 72 h, 72 a 144 h e 0 a 144 h. A caracterização da lipase extracelular foi feita pelo estudo da influência da temperatura e pH na atividade enzimática e cálculo dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$). As melhores condições para a produção de lipase no DCC foram: 10 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 2 g L⁻¹ do surfactante Triton X-100, com máxima atividade de lipase de 7,25 U mL⁻¹ em 120 h. A maior atividade de lipase (34,8 U mL⁻¹) foi obtida no cultivo CM 72-144 h em 144 h, a qual corresponde a aumento de 287,5 % quando comparada a máxima atividade no controle (120 h). A lipase de *Y. lipolytica* caracterizada no cultivo controle e com aplicação de CM 72-144 h apresentou temperatura ótima de 37 °C. O pH ótimo para o cultivo controle foi 7 e para o cultivo com CM foi 8, indicando que a presença do CM alterou condições catalíticas da lipase produzida pela *Y. lipolytica*. O método de linearização de Lineweaver-Burk ($K_m = 37,71$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 84,03$ mM min⁻¹) foi o que melhor se ajustou para lipase produzida com aplicação de CM. Portanto, o presente trabalho apresenta resultados inovadores para a produção de lipase, visto que este é um dos primeiros trabalhos na literatura a abordar a aplicação de CM em cultivos de *Y. lipolytica* para produzir essa enzima. Os resultados apresentados permitem concluir que a levedura sofreu influência positiva na produção de lipase quando o CM foi aplicado de 72 a 144 h do cultivo.

Palavras-chave: Biotecnologia. Enzimas. Fermentação. Leveduras. Planejamento experimental.

ABSTRACT

EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCTION BY *Yarrowia lipolytica* WITH APPLICATION OF MAGNETIC FIELDS

Yeasts has advantages to produce lipases, as they are easily growing in liquid media, providing better control of process variables. The use of magnetic fields (MF) in microbial cultures has been shown to be a viable and low-cost technique to increase enzyme production and other biomolecules. Studies suggest that MF can modify cell membrane permeability, cause changes in DNA transcription, thus influencing kinetic parameters. Therefore, this study aimed at establishing the best culture medium composition and investigate MF effects on lipase production by the yeast *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095. First, a central composite design (CCD) 2^3 was carried out to study the conditions of the culture medium to produce lipase, having as independent variables: glucose concentration (10 to 30 g L⁻¹), olive oil (5 to 15 g L⁻¹) and Triton X-100 (2 to 8 g L⁻¹). Cultures were carried out at 28 °C, initial pH 6, 180 rpm for 120 h, and extracellular lipase activity was the main response evaluated. After establishing the best conditions to produce lipase, MF of 30 mT was applied to cultures using ferrite magnets at different times: 0 to 72 h, 72 to 144 h and 0 to 144 h. The characterization of extracellular lipase was carried out by studying the influence of temperature and pH on enzymatic activity and calculating kinetic parameters (K_m and V_{max}). The best conditions to produce lipase in the CCD were: 10 g L⁻¹ of glucose, 15 g L⁻¹ of olive oil and 2 g L⁻¹ of the surfactant Triton X-100, with a maximum lipase activity of 7.25 U mL⁻¹ in 120 h. The highest lipase activity (34.8 U mL⁻¹) was obtained in the MF culture 72-144 h in 144 h, which corresponds to an increase of 287.5 % by comparison with the maximum activity in the control (120 h). The lipase of *Y. lipolytica* characterized in the control culture and with MF application 72-144 h had an optimal temperature of 37 °C. The optimal pH for the control culture was 7 and for the MF culture it was 8, indicating that MF altered the catalytic conditions of the lipase produced by *Y. lipolytica*. The Lineweaver-Burk linearization method ($K_m = 37.71$ mM; $V_{max} = 84.03$ mM min⁻¹) was the best fit for lipase produced with MF application. Therefore, this study has innovative results to produce lipase, since this is one of the first study with MF application in *Y. lipolytica* cultures to produce this enzyme. Results had allowed us to conclude that this yeast had a positive influence on lipase production when MF was applied from 72 to 144 h of cultivation.

Keywords: Biotechnology. Enzymes. Fermentation. Yeasts. Experimental design.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substratos usados para produção de lipases por leveduras.	32
Tabela 2 – Aplicação de CM no cultivo de diferentes micro-organismos.	39
Tabela 3 - Composição do meio de cultivo para o estudo da produção de lipase.	44
Tabela 4 - Matriz do DCC 2 ³ com valores reais e codificados.....	44
Tabela 5 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCC 2 ³ para a atividade enzimática de lipase da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h.	55
Tabela 6 - Análise de variância do DCC 2 ³ para a atividade de lipase da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h.	55
Tabela 7 - Valor predito e desvio relativo para produção de lipase por <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h de cultivo.	57
Tabela 8 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCC 2 ³ para a concentração de biomassa da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h.....	58
Tabela 9 - Análise de variância do DCC 2 ³ para a concentração de biomassa da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h.	58
Tabela 10 - Valor predito e desvio relativo para concentração de biomassa da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em 120 h de cultivo.	61
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos determinados experimentalmente a partir da lipase produzida de <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 na presença de CM 72-144 h.	68
Tabela A1 – Atividade enzimática de lipase obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.....	92
Tabela A2 – Concentração de açúcares redutores obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.....	93
Tabela A3 – Valores de pH obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.....	94
Tabela A4 - Concentração de biomassa obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.	95
Tabela A5 - Resultados do cultivo controle (sem aplicação de CM).	96
Tabela A6 - Resultados do cultivo CM 0 – 72 h.	97
Tabela A7 - Resultados do cultivo CM 72 – 144 h.	98
Tabela A8 - Resultados do cultivo CM 0 – 144 h.	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cultivos com aplicação de campo magnético gerados por imãs de ferrite acoplados na base dos frascos <i>Erlenmeyer</i>	45
Figura 2 - Reação da hidrólise do pNPP. (A) Antes da reação os tubos contendo os reagentes e o extrato não apresentam coloração. (B) Após a reação ocorre a hidrólise do substrato e liberação do p-nitrofenol (tonalidade amarelada).....	49
Figura 3 - Atividade enzimática de lipase dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental para estudo do meio de cultivo na produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.	50
Figura 4 - Concentração de açúcares redutores dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular pela levedura <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.	51
Figura 5 - Valores de pH dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.	52
Figura 6 - Concentração de biomassa dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por <i>Y. lipolytica</i> NNRL Y-1095.	53
Figura 7 – Curva de contorno obtida para a atividade enzimática de lipase de levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em função da concentração de glicose e concentração de azeite de oliva.	56
Figura 8 - Curvas de contorno obtida para a concentração de biomassa da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 em função da glicose e azeite de oliva (A), Triton X-100 e azeite de oliva (B) e de glicose e Triton X-100 (C).....	60
Figura 9 - Cultivos de <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 sob influência de diferentes intervalos de aplicação de campos magnéticos (CM): (A) Ensaio controle; (B) CM 0-72; (C) CM 72-144 e (D) CM 0-144.	63
Figura 10 - Máxima concentração de biomassa (A) e produtividade máxima de biomassa (B) para cada ensaio em diferentes tempos de cultivo (parênteses). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.	64
Figura 11 - Máxima atividade enzimática de lipase (A) e produtividade máxima de lipase (B) para cada ensaio em diferentes tempos de cultivo (parênteses). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.	66
Figura 12 - Gráfico de Michaelis-Menten (A) e linearizações da equação de Michaelis-Menten da reação catalisada pela lipase de <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095, Lineweaver-Burk (B), Eadie-Hofstee (C) e Hanes-Woolf (D).	69
Figura 13 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de lipase produzida por <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 no cultivo controle e CM 72-144.....	70
Figura 14 - Efeito do pH na atividade enzimática de lipase produzida por <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095 no cultivo controle e CM 72-144.	72
Figura A1 – Curva padrão de biomassa da levedura <i>Y. lipolytica</i> NRRL Y-1095.....	90
Figura A2 - Curva padrão de p-nitrofenol.	90
Figura A3 - Curva padrão de glicose.....	91
Figura A4 - Curva padrão de albumina de soro bovino (98% pureza).....	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. LIPASES	27
3.2. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS	27
3.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR LEVEDURAS	29
3.3.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	31
3.4. CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS	37
3.5. CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA	43
4.2. PREPARO DO INÓCULO	43
4.3. ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR	43
4.4. PRODUÇÃO DE LIPASE COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ..	45
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
4.5.1. Determinação da concentração de biomassa.....	45
4.5.2. Determinação de atividade de lipase extracelular	46
4.5.3. Determinação de açúcares redutores	46
4.5.4. Determinação de pH	46
4.5.5. Determinação de proteínas	46
4.5.6. Caracterização da lipase.....	47
4.6. PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO	47
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO.....	49
5.2. PRODUÇÃO DE LIPASE COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS ..	61
5.3. CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA <i>YARROWIA</i> <i>LIPOLYTICA</i>	67
5.3.1. Caracterização cinética da lipase	67
5.3.2. pH e temperatura ótima da lipase	70
6. CONCLUSÕES	73
7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
8. RESÍDUOS GERADOS.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICE	89

1. INTRODUÇÃO

De acordo com relatório publicado na *Focus on Catalysts* (2019), projeções do mercado mundial mostram que o segmento de produção de enzimas pode apresentar valor estimado de 19 bilhões de dólares até 2025, sendo 590 milhões referentes às lipases. Além disso, segundo esse relatório a demanda industrial de enzimas no Brasil deve se expandir a uma taxa de crescimento anual de 8,4 %, durante o período projetado, por conta da expansão de produtos de giro rápido, como papel e medicamentos, assim como de empresas nutracêuticas no país.

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de cadeias longas de acilgliceróis em ácidos graxos livres na interface óleo-água e, dependendo das condições do sistema, podem atuar na síntese de diversos compostos (GEOFFRY; ACHUR, 2017; YADAV et al., 2019). Assim, as lipases apresentam grande poder catalítico e seletivo com relação a alguns substratos proporcionando a essas enzimas múltiplas aplicações industriais como produção de biodiesel (ARTHY et al., 2014), detergentes (PHUKON et al., 2020), tratamento de efluentes (JOSHI et al., 2019), produção de flavorizantes (PENG et al., 2014), iogurtes (HUANG et al., 2020), queijos (KENDIRCI et al., 2020), fármacos (CIPOLATTI et al., 2020) e papel (GUTIÉRREZ et al., 2009).

A levedura *Yarrowia lipolytica* é apontada como um dos micro-organismos com potencial para a produção de lipase (CORZO; REVAH, 1999; MAGDOULI et al., 2017). Estudos tem mostrado que esta levedura tem a capacidade de assimilar diferentes compostos que atuam como fonte de carbono e/ou indutor da síntese dessa enzima; como glicose, (DOMÍNGUEZ et al., 2003), glicerol (MAGDOULI et al., 2017), azeite de oliva (MAGDOULI et al., 2017) e óleo de girassol (DOMÍNGUEZ et al., 2003), sendo que a presença de indutores é essencial para sua produção. O emprego de surfactantes como *Tween* 80, Triton X-100 ou polietilenoglicol (PEG) também têm mostrado incrementar a produção microbiana de lipases, pois esses compostos emulsionam os acilgliceróis em água facilitando a atuação dessas enzimas sobre o substrato lipídico (DOMÍNGUEZ et al., 2003; MAGDOULI et al., 2017; YADAV et al., 2011).

Moraes, Machado e D'amore (2018) realizaram triagem entre diferentes leveduras (*Y. lipolytica* NRRL YB-423, *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 e *Lipomyces starkeyi* NRRL Y- 11557) para a produção de lipase extracelular. A *Y. lipolytica* NRRL YB- 423 e *L. starkeyi* NRRL Y-11557 foram linhagens que não apresentaram produção da enzima,

entretanto, a *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 apresentou resultados promissores para a produção extracelular.

A necessidade da otimização de obtenção de biomoléculas, visando redução de custo e tempo, obtenção de alto rendimento e produtividade, tem levado pesquisadores de diversas áreas a utilizarem ferramentas como o planejamento experimental (RODRIGUES; IEMNA, 2014). Essa ferramenta permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resulta em objetividade científica nas conclusões assim como, a obtenção de modelos preditivos (CALADO, 2003). Além disso, o planejamento experimental apresenta diversas vantagens como redução do número de experimentos, as variáveis do processo são avaliadas simultaneamente, existindo a possibilidade de otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (RODRIGUES; IEMNA, 2014).

A utilização de campos magnéticos (CM) para a obtenção de biomoléculas a partir de micro-organismos tem mostrado resultados promissores (CARDIAS et al., 2020; COSTA et al., 2020; FENG et al., 2020; VEIGA et al., 2020). Incremento na produção de enzimas como lipase (DAVID et al., 2016), invertase (CANLI et al., 2011) e inulinase (CANLI; KURBANOGLU, 2011) foram relatados. Entretanto, o CM pode causar estimulação, inibição ou nenhuma alteração quando aplicado aos cultivos.

De acordo com Santos et al. (2010) os efeitos positivos dos CM podem estar restritos a certos valores de intensidade e tempo de exposição e modificações nesses parâmetros podem incrementar a produção de biomassa e biomoléculas. Outros estudos sugeriram que os CM podem modificar a permeabilidade da membrana celular (ALBUQUERQUE et al., 2016; BOEIRA et al., 2021), promover mudanças na transcrição do DNA e no ciclo celular (AMARA et al., 2007) afetando, consequentemente, os parâmetros cinéticos e síntese de biomoléculas.

Assim, inicialmente foi utilizado planejamento experimental para estabelecer as melhores concentrações de fontes de carbono lipídica (azeite de oliva), não lipídica (glicose) e surfactante (Triton X-100) adicionados ao meio de cultivo para a síntese de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095. Posteriormente, visando incrementar a produção e/ou facilitar a excreção da lipase extracelular pela levedura, CM foram aplicados durante diferentes fases do cultivo e seus efeitos na produção e características da enzima sintetizada foram investigados.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer a melhor composição de meio de cultivo e investigar os efeitos de campos magnéticos na produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração das fontes de carbono e surfactante para a produção de lipase extracelular;
- Mensurar a influência dos CM na produção e produtividade de biomassa e lipase extracelular;
- Caracterizar a lipase produzida com aplicação dos CM quanto à temperatura e pH ótimos e calcular os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da lipase produzida.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres (GEOFFRY; ACHUR, 2017; GUPTA et al., 2015). Essas enzimas estão associadas ao metabolismo de lipídeos, assim como as esterases (EC 3.1.1.1), sendo ambas carboxilesterases. A diferença entre as lipases e esterases está na seletividade quanto ao substrato: as primeiras catalisam principalmente reações de substratos de cadeia longa, na interface água-óleo, enquanto as segundas agem em ésteres de cadeias curtas e (LAI, 2019).

Além disso, ensaios cristalográficos evidenciaram que algumas lipases apresentam uma tampa (*lid*) que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice (Ser-His-Asp/Glu) (ERICSSON et al., 2008). Em ambientes aquosos, ou seja, sem a presença de substratos hidrofóbicos a tampa cobre o sítio catalítico e, conseqüentemente a lipase está inativa. Na presença de substratos hidrofóbicos (interface água-óleo), a tampa é aberta tornando a enzima ativa (CASAS-GODOY et al., 2018). Além da hidrólise dos acilgliceróis, dependendo das condições do sistema, as lipases podem catalisar uma variedade de reações de síntese que incluem esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (YADAV et al., 2019).

Diversos organismos, como animais e plantas (PAHOJA; SETHAR, 2002), bactérias (BEHERA et al., 2019), fungos filamentosos (BURKERT et al., 2004), microalgas (BYREDDY et al., 2017) e leveduras (BALOCH et al., 2019; PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2000; TASKIN et al., 2016) possuem habilidade de produzir lipases intra e/ou extracelulares. Nos seres humanos, as lipases têm como função a digestão de gorduras alimentares e hidrólise de lipídeos de reserva (ARNER; LANGIN, 2007). Nas plantas, as lipases estão localizadas principalmente nas sementes, como parte dos tecidos de reserva energética, realizando a hidrólise dos acilgliceróis necessários durante a germinação dos grãos (BARROS et al., 2010). Nos micro-organismos, a produção de lipases extracelulares, normalmente, ocorre para hidrolisar os acilgliceróis presentes no meio para facilitar a assimilação de lipídeos pela célula (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017).

3.2. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS

A obtenção de lipases a partir de fontes microbianas torna-se de interesse, pois dentre as vantagens os micro-organismos podem ser facilmente manipulados geneticamente

(SOREANU et al., 2018), são potenciais fornecedores regulares de enzimas, uma vez que não dependem de efeitos sazonais para sua multiplicação (SALEHMIN; ANNUAR; CHISTI, 2014) e podem apresentar crescimento mais acelerado comparado aos animais e plantas (PAHOJA; SETHAR, 2002).

A localização das lipases e a quantidade produzida em micro-organismos estão intimamente ligadas aos tipos de fontes de carbono lipídicas ou não lipídicas (MAGDOULI et al., 2017; NAJJAR et al., 2011; YADAV et al., 2011). Sabe-se que a indução da síntese de enzimas não constitutivas ocorre apenas quando o indutor se encontra presente, neste caso uma fonte de carbono lipídica. Essa indução causada por substratos ocorre de maneira indireta, dependente das etapas inicial e final da síntese de RNA mensageiro (mRNA) durante a transcrição do DNA pela enzima RNA polimerase. Assim, a presença de alguns substratos indutores permite a expressão de genes que sinalizam o início da transcrição e, conseqüentemente, sintetizam a enzima. Além disso, a indução enzimática também pode ser controlada por um repressor. Neste caso, a proteína repressora específica encontra-se ativa na ausência do substrato indutor e, conseqüentemente, bloqueia a síntese de mRNA (MADIGAN et al., 2016). Diversos estudos relataram que compostos lipídicos como por exemplo azeite de oliva e óleo de girassol, podem induzir a síntese de lipase (BALOCH et al., 2019; MAGDOULI et al., 2017; YADAV et al., 2011).

Estudos genômicos encontrados na literatura relataram que a *Y. lipolytica* podem expressar lipases extracelulares (Lip2, Lip8, Lip7, Lip14 e Lip18) e intracelulares (Lip1, Lip3 e Lip6). Fickers, Destain e Thonart (2005) observaram que o gene LIP2 codifica uma lipase extracelular (Lip2p) em *Y. lipolytica* JMY775, que preferencialmente hidrolisa ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (C18). Em outro estudo, Fickers et al. (2005) observaram dois outros genes, LIP7 e LIP8 nesta mesma levedura, que codificam lipases que se mostraram extracelulares.

Kumari e Gupta (2012) expressaram duas lipases extracelulares (Lip14p e Lip18p) de *Y. lipolytica* MSR80 utilizando *Escherichia coli* HB101 (pEZZ18) como sistema vetor. As atividades específicas máximas foram de 200 U mg⁻¹ para a Lip14p e 250 U mg⁻¹ para a Lip18p. Além disso, foi constatado que ambas isoformas de lipase preferencialmente hidrolisaram compostos ricos em ácido oleico (C18:1), como azeite de oliva e óleo de amendoim.

Dois tipos de cultivo podem ser usados para a produção de lipases microbianas, o cultivo submerso (CSm) e cultivo em estado sólido (CES). Os fungos filamentosos são preferencialmente cultivados em CES, pois esses micro-organismos possuem a capacidade de

produzir hifas tubulares alongadas com a função de colonizar a superfície do substrato para secretar metabólitos e enzimas com a finalidade de absorver os nutrientes (BALMANT et al., 2015; OJEDA-HERNÁNDEZ et al., 2018). Por outro lado, as bactérias e leveduras são cultivadas preferencialmente em CSm, já que por serem micro-organismos unicelulares a absorção de nutrientes e a transferência de oxigênio no meio líquido se mostram mais efetivas, além da facilidade de controle das variáveis do processo, que podem ser facilmente ajustadas (SHARMA et al., 2018).

3.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR LEVEDURAS

Na literatura existem diversos estudos que avaliaram a produção de lipases em diferentes fontes de carbono lipídicas e/ou não lipídicas e presença de surfactantes no meio (Tabela 1). Normalmente, as fontes de carbono não lipídicas (glicose ou glicerol) são empregadas com a finalidade de proporcionar a multiplicação celular das leveduras e, conseqüentemente, aumento da concentração de biomassa (GOTTARDI et al., 2021). Em contrapartida, as fontes de carbono lipídicas (azeite de oliva, óleos vegetais ou gorduras de origem animal) são utilizadas com a finalidade de estimular a produção de lipases microbianas, visto que a biossíntese de lipase extracelular em cultivos de leveduras pode ser induzível por um ou mais substratos, sintetizadas dentro da célula e excretadas para sua superfície ou ambiente externo (PEREIRA-MEIRELLES; ROCHA-LEÃO; SANT'ANNA, 2000). Além disso, a fonte de nitrogênio, pH do meio de cultivo, temperatura, agitação e a concentração de oxigênio dissolvido, também são fatores que influenciam o crescimento celular e a produção de lipases microbianas (GUPTA et al., 2015).

