

**Produção de lipase por leveduras isoladas de frutos de palmeiras**

**Lipase production by yeast isolated from palm trees fruit**

**Producción de lipasa por aislado de fruta de palma**

Recebido: 10/06/2020 | Revisado: 24/06/2020 | Aceito: 28/06/2020 | Publicado: 09/07/2020

**Eduardo Henrique Santos Guedes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3189-9576>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: [edu3-d@hotmail.com](mailto:edu3-d@hotmail.com)

**Carla Gonçalves Conte**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5978-7467>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: [carlagconte@gmail.com](mailto:carlagconte@gmail.com)

**Thiago Lucas de Abreu-Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4222-4128>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: [abreulimatl@uft.edu.br](mailto:abreulimatl@uft.edu.br)

**Solange Cristina Carreiro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4651-072X>

Universidade Federal do Tocantins, Brasil

E-mail: [solange@uft.edu.br](mailto:solange@uft.edu.br)

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade lipolítica de linhagens de leveduras isoladas de frutos de diferentes espécies de palmeiras do cerrado Tocantinense em meio sólido contendo Tween 20 nas temperaturas, 25, 35 e 40 °C avaliando-se o índice enzimático (IE). Avaliou-se também o efeito do pH, agitação, concentração de sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e extrato de levedura em cultivo submerso para as duas linhagens que apresentaram o maior valor de IE, através de um planejamento de Plackett-Burman (PB), para isso, foi realizado um estudo exploratório, laboratorial de natureza quantitativa. Das 150 linhagens testadas 24 (16%) apresentaram resultados positivos a 25 °C, 12 (8%) a 35 °C e nenhuma linhagem apresentou atividade a 40 °C. Os maiores valores de IE obtidos foram de 6,0 e 5,0 a 25 °C para as linhagens T194 e T199, respectivamente. Os resultados do PB mostraram que apenas

o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentou influência significativa para a produção de lipases, com valores variando de 34,3 (T194) e 43,6  $\text{U.mL}^{-1}$  (T199). Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com diferentes níveis de concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e observou-se que não houve efeito significativo para a linhagem T194, porém as concentrações de 30 e 35  $\text{g.L}^{-1}$  apresentaram efeito significativo para a linhagem T199, as atividades variaram de 61,0 e 70,1  $\text{U.mL}^{-1}$ . A adição de o sulfato de amônio ao meio de cultura elevou a produção de lipase da linhagem T194 de 34,3 para 60  $\text{U.mL}^{-1}$  e de 43,6 para 70,1  $\text{U.mL}^{-1}$  para a linhagem T199.

**Palavras-chave:** Leveduras; Atividade lipolítica; Plackett-burman; Índice enzimático; Coco.

### Abstract

The aim of this work was to evaluate the lipolytic capacity of yeasts isolated from different Tocantinense Savana's palm fruits in solid medium supplemented with Tween 20 at 25, 35 and 40° C evaluating the enzymatic index (EI). It was evaluated the effects of pH, temperature, agitation,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and yeast extract concentration in submerged culture to two strains with the highest EI, using a Plackett-Burman (PB) design, for this, an exploratory, laboratory study of a quantitative nature was carried out. From the 150 strains tested 24 (16%) showed positive results at 25 °C, 12 (8%) at 35 °C and none of the strains presented activity at 40 °C. The highest EI values obtained were 6.0 and 5.0 at 25 °C by T194 and T199, respectively. The PB results showed that just the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  had significant influence in lipase production whose values ranged from 34.3  $\text{U.mL}^{-1}$  (T194) to 43.6  $\text{U.mL}^{-1}$  (T199). A completely randomized design with different levels of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was conducted and there was no significant effect to T194 strain, but concentration among 30 and 35  $\text{g.L}^{-1}$  showed significant effect to T199 strain, and the lipase activity ranged from 61 to 70.1  $\text{U.mL}^{-1}$ . The medium supplemented with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  increased the lipase production from 34.3 to 60  $\text{U.mL}^{-1}$  to T194 strain and from 43.6 to 70.1  $\text{U.mL}^{-1}$  to T199 strain.