Antes de compreender as necessidades dos micro-organismos, é importante conhecer quais desses tem se mostrado mais promissores na produção de lipases. Pesquisas nas últimas décadas mostraram que as leveduras dos gêneros *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. e *Yarrowia* sp. tem se destacado como principais produtoras dessas enzimas (MAGDOULI et al., 2017; MONTEIRO et al., 2020; TASKIN et al., 2016).

Baloch et al. (2019) investigaram a utilização de 4 g L⁻¹ de diferentes fontes de nitrogênio orgânicas (extrato de levedura e peptona) e inorgânicas (NH₄NO₃ e ureia) na produção de lipase pela levedura *Dipodascus capitatus* A4C. Os melhores resultados para cada fonte de nitrogênio foram extrato de levedura (1200 U mL⁻¹), peptona (1102 U mL⁻¹), ureia (1073 U mL⁻¹) e nitrato de amônia (539 U mL⁻¹). As fontes orgânicas proporcionaram os melhores resultados devido a aminoácidos e peptídeos, vitaminas e carboidratos solúveis

em água encontrado nesses substratos, enquanto as fontes de nitrogênio inorgânico continham apenas nutrientes que satisfazem os requisitos mínimos para o crescimento da levedura.

De acordo com Mesa et al. (2018), 20 g L⁻¹ do surfactante Triton X-100 modificou o sítio ativo e as interações com o substrato da lipase comercial de *Thermomyces lanuginose* em diferentes pH (5 a 9), indicando que interações enzima-substrato são dependentes de concentração de surfactante e proporção de lipase. Os autores acreditam que o Triton X-100 pode ter modulado a geometria do sítio ativo, favorecendo melhor o ajuste enzimático do substrato, o que influenciou a atividade e estabilidade em todos os valores de pH avaliados.

Li et al. (2019) isolaram e caracterizaram uma lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* em diversos surfactantes. A atividade da enzima foi induzida pelo surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (DSS) e os surfactantes não iônicos *Tween* 20, *Tween* 80 e Triton X-100, mas foi inibida pelo surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (BCT).

Taskin et al. (2016) isolaram a levedura *Rhodotorula glutinis* HL 25 a partir de amostras de solo e avaliaram a produção de lipases com células livres e imobilizadas. A produção de lipases aumentou 138,6 % (30,3 U L⁻¹) para as células livres com 40 g L⁻¹ de azeite de oliva e 122,3 % (41,2 U L⁻¹) para as células imobilizadas com 50 g L⁻¹, comparados aos seus respectivos controles (sem azeite de oliva). A influência do surfactante Triton X-100 no meio de cultivo (1 a 12,5 g L⁻¹) também foi avaliada sendo constatado incremento de 46,4 % (44,5 U L⁻¹) utilizando 5 g L⁻¹ do composto na atividade de lipase quando empregado 40 g L⁻¹ de azeite de oliva como fonte de carbono e 52,3 % (66,4 U L⁻¹) com 7,5 g L⁻¹ do surfactante, quando a célula estava imobilizada e com 50 g L⁻¹ de azeite de oliva.

Grbavčić et al. (2007) aumentaram em até 70 % a produção de lipase extracelular por *Candida utilis* isolada a partir de óleo de soja residual. A utilização de compostos lipídicos (trioleína, ácido oleico, ácido palmítico, ácido caprílico e azeite de oliva) e não lipídicos (dodecano) como fonte de carbono foram estudadas. Os melhores resultados foram evidenciados com utilização de ácido oleico (60 g L⁻¹) como fonte principal de carbono e *Tween* 80 (11 g L⁻¹) como surfactante, representando máxima atividade de lipase de 450 U mL⁻¹. A produção máxima de lipase foi atingida em 120 h, após a fase exponencial de crescimento celular que foi até 96 h. Além disso, apesar do ácido caprílico ter aumentado a atividade de lipase, o mesmo inibiu o crescimento da levedura, resultando em baixa concentração de biomassa.

Baloch et al. (2019) investigaram a influência de fontes de carbono lipídicas (20 g L⁻¹ de óleo de palma ou óleo de *Jatropha curcas*), não lipídicas (20 g L⁻¹ de glicose ou melação ou glicerol), assim como a combinação de 10 g L⁻¹ de cada substrato (glicose e óleo de palma; glicose e óleo de *J. curcas*; melação e óleo de *J. curcas*; glicerol e óleo de *J. curcas*) na produção de lipases intra e extracelular pela levedura *Dipodascus capitatus* A4C. O meio contendo 20 g L⁻¹ de óleo de *J. curcas* foi o que promoveu a maior atividade de lipase extracelular (2670 U mL⁻¹) em 96 h de cultivo, enquanto os meios contendo 20 g L⁻¹ de glicose ou 20 g L⁻¹ de melação foram os mais adequados para a produção de lipases intracelulares ligadas a parede das células, com atividade de aproximadamente 600 U mL⁻¹ em 24 h de cultivo e 400 U mL⁻¹ em 48 h, respectivamente.

3.3.1. *Yarrowia lipolytica*

As leveduras do gênero *Yarrowia* são consideradas não patogênicas, possuem aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*), apresentando o certificado GRAS (*Generally Recognized as safe*), portanto, vêm sendo estudadas para obtenção de biomoléculas devido à sua versatilidade e segurança (GROENEWALD et al., 2014). Assim como outras leveduras, as *Yarrowia* se destacam na produção de metabólitos de valor agregado, como por exemplo, ácidos orgânicos (CARSANBA et al., 2019), carotenoides (GRENFELL-LEE et al., 2014), lipases (FABISZEWSKA et al., 2014; YADAV et al., 2011) e lipídeos (BEOPOULOS et al., 2008).

A *Yarrowia lipolytica* tem potencial para a produção de lipase extracelular em cultivos submersos. Assim, a otimização das condições de cultivo pode conduzir ao aumento significativo na síntese dessas enzimas (SZANDRA et al., 2018; YADAV et al., 2011). Para incrementar a produção de lipases é necessário estabelecer as melhores condições de cultivo e composição do meio para cada micro-organismo, pois mesmo pertencendo ao mesmo gênero essas leveduras possuem comportamentos distintos (CORZO; REVAH, 1999; DOMÍNGUEZ et al., 2003; MAGDOULI et al., 2017; NAJJAR et al., 2011; YADAV et al., 2011).

Lopes et al. (2018) cultivaram *Y. lipolytica* W29 empregando de 20 a 80 g L⁻¹ de banha de porco como fonte principal de carbono do meio de cultivo e suplementaram o meio com 5 a 20 g L⁻¹ de goma arábica sendo que a produção de lipase variou de 0,085 a 0,56 U mL⁻¹. A menor atividade enzimática de lipase foi relatada no cultivo contendo 50 g L⁻¹ de banha de porco e 10 g L⁻¹ de goma arábica e a maior no cultivo contendo 20 g L⁻¹ de banha e 10 g L⁻¹ de goma.

Tabela 1 - Substratos usados para produção de lipases por leveduras.

Micro-organismo	Fontes de carbono não lipídicas	Fontes de carbono lipídicas	Surfactantes	Máxima produção de lipase (U mL⁻¹)	Método de determinação de lipase e substrato	Tempo de máxima produção de lipase (h)	Referências
<i>Yarrowia lipolytica</i> CECT 1240	20 g L ⁻¹ glicose	10 g L ⁻¹ óleo de girassol	-	49	Titulométrico (azeite de oliva)	192	DOMÍNGUEZ et al. (2003)
<i>Yarrowia lipolytica</i> CECT 1240	20 g L ⁻¹ glicose	-	10 g L ⁻¹ PEG – 200*	50	Titulométrico (azeite de oliva)	168	DOMÍNGUEZ et al. (2003)
<i>Yarrowia lipolytica</i> YB- 423-12	30 g L ⁻¹ glicose	40 g L ⁻¹ óleo de avelã residual	-	13	Titulométrico (azeite de oliva)	120	SAYGÜN et al. (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i> HL 25	-	50 g L ⁻¹ azeite de oliva	8 g L ⁻¹ Triton X -100	0,074	Espectrofotométrico (p-nitrofenil palmitato)	60	TASKIN et al. (2016)
<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	40 g L ⁻¹ glicerol bruto	-	50 g L ⁻¹ <i>Tween</i> 80	15	Titulométrico (azeite de oliva)	72	MAGDOULI et al. (2017)

Continuação da Tabela 1.

Micro-organismo	Fontes de carbono não lipídicas	Fontes de carbono lipídicas	Surfactantes	Máxima produção de lipase (U mL⁻¹)	Método de determinação de lipase e substrato	Tempo de máxima produção de lipase (h)	Referências
<i>Yarrowia lipolytica</i> SM7	40 g L ⁻¹ glicerol bruto	50 g L ⁻¹ azeite de oliva	-	25	Titulométrico (azeite de oliva)	72	MAGDOULI et al. (2017)
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	-	20 a 80 g L ⁻¹ banha de porco	5 a 20 g L ⁻¹ goma arábica	0,56	Espectrofotométrico (p-nitrofenil butirato)	-	LOPES et al. (2018)
<i>Dipodascus capitatus</i> A4C	10 g L ⁻¹ glicose	10 g L ⁻¹ óleo de palma	-	2627	Espectrofotométrico (óleo de palma)	96	BALOCH et al. (2019)
<i>Dipodascus capitatus</i> A4C	10 g L ⁻¹ glicose	10 g L ⁻¹ óleo de <i>Jatropha curcas</i>	-	2670	Espectrofotométrico (óleo de palma)	96	BALOCH et al. (2019)
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	-	10 a 50 g L ⁻¹ óleos residuais	0 a 50 g L ⁻¹ goma arábica	0,52	Espectrofotométrico (p-nitrofenil butirato)	9	LOPES et al. (2019)

Continuação da Tabela 1.

Micro-organismo	Fontes de carbono não lipídicas	Fontes de carbono lipídicas	Surfactantes	Máxima produção de lipase (U mL⁻¹)	Método de determinação de lipase e substrato	Tempo de máxima produção de lipase (h)	Referências
<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	6 g L ⁻¹ glicose e 0,5 g L ⁻¹ de moléculas da cadeia produtiva do PET**	-	-	0,39	Espectrofotométrico (p-nitrofenil laurato)	24	COSTA et al. (2020)
<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682	-	2,5 g L ⁻¹ óleo residual de fritura	-	4,9	Espectrofotométrico (p-nitrofenil laurato)	75	FRAGA et al. (2021)

* Polietilenoglicol 200 (PEG – 200), ** Politereftalato de etileno – PET (monoetilenoglicol (MEG), ácido tereftálico (TPA), bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET), oligômeros PET, PET amorfo e PET pós-consumo).

Corzo e Revah (1999) investigaram a influência de 20 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono não lipídica, 10 g L⁻¹ de azeite de oliva ou óleo de milho como fonte de carbono lipídica e 0 a 10 g L⁻¹ de *Tween* 80 como surfactantes, assim como temperatura e pH, na produção de lipases por *Y. lipolytica* 681. As concentrações de *Tween* 80 entre 0,5 e 2 g L⁻¹ aumentaram a atividade extracelular das lipases sem alterar a concentração de biomassa. As melhores condições de cultivo foram 30°C, pH inicial de 4,7 e 54 h utilizando o óleo de milho, onde foi obtida máxima atividade enzimática de 18 U mL⁻¹.

Pereira-Meirelles, Rocha-Leão e Sant'anna (2000) estudaram a produção de lipases intracelulares, intracelulares ligadas a parede das células e extracelulares por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando meios com 20 g L⁻¹ de azeite de oliva ou 20 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono. A maior produção de lipases intracelulares para ambos os meios ocorreu em 24 h de cultivo. Após esse período, as lipases intracelulares e intracelulares ligadas às membranas das células foram secretadas nos meios de cultivos. A máxima atividade de lipase extracelular (24.000 U mL⁻¹) foi observada em 150 h de cultivo, na fase estacionária de crescimento, utilizando azeite de oliva.

Domínguez et al. (2003) utilizaram 20 g L⁻¹ de glicose como fonte principal de carbono e investigaram a influência da presença de fontes de carbono lipídicas (ácido oleico, azeite de oliva, butirina e óleo de girassol) e 10 g L⁻¹ de surfactantes (*Tween* 80, Triton X-100, goma arábica e PEG) na síntese de lipase por *Y. lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942). As máximas atividades de lipase foram obtidas utilizando óleo de girassol (57,9 U mL⁻¹), azeite de oliva (48,5 U mL⁻¹) em 192 h de cultivo e óleo de girassol e PEG-200 (49,8 U mL⁻¹) em 168 h.

Yadav et al. (2011) investigaram a produção lipases por *Y. lipolytica* NCIM 3639. Essa cepa produziu lipases intra e extracelulares quando cultivada em 10 g L⁻¹ de azeite de oliva ou 5 a 20 g L⁻¹ *Tween* 80 como fonte de carbono e surfactante, respectivamente. Os melhores resultados de lipase extracelular (15 U mL⁻¹) foram em 48 h de cultivo utilizando 20 g L⁻¹ de *Tween* 80. Atividade extracelular de lipase não foi detectada quando o azeite de oliva foi empregado. Em contraste, a maior produção de lipases intracelulares foi observada com o azeite de oliva (101 U mL⁻¹) em 48 h de cultivo.

De acordo com Najjar et al. (2011), *Y. lipolytica* CBS 7504 foi cultivada em meio contendo 40 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono não lipídica ou 10 g L⁻¹ de azeite de oliva como fonte lipídica e suas combinações (glicose e azeite de oliva). A atividade máxima de lipase (214 U mL⁻¹) foi obtida no meio que continha apenas azeite de oliva em 28 h de cultivo. Quando a glicose foi utilizada como única fonte de carbono, a atividade permaneceu muito

baixa (8 U mL^{-1}). Além disso, as atividades da enzima no meio contendo as duas fontes de carbono foram inferiores (33 U mL^{-1}) aos observados no meio com apenas o azeite.

Magdouli et al. (2017) estudaram cultivos de *Y. lipolytica* SM7 em meio contendo 40 g L^{-1} glicerol residual como fonte principal de carbono e azeite de oliva, óleo vegetal, *Tween* 20, *Tween* 80 ou Triton X-100 como indutores da produção de lipases. As máximas produções da enzima foram observadas em 48 e 72 h do cultivo para qualquer indutor empregado. As melhores atividades de lipases foram 525 %, 461 % e 275 % maiores nos ensaios com 40 g L^{-1} de azeite de oliva, 40 g L^{-1} óleo vegetal e 50 g L^{-1} de *Tween* 80, respectivamente, comparado ao cultivo apenas com o glicerol residual em 72 h.

Em outro estudo, Lopes et al. (2019) investigaram a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* W29 utilizando 10 a 50 g L^{-1} óleos residuais de cozinha como fonte principal de carbono e suplementou o meio de cultivo com goma arábica de 0 a 50 g L^{-1} . A atividade enzimática variou de $0,064 \text{ U mL}^{-1}$, para o cultivo com 50 g L^{-1} de óleo residual e 10 g L^{-1} de goma arábica, a $0,52 \text{ U mL}^{-1}$ para o cultivo com 50 g L^{-1} de óleo residual e 5 g L^{-1} de goma.

Fraga et al. (2021) estudaram a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 empregando como fonte principal de carbono $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de diferentes subprodutos da produção de óleo de palma (Destilado Desodorizante de Óleo de Palma - DDOP, óleo de palma residual de fritura – OPRF, óleo residual de fritura do comércio local ORFCL ou óleo de palma – OP). ORFCL proporcionou a maior atividade de $4,9 \text{ U mL}^{-1}$ em 75 h de cultivo. Em 48 h de cultivo, DDOP apresentou $2,3 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade de lipase.

Alguns autores ainda mostraram que a produção de lipases pela *Y. lipolytica* não ocorre sem a adição de substrato lipídico. Fabiszewska et al. (2014) concluíram que a utilização de glicerol, como fonte de carbono para a crescimento da *Y. lipolytica* KKP 379, é possível em cultivo submerso, mas a produção da enzima não ocorreu sem a adição de substrato lipídico. Além disso, a presença de moléculas indutoras da síntese de lipase no meio de cultivo de leveduras é uma estratégia que vem sendo adotada para aumentar a síntese e excreção de lipase para o meio (CORZO; REVAH, 1999; MAGDOULI et al., 2017). Triacilgliceróis, ácidos graxos ou surfactantes mostraram aumento na atividade de lipase (FABISZEWSKA et al., 2014; MAGDOULI et al., 2017; SAYGÜN et al., 2014). Desta forma, mudanças nesses fatores podem influenciar positivamente a síntese de lipases.

Os surfactantes como *Tween* 20, *Tween* 80, Triton X-100 e PEG podem ser utilizados como emulsificantes nos meios para produção de lipase, com a finalidade de obter alterações na permeabilidade da parede celular ou efeito do surfactante na estrutura da enzima (CORZO; REVAH, 1999; LI et al., 2019; MESA et al., 2018; ZAREVÚCKA et al., 2012).

Além disso, como os substratos lipídicos empregados para a produção de lipase são insolúveis em água, os surfactantes auxiliam na emulsão de óleos e gorduras no meio de cultivo, facilitando a hidrólise desses compostos na interface óleo-água pelas lipases (BYREDDY et al., 2017).

Ping et al. (2018) avaliaram diferentes temperaturas (20 a 70 °C), pH iniciais (4,0 a 9,0) e concentrações (20 a 60 g L⁻¹) de fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, água de maceração de milho, sulfato de amônia, farinha de feijão e extrato de carne) na produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* Wt-11 e *Y. lipolytica* Mut-16. A melhor fonte de nitrogênio, para ambas as cepas foi 40 g L⁻¹ de farinha de feijão. O pH 6,0 foi o ideal para aumentar a atividade de lipase obtendo 5 U mL⁻¹ e 12 U mL⁻¹ para *Y. lipolytica* Wt-11 e *Y. lipolytica* Mut-96, respectivamente. Para ambas as cepas, o pH 6,0 e 28° C foram estabelecidos para o cultivo.

3.4. CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOPROCESSOS

A aplicação de CM em micro-organismos não é um tema recente. Moore (1979) avaliou os efeitos biológicos da presença de CM com intensidades que variaram de 5 a 90 mT e frequência com forma de ondas triangulares ou senoidais que variaram entre 0 a 0,3 Hz em quatro cepas de bactérias e uma de levedura. O crescimento das duas bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Halobacterium salinarum*) foi mais evidenciado pela exposição aos CM, do que as duas bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*) ou da levedura (*Candida albicans*). Embora a morte dos micro-organismos por CM não tenha sido observada no estudo, ocorreu inibição suficiente do crescimento microbiano para indicar que os CM podem alterar a concentração de células.

Estudos mais recentes tem buscado e evidenciado estímulos positivos na produção de diversas biomoléculas, com a aplicação de CM moderados em cultivos microbianos (Tabela 2). Alguns exemplos são produção de biomassa e glutatona (GSH) por *Saccharomyces cerevisiae* com CM entre 25 e 34,3 mT (SANTOS et al., 2010), lipases por *Yarrowia lipolytica* entre 2 e 11 mT (DAVID et al., 2016), lipídeos e pigmentos por *Chlorella homosphaera* com aplicação de 15, 30 e 60 mT (COSTA et al., 2020).

Gemishev et al., (2009) aplicaram CM (5, 10, 30 ou 70 mT) nos inóculos de *Trichoderma reesei* M7 por 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹ e, posteriormente, realizaram cultivos submersos (120 h) com a finalidade de avaliar os efeitos dos CM na atividade de endoglucanase. CM entre 5 e 30 mT aplicados por 24 h nos inóculos aumentaram a atividade da enzima e síntese de

proteínas nesse micro-organismo entre 48 e 120 h de cultivo. Além disso, houve incremento de 27,4 % na atividade da enzima (79 U mL^{-1}) quando 10 mT foi aplicado no inóculo por 24 h.

Santos et al. (2010) aplicaram CM que variaram entre 25 e 34,3 mT em cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 durante as primeiras 8, 12 e 16 h de cultivo. A maior produção de GSH ocorreu quando 25 mT (8 e 16 h) e 34,3 mT (16 h) foram aplicados nos cultivos submersos. O tempo de exposição e intensidade de CM influenciaram a produção de GSH.

Canli et al. (2011) avaliaram a aplicação de CM na produção de invertase pela levedura *Rhodotorula glutinis*. Intensidades de 0 mT, ou seja, ausência de CM proporcionado pelo isolamento da gaiola de Faraday, 7 mT gerado por bobina cilíndrica de cobre e o experimento controle, feito sob intensidade do CM terrestre, foram avaliados. O CM foi aplicado por 72 h nos inóculos que posteriormente foram inoculados em meio submerso que permaneceram em agitador orbital por 120 h. Incremento de 49 % (21 U mL^{-1}) e 67 % (24 U mL^{-1}) foi evidenciado na produção de invertase em 72 h de cultivo nos cultivos com gaiola de Faraday (0 mT) e CM aplicado por bobina (7 mT), respectivamente, comparado ao controle. A produção de biomassa foi incrementada em 14 % no cultivo com 0 mT e 28 % com 7 mT.