**Keywords:** Yeast; Lipolytic activity; Plackett-burman; Enzymatic index; Coconut.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue verificar la capacidad lipolítica de las cepas de levadura aisladas de las palmas Cerrado Tocantinense en medio sólido que contiene Tween 20 a diferentes temperaturas, evaluando el índice enzimático (IE). El efecto del pH, la agitación, la concentración de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y el extracto de levadura en el cultivo sumergido también se evaluaron para las dos cepas que presentaron el mayor valor de IE, a través de un plan Plackett-Burman. (PB), para esto, realizó un estudio exploratorio de

naturaleza cualitativa. De las 150 cepas analizadas, 24 (16%) mostraron resultados positivos a 25 °C, 12 (8%) a 35 °C y ninguna cepa mostró actividad a 40 °C. Los valores más altos de IE obtenidos fueron 6.0 y 5.0 a 25 °C para las líneas T194 y T199, respectivamente. Los resultados de PB mostraron que solo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuvo una influencia significativa en la producción de lipasa, con valores que varían de 34.3 (T194) a 43.6  $\text{U.mL}^{-1}$  (T199). Se realizó un diseño completamente al azar con diferentes niveles de concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se observó que no hubo un efecto significativo para la cepa T194, pero las concentraciones de 30 y 35  $\text{g.L}^{-1}$  mostraron un efecto significativo para la cepa T199, las actividades varió de 61.0 a 70.1  $\text{U.mL}^{-1}$ . La adición de sulfato de amonio al medio de cultivo aumentó la producción de lipasa de la línea T194 de 34.3 a 60  $\text{U.mL}^{-1}$  y de 43.6 a 70.1  $\text{U.mL}^{-1}$  para la línea T199.

**Palabras clave:** Levaduras; Actividad lipolítica; Plackett-burman; Índice enzimático; Coco.

## 1. Introdução

As enzimas como catalisadores biológicos vêm se destacando mundialmente em processos que abrangem diversas áreas no setor industrial, são utilizadas principalmente para diminuir custos, na melhoria de processos, como também possibilitam o uso de novas matérias-primas pela mudança das características físico-químicas (Lima et al., 2019; Fellows, 2019). Além disso, apresentam uma alta especificidade, ação rápida e biodegradabilidade, maiores rendimentos em processos e uma redução na geração de resíduos (Lehninger et al., 2014; Coelho et al., 2008).

As enzimas podem ser obtidas de diferentes formas, seja a partir de animais, plantas e microrganismos. As enzimas microbianas têm sido alvo de muitos estudos, pois os microrganismos podem secretar grande quantidade de catalisadores com uma ampla gama de aplicações em muitas indústrias. O sucesso do uso de microrganismos para a produção de enzimas está relacionado à habilidade de se adaptarem e resistirem a condições de estresse, ausência do efeito da sazonalidade, possibilidade de manipulação genética e rápido desenvolvimento em cultura (Liu & Kokare, 2017; Hasan et al., 2006). Além disso, a manipulação de microrganismos possibilita a produção de enzimas em grande escala (Orlandelli et al., 2012).

Há uma grande quantidade de enzimas distintas, sendo que as hidrolases se destacam no cenário da tecnologia enzimática, pelo fato de proporcionarem modificações em matérias-primas relevantes, como a hidrólise de amido pelas amilases, o rompimento das ligações glicosídicas da celulose pelas celulasas. A liberação de ácidos graxos e glicerol pela ação das

lipases em óleos e gorduras modificam ou solubilizam gorduras, quebra emulsões, concede e melhora aromas a produtos lácteos de panificação e queijos, destacando-se também no tratamento de efluentes de indústrias distintas (Coelho et al., 2008; Lima et al., 2019).

A obtenção de lipases pode ser feita a partir de vários organismos, entretanto, as microbianas são mais promissoras, sendo as leveduras usualmente utilizadas na produção dessas enzimas, pois são microrganismos encontrados em diferentes habitats, sendo assim uma valiosa fonte natural para identificação de novas fontes de lipases que podem favorecer novas propriedades catalíticas (Salihu et al., 2016; Oliveira et al., 2014). Os principais gêneros de leveduras produtoras de lipases são *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomycopsis* (Liu & Kokare, 2017).

Outros microrganismos como fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus* (Penha et al., 2016) e bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Staphylococcus* também são produtores de lipases (Liu & Kokare, 2017).

Diversos fatores de composição do meio de cultivo podem potencializar a produção de lipase, tipos e concentrações de fontes de carbono e nitrogênio, fontes lipídicas, pH, temperatura e agitação são indispensáveis quando objetivo é aumentar a atividade enzimática (Colla et al., 2016 ; Fabiszewska et al., 2014).

Portanto o estudo das características bioquímicas das diferentes lipases produzidas pelos microrganismos, e também o conhecimento das condições ideais para a produção destas enzimas são fundamentais para empregá-las eficientemente nos diferentes processos industriais (Turati, 2012).

Frente à demanda por novas enzimas com prospecção de aplicabilidade, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas linhagens produtoras de enzimas (Paludo et al., 2019; Baratto, 2011).

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade lipolítica de linhagens de leveduras isoladas dos frutos de diferentes espécies de palmeiras do cerrado Tocantinense.

## **2. Metodologia**

Este estudo trata-se uma pesquisa experimental e laboratorial de natureza quantitativa, onde as condições do meio são controladas para realização dos ensaios, conforme descrito por Pereira et al., (2018). Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins (UFT) localizado no campus de Palmas.

## 2.1. Linhagens de leveduras

Foram utilizadas 150 linhagens de leveduras previamente isoladas de frutos de diferentes espécies de palmeiras do cerrado Tocantinense: tucum (*Bactris setosa*), inajá (*Maximiliana maripa*), macaúba (*Acrocomia intumescens*) e buriti (*Mauritia flexuosa*). Todas as linhagens pertencem à coleção de culturas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins e estão preservadas à -80 °C.

Antes de realizar os experimentos, todas as linhagens foram reativadas em ágar sabouraud glicose (5 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 18 g.L<sup>-1</sup> ágar) pela técnica de estriamento com incubação a 28 °C por 48 horas.

## 2.2. Seleção de linhagens lipolítica

A avaliação da capacidade lipolítica das linhagens foi feita em meio sólido contendo peptona (10 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (0,1 g.L<sup>-1</sup>), ágar (20 g.L<sup>-1</sup>), 10 mL de Tween 20 e pH ajustado para 6 com ácido acético de acordo com o método de Sierra (1956).

Com auxílio de palitos de dente estéreis foram inoculadas, em pontos, 8 linhagens por placa e as placas foram incubadas por sete dias, nas temperaturas 25, 35 e 40 °C.

A atividade lipolítica das linhagens foi observada como um halo claro visível ao redor das colônias, devido à formação de cristais de sais de cálcio. Os diâmetros dos halos de hidrólise (H) e do crescimento das colônias (C) foram aferidos com auxílio de paquímetro e os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE), que é a relação H/C, segundo proposto por Hankin e Anagnostakis (1975).

Os experimentos foram realizados em três repetições e o delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, foi aplicado o teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias usando o pacote estatístico Assistat<sup>®</sup> 7,7 beta.

## 2.3. Produção de lipase em cultivo submerso

Com base nos resultados obtidos no meio sólido foram selecionadas as 2 linhagens que apresentaram maior IE para a quantificação das lipases em cultivo submerso.

As linhagens selecionadas foram crescidas em caldo sabouraud glicose (50 g.L<sup>-1</sup> de glicose) durante 16 horas a 28 °C com agitação de 150 rpm para a obtenção do pré-inóculo. Alíquotas de 8 mL de pré-inóculo foram adicionadas diretamente aos meios de cultivo correspondendo a uma concentração inicial de 1,3 x 10<sup>7</sup> células por mL.