Canli e Kurbanoglu (2011) investigaram os efeitos da aplicação de 4 e 7 mT na produção de inulinase por *Geotrichum candidum* OC-7. Os CM foram gerados por bobinas de cobre e aplicados durante todo o cultivo de 120 h. Os melhores resultados ($535,2 \text{ U g}^{-1}$) foram constatados em 72 h de cultivo, representando aumento de 29,9 % comparado ao controle (sem CM).

Taskin et al. (2013) realizaram a triagem de 5 cepas de *Aspergillus niger* com aplicação de CM gerado por bobina cilíndrica de cobre (0,45; 3; 5; 7 e 9 mT) e diferentes tempos de exposição (120, 144, 168 e 196 h). A concentração de biomassa e a atividade de invertase de todas as cepas aumentaram com a elevação da intensidade de 0,45 para 5 mT e, diminuíram quando a intensidade aumentou de 5 para 9 mT. Os melhores resultados foram obtidos com *A. niger* OZ-3, com máxima atividade de invertase ($50,57 \text{ U mL}^{-1}$) e concentração de biomassa ($4,56 \text{ g L}^{-1}$) com aplicação de 5 mT no inóculo por 144 h.

Corzo e Revah (1999) investigaram a influência de 20 g L^{-1} de glicose como fonte de carbono não lipídica, 10 g L^{-1} de azeite de oliva ou óleo de milho como fonte de carbono lipídica e 0 a 10 g L^{-1} de Tween 80 como surfactantes, assim como temperatura e pH, na produção de lipases por *Y. lipolytica* 681. As concentrações de Tween 80 entre 0,5 e 2 g L^{-1} aumentaram a atividade extracelular das lipases sem alterar a concentração de biomassa. As

melhores condições de cultivo foram 30°C, pH inicial de 4,7 e 54 h utilizando o óleo de milho, onde foi obtida máxima atividade enzimática de 18 U mL⁻¹.

Tabela 2 – Aplicação de CM no cultivo de diferentes micro-organismos.

Micro-organismo	Intensidade (mT)	Tempo exposição	Aplicação de CM	Resposta positiva	Referências
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	220	24 h	Imãs de neodímio	Incremento da biomassa e bioetanol	MOTTA et al. (2004)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	20	24, 48 ou 72 h	Imãs de ferrite	Incremento da produção de glutatona	SANTOS et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i> OZ-3	3, 5, 7 ou 9	120, 144, 168 ou 196 h	Bobina cilíndrica de cobre	Incremento da atividade de invertase	TASKIN et al. (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-1095	2, 6 ou 11	24 h	Bobina de Helmholtz	Incremento da atividade de lipase	DAVID et al. (2016)
<i>Chlorella minutissima</i>	30	12 d	Imãs de ferrite	Incremento de biomassa e carboidratos	MENESTRINO et al. (2020)
<i>Chlorella homosphaera</i>	15, 30 ou 60	1 h d ⁻¹ ou 24 h d ⁻¹	Imãs de ferrite	Incremento de biomassa e lipídeos	COSTA et al. (2020)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	30 ou 60	16 d	Imãs de ferrite	Incremento de biomassa	VEIGA et al. (2020)
<i>Phaffia rhodozyma</i> NRRL Y-17268	30	24, 48, 72, 96, 120, 144 ou 168 h	Imãs de ferrite	Incremento de carotenoides	SILVA et al. (2020)
<i>Tribonema</i> sp.	30	10 d	Imãs de ferrite	Incremento de biomassa e lipídeos	HUO et al. (2020)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	30	1, 12 ou 24 h d ⁻¹	Imãs de ferrite ou solenoides	Incremento de biomassa e lipídeos	MENESTRINO et al. (2021)
<i>Limnospira indica</i> PCC8005	11	1 h d ⁻¹ ou 24 h d ⁻¹	Bobina cilíndrica de cobre	Incremento de biomassa e proteínas	DEAMICI et al. (2022)

Entretanto, as respostas ao CM nem sempre são lineares, ou seja, os efeitos nas células e na formação de biomoléculas, podem ser estimuladores, inibitórios ou não causarem nenhuma alteração quando aplicado aos cultivos, dependendo da intensidade, tempo de exposição e espécie do micro-organismo (DAVID et al., 2016; SANTOS et al., 2010). De acordo com Albuquerque et al. (2016), a aplicação de CM pode causar efeitos na morfologia das células e componentes intracelulares devido à orientação de biomoléculas (paramagnéticas ou ferromagnéticas) com as linhas do campo. Segundo os autores, membranas, microtúbulos celulares e proteínas podem receber torques devido à reorientação causada pelo CM e, conseqüentemente, modificam a permeabilidade da membrana celular, melhorando o transporte de substrato e produto entre o citoplasma.

Boeira et al. (2021) avaliaram os efeitos da aplicação de 35 mT na fermentação alcoólica da *Saccharomyces cerevisiae* US-05. Alterações significativas na morfologia da parede celular da levedura foram constatadas. Tang et al. (2019) avaliaram a exposição da bactéria *Flavobacterium* sp. m1-14 a 100 mT por 24, 48, 72 ou 120 h de cultivo e o comprimento da célula aumentou em 123 %, 258 %, 70,1 % e 31,2 %, respectivamente.

Outros estudos têm mostrado que a aplicação de CM em sistemas biológicos pode causar destruição ou substituição de nucleotídeos no DNA, promovendo alterações da sua integridade e da expressão gênica (AMARA et al., 2007), alteração no processo de transcrição, assim como no processo de tradução (PAUL; FERL; MEISEL, 2006). Albuquerque et al. (2016) ainda relataram que a influência dos CM no DNA pode estar relacionada a fatores de estresse diretamente influenciados pelo CM ou indiretamente pelo estresse oxidativo induzido.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE

A temperatura e o pH desempenham papel importante na atividade de todas as enzimas. A literatura evidência faixas variadas de pH e temperaturas ótimas para lipases obtidas de diferentes fontes microbianas. As lipases microbianas, em particular as obtidas a partir de cultivos de *Y. lipolytica*, possuem pH ótimo entre 6 e 8 e temperatura ótima entre 35 e 37 °C. Fickers et al. (2006) avaliaram a temperatura e pH ótimos para *Y. lipolytica* CBS6303 e relataram pH ótimo 7 para a lipase contida no sobrenadante, pH 6 para enzima após secagem em *spray dryer* e temperatura ótima de 37 °C para ambos os casos. Aloulou et al. (2007) estudaram o efeito do pH na lipase produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginos* e na levedura *Y. lipolytica* e constataram pH ótimo de 9 e 7, respectivamente.

Em outro estudo, Yu et al. (2007) expressaram o gene Lip2 da *Y. lipolytica* em *Pichia pastoris* e observaram 8 como pH ótimo e temperatura ótima de 40 °C. Gururaj et al. (2016) encontraram pH ótimo de 8 e temperatura de 50 °C para lipase produzida pela bactéria *Acinetobacter* sp. AU07. Carvalho et al. (2017) produziram e caracterizaram lipase obtida em cultivos de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e relataram pH ótimo 6 e temperatura ótima de 35 °C para a enzima. Nunes et al. (2021) caracterizaram lipase produzida por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e as condições ótimas de pH e temperatura foram 7 e 37 °C, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi feito no Laboratório de Biotecnologia (BIOTEC) e Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MIBI) da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1. MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA

O estudo foi realizado com a levedura *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095 cedida pelo *Northern Regional Research Laboratory* (Peoria, USA), a qual se encontra armazenada no MIBI da FURG em meio ágar *Yeast and Malt* (YM) com composição em (g L⁻¹): 10 de glicose, 5 de peptona, 3 de extrato de levedura, 3 de extrato de malte e 20 de ágar, em tubo inclinado a 5 °C e pH 6,0. Para a manutenção da cepa foram feitos repiques da levedura em tubos inclinados a cada 60 dias utilizando o meio para manutenção da viabilidade celular do micro-organismo.

4.2. PREPARO DO INÓCULO

Dois tubos inclinados de cultura microbiana de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 foram raspados com 10 mL de água destilada estéril em cada tubo, para remoção de células e estas foram transferidas para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL totalizando 200 mL (180 mL de meio de cultivo e 20 mL de inóculo). A composição do meio de cultivo do inóculo foi em g L⁻¹: 40 de glicose; 8 de KH₂PO₄; 0,5 de MgSO₄.7H₂O e 3 de extrato de levedura e pH inicial 6,0 de acordo com Frengova et al. (1994). Os frascos foram mantidos em agitador orbital a 180 rpm, 28 °C durante 24 h. A padronização da concentração do inóculo foi feita por densidade óptica (OD) a 600 nm em espectrofotômetro e os cultivos iniciaram com 20 mL de inóculo contendo concentração de biomassa média de 3,78 ± 0,20 g L⁻¹.

4.3. ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR

Os cultivos foram feitos em agitador rotativo a 180 rpm utilizando frascos *Erlenmeyer* (500 mL) contendo volume final de 200 mL (meio e inóculo) onde os componentes do meio não avaliados foram fixados de acordo com Frengova et al. (1994) modificado pela

adição de azeite de oliva e Triton X-100, conforme Tabela 3. Os cultivos foram conduzidos a 28 °C, pH inicial 6,0, 10 % de inóculo (v v⁻¹), durante 120 h.

Tabela 3 - Composição do meio de cultivo para o estudo da produção de lipase.

Composto	Concentração (g L⁻¹)
Glicose	10 a 30
KH ₂ PO ₄	8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	3
Azeite de oliva	5 a 15
Triton X-100	2 a 8

A Tabela 4 apresenta os níveis codificados e reais (entre parênteses) das variáveis independentes que foram estudadas. Para este estudo foi feito delineamento composto central (DCC) 2³ com três pontos centrais totalizando 11 ensaios.

Tabela 4 - Matriz do DCC 2³ com valores reais e codificados.

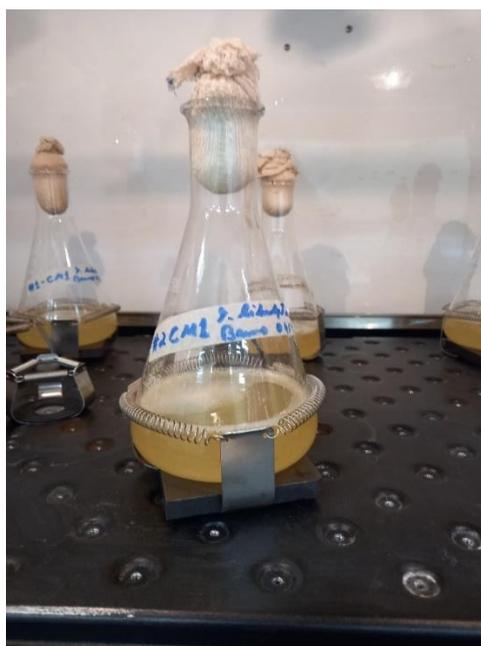
Ensaio	Glicose (g L⁻¹)	Azeite de oliva (g L⁻¹)	Triton X-100 (g L⁻¹)
1	-1 (10)	-1 (5)	-1 (2)
2	1 (30)	-1 (5)	-1 (2)
3	-1 (10)	1 (15)	-1 (2)
4	1 (30)	1 (15)	-1 (2)
5	-1 (10)	-1 (5)	1 (8)
6	1 (30)	-1 (5)	1 (8)
7	-1 (10)	1 (15)	1 (8)
8	1 (30)	1 (15)	1 (8)
9	0 (20)	0 (10)	0 (5)
10	0 (20)	0 (10)	0 (5)
11	0 (20)	0 (10)	0 (5)

A concentração de biomassa, açúcares redutores e pH foram parâmetros acompanhados durante o planejamento, todavia, a resposta avaliada no delineamento experimental foi a atividade de lipase extracelular (U mL⁻¹).

4.4. PRODUÇÃO DE LIPASE COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

Após a determinação da melhor composição do meio de cultivo foi avaliada a influência dos CM com intensidade média de 30 mT gerados por ímãs de ferrite acoplados às bases dos frascos (Figura 1). Nos cultivos os CM foram aplicados nos tempos de 0 – 72 h, 72 – 144 h e 0 – 144 h. Todos os cultivos foram feitos em triplicata. O cultivo controle foi feito nas melhores condições obtidas pelo delineamento experimental, porém sem a aplicação de CM. Amostras foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h e as respostas avaliadas nesses tempos foram a atividade enzimática de lipase extracelular ($U\ mL^{-1}$), concentração de açúcares redutores ($g\ L^{-1}$), concentração de biomassa ($g\ L^{-1}$) e pH. Ao final do cultivo as características cinéticas da enzima também foram avaliadas.

Figura 1 - Cultivos com aplicação de campo magnético gerados por ímãs de ferrite acoplados na base dos frascos *Erlenmeyer*.



4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi quantificada em espectrofotômetro (QUIMIS Q998U, Brasil) por densidade óptica (OD) a 600 nm. Para tal, as amostras foram centrifugadas a 2034 x g por 20 min e a biomassa ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada.

A densidade ótica foi convertida para biomassa seca utilizando curva padrão da levedura (Figura A1 do Apêndice).

4.5.2. Determinação de atividade de lipase extracelular

A atividade enzimática foi determinada pela hidrólise do substrato p-nitrofenil-palmitato (pNPP), com liberação de p-nitrofenol e ácido graxo (SILVA et al., 2005). Um volume de 0,10 mL do extrato enzimático bruto (sobrenadante) foi filtrado em membrana filtrante 0,45 µm. O sobrenadante obtido foi misturado em 0,9 mL da solução de substrato contendo para 100 mL: 30 mg de pNPP diluído em 10 mL de iso-propanol, 400 mg de Triton X-100 e 100 mg de goma arábica diluídos em 90 mL de tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A reação ocorreu a 37 °C por 30 min. Após o término da reação, a absorbância das amostras foi medida por espectrofotômetro (QUIMIS Q998U, Brasil) a 410 nm e relacionada com curva padrão de p-nitrofenol 0,14 mM (Figura A2 do Apêndice). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 nmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de reação estudadas.

4.5.3. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi feita no sobrenadante do cultivo utilizando o método espectrofotométrico (QUIMIS Q998U, Brasil) do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959), a 540 nm. Para a correlação com os resultados obtidos durante a fermentação foi utilizada curva padrão de glicose (Figura A3 do Apêndice).

4.5.4. Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada no sobrenadante do cultivo, utilizando pHmetro (KASVI K39-2014B, Brasil) de bancada (AOAC, 2000).

4.5.5. Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi feita utilizando o método de Lowry (LOWRY et al., 1951) empregando espectrofotômetro (QUIMIS Q998U, Brasil) com leitura a 750 nm, empregando curva padrão de albumina de soro bovino (Figura A4 do Apêndice).

4.5.6. Caracterização da lipase

As condições ótimas da atividade de lipase foram estabelecidas de acordo com descrito por Yadav et al. (2011). O pH ótimo da enzima foi determinado medindo a atividade enzimática da lipase a 37 °C em diferentes valores de pH (pH 3, 5, 7 e 9). Os tampões fosfato de citrato 50 mM pH 3, 4, 5 e 6 e o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7, 8 e 9 foram utilizados. A temperatura ótima da enzima foi determinada medindo a atividade da enzima em diferentes temperaturas (25, 37, 45 e 55 °C) em tampão tris-HCl 50 mM pH 8. A temperatura e pH ótimos foram determinados no cultivo com CM, no qual foram obtidas as maiores atividades enzimáticas, assim como no cultivo controle (sem CM).

Os parâmetros cinéticos da lipase produzida no cultivo com aplicação do CM, como velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) e constante de Michaelis (K_m) foram avaliados utilizando os métodos de ajustes lineares de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf, conforme a Equações 1, 2 e 3, respectivamente. A determinação dos parâmetros foi feita utilizando pNPP (0,1 a 1,2 mM) como substrato.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad (1)$$

$$V_0 = \frac{-K_m \cdot V_0}{[S_0]} + V_{\text{máx}} \quad (2)$$

$$\frac{[S_0]}{V_0} = \frac{[S_0]}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \quad (3)$$

4.6. PARÂMETROS CINÉTICOS DO CULTIVO

A produtividade (P) de lipase ($\text{U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi obtida a partir da equação 4, onde A é a atividade de lipase (U mL^{-1}) ou biomassa (g L^{-1}) no tempo final do cultivo t (h) e A_0 é a atividade enzimática de lipase (U mL^{-1}) ou biomassa (g L^{-1}) no tempo inicial t_0 (h).

$$P = \frac{A - A_0}{t - t_0} \quad (4)$$

A equação 5 foi utilizada para determinação da eficiência do CM na produção de biomassa e atividade de lipase. Onde E é a eficiência da aplicação de CM (%), C_{CM} e C_C são respostas com aplicação de CM e controle, respectivamente.

$$E (\%) = \left(\frac{C_{CM} - C_C}{C_C} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

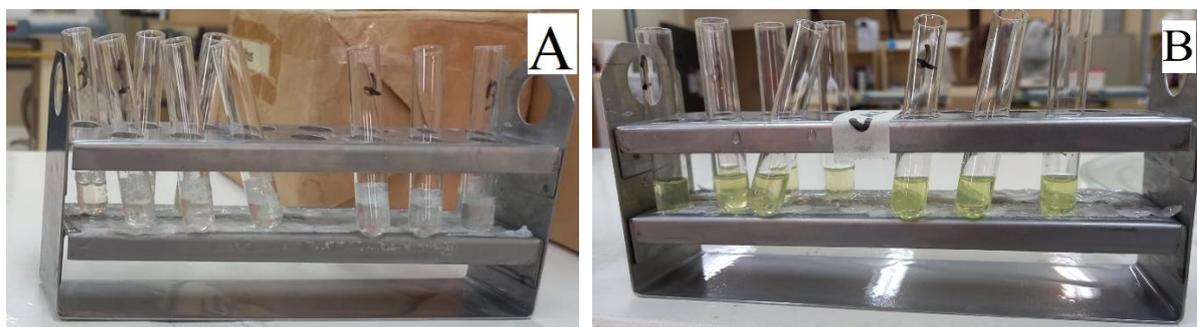
O planejamento experimental foi avaliado pelo Statistica versão 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Resultados obtidos (concentração de açúcares redutores, concentração de biomassa, atividade enzimática de lipase, parâmetros cinéticos de cultivo e caracterização enzimática) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido de teste post-hoc Tukey, sendo considerados valores significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DO MEIO DE CULTIVO

Diversos estudos relataram que a produção de lipase microbiana intracelular ou extracelular é influenciada pela fonte de carbono lipídica, não lipídica e a presença de surfactantes. Assim, o DCC 2³ foi empregado para estudar a influência da concentração das fontes de carbono não lipídica (glicose), lipídica (azeite de oliva) e do surfactante Triton X-100 no meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095. As variáveis estudadas no DCC 2³, seus níveis codificados e reais e a matriz dos ensaios realizados estão apresentados na Tabela 4. O método utilizado para a determinação da atividade enzimática de lipase foi a hidrólise do substrato pNPP, conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Reação da hidrólise do pNPP. (A) Antes da reação os tubos contendo os reagentes e o extrato não apresentam coloração. (B) Após a reação ocorre a hidrólise do substrato e liberação do p-nitrofenol (tonalidade amarelada).