Para a produção de lipase em cultivo submerso foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo composto por óleo de oliva (20 g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (2 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g.L<sup>-1</sup>), peptona (10 g.L<sup>-1</sup>) e concentrações variáveis de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e extrato de levedura. O pH dos meios foi ajustado com tampão fosfato 0,5 μmol.L<sup>-1</sup> e os frascos incubados sob diferentes níveis de agitação a 25 °C. Foi utilizado um planejamento de Plackett-Burman (PB8) para se avaliar o efeito das variáveis pH, agitação, concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e extrato de levedura, com 8 ensaios, segundo Rodrigues e Iemma (2014).

O tempo de incubação total foi de 48 horas. Foram colhidas amostras a cada 24 horas, as quais foram centrifugadas por 30 min em centrífuga refrigerada e o sobrenadante (extrato enzimático bruto – EEB) foi armazenado sob refrigeração para posterior determinação da atividade enzimática. A Tabela 1 apresenta as variáveis e níveis estudados no PB8.

**Tabela 1.** Variáveis independentes e níveis utilizados no Delineamento de Plackett-Burman (PB8) para a produção de lipase.

Ensaio	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	pH	Agitação (rpm)
1	20	0	5	250
2	20	15	5	150
3	20	15	6	150
4	10	15	6	250
5	20	0	6	250
6	10	15	5	250
7	10	0	6	150
8	10	0	5	150

Fonte: Elaborada pelos autores (2020).

A Tabela 1 define a composição e combinação dos 8 ensaios com suas variáveis independente e níveis utilizados com o objetivo de determinar quais dessas variáveis vão exercer maior influência no processo para produção de lipase.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 10% de significância usando o *software Statistica 5.0*.

Foram selecionadas as variáveis estatisticamente significativas para a realização de um delineamento inteiramente casualizado (DIC), mantendo as demais condições conforme descrito acima e foram realizados 7 ensaios e os resultados foram submetidos à análise de

variância (ANOVA) e, quando significativos, foi aplicado o teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias usando o programa *ASSISTAT* 7.7 beta.

#### **2.4. Determinação de atividade lipolítica**

A medida da atividade lipolítica foi realizada por método titulométrico pela avaliação dos ácidos graxos liberados titulados com solução de NaOH 0,1 M até pH final 11, segundo a metodologia descrita por Freire et al., (1997) com modificações. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Seleção de linhagens lipolíticas**

Das 150 linhagens estudadas 24 (16%) apresentaram atividade lipolítica a 25 °C e 12 (8%) a 35 °C. Os valores de IE variaram de 1,7 a 6,0. A Tabela 2 apresenta os resultados das linhagens que obtiveram  $IE > 2$ , valor que, segundo Oliveira et al., (2007), indica boa atividade enzimática.

**Tabela 2.** Valores de Índice Enzimático (IE) para a produção de lipases nas diferentes temperaturas. Média de 3 repetições.

<b>Linhagem</b>	<b>25 °C</b>	<b>35 °C</b>
T7	2,2 <sup>cde</sup>	-
T10	2,4 <sup>cde</sup>	-
T15	2,0 <sup>de</sup>	2,3 <sup>cd</sup>
T17	3,2 <sup>cde</sup>	-
T39	1,7 <sup>e</sup>	2,8 <sup>cd</sup>
I102	2,1 <sup>de</sup>	2,0 <sup>cd</sup>
T178	-	2,3 <sup>cd</sup>
T189	2,7 <sup>cde</sup>	3,0 <sup>bcd</sup>
T194	6,0 <sup>a</sup>	4,9 <sup>a</sup>
T195	2,2 <sup>cde</sup>	-
I295	3,4 <sup>bcd</sup>	-
I318	3,1 <sup>cde</sup>	-
B753	3,0 <sup>cde</sup>	2,4 <sup>cd</sup>
T755	3,3 <sup>cde</sup>	2,7 <sup>cd</sup>
M977	2,2 <sup>cde</sup>	-
M1001	2,0 <sup>de</sup>	-
B1020	2,0 <sup>de</sup>	-
I1236	3,8 <sup>bc</sup>	3,5 <sup>abc</sup>
T60	3,4 <sup>bcd</sup>	2,6 <sup>cd</sup>
I296	2,3 <sup>cde</sup>	-
T199	5,0 <sup>ab</sup>	4,5 <sup>ab</sup>

(-) resultado negativo. Fonte: Elaborado pelos autores.

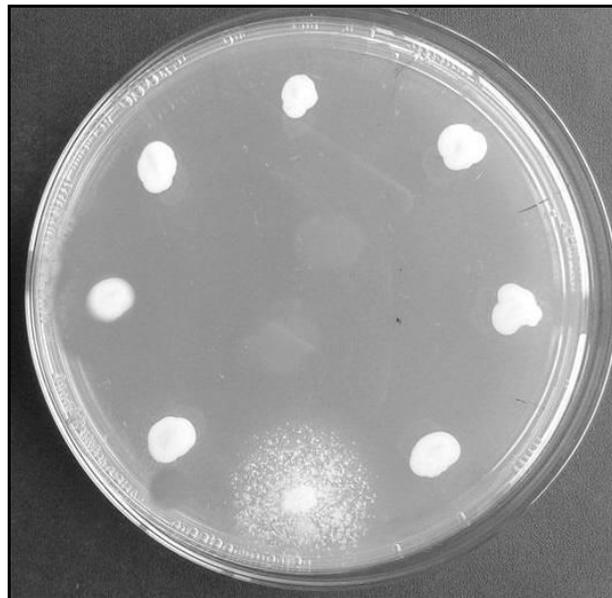
Na Tabela 2 letras anteriores ao código da linhagem indicam sua origem, buriti (B), inajá (I), macaúba (M), tucum (T), na segunda coluna observa-se a média da produção de lipase em meio sólido a 25 °C e na terceira coluna apresenta a produção a 35 °C, as médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo Teste de *Tukey*.

As linhagens T194 e T199 isoladas de tucum (*Bactris setosa*) apresentaram os maiores valores de IE a 25 °C e a 35 °C. Além dessas duas linhagens, I1236 isolada de inajá (*Maximiliana maripa*) também apresentou maior valor de IE, diferindo estatisticamente das demais linhagens. Na temperatura de 25 °C observou-se maior número de linhagens positivas

para a produção de lipases e maiores valores de IE, entretanto as linhagens T189, T39 e T15, isoladas de tucum, apresentaram aumentos nos valores de IE a 35 °C, e a linhagem T178 só apresentou atividade lipolítica nesta temperatura.

A Figura 1 apresenta um halo de hidrólise de uma linhagem lipolítica.

**Figura 1.** Halo de hidrólise formado ao redor da colônia produtora de lipases.



Fonte: autores (2020).

Percebe-se a partir da Figura 1 a produção de lipases em meio sólido através da formação do halo de hidrólise claro e visível ao redor da colônia produtora, proveniente da precipitação de cristais de sais de cálcio.

No cultivo a 40 °C nenhuma das linhagens apresentou resultado positivo, possivelmente porque a temperatura mais elevada prejudicou o crescimento celular e a produção da enzima. Os resultados obtidos apontam que o aumento da temperatura influenciou negativamente a produção de lipase, haja visto que o número de linhagens positivas a 35 °C foi 50% menor do que a 25 °C, exceto para a linhagem T178 que apresentou resultado positivo apenas a 35 °C.

Estudos como o de Vale et al., (2015) corroboram com resultados aqui encontrados onde os autores estudaram a ocorrência e o potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de babaçu (*Attalea speciosa*), uma palmeira oleaginosa do cerrado tocantinense, e obtiveram resultados expressivos para a atividade lipolítica com 73,8% dos 84 isolados apresentando formação de halo e índices de atividade enzimática.