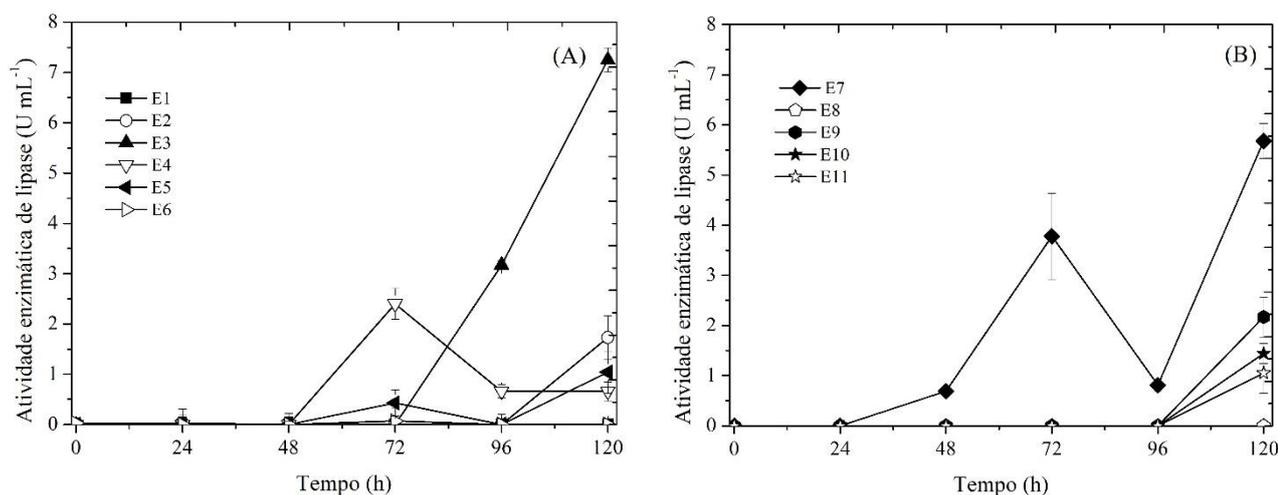


A Figura 3 e a Tabela A1 (Apêndice) apresentam os resultados de atividade enzimática de lipase extracelular ao longo do cultivo (120 h). A maior atividade enzimática foi 7,25 U mL⁻¹ em 120 h no ensaio 3 (10 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 2 g L⁻¹ de Triton X-100). No ensaio 7 (10 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 8 g L⁻¹ de Triton X-100) foi obtido 5,68 U mL⁻¹ ao final do cultivo. Todavia, nos ensaios E1, E6 e E7 a produção da enzima, aparentemente, foi inibida ao longo de todo o cultivo. As maiores concentrações de glicose estudadas (20 e 30 g L⁻¹) podem ter inibido a síntese de lipase pela *Y. lipolytica*. Como citado por Najjar et al. (2011) os quais constataram que a glicose atuou como repressor da síntese de lipase por *Y. lipolytica* CBS 7504 e os níveis da enzima permaneceram baixos até esse substrato ser consumido. Esses autores ainda evidenciaram que a produção da enzima, nessa levedura, foi dependente de uma fonte de substrato lipídico. A ausência de produção de lipase nas primeiras 48 h de cultivo provavelmente esteja associada ao consumo

preferencial do substrato utilizado no meio de cultivo, ou seja, a levedura consome primeiro glicose e, posteriormente, o azeite de oliva que atua como indutor da síntese da enzima.

Além disso, a inibição da produção de lipase pode estar associada à concentração de indutor (azeite de oliva) utilizado nos cultivos. Como observado na Figura 3, os ensaios (E1, E2, E5, E6, E9, E10 e E11) que continham as menores concentrações de azeite de oliva (5 ou 10 g L^{-1}) apresentaram pouco ou nenhuma atividade durante todo o tempo de cultivo, indicando que a concentração de 15 g L^{-1} desse composto influenciou de forma positiva a síntese de lipase extracelular por *Y. lipolytica* Y-1095.

Figura 3 - Atividade enzimática de lipase dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental para estudo do meio de cultivo na produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.



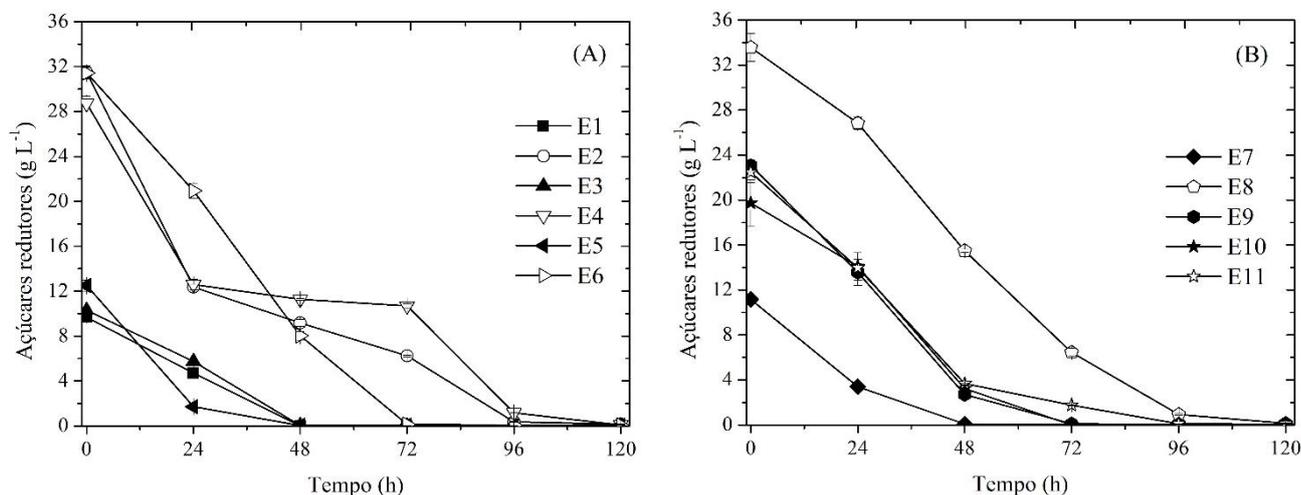
Os resultados de atividade enzimática de lipase foram superiores aos reportados por diversos autores que estudaram a produção dessa enzima em leveduras e empregaram derivados do p-nitrofenil (butirato, laurato ou palmitato) como substrato da lipase para determinação da atividade enzimática. Taskin et al. (2016) utilizaram a levedura *Rhodotorula glutinis* HL 25 para a produção de lipase em 50 g L^{-1} azeite de oliva e 8 g L^{-1} de Triton X - 100 relataram máxima atividade de $0,074 \text{ U mL}^{-1}$. Lopes et al. (2018) empregado planejamento experimental conseguiram $0,56 \text{ U mL}^{-1}$ de máxima atividade da lipase quando empregaram 20 g L^{-1} de banha de porco e 10 g L^{-1} de goma arábica nos cultivos de *Y. lipolytica* W29. Em outro estudo, Lopes et al. (2019) também utilizaram planejamento experimental para a produção de lipase por *Y. lipolytica* W29 e obtiveram máxima atividade de $0,52 \text{ U mL}^{-1}$ para o cultivo contendo 50 g L^{-1} de óleo residual de fritura e 5 g L^{-1} de goma arábica.

Fraga et al. (2018) utilizaram a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 para produzir lipase empregando $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de óleo residual de fritura como fonte de carbono e obtiveram $4,73 \text{ U mL}^{-1}$ como máxima atividade. Costa et al. (2020) observaram máxima atividade de lipase por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 de $0,39 \text{ U mL}^{-1}$ utilizando 6 g L^{-1} glicose e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de politereftalato de etileno (PET) como fonte de carbono. . Em outro estudo, Fraga et al. (2021) conseguiram máxima atividade de lipase de $4,9 \text{ U mL}^{-1}$ quando empregado $2,5 \text{ g L}^{-1}$ óleo residual de fritura como único substrato para a *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682.

Portanto, a *Y. lipolytica* NNRL Y-1095 possui a capacidade de consumir a glicose como fonte de carbono para produzir lipase extracelular. Todavia, dependendo da concentração utilizada e presença de substratos lipídicos podem ser fatores limitantes da síntese da enzima. Além disso, a queda na produção de lipase em 72 h nos ensaios E4 e E7 possivelmente esteja associada a produção de proteases extracelulares, como citado por Pereira-Meirelles; Rocha-Leão; Sant'anna, (2000) que relataram inibição da síntese dessa enzima com o aumento da produção de protease ao longo do cultivo da *Y. lipolytica*.

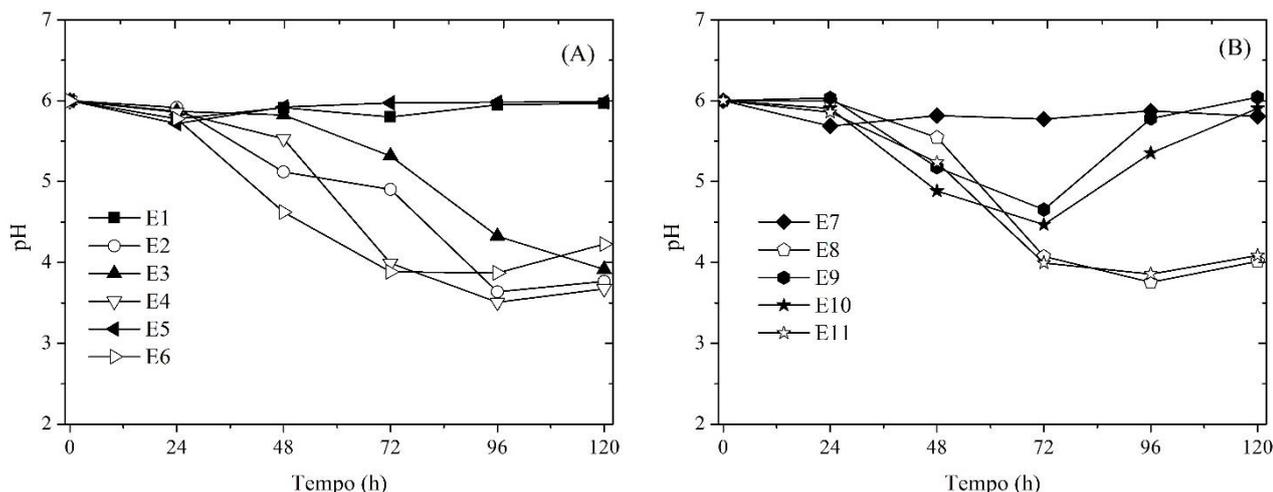
Na Figura 4 e Tabela A2 (Apêndice) estão apresentados os resultados da concentração de glicose durante as 120 h de cultivo. A glicose foi totalmente consumida pela levedura nas primeiras 48 h de cultivo quando 10 g L^{-1} foram utilizados (E1, E3 E5 e E7). Quando 20 g L^{-1} de glicose foram utilizados (E9, E10 e E11) a fonte de carbono foi totalmente consumida pela levedura em 96 h de cultivo, o que também foi constatado nos ensaios como 30 g L^{-1} de glicose (E2, E6 e E8). Todavia, no ensaio que continha as maiores concentrações de glicose (30 g L^{-1}) e azeite (15 g L^{-1}) a glicose foi totalmente consumida em 120 h.

Figura 4 - Concentração de açúcares redutores dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.



Os valores de pH durante as 120 h de cultivo estão apresentados na Figura 5 e na Tabela A3 (apêndice). O pH final dos cultivos variou de 3,7 a 5,9 e foi menor que o pH inicial (6). Os cultivos contendo 10 g L⁻¹ de glicose (E1, E5 e E7) apresentaram pouca variação de pH durante todo cultivo. Em contrapartida, os ensaios do ponto central (E9 e E10), que continham concentração de 20 g L⁻¹ de glicose tiveram diminuição do pH ao longo do cultivo. Todavia, até o final das 120 h o pH aumentou e permaneceu próximo de 6. Os ensaios E2, E4 e E8, que continham a maior concentração de glicose (30 g L⁻¹) apresentaram os menores valores de pH ao final dos cultivos, sendo 3,8; 3,7 e 4,0, respectivamente.

Figura 5 - Valores de pH dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.



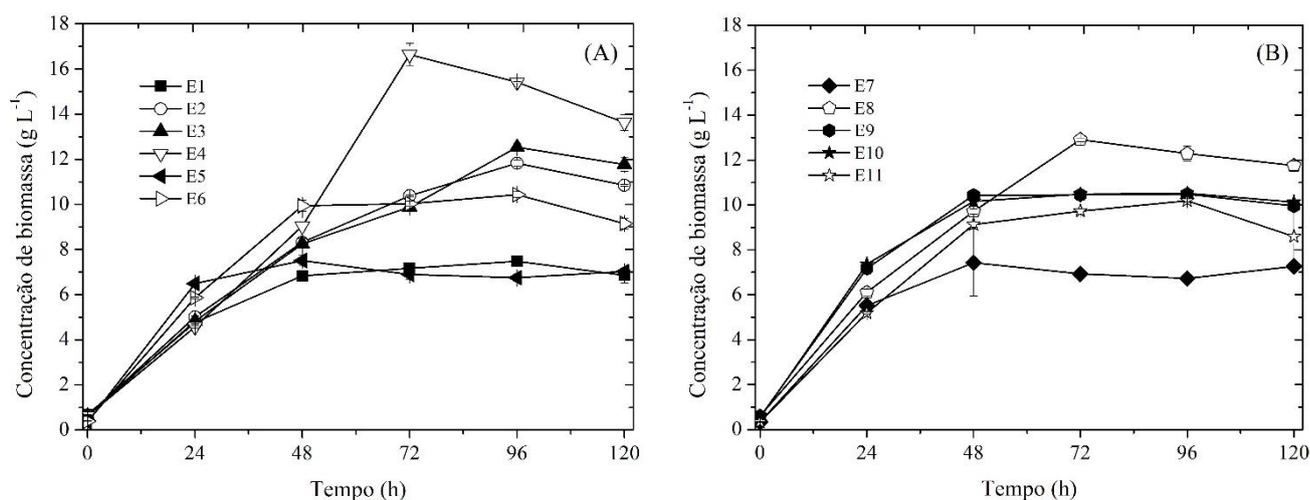
A concentração inicial de glicose pode influenciar o pH ao longo do cultivo da *Y. lipolytica* Y-1095. Já a concentração ou presença do azeite de oliva ou Triton X-100 não parece influenciar esse parâmetro, pois foi constatado comportamento semelhante do pH para diferentes concentrações desses compostos, por exemplo, entre os ensaios E2 (30 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de azeite de oliva e 2 g L⁻¹ de Triton X-100) e E8 (30 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 8 g L⁻¹ de Triton X-100), apresentaram queda do pH com elevada concentração de glicose. Os ensaios E1 (10 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de azeite de oliva e 2 g L⁻¹ de Triton X-100), E5 (10 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de azeite de oliva e 8 g L⁻¹ de Triton X-100) e E7 (10 g L⁻¹ de glicose, 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 8 g L⁻¹ de Triton X-100), apresentaram comportamento semelhante em termos de pH durante o cultivo para diferentes concentrações de azeite de oliva e Triton X-100, entretanto, a concentração inicial de glicose foi a mesma para todos os ensaios. Além disso, nos ensaios E1 e E5, correspondentes aos menores níveis do

planejamento experimental para o azeite de oliva e glicose, apresentaram pH constante durante o tempo de cultivo, podendo estar relacionado a menores concentrações de ácidos orgânicos produzidos pelo consumo destes substratos.

Portanto, a concentração inicial de glicose demonstrou ser a variável que mais influenciou o pH durante as 120 h de cultivo da *Y. lipolytica* Y-1095. Além disso, a diminuição do pH pode ser decorrente do consumo do substrato e produção de ácidos orgânicos pela levedura, como observaram Li et al. (2019). Logo nos cultivos com maiores concentrações de glicose houve maiores produções de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, resultaram em menores valores de pH ao final do cultivo.

Na Figura 6 e Tabela A4 (Apêndice) são apresentadas as concentrações de biomassa ao longo do cultivo (120 h) nas diferentes condições do planejamento experimental e ocorreu crescimento da levedura em todas as condições estudadas. A máxima concentração de biomassa ($16,64 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida em 72 h de cultivo no ensaio 4, contendo 30 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de azeite de oliva e 2 g L^{-1} de Triton X-100. Em contrapartida, a menor concentração ao final do cultivo ($6,85 \text{ g L}^{-1}$) foi observada no ensaio 1, contendo em g L^{-1} : 10 glicose, 5 de azeite de oliva e 2 Triton X-100. Isto pode estar associado as menores concentrações de fontes de carbono (azeite de oliva e glicose) quando comparado aos demais ensaios.

Figura 6 - Concentração de biomassa dos ensaios E1 a E6 (A) e E7 a E11 (B) do planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.



Os cultivos E4 e E8 continuam as maiores concentrações de glicose (30 g L^{-1}) e azeite de oliva (15 g L^{-1}) e, a partir das 72 h, apresentaram as maiores concentrações de biomassa (Figura 6). Em contrapartida, os ensaios E2 e E6 também continuam 30 g L^{-1} de

glicose, entretanto, apenas 5 g L⁻¹ de azeite de oliva e nestas condições as concentrações de biomassa ao longo do cultivo foram inferiores as relatados nos ensaios contendo a mesma concentração de glicose e maior concentração de azeite de oliva (E4 e E8). Além disso, os ensaios E1, E5 e E7 continham as menores concentrações de glicose (10 g L⁻¹) e concentrações variadas de azeite de oliva (5 g L⁻¹ para E1 e E5; 15 g L⁻¹ para E7) apresentando as menores concentrações de biomassa ao longo de todo o cultivo.

Segundo Saygün et al. (2014) ao cultivar *Y. lipolytica* YB 423-12 na presença de glicose e diferentes fontes lipídicas, como óleos de colza, gergelim, linhaça ou truta obtiveram máximas concentração de biomassa de 25,14 g L⁻¹, 23,91 g L⁻¹, 26,67 g L⁻¹ e 20,48 g L⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que essas fontes lipídicas foram fundamentais para o incremento da biomassa da levedura, visto que quando apenas a glicose esteve presente no meio de cultivo a máxima concentração de biomassa foi 14,41 g L⁻¹. No cultivo da levedura *Y. lipolytica*, Chai et al. (2019) utilizaram 10 g L⁻¹ glicose e de 20 a 40 g L⁻¹ óleo de colza como fontes de carbono do meio de cultivo. A máxima concentração de biomassa de 10 g L⁻¹ foi obtida com a maior concentração de óleo.

Esses resultados mostram que o aumento da concentração de biomassa está relacionado à concentração de substrato. Assim, quanto maior a concentração de azeite de oliva e glicose no meio de cultivo, maior será o incremento da concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095.

Na Tabela 5 estão apresentados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios para a atividade enzimática de lipase, utilizando erro global, sem exclusão dos termos não significativos. Constatou-se que o Triton X-100 e a interação entre a concentração de glicose e Triton X-100 e interação entre azeite de oliva e Triton X-100 não foram significativos.

Com a finalidade de avaliar se os dados obtidos são preditivos, realizou-se o teste de distribuição F. Na Tabela 6 é apresentada a análise de variância (ANOVA) para os ensaios do DCC. Optou-se por utilizar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, sendo estes, incorporados aos resíduos, com percentual de variação explicada (R²) de 0,92 e o valor de F_{calculado} foi maior que o F_{tabelado}. Como o valor de F_{calculado} (9,70) é maior que o de F_{tabelado} (3,07), confirma-se que o modelo obtido é preditivo obtendo-se a superfície de resposta.

Tabela 5 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCC 2³ para a atividade enzimática de lipase da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t (4)	p-valor
Média*	1,91	0,50	3,00	0,040
Glicose (L)*	-1,45	0,58	-2,49	0,067
Azeite de oliva (L)*	1,35	0,58	2,32	0,081
Triton X-100 (L)	-0,36	0,58	-0,63	0,566
Glicose X Azeite*	-1,62	0,58	-2,79	0,049
Glicose X Triton X-100	-0,23	0,58	-0,40	0,710
Azeite X Triton X-100	-0,19	0,58	-0,33	0,757

*Fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,1$); L= Termo linear.

Tabela 6 - Análise de variância do DCC 2³ para a atividade de lipase da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calculado}
Regressão	52,4	3	17,5	26,71
Resíduos	4,6	7	1,8	
Total	57,0	10		

Porcentagem de variação explicada (R^2) = 0,92; $F_{(0,1;3;7)} = 3,07$.

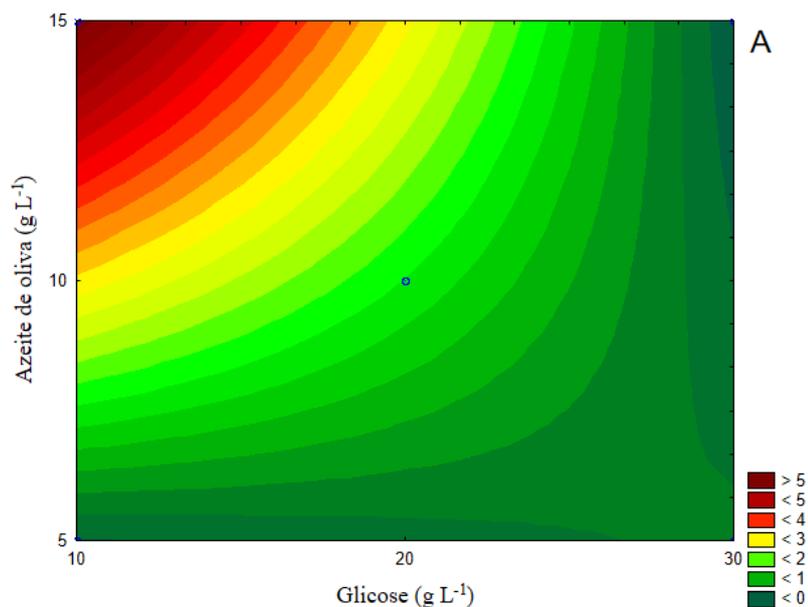
O modelo com as variáveis codificadas estatisticamente significativas, que representam a atividade enzimática de lipase ($U\ mL^{-1}$) em função da concentração de glicose e azeite de oliva nas faixas estudadas, é apresentado na equação 6, onde X_1 representa a concentração de glicose e X_2 representa a concentração de azeite de oliva.

$$\text{Lipase (U mL}^{-1}\text{)} = 1,91 - 1,45*X_1 + 1,35*X_2 - 1,62X_1 *X_2 \quad (6)$$

A Figura 7 mostra a curva de contorno que relaciona as variáveis independentes concentração de glicose e concentração de azeite de oliva com a variável dependente atividade de lipase. O aumento da concentração de azeite de oliva de 5 para 15 $g\ L^{-1}$ e a redução da concentração de glicose de 30 para 10 $g\ L^{-1}$ resultou nas maiores atividades enzimáticas. O surfactante Triton X-100 não foi uma variável significativa para a produção de lipase

extracelular, portanto, para os cultivos com aplicação do CM, essa variável foi fixada no menor nível estudado (2 g L^{-1}).

Figura 7 – Curva de contorno obtida para a produção de lipase de levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em função da glicose e azeite de oliva.



A atividade de lipase predita pelo modelo foi comparada aos valores experimentais e os erros relativos foram calculados (Tabela 7). Os erros relativos foram baixos na região desejada em que as atividades estão maximizadas.

Nos ensaios E1, E6 e E8 não ocorreu produção de lipase em 120 h de cultivo. O ensaio E1 continha as menores concentrações de substratos (10 g L^{-1} de glicose e 5 g L^{-1} de azeite de oliva) e surfactante (2 g L^{-1}), ou seja, as baixas concentrações desses compostos, principalmente do azeite de oliva, não proporcionaram a produção de lipase extracelular. Em contrapartida, nos ensaios E6 e E8 a alta concentração de glicose (30 g L^{-1}) pode ter provocado a inibição da síntese de lipase. Além disso, nos ensaios E2, E4 e E5 os erros relativos foram altos mostrando que o modelo não se ajusta para algumas respostas.

Com isso, tem-se que o modelo apresentado na equação 6 para concentrações menores que 30 g L^{-1} de glicose e apresenta capacidade de predizer a atividade enzimática de lipase dentro dessa faixa (10 a 20 g L^{-1} de glicose e 5 a 15 g L^{-1} de azeite de oliva). O Triton X- 100 não causou efeitos na produção da enzima, sendo a sua concentração fixada nos menores níveis do planejamento, ou seja, 2 g L^{-1} . A redução da concentração do surfactante ou até mesmo a sua exclusão como variável do processo deve ser avaliada, bem como o estudo

de menores concentrações de glicose e maiores concentrações de azeite de oliva. Pois de acordo com a Figura 7, a região de máximo encontra-se nas menores concentrações de carbono não lipídica e maiores concentrações da fonte de carbono lipídica.

Tabela 7 - Valor predito e desvio relativo para produção de lipase por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h de cultivo.

Ensaio	Atividade enzimática de lipase - experimental (U mL⁻¹)	Atividade enzimática de lipase - modelo (U mL⁻¹)	Erro relativo (%)
1	0	0,40	-
2	1,73	0,74	57,28
3	7,25	6,34	12,55
4	0,66	0,20	69,19
5	1,04	0,40	62,06
6	0	0,74	-
7	5,68	6,34	-11,59
8	0	0,20	-
9	2,20	1,92	12,78
10	1,45	1,92	-32,33
11	1,10	1,92	-74,43

Diversos estudos relataram a produção de lipase pela levedura *Y. lipolytica*, como mostrado na Tabela 1. Todavia, na maioria dos estudos foram usadas altas concentrações de fontes de carbono não lipídicas e lipídicas para a produção da enzima, como é o caso de Domínguez et al. (2003), que utilizaram 20 g L⁻¹ glicose e 10 g L⁻¹ PEG – 200 na produção de lipase pela *Y. lipolytica* CECT 1240. Em outro estudo, Saygün et al. (2014) produziram lipase pela *Y. lipolytica* YB- 423-12, em 20 g L⁻¹ glicose e 40 g L⁻¹ óleo de avelã residual. Magdouli et al. (2017), utilizaram 40 g L⁻¹ glicerol bruto e 50 g L⁻¹ azeite de oliva para produzir lipase pela *Y. lipolytica* SM7.

Portanto, os resultados de produção de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, obtidos no presente planejamento, se mostram promissores visto que, a produção da enzima talvez não dependa da presença de surfactante e ocorre em baixas concentrações de fonte de carbono não lipídica, possibilitando a redução dos custos de processo.

Na Tabela 8 estão apresentados os coeficientes de regressão e desvio padrão dos ensaios para a concentração de biomassa, utilizando erro global, sem exclusão dos termos não significativos. É possível notar que a concentração de glicose e azeite de oliva apresentaram efeito positivo e o Triton X-100 efeito negativo. Além disso, as interações entre todas as variáveis não foram significativas.

Tabela 8 - Coeficiente de regressão e desvio padrão do DCC 2³ para a concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h.

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	t (4)	p-valor
Média*	9,73	0,30	32,04	0,00
Glicose (L)*	1,56	0,36	4,38	0,01
Azeite de oliva (L)*	1,32	0,36	3,70	0,02
Triton X-100 (L)*	-0,99	0,36	-2,77	0,05
Glicose X Azeite	0,03	0,36	0,08	0,94
Glicose X Triton X-100	0,09	0,36	0,26	0,80
Azeite X Triton X-100	-0,61	0,36	-1,70	0,16

*Fatores estatisticamente significativos ($p \leq 0,1$); L= Termo linear.

Com a finalidade de avaliar se os dados obtidos são preditivos, realizou-se o teste de distribuição F. Na Tabela 9 é apresentada a análise de variância (ANOVA). Optou-se por utilizar o modelo sem os parâmetros estatisticamente não significativos, sendo estes, incorporados aos resíduos, com percentual de variação explicada (R^2) de 0,85 e o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} . Como o valor de $F_{\text{calculado}}$ (13,60) é maior que o de F_{tabelado} (3,07), confirma-se que o modelo obtido é preditivo obtendo-se a superfície de contorno.

Tabela 9 - Análise de variância do DCC 2³ para a concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calculado}
Regressão	41,1	3,0	13,7	13,60
Resíduos	7,1	7,0	1,0	
Total	48,2	10,0		

Porcentagem de variação explicada (R^2) = 0,85; $F(0,1;3;7) = 3,07$.

O modelo com as variáveis codificadas estatisticamente significativas que representam a concentração e biomassa (g L^{-1}) em função da concentração de glicose, azeite de oliva e Triton X-100 nas faixas estudadas é apresentado na equação 7, onde X_1 representa a concentração de glicose, X_2 representa a concentração de azeite de oliva e X_3 representa a concentração de Triton X-100.

$$\text{Concentração de biomassa (g L}^{-1}\text{)} = 9,73 + 1,56 * X_1 + 1,32 * X_2 - 0,99 * X_3 \quad (7)$$

A Figura 8 mostra as curvas de contorno que relacionam as variáveis independentes concentração de glicose, concentração de azeite de oliva e concentração de Triton X-100 com a variável dependente concentração de biomassa. O aumento da concentração de azeite de oliva de 5 para 15 g L^{-1} e da concentração de glicose de 10 para 30 g L^{-1} resultou nas maiores concentrações de biomassa (Figura 8A). Além disso, o aumento da concentração de azeite de oliva de 5 para 15 g L^{-1} e glicose de 10 para 30 g L^{-1} com a redução da concentração de Triton X-100 de 6 para 2 g L^{-1} proporcionaram as maiores concentrações de biomassa, conforme as Figuras 8B e 8C, respectivamente.

Com as maiores concentrações das fontes de carbono e a menor concentração de surfactante foram obtidas as maiores concentrações de biomassa. Todavia, para a produção de lipase extracelular as melhores condições para incrementar a produção dessa enzima são o aumento da concentração da fonte de carbono lipídica (azeite de oliva) e redução ou exclusão da fonte de carbono (glicose) e do surfactante (Triton X-100). Portanto, esses resultados mostraram que a produção da lipase, pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, não está associada a produção de biomassa.

A concentração de biomassa predita pelo modelo foi calculada, utilizando a equação 7, e comparada aos valores experimentais utilizando-se o cálculo dos erros relativos. A partir dos dados apresentados na Tabela 10, pode-se observar que a concentração de biomassa experimental variou de 6,85 a 13,63 g L^{-1} e a concentração de biomassa do modelo variou de 7,84 a 13,59 g L^{-1} , representando desvios relativos entre -14,36 e 16,52 %. Portanto, o modelo apresentado na Equação 6 apresenta capacidade de prever a concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 dentro da faixa estudada.

Figura 8 - Curvas de contorno obtida para a concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em função da glicose e azeite de oliva (A), Triton X-100 e azeite de oliva (B) e de glicose e Triton X-100 (C).

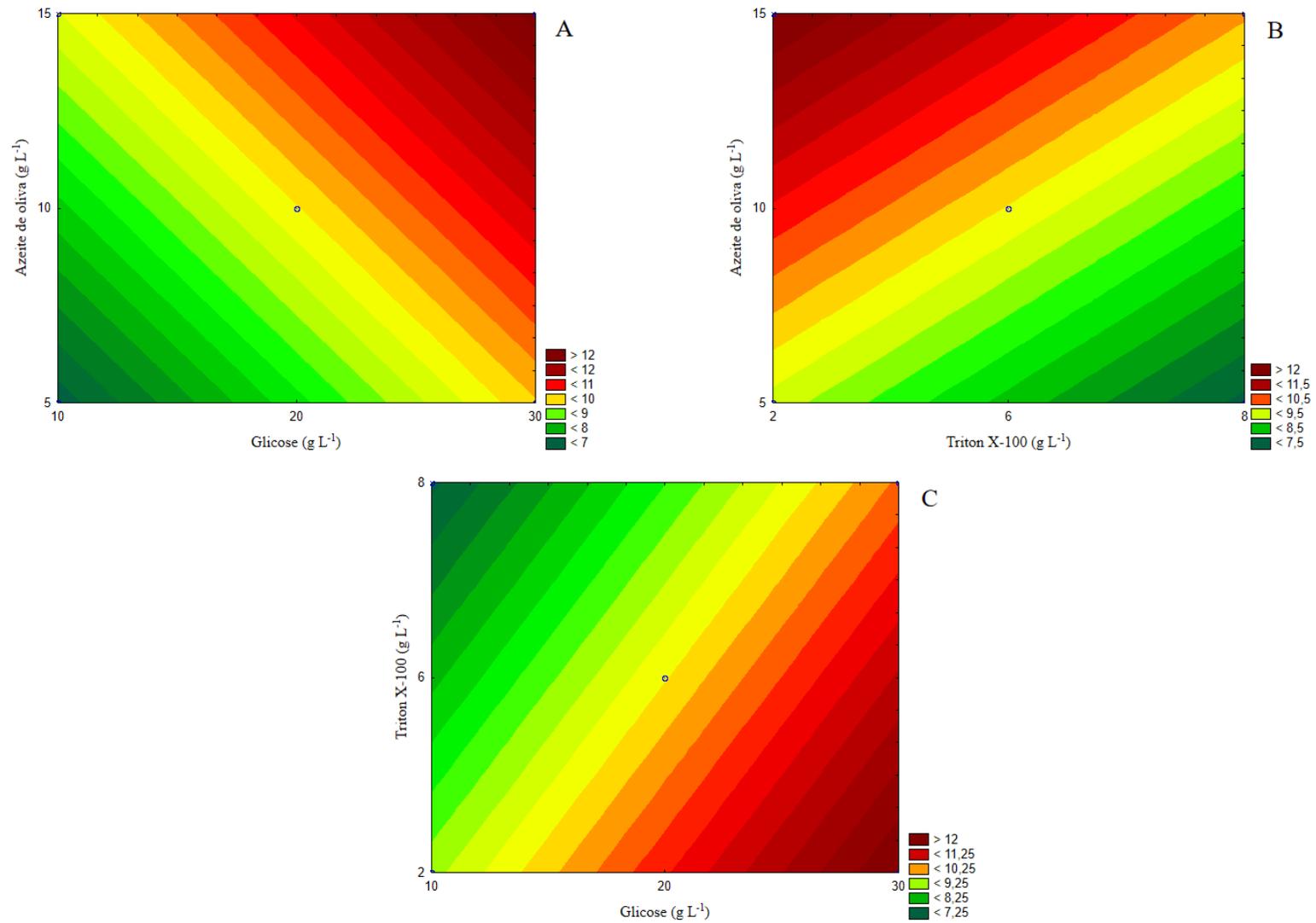


Tabela 10 - Valor predito e desvio relativo para concentração de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 em 120 h de cultivo.

Ensaio	Concentração de biomassa – experimental (g L ⁻¹)	Concentração de biomassa – modelo (g L ⁻¹)	Erro relativo (%)
1	6,85	7,84	-14,36
2	10,85	10,95	-0,96
3	11,77	10,47	11,00
4	13,63	13,59	0,28
5	7,02	5,86	16,52
6	9,15	8,98	1,89
7	7,27	8,50	-16,85
8	11,75	11,62	1,17
9	9,96	9,73	2,37
10	10,13	9,73	4,03
11	8,59	9,73	-13,20

5.2. PRODUÇÃO DE LIPASE COM APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS

O presente trabalho é um dos primeiros a abordar a aplicação de CM em cultivos de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 para a produção de lipase. Os cultivos com aplicação de CM foram feitos utilizando as melhores condições de cultivo para a produção de lipase extracelular em frasco *Erlenmeyer* obtidos no planejamento experimental (10 g L⁻¹ de glicose e 15 g L⁻¹ de azeite de oliva e 2 g L⁻¹ do surfactante Triton X-100) Os demais componentes do meio de cultivo, como MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄ e extrato de levedura, foram mantidos nas concentrações conforme descrito na Tabela 3. Para avaliar a influência do CM na produção da enzima, os cultivos foram submetidos a intensidades médias de 30 mT, sendo avaliadas 3 condições com aplicação do CM: 0–72 h, 72–144 h e 0–144 h.

A Figura 9 e as Tabelas A5, A6, A7 e A8 (Apêndice) apresentam os resultados dos cultivos. A produção extracelular de lipase foi observada em todos os cultivos (Figura 9) e aumentou a partir das 72 h com aplicação de CM 72-144 (Figura 9C). Em contrapartida, nos demais cultivos os maiores valores de atividade enzimática ocorreram entre 72 e 96 h. De acordo com Albuquerque et al. (2016), Boeira et al. (2021) e Taskin et al. (2013), a estimulação ou inibição dos CM são atribuídos a mudanças das membranas (lipídicas ou plasmáticas),

mudanças na síntese de DNA, alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das biomoléculas.

Além disso, os efeitos biológicos causados pelo CM em micro-organismos e em suas biomoléculas dependem da intensidade, da frequência, do tempo de exposição e da orientação das linhas do campo (DAVID et al., 2016; DEAMICI et al., 2022; HUO et al., 2020).

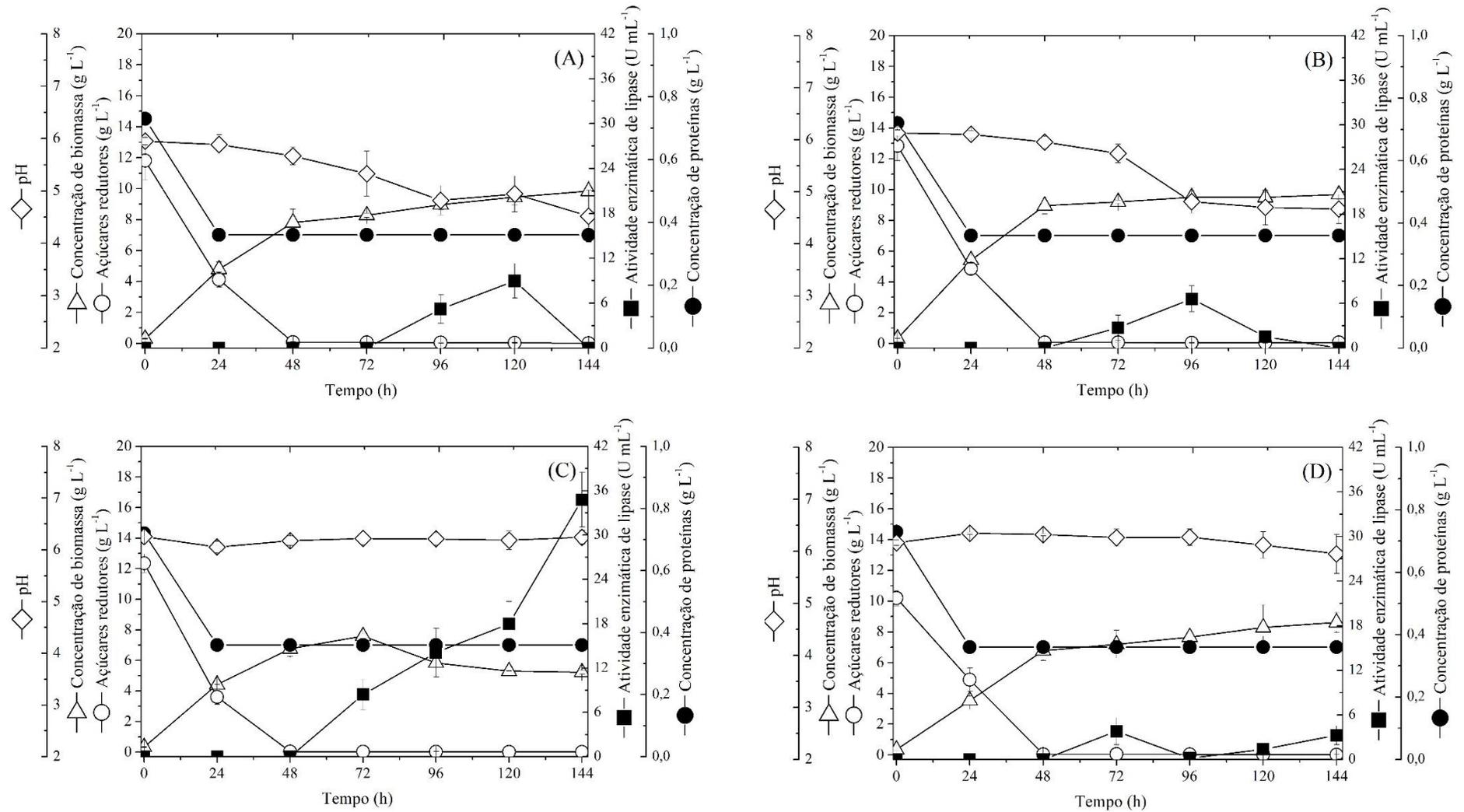
Como observado por David et al. (2016), que estudaram diferentes orientações das linhas do CM (2 a 11 mT) aplicado em cultivos de *Y. lipolytica* Y-1095 para avaliar a produção de lipase intracelular. Quando as linhas do CM atravessaram transversalmente o reator foram obtidas as maiores produções de lipase, independente da intensidade aplicada. Esses autores concluíram que quando o CM foi aplicado nessas condições ocorreu maior transferência de substrato para o interior das células da levedura e, conseqüentemente, maior produção intracelular da enzima.

Portanto, o aumento da atividade enzimática de lipase no ensaio CM 72-144 pode estar relacionado a alterações na membrana celular, que facilitaram a excreção da enzima para o meio extracelular ou alterações na sua estrutura, proporcionando maior atividade catalítica com relação aos demais ensaios.

A glicose (10 g L^{-1}) foi utilizada como fonte carbono não lipídica e em todos os cultivos mais de 95 % do substrato foi consumido após 48 h. A partir desse momento ocorreu diminuição gradativa da concentração dos açúcares redutores indicando que a glicose foi totalmente consumida ao final do cultivo. Em decorrência do consumo do substrato a concentração de biomassa aumentou até as 144 h de cultivo para os cultivos controle (Figura 9A) e CM 0-144 (Figura 9D). No cultivo CM 0-72 (Figura 9B) a levedura, aparentemente, entrou em estado estacionário a partir de 48 h. Em contrapartida, no cultivo CM 72-144 (Figura 9C) ocorreu declínio na concentração de biomassa após 72 h.

Em todos os cultivos (Figura 9) a glicose foi quase totalmente consumida a partir das 48 h de cultivo proporcionando o aumento da concentração de biomassa. Todavia, quando o CM foi aplicado nas últimas 72 h do cultivo (Figura 9C) ocorreu diminuição na concentração de biomassa, ou seja, a presença do CM, nesse período, pode ter causado estresse nas células de levedura.