Paludo et al., (2019) encontraram 40,5% de linhagens lipolíticas ao avaliar a produção enzimática de 205 linhagens isoladas de folhas em decomposição. Os autores consideram que estudos que investiguem novos microrganismos produtores de enzimas são de grande interesse biotecnológico e que as leveduras têm se destacado nesse contexto.

A busca e descrição de novas linhagens lipolíticas é de interesse biotecnológico, pois as lipases são comumente usadas na produção de uma variedade de produtos, variando de sucos de frutas, alimentos assados e fermentações de vegetais, tratamento de efluentes e uso como emulsificantes em alimentos e produtos farmacêuticos (Liu & Kokare, 2017).

### 3.2. Produção de lipase em cultivo submerso e influência das variáveis na produção de lipase.

As linhagens T194 e T199 foram selecionadas para os ensaios em cultivo submerso, uma vez que apresentaram os maiores valores de IE.

A Tabela 3 apresenta os valores de atividade lipolítica obtidos em cada ensaio do planejamento experimental Plackett-Burman (PB8).

**Tabela 3.** Resultados da atividade lipolítica ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) obtidos no PB8 em diferentes tempos de incubação para as linhagens T194 e T199.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	24h		48h	
					T194	T199	T194	T199
1	20	0	5	250	24,6	23,0	20,6	22,0
2	20	15	5	150	34,3	26,6	30,0	43,6
3	20	15	6	150	31,0	29,0	30,3	36,6
4	10	15	6	250	31,0	29,6	31,3	42,3
5	20	0	6	250	27,0	21,0	16,3	33,0
6	10	15	5	250	32,6	27,3	26,0	33,0
7	10	0	6	150	19,3	21,6	18,3	35,3
8	10	0	5	150	25,6	20,0	18,0	23,3

X<sub>1</sub>: Extrato de levedura; X<sub>2</sub>:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; X<sub>3</sub>: pH; X<sub>4</sub>: Agitação. Fonte: Elaborada pelos autores (2020).

Os valores de atividade lipolítica variaram de 16,3 a 43,6  $\text{U.mL}^{-1}$  entre as 2 linhagens (Tabela 3). Para a linhagem T194 a maior atividade enzimática foi obtida após 24h horas de incubação com valor de 34,3  $\text{U.mL}^{-1}$  e para a linhagem T199 a maior atividade foi obtida após 48h com valor de 43,6  $\text{U.mL}^{-1}$ .

A análise estatística dos resultados mostrou que apenas a variável  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentou efeito significativo ( $p < 0,1$ ) sobre a atividade lipolítica para ambas as linhagens com 24 h de incubação, e apenas para a linhagem T194 após 48 h de incubação.

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises estatísticas para linhagem T194.

**Tabela 4.** Análise dos efeitos para a linhagem T194.

	Efeito		Erro Padrão		t calculado		p-Valor	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Média	28,18	23,85	0,91	0,98	31,04	24,33	0,00	0,00
Extrato de levedura ( $x_1$ )	2,10	0,90	1,82	1,96	1,16	0,46	0,33	0,67
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $x_2$ )	8,10	11,10	1,82	1,96	4,46	5,66	0,02	0,01
pH ( $x_3$ )	-2,20	0,40	1,82	1,96	-1,21	0,20	0,31	0,85
Agitação ( $x_4$ )	1,25	-0,60	1,82	1,96	0,69	-0,31	0,54	0,77

Fonte: Elaborada pelos autores (2020).

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises estatísticas para linhagem T199.

**Tabela 5.** Análise dos efeitos para a linhagem T199.

	Efeito		Erro Padrão		t calculado		p-Valor	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Média	24,76	33,64	0,52	2,24	47,60	47,60	0,00	0,00
Extrato de levedura ( $x_1$ )	0,28	0,32	1,04	4,48	0,26	0,26	0,80	0,94
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $x_2$ )	6,73	10,48	1,04	4,48	6,46	6,46	0,00	0,10
pH ( $x_3$ )	1,08	6,33	1,04	4,48	1,03	1,03	0,37	0,25
Agitação ( $x_4$ )	0,92	-2,13	1,04	4,48	0,89	0,89	0,43	0,66

Fonte: Elaborada pelos autores (2020).