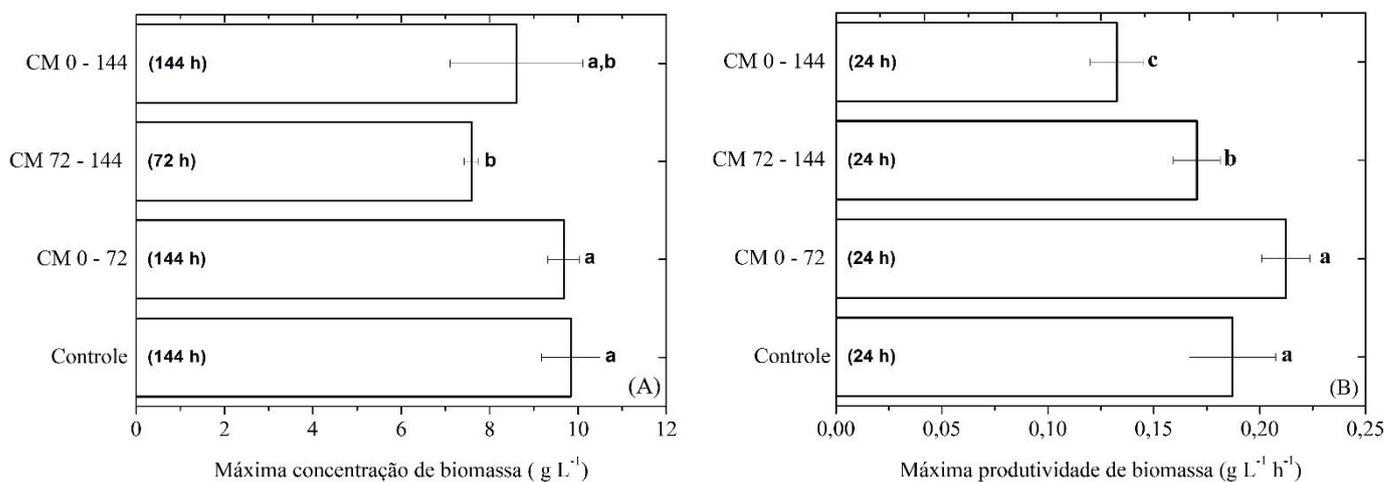
Figura 9 - Cultivos de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 sob influência de diferentes intervalos de aplicação de campos magnéticos (CM): (A) Ensaio controle; (B) CM 0-72; (C) CM 72-144 e (D) CM 0-144.



Conforme citado por Deutmeyer et al. (2011), a produção de biomassa aumentou 8 % no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* sob influência de 200 mT por 30 h em comparação com o controle. Mohtasham et al. (2016) observaram aumento de 50 % na produção de biomassa por *Bacillus licheniformis* com 10 mT por 43 h, em comparação com o controle. Rakoczy, Konopacki e Fijałkowski (2016) estudaram os efeitos da aplicação de 34 mT no crescimento e atividade metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* e a presença do CM diminuiu significativamente o número de células e inibiu sua atividade metabólica celular.

A Figura 10A mostra que a máxima concentração de biomassa variou entre 7,59 e 9,84 g L⁻¹, sendo obtida em 144 h de cultivo, exceto para o cultivo CM 72-144 que atingiu a máxima concentração em 72 h sendo estatisticamente diferente do cultivo controle e CM 0-72. Este fato pode estar relacionado ao estresse sofrido pela célula durante o início da exposição ao CM que ocorreu em 72 h. Como ilustrado na Figura 10A, a aplicação de 30 mT entre 72–144 h de cultivo proporcionou redução significativa na máxima concentração de biomassa de 68,9 % comparado ao controle.

Figura 10 - Máxima concentração de biomassa (A) e produtividade máxima de biomassa (B) para cada ensaio em diferentes tempos de cultivo (parênteses). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.



A Figura 10B mostra que a produtividade máxima de biomassa variou de 0,13 a 0,21 g L⁻¹ h⁻¹ em 24 h de cultivo. Houve diferença significativa entre os ensaios com 95 % de confiança, sendo que o cultivo com aplicação de CM 0-144 apresentou a menor produtividade de biomassa (0,13 g L⁻¹ h⁻¹) se comparado às demais condições, representando diminuição de 31,7 % comparado ao cultivo controle.

A máxima produtividade de biomassa (Figura 10B) foi reduzida em 10,5 % e 31,6 % quando comparado ao cultivo controle com o CM 72-144 e CM 0-144, respectivamente. Portanto, as condições de cultivo e o estresse físico causado pela presença do CM podem afetar de formas diferentes o mesmo micro-organismo.

A máxima produção de lipase (Figura 11A) foi observada no ensaio CM 72-144 em 144 h de cultivo com atividade de $34,8 \text{ U mL}^{-1}$, representando aumento significativo de 287,5 % comparado ao cultivo controle, que atingiu a máxima produção em 120 h. A máxima produtividade de lipase (Figura 11B) foi $0,24 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ no cultivo CM 72-144 em 144 h de cultivo, representando incremento significativo de 242,9 % comparado ao controle em 120 h e 380 % comparado ao cultivo CM 0-144 em 72 h.

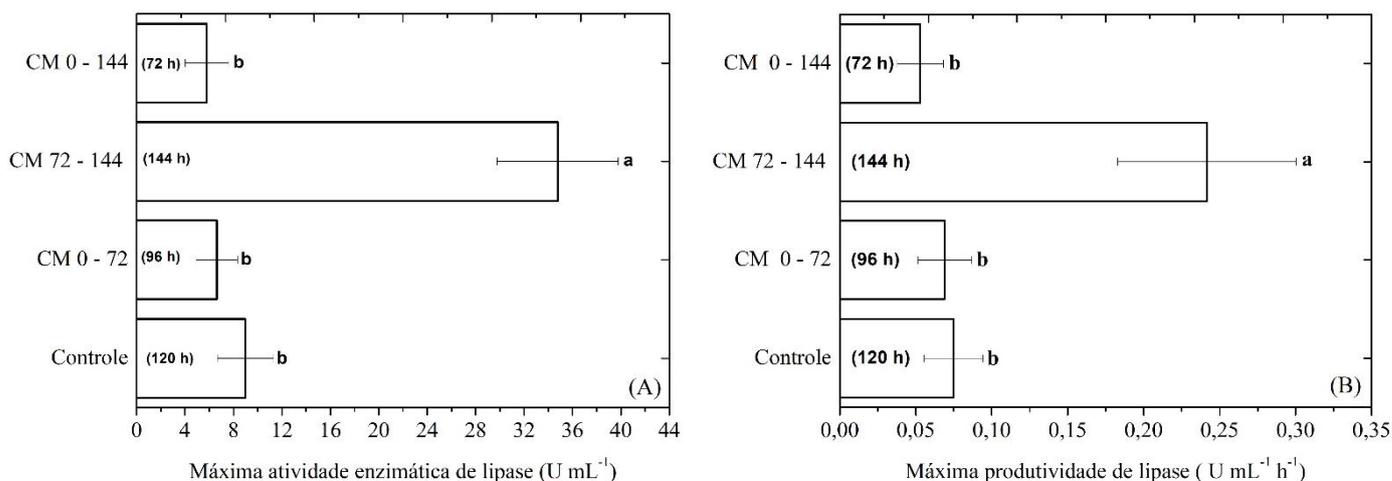
Fabiszewska e Bialecka-Florjańczyk (2015) produziram lipase por *Y. lipolytica* KKP 379 em meio contendo azeite de oliva, na ausência de CM, e relatando máxima atividade da enzima de $0,2 \text{ U mL}^{-1}$ após 65 h de cultivo. Em outro estudo Magdouli et al. (2017) estudaram a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* SM7 sem a presença de CM e a máxima produção da enzima foi 25 U mL^{-1} em 72 h de cultivo. No presente trabalho, no ensaio CM 72-144 maior produção de lipase foi obtida, ou seja, a aplicação do CM se mostra uma boa estratégia para incrementar a produção da enzima e, esse fato pode estar relacionado ao período de aplicação.

David et al. (2016) é o único trabalho na literatura, até o presente momento, que relatou a produção de lipase microbiana com aplicação de CM. Esses autores aplicaram CM que variaram de 2 a 11 mT em cultivos de *Y. lipolytica* e concluíram que tanto a presença, quanto a orientação das linhas do CM influenciaram significativamente a produção intracelular de lipase, sendo obtido incremento de até 41,7 % na produção da enzima, mas a produção de biomassa não foi afetada pela presença do CM. Esses autores citaram que a presença do CM pode interferir na interface célula-líquido, resultando em maior entrega de nutrientes, mitigando assim os efeitos de difusão externa, sendo a aplicação do campo manifestada em nível macroscópico, como crescimento de biomassa e aumento na produção de metabólito. Comportamento semelhante foi relatado no presente trabalho, pois a aplicação do CM influenciou significativamente a produção extracelular da lipase. Todavia, com exceção do ensaio CM 72-144, não foi observado alteração na concentração de biomassa.

Portanto, as melhores condições para a produção de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 foram a aplicação de CM 72 - 144 h utilizando meio contendo 10 g L^{-1} de glicose, 15 g L^{-1} de azeite de oliva, 2 g L^{-1} de Triton X-100, 8 g L^{-1} de KH_2PO_4 ; $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3 g L^{-1} de extrato de levedura, e condições de cultivo de

180 rpm, pH inicial 6 e à 28 °C. Nestas condições foi atingida a máximas respostas concentração de biomassa de $7,59 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$ (72 h), produtividade de biomassa de $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (24 h), atividade de lipase de $34,8 \pm 8,46 \text{ U mL}^{-1}$ (144 h) e produtividade de atividade de lipase de $0,24 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (144 h).

Figura 11 - Máxima atividade enzimática de lipase (A) e produtividade máxima de lipase (B) para cada ensaio em diferentes tempos de cultivo (parênteses). Letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre os ensaios ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.



Nos cultivos controle (Figura 9A) e com aplicação de CM 0-72 (Figura 9B) ocorreu diminuição do pH a partir de 48 h de cultivo, chegando a 4,52 e 4,67 ao final do cultivo, respectivamente. Em contrapartida, nos cultivos com CM 72-144 (Figura 9C) e CM 0-144 (Figura 9D) o pH se manteve estável durante todo o cultivo chegando a 6,2 e 6,0, respectivamente, em 120 h. De acordo com Cavallo et al. (2020) e Levinson et al. (2007) a diminuição do pH em cultivos da *Y. lipolytica*, geralmente, está associada ao consumo do substrato e, conseqüentemente, produção de ácidos orgânicos. Todavia, esse comportamento não foi observado nos cultivos CM 72-144 e CM 0-144 podendo indicar que a aplicação do CM alterou o metabolismo da levedura e inviabilizou a produção desses compostos no meio de cultivo.

A aplicação do campo durante as primeiras 72 h, aparentemente, aumentou a produção de ácidos orgânicos e conseqüentemente diminuição do pH. Por outro lado, no cultivo onde o campo permaneceu nas últimas 72 h de cultivo o pH se manteve praticamente inalterado até o final do cultivo, ou seja, isso reforça que os efeitos da presença do CM podem estarem restritos a alguns períodos do cultivo.

Em todos os ensaios (Figura 9) e Tabela A5, A6, A7 e A8 (apêndice) a concentração de proteínas inicial variou de 0,72 a 0,73 g L⁻¹ e, após 24 h diminuiu para 0,36 g L⁻¹ mantendo-se constante em todos os ensaios até as 144 h de cultivo. A diminuição na concentração de proteínas provavelmente está relacionada ao seu consumo pela levedura para síntese de enzimas e outras biomoléculas essenciais para o seu crescimento.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA PELA LEVEDURA *YARROWIA LIPOLYTICA*

5.3.1. Caracterização cinética da lipase

A Figura 12 mostra diferentes métodos de linearização da equação de Michaelis-Menten da lipase de *Y. lipolytica* Y-1095 obtida no cultivo CM 72-144. A linearização auxilia na determinação dos parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, uma vez que a regressão linear é um método menos trabalhoso que os modelos de regressão não lineares. Esses parâmetros são de grande relevância para trabalhos com enzimas, pois proporcionam melhor entendimento do comportamento da enzima, assim como a sua cinética em relação ao substrato.

O efeito da variação da concentração de substrato (pNPP) na velocidade inicial (V_0) das reações catalisadas foi estudado experimentalmente (Figura 12A). Nestas condições, assume-se que o complexo ES está formado e que a concentração de substrato permanece praticamente inalterada, podendo ser chamada de cinética de estado estacionário. Quando presente em baixas concentrações (pNPP), a velocidade de reação é proporcional a concentração de substrato. Todavia, ao atingir um platô o aumento de V_0 se torna insignificante, mesmo com o aumento da concentração de substrato e, esse ponto, pode ser denominado $V_{m\acute{a}x}$.

O método de Lineweaver-Burk, normalmente, é o mais utilizado para a linearização de dados obtidos a partir de experimentos cinéticos com enzimas, entretanto, ao calcular o inverso da velocidade inicial ($1/V_0$), o método tende a dar ênfase aos menores valores de V_0 , que são os que, em geral, apresentam os maiores erros experimentais, e tende a concentrar os pontos de alta concentração em uma pequena região. Portanto, o emprego de mais de um método de linearização, da equação de Michaelis-Menten, se mostra favorável para melhor compreender o comportamento da enzima. Portanto, três métodos de linearização foram empregados, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf com a finalidade de comparar os métodos para a lipase produzida.

Conforme observado na Figura 12A a curva tendeu a um platô, evidenciando que a concentração saturante para lipase produzida está acima de 14 mM. O método linear que

apresentou melhor resultado para a lipase produzida por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 foi Lineweaver-Burk (Figura 12B), uma vez que apresentou coeficiente de determinação (R^2) de aproximadamente 0,99 mostrando boa representatividade dos dados.

Os parâmetros cinéticos de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para esses três métodos de linearização foram similares, ou seja, os métodos empregados apresentam boa concordância entre si, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos determinados experimentalmente a partir da lipase produzida de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 na presença de CM 72-144 h.

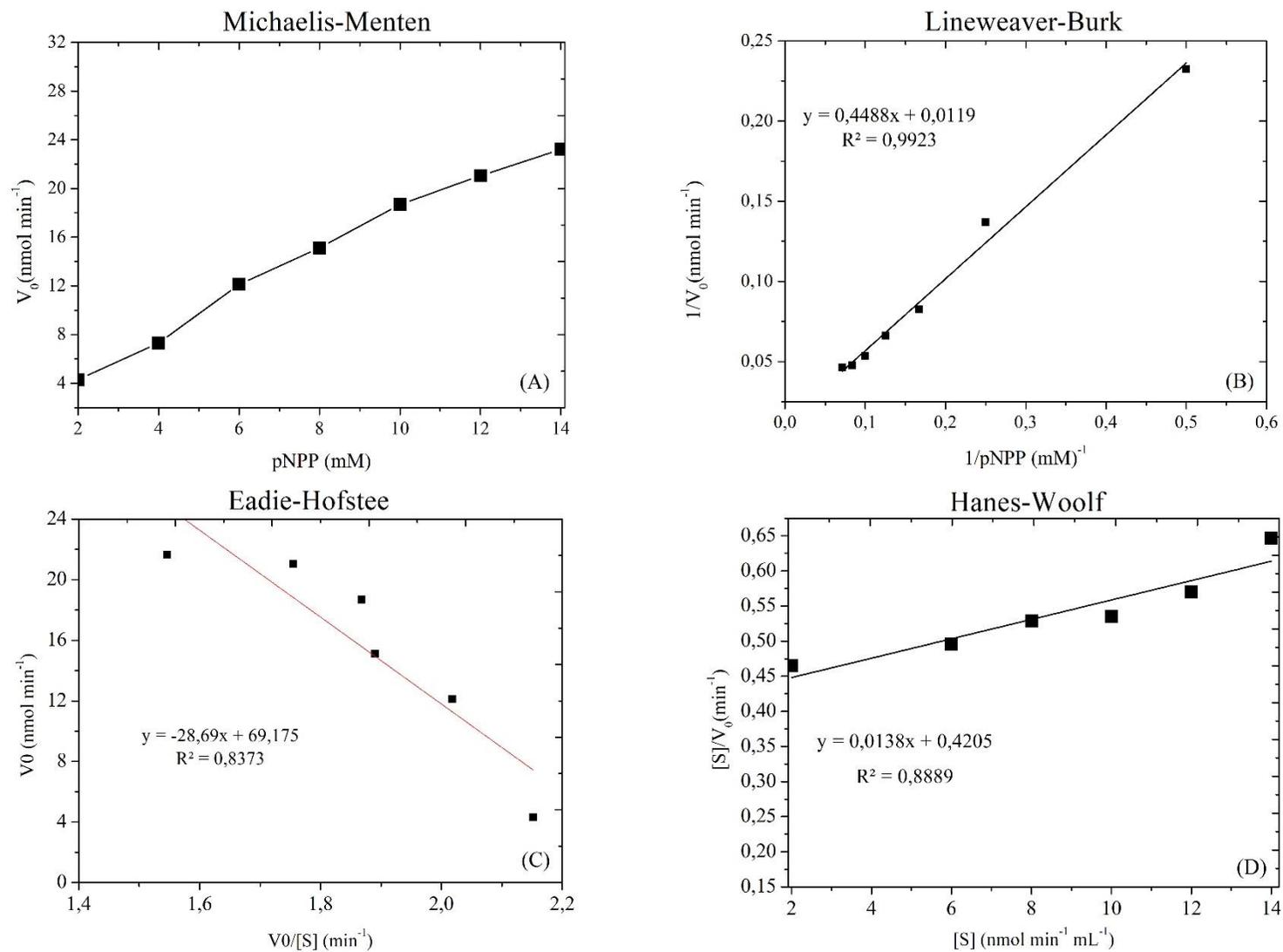
Ensaio	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM min ⁻¹)	R^2
Lineweaver -Burk	37,71	84,03	0,99
Eadie-Hofstee	41,99	95,55	0,84
Hanes-Woolf	39,93	88,50	0,89

Na literatura diversos estudos produziram e caracterizaram lipase de *Y. lipolytica* e calcularam os parâmetros cinéticos da enzima. Brígida et al. (2007) relataram $K_m = 0,234$ mM e $V_{m\acute{a}x} = 0,0033$ mM min⁻¹ para lipase extracelular produzida pela *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682. Xie et al. (2015) caracterizaram lipase extracelular de *Y. lipolytica* produzida na ausência de CM e relataram $K_m = 20,56$ mM e $V_{m\acute{a}x} = 1,72$ mM min⁻¹ quando a enzima estava imobilizada em microesferas e $K_m = 9,73$ mM e $V_{m\acute{a}x} = 1,2$ mM min⁻¹ na forma livre.

Carvalho et al. (2017) caracterizaram lipase extracelular produzida pela *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 e relataram para o extrato bruto da enzima $K_m = 0,381$ mM e $V_{m\acute{a}x} = 103,79$ mM min⁻¹ e para o extrato após ultrafiltração $K_m = 0,809$ mM e $V_{m\acute{a}x} = 148,35$ mM min⁻¹.

O K_m encontrado para a lipase produzida pela *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 (Tabela 11) na presença do CM apresenta valores superiores aos relatados por outros autores, citados anteriormente, quando estudaram a caracterização da enzima produzida por *Y. lipolytica*. Isso mostra que a lipase obtida na presença do CM apresentou menor afinidade pelo substrato utilizado (pNPP) quando comparado a esses estudos. Todavia, no ensaio CM 72-144 a $V_{m\acute{a}x}$ foi superior ao relatado por diversos autores, exceto por Carvalho et al. (2017), indicado que a lipase produzida apresentou maior atividade enzimática que os demais autores.

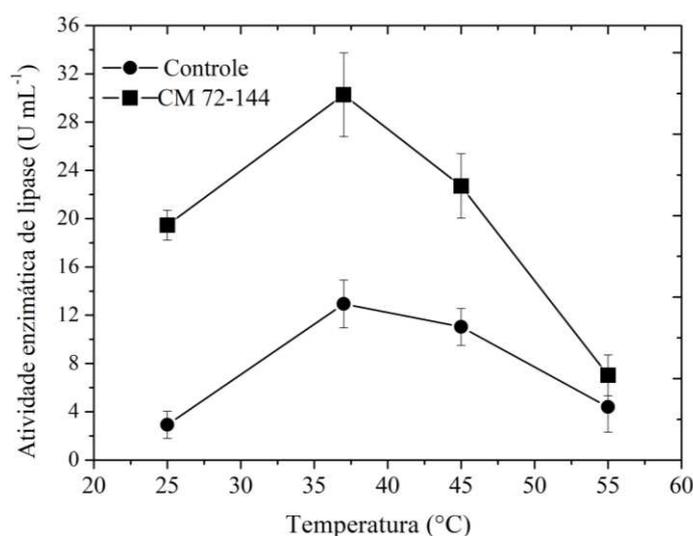
Figura 12 - Gráfico de Michaelis-Menten (A) e linearizações da equação de Michaelis-Menten da reação catalisada pela lipase de *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, Lineweaver-Burk (B), Eadie-Hofstee (C) e Hanes-Woolf (D).