As Tabelas 4 e 5 exibem os resultados das análises estatísticas dos efeitos das variáveis (extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH e agitação) sobre a atividade lipolítica das linhagens T194 e T199 após 24 h e 48 h de incubação.

As maiores atividades enzimáticas foram observadas nas condições do ensaio 2, onde a variável significativa  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  encontrava-se em nível mais alto, e os menores valores de atividade enzimática foram obtidos nos ensaios em que o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se encontrava no nível

mais baixo (ensaio 1 e 5), indicando que maiores concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  favoreceriam a produção de lipases por estas linhagens.

Tan et al., (2004), ressaltam a importância das fontes de nitrogênio tanto inorgânico como orgânico para a síntese de enzimas, salientando que o nitrogênio orgânico pode oferecer aminoácidos e outros fatores para o crescimento do microrganismo, que são importantes para a produção enzimática e o nitrogênio inorgânico pode ser utilizado rapidamente para a síntese, deste modo, ambos são usados para a produção de lipases.

Oliveira et al., (2013) observaram também o aumento na atividade lipolítica de *Candida guilliermondii* na presença de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em fermentação submersa utilizando resíduos da agroindústria.

### 3.2.1. Delineamento inteiramente casualizado (DIC) para o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Com base nos resultados obtidos do planejamento de Plackett-Burman foi avaliada a influência de diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20, 25, 30, 35  $\text{g.L}^{-1}$ ) na produção de lipase. Foi utilizado o mesmo meio para cultivo submerso conforme descrito na metodologia, entretanto fixando valores de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura e pH 5,0, com incubação a 150 rpm durante 24 h para T194 e 48 h para a T199.

Os valores médios das atividades lipolíticas obtidos foram de 61,0 para a linhagem T194 e 70,1 para T199. A tabela 6 apresenta a média dos valores obtidos para as faixas estudadas.

**Tabela 6.** Resultados das atividades lipolíticas ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) obtidas para as linhagens T194 e T199 após 24 h e 48 h de incubação, respectivamente. Média de 3 repetições.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	T194	T199
20	58.1 <sup>a</sup>	60.1 <sup>b</sup>
25	58.6 <sup>a</sup>	66.0 <sup>ab</sup>
30	59.6 <sup>a</sup>	69.8 <sup>a</sup>
35	61.0 <sup>a</sup>	70.1 <sup>a</sup>

Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelos autores (2020).

Para a linhagem T194 não houve diferença significativa na atividade lipolítica nas diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  utilizadas. Ensaio utilizando faixas mais amplas de

concentração devem ser realizados para se verificar a possível interferência do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na produção da enzima.

Para a linhagem T199 a atividade lipolítica foi maior nas concentrações mais elevadas de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Tan et al., (2003) demonstraram que, dentre as fontes de nitrogênio testadas, o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se destacou na produção de lipases por *Candida* sp., aumentando em 3 vezes a produção, o que corrobora com os dados obtidos para a linhagem T199.

Os resultados encontrados no presente estudo mostram o potencial dessas linhagens de leveduras para produção de lipases, com valores de atividade superiores aos encontrados por Wolski (2008) para o fungo filamentosso *Penicillium* sp., que apresentou máxima atividade de 20,96 U.mL<sup>-1</sup>.

Embora a produção de lipases por fungos filamentosos seja normalmente mais reportada na literatura, os dados obtidos no presente trabalho mostram expressiva produção de lipases por linhagens de leveduras isoladas de frutos das palmeiras tucum (*Bactris setosa*), inajá (*Maximiliana maripa*), macaúba (*Acrocomia intumescens*) e buriti (*Mauritia flexuosa*) o que representa um importante potencial biotecnológico dessas linhagens.

#### 4. Considerações Finais

As linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras oriundas do cerrado tocantinense mostram potencial como produtoras de lipases. Temperaturas acima de 35 °C parecem inibir a produção de lipases e a suplementação do meio de cultivo com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  influencia significativamente a produção da enzima. Concentrações mais elevadas de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (acima de 20 g.L<sup>-1</sup>) incrementam a atividade lipolítica.