5.3.2. pH e temperatura ótima da lipase

O efeito da temperatura na atividade da lipase, produzida nos cultivos com aplicação de CM e sem aplicação (controle), foi avaliado na faixa de temperatura de 25 a 55 °C (Figura 13). Em todas as temperaturas estudadas foi observado atividade enzimática da lipase, sendo a máxima observada a 37 °C para a enzima obtida na condição controle e CM 72-144 h. Para essa temperatura, quando o CM foi aplicado, a atividade foi 37,27 U mL⁻¹, entretanto, no cultivo controle, para essa mesma temperatura, a atividade foi 12,94 U mL⁻¹.

Figura 13 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de lipase produzida por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 no cultivo controle e CM 72-144.



A menor atividade (7,03 U mL⁻¹) com aplicação de CM foi a 55 °C. Já no cultivo controle, a menor atividade (2,92 U mL⁻¹) foi a 25 °C. A aplicação do CM 72-144 no cultivo não alterou a temperatura ótima da enzima comparado ao controle (sem CM).

A temperatura ótima para a lipase produzida por *Y. lipolytica* Y-1095 está próxima a diversos estudos encontrados na literatura. Como Janek et al. (2020) e Fraga et al. (2018) que obtiveram temperatura ótima para lipase de *Y. lipolytica* de 37 °C. Outros estudos ainda relatam diferentes temperatura ótima para a lipase obtida por essa levedura de 25 °C (YADAV et al., 2011), 30 °C (PING et al., 2018) e 40 °C (YU; QIN; TAN, 2007). A diferença entre as temperaturas ótimas para a lipase obtida a partir da *Y. lipolytica* provavelmente esteja associada às diferentes linhagens desse micro-organismo encontradas na natureza, assim como às diferentes isoformas produzidas dessa enzima.

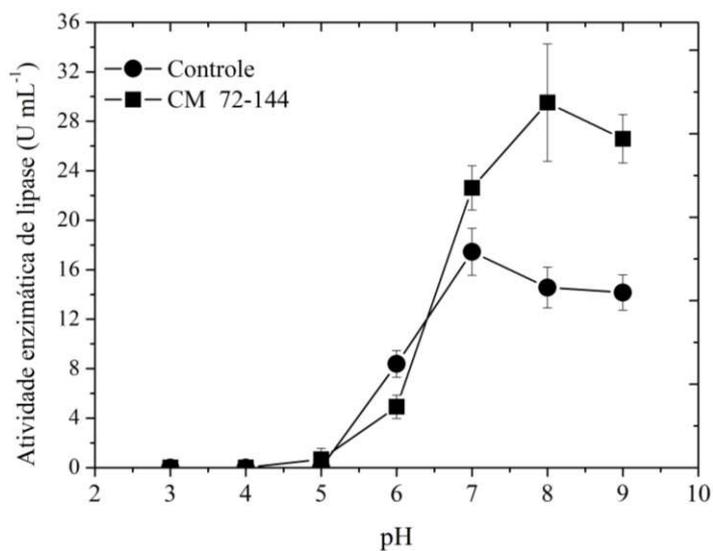
O efeito do pH na atividade enzimática da lipase, obtida com e sem CM, foi avaliado na faixa de 3 a 9 (Figura 14). Para esses ensaios as reações foram feitas à 37 °C, visto que essa se mostrou a melhor temperatura para a lipase produzida pela *Y. lipolytica* NRRL Y- 1095, em ambas as condições de obtenção da enzima. A atividade enzimática de lipase foi observada a partir do pH 5, em pH 3 e 4 não foi observada atividade, entretanto, esses resultados podem estar relacionados ao substrato utilizado (pNPP) que, após sofrer hidrólise pela lipase, resulta em p-nitrofenol que apresentaria a coloração amarelada em pH alcalino. Em pH 5 a atividade de lipase não foi detectada no controle, entretanto, no cultivo com aplicação de CM foi observado 0,68 U mL⁻¹. Em pH 6 a atividade no controle (8,4 U mL⁻¹) foi maior comparada com a aplicação de CM (4,9 U mL⁻¹). O pH 8 foi o que proporcionou maior atividade (29,5 U mL⁻¹) para a enzima obtida no ensaio com aplicação do CM. No ensaio controle, o pH ótimo da enzima foi 7, apresentando atividade enzimática de 17,5 U mL⁻¹. Esses resultados evidenciam que a aplicação do CM 72-144 influenciou o pH ótimo da lipase produzida por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095.

As lipases possuem uma região flexível e conservada, conhecida como tampa hidrofóbica ou *lid*, que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice (Ser-His-Asp/Glu) (ERICSSON et al., 2008). Essa região pode assumir duas formas conformacionais distintas durante sua ativação interfacial, podendo acarretar na sua forma ativa (aberta) ou inativa (fechada) (GODOY et al., 2018). Portanto, a diferença no pH ótimo da lipase entre a enzima obtida sem aplicação do CM (controle) e com a presença do CM entre 72-144 h do cultivo pode estar relacionada a alterações nesse *lid*. Além disso, o pH ótimo das enzimas é dependente do tipo de grupo ionizável dos resíduos de aminoácidos que podem fazer parte da manutenção estrutural da enzima ou estarem intimamente relacionados ao sítio ativo. Logo, dependendo da concentração hidrogeniônica as enzimas podem apresentar uma conformação mais apropriada para exercer seu papel catalítico (MARZZOCO; TORRES, 2017). A presença do CM pode ter alterado as cargas os grupos ionizáveis dos aminoácidos presentes no sítio ativo, e consequentemente, alterou o pH para a lipase produzida pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y- 1095. Yan et al. (1997) estudaram os efeitos da aplicação de 30 mT na atividade de α -amilase imobilizada e constataram que ocorreu alteração da conformação secundária da enzima quando exposta ao CM e consequentemente alterou sua atividade e parâmetros cinéticos.

Portanto, a presença do CM pode ter alterado a estrutura ou o sítio ativo da lipase produzida pela *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 e, consequentemente, levou a um pH ótimo mais elevado em comparação ao ensaio controle (sem CM). Além disso, a temperatura e pH ótimos

para atividade de lipase dependem da fonte microbiana utilizada para a obtenção da enzima, assim como as isoformas produzidas pelo micro-organismo. A aplicação do CM, aparentemente, proporcionou pH ótimo maior que o encontrado no ensaio controle. Todavia, a temperatura ótima para ambos os cultivos não foi alterada.

Figura 14 - Efeito do pH na atividade enzimática de lipase produzida por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 no cultivo controle e CM 72-144.



6. CONCLUSÕES

As melhores condições de cultivo para a produção de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 foram azeite de oliva, glicose e Triton X-100 nas concentrações de 15 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ e 2 g L⁻¹, respectivamente. A aplicação do CM entre as 72-144 h diminuiu a máxima concentração de biomassa (7,59 g L⁻¹) quando comparado as demais condições de aplicação de CM e ensaio controle, entretanto, quando o CM foi aplicado nesse período houve incremento de 287,5 % na máxima produção de lipase extracelular (34,8 U mL⁻¹) em 144 h de cultivo. Além disso, ficou evidenciado que a produção da lipase, pela levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095, não está associada a produção de biomassa.

Os parâmetros cinéticos para a lipase produzida com aplicação do CM foram determinados e os métodos lineares que melhor se ajustou foi Lineweaver-Burk ($K_m = 37,71$ mM; $V_{m\acute{a}x} = 84,03$ mM min⁻¹). A atividade enzimática de lipase foi caracterizada com relação ao pH ótimo e temperatura ótima. No cultivo controle (sem CM) as condições ótimas foram pH 7 e temperatura de 37 °C. Enquanto que no cultivo com aplicação de CM 72-144 o pH ótimo foi 8 e a temperatura foi 37 °C.

Conclui-se que o uso de 30 mT na levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095 aumentou a produção de lipase e que o melhor período de aplicação para produzir a enzima foi de 72 a 144 h de cultivo. Além disso, a aplicação do CM afetou o pH ótimo da lipase produzida, entretanto, a temperatura ótima para ambos os cultivos não foi alterada.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar os efeitos da ausência da glicose e do Triton X-100 no meio para a produção de lipase por *Y. lipolytica* NRRL Y-1095;
- Aumentar escala para produção de lipase por *Y. lipolytica* com aplicação de CM;
- Avaliar o efeito dos CM na célula de *Y. lipolytica* através de expressão gênica;
- Estudar a influência de CM em outros períodos do cultivo para produção de lipase;
- Estudar a purificação da lipase com e sem a aplicação do CM.

8. RESÍDUOS GERADOS

Os resíduos gerados foram descartados em frasco de vidro devidamente identificado para posterior recolhimento de empresa responsável pelo gerenciamento de resíduos da Universidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, W. W. C.; COSTA, R. M. P. B.; E FERNANDES, T. D. S.; PORTO, A. L. F. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 16-28, 2016.
- ALOULOU, A. PUCCINELLI, D. DE CARO, A. LEBLOND, Y. CARRIÈRE, F. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1771, n. 12, p. 1446-1456, 2007.
- AMARA, S.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; GARREL, C.; GUIRAUD, P., FAVIER, A.; ABDELMELEK, H. Influence of a static magnetic field (250 mT) on the antioxidant response and DNA integrity in THP1 cells. **Physics in Medicine & Biology**, v. 52, n. 4, p. 889-898, 2007.
- AOAC. Official methods of analysis, 17th ed. Arlington, VA: **Association of Official Analytical Communities**. 2000.
- ARNER, P.; LANGIN, D. The role of neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, n. 3, p. 246-250, 2007.
- ARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M. K.; ROSE, C.; KAMINI, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: an overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.
- BALMANT, W.; SUGAI-GUÉRIOS, M. H.; CORADIN, J. H.; KRIEGER, N.; JUNIOR, A. F.; MITCHELL, D. A. A model for growth of a single fungal hypha based on well-mixed tanks in series: simulation of nutrient and vesicle transport in aerial reproductive hyphae. **PLoS One**, v. 10, n. 3, e0120307, 2015.
- BALOCH, K. A.; UPAICHI, A.; CHEIRSILP, B. Use of low-cost substrates for cost-effective production of extracellular and cell-bound lipases by a newly isolated yeast *Dipodascus capitatus* A4C. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 101102, 2019.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.
- BEHERA, A. R.; VELUPPAL, A.; DUTTA, K. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 34277-34284, 2019.
- BEOPOULOS, A.; MROZOVA, Z.; THEVENIEAU, F.; LE DALL, M. T.; HAPALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; NICAUD, J. M. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7779-7789, 2008.
- BOEIRA, C. Z.; CARVALHO SILVELLO, M. A.; REMEDI, R. D.; FELTRIN, A. C. P.; SANTOS, L. O.; GARDA-BUFFON, J. Mitigation of nivalenol using alcoholic fermentation and magnetic field application. **Food Chemistry**, v. 340, 127935, 2021.

- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.
- BRIGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. In: **Proceedings of the European Congress of Chemical Engineering 6, (ECCE'07)**, 2007.
- BYREDDY, A. R.; RAO, N. M.; BARROW, C. J.; PURI, M. Tween 80 influences the production of intracellular lipase by *Schizochytrium* S31 in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 30-35, 2017.
- CALADO, V. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro : Editora E-papers, 2003.
- CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, E. B. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 1, p. 35-39, 2011.
- CANLI, O.; KURBANOGLU, E. B. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid state fermentation using leek as substrate. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, p. 1-7, 2011.
- CARDIAS, B. B.; TREVISOL, T. C.; BERTUOL, G. G.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Hydrolyzed *Spirulina* biomass and molasses as substrate in alcoholic fermentation with application of magnetic fields. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11 p. 1-9, 2020.
- CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 259-266, 2017.
- CARSANBA, E.; PAPANIKOLAOU, S.; FICKERS, P.; AGIRMAN, B.; ERTEN, H. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. In: **Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application**. Springer, Cham, 2019. p. 91-117.
- CASAS-GODOY, L.; GASTEAZORO, F.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; MARTY, A.; SANDOVAL, G. Lipases: an overview. In: **Lipases and Phospholipases**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 3-38.
- CAVALLO, E.; NOBILE, M.; CERRUTTI, P.; FORESTI, M. L. Exploring the production of citric acid with *Yarrowia lipolytica* using corn wet milling products as alternative low-cost fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 155, 107463, 2020.
- CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; HENRIQUES, R. O.; PINTO, M. C. C.; LORENTE, G. F.; MANOEL, E. A.; PESSELA, B. C. Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2957-2963, 2020.
- COSTA, A. M.; OLIVEIRA LOPES, V. R.; VIDAL, L.; NICAUD, J. M.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Poly (ethylene terephthalate) (PET) degradation by *Yarrowia lipolytica*:

investigations on cell growth, enzyme production and monomers consumption. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 81-90, 2020.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 173-180, 1999.

COSTA, S. S.; PERES, B. P.; MACHADO, B. R.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Increased lipid synthesis in the culture of *Chlorella homosphaera* with magnetic fields application. **Bioresource Technology**, v. 315, 123880, 2020.

DAVID, G. F.; PEREZ, V. H.; JUSTO, O. R.; CUBIDES, D. C.; CARDONA, C. A.; HRISTOV, J. Glycerol bioconversion in unconventional magnetically assisted bioreactor seeking whole cell biocatalyst (intracellular lipase) production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 111, p. 243-252, 2016.

DEAMICI, K. M.; MORAIS, M. G.; SANTOS, L. O.; GROS, F.; COSTA, J. A. V.; LAROCHE, C. Magnetic field action on *Limnospira indica* PCC8005 cultures: enhancement of biomass yield and protein content. **Applied Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1533, 2022.

DEUTMEYER, A.; RAMAN, R.; MURPHY, P.; PANDEY, S. Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2011, p. 207-213, 2011.

DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F. J.; SANROMÁN, M. A.; LONGO, M. A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 78, n. 11, p. 1166-1170, 2003.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTRÖM, A. G.; BÄCKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, 2008.

FABISZEWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; ZAMOJSKA, W. M.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 404-410, 2014.

FABISZEWSKA, A. U.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. Factors influencing synthesis of extracellular lipases by *Yarrowia lipolytica* in medium containing vegetable oils. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 231-237, 2015.

FENG, X.; CHEN, Y.; LV, J.; HAN, S.; TU, R.; ZHOU, X.; REN, N. Enhanced lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* through magnetic field pretreatment of wastewater and treatment of microalgae-wastewater culture solution: magnetic field treatment modes and conditions. **Bioresource Technology**, v. 306, 123102, 2020.

FRENGOVA, G.; SIMOVA, E.; PAVLOVA, K.; BESHKOVA, D.; GRIGOROVA, D. Formation of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* in whey ultrafiltrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 8, p. 888-894, 1994.

FICKERS, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 22, p. 1751-1754, 2005.

FICKERS, P.; FUDALEJ, F.; LE DALL, M. T.; CASAREGOLA, S.; GAILLARDIN, C.; THONART, P.; NICAUD, J. M. Identification and characterization of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 3, p. 264-274, 2005.

FICKERS, P.; ONGENA, M. A. R. C.; DESTAIN, J.; WEEKERS, F.; THONART, P. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 756-759, 2006.

FRAGA, J. L.; PENHA, A. C.; PEREIRA, D. S.; SILVA, K. A.; AKIL, E.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. Use of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized in cell debris for the production of lipolyzed milk fat (LMF). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3413, 2018.

FRAGA, J. L.; SOUZA, C. P.; PEREIRA, A. D. S.; AGUIEIRAS, E. C.; SILVA, L. O.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia lipolytica* and biocatalyst application/reuse. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, p. 1-9, 2021.

GEMISHEV, O.; DIMOVA, P.; PANOVA, N.; EVSTATIEVA, Y. Effect of static magnetic field on synthesis of endoglucanase by *Trichoderma reesei*—m7. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 848-851, 2009.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. A. novel halophilic extracellular lipase with both hydrolytic and synthetic activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 125-130, 2017.

GRBAVČIĆ, S. Ž.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. I.; BEZBRADICA, D. I.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S. S.; KNEŽEVIĆ, Z. D. Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 8-9, p. 757-765, 2007.

GRENFELL-LEE, D.; ZELLER, S.; CARDOSO, R.; PUCAJ, K. The safety of β -carotene from *Yarrowia lipolytica*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 1-11, 2014.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN DIJCK, P. W.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 187-206, 2014.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S.; DEVI, G. N.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 647-657, 2016.

GUTIÉRREZ, A.; JOSÉ, C.; MARTÍNEZ, A.; T. Microbial and enzymatic control of pitch in the pulp and paper industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1005-1018, 2009.

- HUANG, Y. Y.; YU, J. J.; ZHOU, Q. Y.; SUN, L. N.; LIU, D. M.; LIANG, M. H. Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131 p. 109577, 2020.
- HUO, S.; CHEN, X.; ZHU, F.; ZHANG, W.; CHEN, D., JIN, N.; RUAN, R. Magnetic field intervention on growth of the filamentous microalgae *Tribonema* sp. in starch wastewater for algal biomass production and nutrients removal: Influence of ambient temperature and operational strategy. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122884, 2020.
- JANEK, T.; MIROŃCZUK, A. M.; RYMOWICZ, W.; DOBROWOLSKI, A. High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: a biophysical approach. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 689, p. 108475, 2020.
- JOSHI, R.; SHARMA, R.; KUILA, A. Lipase production from *Fusarium incarnatum* KU377454 and its immobilization using Fe₃O₄ NPs for application in waste cooking oil degradation. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 134-140, 2019.
- KENDIRCI, P.; SALUM, P.; BAS, D.; ERBAY, Z. Production of enzyme-modified cheese (EMC) with ripened white cheese flavor: II-Effects of lipases. **Food and Bioprocess Technology**, v. 122, p. 230-240, 2020.
- KUMARI, A., GUPTA, R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 9, p. 1733-1739, 2012.
- LAI, O. M.; LEE, Y. Y.; PHUAH, E. T.; AKOH, C. C. Lipase/esterase: Properties and Industrial Applications. In: **Reference Module in Food Science**. Elsevier, pp.158-167, 2019.
- LEE, J. S.; KANG, E. J.; KIM, M. O.; LEE, D. H.; BAE, K. S.; KIM, C. K. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 112-117, 2001.
- LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 292-295, 2007.
- LI, Y.; LIU, T. J.; ZHAO, M. J.; ZHANG, H.; FENG, F. Q. Screening, purification, and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* isolated from stuffed buns steamers. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 20, n. 4, p. 332-342, 2019.
- LIU, Z.; GAO, Y.; CHEN, J.; IMANAKA, T.; BAO, J.; HUA, Q. Analysis of metabolic fluxes for better understanding of mechanisms related to lipid accumulation in oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 144-151, 2013.
- LIU, X.; YU, X.; GAO, S.; DONG, X.; XIA, J.; XU, J.; WANG, Z. Enhancing the erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from waste oil using loofah sponge as oil-in-water dispersant. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107302, 2019.
- LOPES, M.; GOMES, A. S.; SILVA, C. M.; BELO, I. Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. **Journal of Biotechnology**, v. 265, p. 76-85, 2018.

- LOPES, M.; MIRANDA, S. M.; ALVES, J. M.; PEREIRA, A. S.; BELO, I. Waste cooking oils as feedstock for lipase and lipid-rich biomass production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 1, p. 1800188, 2019.
- LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.
- MAGDOULI, S.; GUEDRI, T.; TAREK, R.; BRAR, S. K.; BLAIS, J. F. Valorization of raw glycerol and crustacean waste into value added products by *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 57-68, 2017.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. Bioquímica básica. In: **Bioquímica básica**. 2017.
- MENESTRINO, B. C.; PINTOS, T. H. C.; SALA, L.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Application of static magnetic fields on the mixotrophic culture of *Chlorella minutissima* for carbohydrate production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, n. 3, p. 822-830, 2020.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 58-77, 2017.
- MENESTRINO, B.; SALA, L.; COSTA, J. A. V.; BUFFON, J. G.; SANTOS, L. O. Magnetic fields exhibit a positive impact on lipid and biomass yield during phototrophic cultivation of *Spirulina* sp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 10, p. 2087-2097, 2021.
- MESA, M.; PEREAÑEZ, J. A.; PRECIADO, L. M.; BERNAL, C. How the Triton X-100 modulates the activity/stability of the *Thermomyces lanuginose* lipase: insights from experimental and molecular docking approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2410-2417, 2018.
- MICHELY, S., GAILLARDIN, C.; NICAUD, J. M.; NEUVÉGLISE, C. Comparative physiology of oleaginous species from the *Yarrowia* clade. **PloS One**, v. 8, n. 5, e63356, 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.
- MOHTASHAM, P.; KESHAVARZ-MOORE, E.; KALE, I.; KESHAVARZ, T. Application of magnetic field for improvement of microbial productivity. In: **5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY (IBIC 2016)**. AIDIC SERVIZI SRL, 2016. p. 43-48.
- MONTEIRO, R. R.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; BERENGUER-MURCIA, Á.; ROCHA, T. N.; SANTOS, J. C.; ALCÁNTARA, A. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141-154, 2020.
- MOORE, R. L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1145-1151, 1979.