Sugere-se assim novas pesquisas que contemplem uma faixa mais amplas dos níveis das variáveis estudadas, pH, extrato de levedura e agitação.

#### Referências

Baratto, C. M., Salamoni, S. P., Costa, R., Oliveira, C. B. D., & Locatelli, G. O. (2011). Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência, Joaçaba*, 11(2), 15-28.

Coelho, M. A. Z., Salgado, A. M., & Ribeiro, B. D. (2008). *Tecnologia enzimática*. Editora EPUB.

Colla, L. M., Primaz, A. L., Benedetti, S., Loss, R. A., Lima, M. D., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. (2016). Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *brazilian journal of microbiology*, 47(2), 461-467.

Fabiszewska, A. U., Stolarzewicz, I. A., Zamojska, W. M., & Białecka-Florjańczyk, E. (2014). Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. *Applied biochemistry and microbiology*, 50(4), 404-410.

Fellows, P. J. (2018). *Tecnologia do Processamento de Alimentos-: Princípios e Prática*. Artmed Editora.

Freire, D. M., Teles, E. M., Bon, E. P., & Sant'Anna, G. L. (1997). Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 409-421). Humana Press.

Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. *Microbiology*, 98(1), 109-115.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.

Lehninger, A. L., Nelson, David L., & Cox, Michael M. (2014). *Bioquímica: Princípios de Bioquímica*. 6° ed, Sarvier Editora..

Lima, U. A. (2019). *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Edgard Blücher Editora.

Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 267-298). Academic Press.

Oliveira, A. C. D., Vargas, J. V. C., Rodrigues, M. L. F., & Mariano, A. B. (2013). Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 15(1), 19-26.

Oliveira, A. C. D., Fernandes, M. L., & Mariano, A. B. (2014). Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1503-1511.

Oliveira, A. N. D., Oliveira, L. A. D., Andrade, J. S., & Chagas-Júnior, A. F. (2007). Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Food Science and Technology*, 27(1), 61-66..

Orlandelli, R. C., Specian, V., Felber, A. C., & Pamphile, J. A. (2012). Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 7(3).

Paludo, G. B., de Abreu-Lima, T. L., & Carreiro, S. C. (2019). Potencial enzimático de leveduras isoladas de folhas em decomposição. *Acta Tecnológica*, 13(2), 65-77.

Pereira A.S. et al. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em:  
[https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Penha, E. D. M., Viana, L. D. A. N., Gottschalk, L. M. F., Terzi, S. D. C., Souza, E. F. D., Freitas, S. C. D., ... & Salum, T. F. C. (2016). Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. *Ciência rural*, 46(4), 755-761.

Rodrigues, M. I., & Iemma, A. F. (2014). Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª. *Campinas/SP*.

Salihu, A., Bala, M., & Alam, M. Z. (2016). Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. *Journal of Taibah University for Science*, 10(6), 850-859.

Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23(1), 15-22.

Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., & Deng, L. (2003). Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*, 39(4), 459-465.

Tan, T., Zhang, M., Xu, J., & Zhang, J. (2004). Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochemistry*, 39(11), 1495-1502.

Turati, D.F. M. (2012). Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de Lipase por *Penicillium janthinellum*. 2012. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Vale, S. C. S., Guimarães, A. P. M., & Moraes, P. B. (2015). Ocorrência e potencial biotecnológico de leveduras associadas aos frutos de *Attalea speciosa* Mart ex Spreng. *Journal of Bioenergy and Food Science*, 2(4), 213-225.

Wolski, E. (2008) *Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando Penicillium sp. livre e imobilizado*. 2008. 100f. Dissertação (mestrado em engenharia de alimentos)-Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Erechim- RS.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Eduardo Henrique Santos Guedes – 40%

Carla Gonçalves Conte – 10%

Thiago Lucas de Abreu-Lima-20%

Solange Cristina Carreiro-30%