- MORAES, A. N. S.; MACHADO, B. R.; D'AMORE, T. Estudo de diferentes indutores na produção de lipase pela levedura *Yarrowia lipolytica*. 2018, 47 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.
- MOTTA, M. A.; MUNIZ, J. B. F.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 393-396, 2004.
- NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUÉRIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIÈRE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1947-1962, 2011.
- NEMA, A.; PATNALA, S. H.; MANDARI, V.; KOTA, S.; DEVARAI, S. K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2019.
- NUNES, P.; FRAGA, J. L.; RATIER, R. B.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; BRÍGIDA, A. I. FICKERS, P.; AMARAL, P. F. Waste soybean frying oil for the production, extraction, and characterization of cell-wall-associated lipases from *Yarrowia lipolytica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 4, p. 809-818, 2021.
- OJEDA-HERNÁNDEZ, D. D.; COSÍO-CUADROS, R.; SANDOVAL, G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MATEOS-DÍAZ, J. C. Solid-state fermentation as an economic production method of lipases. In: **Lipases and Phospholipases**. Humana Press, New York, NY, p. 217-228, 2018.
- PAHOJA, V. M.; SETHAR, M. A. A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. **Journal of Applied Sciences**, v. 2, p. 474-484, 2002.
- PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 737-744, 2002.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 425-435, 2007.
- PAUL, A. L.; FERL, R. J.; MEISEL, M. W. High magnetic field induced changes of gene expression in *arabidopsis*. **BioMagnetic Research and Technology**, v. 4, n. 1, p. 7, 2006.
- PENG, Q.; WANG, X.; SHANG, M.; HUANG, J.; GUAN, G.; LI, Y.; SHI, B. Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.
- PHUKON, L. C.; CHOURASIA, R.; KUMARI, M.; GODAN, T. K.; SAHOO, D.; PARAMESWARAN, B.; RAI, A. K. Production and characterization of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. **Bioresource Technology**, v.323, p. 123352, 2020.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; SANT'ANNA JR., G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 1, p. 71-75, 2000.

PING, L.; YUAN, X.; ZHANG, M.; CHAI, Y.; SHAN, S. Improvement of extracellular lipase production by a newly isolated *Yarrowia lipolytica* mutant and its application in the biosynthesis of L-ascorbyl palmitate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 302-311, 2018.

RAKOCZY, R.; KONOPACKI, M.; FIJAŁKOWSKI, K. The influence of a ferrofluid in the presence of an external rotating magnetic field on the growth rate and cell metabolic activity of a wine yeast strain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 43-50, 2016.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. New York: CRC Press, 2014.

SALEHMIN, M. N. I.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. High cell density fed-batch fermentation for the production of a microbial lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 85, p. 8-14, 2014.

SANTOS, L. O.; ALEGRE, R. M.; GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1362-1367, 2010.

SANTOS, L. O. D.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 921-926, 2012.

SAYGÜN, A.; ŞAHİN-YEŞİLÇUBUK, N.; ARAN, N. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1521-1530, 2014.

SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J. Optimization of culture conditions for extracellular fungal lipase production by submerged fermentation process. **Plant Science Today**, v. 5, n. 3, p. 135-141, 2018.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SILVA, W. O. B.; SANTI, L.; BERGER, M.; PINTO, A. F.; GUIMARÃES, J. A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 8, p. 829-834, 2009.

SILVA, P. G. P.; JÚNIOR, D. P.; SALA, L.; BURKERT, J. F. M.; SANTOS, L. O. Magnetic field as a trigger of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 131-138, 2020.

SOREANU, I.; HENDLER, A.; DAHAN, D.; DOVRAT, D.; AHARONI, A. Marker-free genetic manipulations in yeast using CRISPR/CAS9 system. **Current Genetics**, v. 64, n. 5, p. 1129-1139, 2018.

SZANDRA, N. E.; BUJNA, E.; SIPI CZKI, G.; FARKAS, C.; BELO, I., LOPES, M.; NGUYEN, Q. D. Optimization of lipase production by *Yarrowia divulgata*. In: **FOODCONF 2018-Third International Conference on Food Science and Technology**. 2018. p. 136-137.

TASKIN, M.; ESIM, N.; GENISEL, M.; ORTUCU, S.; HASENEKOGLU, I.; CANLI, O.; ERDAL, S. Enhancement of invertase production by *Aspergillus niger* OZ-3 using low-intensity static magnetic fields. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 177-188, 2013.

TASKIN, M.; UCAR, M. H.; UNVER, Y.; KARA, A. A.; OZDEMIR, M.; ORTUCU, S. Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 97-103, 2016.

TANG, H.; WANG, P.; WANG, H.; FANG, Z.; YANG, Q.; NI, W.; ZHENG, Z. Effect of static magnetic field on morphology and growth metabolism of *Flavobacterium* sp. m1-14. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 12, p. 1923-1933, 2019.

VEIGA, M. C.; FONTOURA, M. M.; OLIVEIRA, M. G.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields: biomass potential of *Spirulina* sp. for food supplement. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 1231-1240, 2020.

World enzymes market to cross \$19 bn by 2025 - driven by rising demand in various end-use industries. **Focus on Catalysts**, v. 11, p. 2-2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.focat.2019.10.006>

XIE, R.; CUI, C.; CHEN, B.; TAN, T. Immobilizing *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 via improvement of microspheres by gelatin modification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 3, p. 771-779, 2015.

YADAV, K. S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10663-10670, 2011.

YADAV, A. N.; SINGH, S.; MISHRA, S.; GUPTA, A. **Recent advancement in white biotechnology through fungi: volume 3: perspective for sustainable environments**. Springer Nature, 2019.

YAN, L.; ZHU, Y.; HE, S. E.; CAO, Z. Effect of static magnetic field on activity of immobilized α -amylase. **Chinese Science Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 127-130, 1997.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384-391, 2007.

YU, M.; LANGE, S.; RICHTER, S.; TAN, T.; SCHMID, R. D. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 53, n. 2, p. 255-263, 2007.

ZAREVÚCKA, M. Olive oil as inductor of microbial lipase. In: BOSKOU, D. (ed). **Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, InTech Europe, Rijeka, Croatia**, p. 457-470, 2012.

APÊNDICE

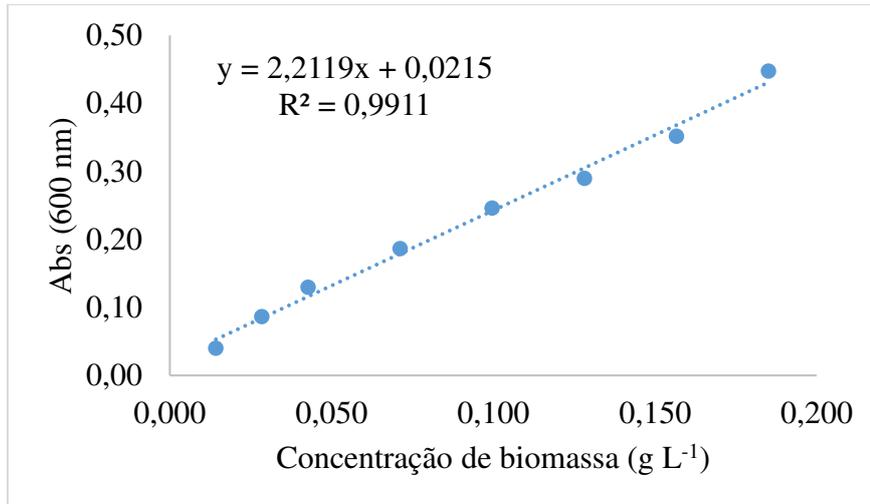
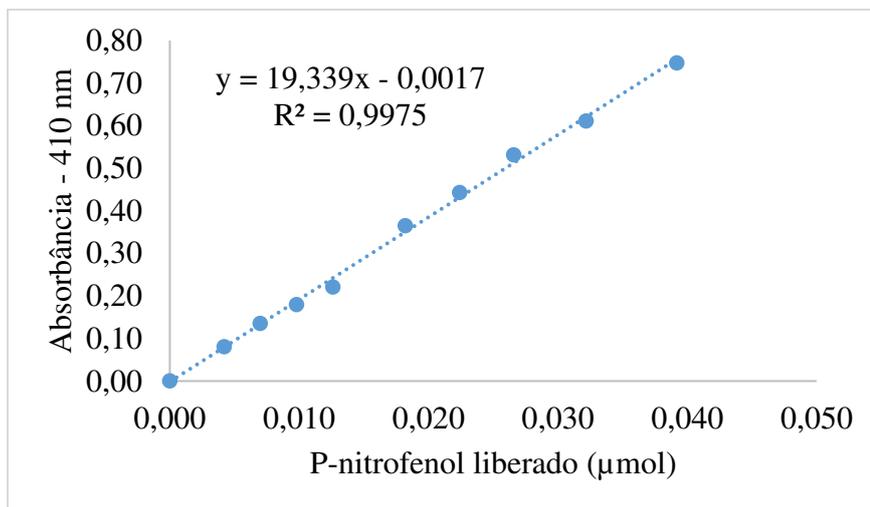
Figura A1 – Curva padrão de biomassa da levedura *Y. lipolytica* NRRL Y-1095.**Figura A2** - Curva padrão de p-nitrofenol.

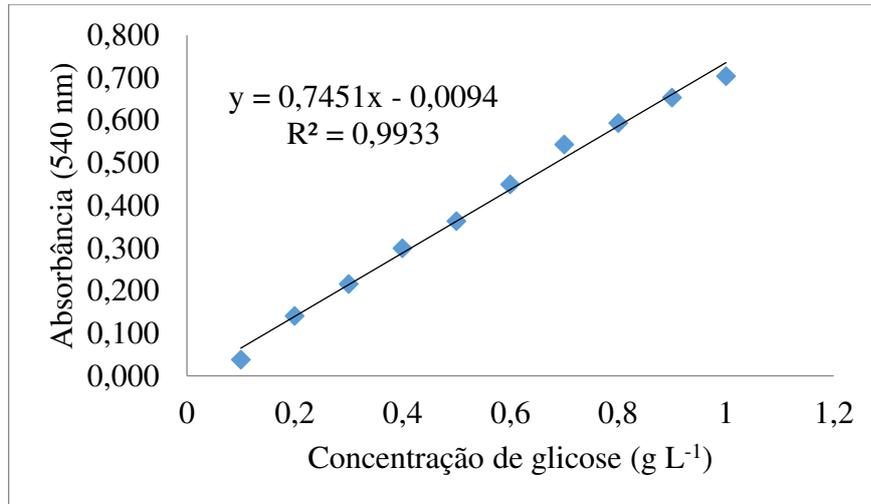
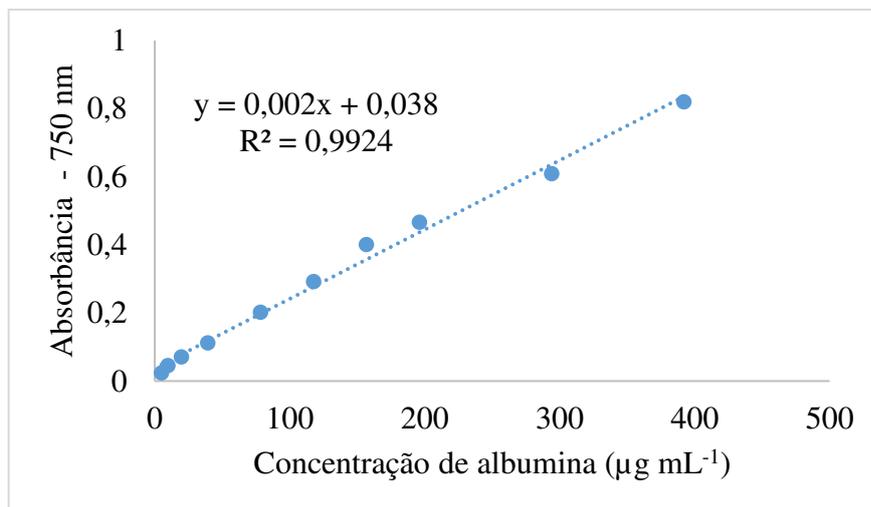
Figura A3 - Curva padrão de glicose.**Figura A4** - Curva padrão de albumina de soro bovino (98% pureza).

Tabela A1 – Atividade enzimática de lipase obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.

Ensaio	Atividade enzimática de lipase (U mL ⁻¹)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,73 ± 0,43
3	n.d	n.d	n.d	n.d	3,17 ± 0,08	7,25 ± 0,80
4	n.d	n.d	n.d	n.d	2,41 ± 0,31	0,66 ± 0,13
5	n.d	n.d	n.d	0,43 ± 0,26	n.d	1,04 ± 0,42
6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
7	n.d	n.d	n.d	3,78 ± 0,86	0,81 ± 0,12	5,68 ± 0,35
8	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2,20 ± 0,39
10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,45 ± 0,70
11	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,10 ± 0,62

n.d: não detectado.

Tabela A2 – Concentração de açúcares redutores obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.

Ensaio	Concentração de glicose (g L ⁻¹)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	9,69 ± 0,04	4,70 ± 0,14	n.d	n.d	n.d	n.d
2	31,50 ± 0,57	12,37 ± 0,27	9,18 ± 0,32	6,24 ± 0,08	0,37 ± 0,04	0,16 ± 0,01
3	10,30 ± 0,04	5,74 ± 0,17	0,03 ± 0,01	n.d	n.d	n.d
4	28,73 ± 0,66	12,60 ± 0,46	11,27 ± 0,08	10,69 ± 0,22	1,18 ± 0,02	0,08 ± 0,01
5	12,50 ± 0,50	1,71 ± 0,15	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
6	31,43 ± 0,52	20,95 ± 0,69	8,03 ± 0,37	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
7	11,16 ± 0,21	3,39 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
8	33,56 ± 1,24	26,83 ± 0,54	15,49 ± 0,14	6,45 ± 0,36	0,92 ± 0,06	0,13 ± 0,03
9	23,06 ± 0,54	13,57 ± 1,17	2,70 ± 0,12	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01
10	19,72 ± 2,07	14,10 ± 1,22	3,23 ± 0,28	n.d	n.d	n.d
11	22,46 ± 0,90	13,97 ± 0,36	3,67 ± 0,09	1,76 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01

n.d: não detectado.

Tabela A3 – Valores de pH obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.

Ensaio	pH				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	6,0	5,78	5,91	5,80	5,95
2	6,0	5,92	5,12	4,90	3,64
3	6,0	5,87	5,82	5,32	4,32
4	6,0	5,86	5,53	3,99	3,51
5	6,0	5,72	5,92	5,97	5,98
6	6,0	5,78	4,62	3,88	3,87
7	6,0	5,69	5,82	5,77	5,87
8	6,0	6,00	5,55	4,07	3,75
9	6,0	6,03	5,18	4,65	5,78
10	6,0	5,91	4,88	4,47	5,35
11	6,0	5,86	5,24	3,99	3,86

Tabela A4 - Concentração de biomassa obtidos no planejamento experimental utilizado para o estudo do meio de cultivo para a produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* NNRL Y-1095.

Ensaio	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	0,68 ± 0,01	4,77 ± 0,06	6,83 ± 0,09	7,17 ± 0,06	7,48 ± 0,11	6,85 ± 0,34
2	0,63 ± 0,01	5,01 ± 0,04	8,32 ± 0,17	10,38 ± 0,04	11,83 ± 0,15	10,85 ± 0,04
3	0,62 ± 0,01	4,82 ± 0,06	8,25 ± 0,18	9,88 ± 0,10	12,53 ± 0,15	11,77 ± 0,30
4	0,62 ± 0,01	4,57 ± 0,06	9,04 ± 0,70	16,64 ± 0,49	15,41 ± 0,03	13,63 ± 0,35
5	0,35 ± 0,01	6,49 ± 0,12	7,51 ± 0,23	6,89 ± 0,22	6,75 ± 0,15	7,02 ± 0,14
6	0,39 ± 0,03	5,86 ± 0,04	9,94 ± 0,25	10,03 ± 0,13	10,43 ± 0,13	9,15 ± 0,25
7	0,34 ± 0,01	5,52 ± 0,02	7,43 ± 1,49	6,93 ± 0,06	6,73 ± 0,12	7,27 ± 0,09
8	0,60 ± 0,02	6,11 ± 0,15	9,71 ± 0,12	12,91 ± 0,08	12,29 ± 0,33	11,75 ± 0,21
9	0,56 ± 0,03	7,18 ± 0,25	10,43 ± 0,07	10,45 ± 0,25	10,48 ± 0,20	9,96 ± 0,17
10	0,52 ± 0,01	7,37 ± 0,09	10,16 ± 0,21	10,48 ± 0,11	10,52 ± 0,07	10,13 ± 0,09
11	0,34 ± 0,01	5,19 ± 0,05	9,13 ± 0,10	9,72 ± 0,11	10,19 ± 0,05	8,59 ± 1,36

Tabela A5 - Resultados do cultivo controle (sem aplicação de CM).

Tempo	pH	Concentração de biomassa (g L⁻¹)	Atividade de lipase (U mL⁻¹)	Concentração de proteínas (g L⁻¹)	Açúcares redutores (g L⁻¹)
0	6,0	0,30 ± 0,02	n.d	0,73 ± ≤0,01	11,81 ± 1,26
24	5,9	4,79 ± 0,49	n.d	0,36 ± ≤0,01	4,13 ± 0,49
48	5,7	7,81 ± 0,87	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,08 ± 0,03
72	5,3	8,28 ± 0,14	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,06 ± 0,02
96	4,8	8,97 ± 0,35	5,2 ± 1,89	0,36 ± ≤0,01	0,05 ± 0,03
120	4,9	9,45 ± 0,50	8,98 ± 2,32	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± 0,02
144	4,5	9,84 ± 0,66	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,02 ± 0,01

n.d: não detectado.

Tabela A6 - Resultados do cultivo CM 0 – 72 h.

Tempo	pH	Concentração de biomassa (g L⁻¹)	Atividade de lipase (U mL⁻¹)	Concentração de proteínas (g L⁻¹)	Açúcares redutores (g L⁻¹)
0	6,1	0,32 ± 0,01	n.d	0,72 ± ≤0,01	12,84 ± 0,97
24	6,1	5,41 ± 0,27	n.d	0,36 ± ≤0,01	4,85 ± 0,36
48	6,0	8,95 ± 0,54	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,07 ± 0,01
72	5,7	9,20 ± 0,11	2,73 ± 1,69	0,36 ± ≤0,01	0,06 ± 0,02
96	4,8	9,50 ± 0,61	6,63 ± 1,71	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± 0,01
120	4,7	9,49 ± 0,36	1,53 ± 0,72	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± 0,01
144	4,7	9,68 ± 0,36	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,06 ± 0, 01

n.d: não detectado.

Tabela A7 - Resultados do cultivo CM 72 – 144 h.

Tempo	pH	Concentração de biomassa (g L⁻¹)	Atividade de lipase (U mL⁻¹)	Concentração de proteínas (g L⁻¹)	Açúcares redutores (g L⁻¹)
0	6,3	0,33 ± 0,02	n.d	0,73 ± ≤0,01	12,35 ± 0,61
24	6,1	4,42 ± 0,01	n.d	0,36 ± ≤0,01	3,61 ± 0,48
48	6,2	6,76 ± 0,49	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± ≤0,01
72	6,2	7,59 ± 0,16	8,41 ± 2,08	0,36 ± ≤0,01	0,03 ± 0,00
96	6,2	5,84 ± 0,41	14,1 ± 7,83	0,36 ± ≤0,01	0,03 ± 0,01
120	6,2	5,30 ± 0,04	18,0 ± 3,00	0,36 ± ≤0,01	0,02 ± ≤0,01
144	6,2	5,23 ± 0,13	34,8 ± 8,46	0,36 ± ≤0,01	0,02 ± ≤0,01

n.d: não detectado.

Tabela A8 - Resultados do cultivo CM 0 – 144 h.

Tempo	pH	Concentração de biomassa (g L⁻¹)	Atividade de lipase (U mL⁻¹)	Concentração de proteínas (g L⁻¹)	Açúcares redutores (g L⁻¹)
0	6,2	0,35 ± 0,03	n.d	0,72 ± ≤0,01	10,21 ± 0,49
24	6,4	3,53 ± 0,28	n.d	0,36 ± ≤0,01	4,89 ± 0,76
48	6,3	6,78 ± 0,63	n.d	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± 0,01
72	6,3	7,19 ± 1,52	3,8 ± 1,82	0,36 ± ≤0,01	0,05 ± 0,01
96	6,3	7,66 ± 1,68	0,2 ± 0,42	0,36 ± ≤0,01	0,04 ± 0,01
120	6,1	8,29 ± 2,49	1,4 ± 0,34	0,36 ± ≤0,01	0,03 ± 0,01
144	6,0	9,28 ± 1,50	3,3 ± 1,81	0,36 ± ≤0,01	0,02 ± 0,01

n.d: não detectado.