

UNIVERSIDADE REGIONAL DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES CAMPUS DE
ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA ‘LIPASE SINTÉTICA’
PRODUZIDA POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus pararoseus***

Alessandra Smaniotto

Erechim, fevereiro de 2010

ALESSANDRA SMANIOTTO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA ‘LIPASE SINTÉTICA’
PRODUZIDA POR UMA NOVA CEPA DE *Sporidiobolus pararoseus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Orientadores: Debora de Oliveira
Helen Treichel

Erechim, fevereiro de 2010.

À minha família, por tornar tudo possível

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente aos meus pais, que abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Suas atitudes são o verdadeiro exemplo de doação, que a meu ver é a verdadeira definição da palavra AMOR. A vocês, minha eterna gratidão.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e da Missões – Campus de Erechim, mais precisamente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização desse trabalho.

Às minhas queridas orientadoras Débora de Oliveira e Helen Treichel, pela inestimável paciência com as minhas inquições e disposição para auxiliar na construção desse trabalho, e também pelos bem humorados “conselhos de vida” em relação às minhas sempre presentes dúvidas e indecisões.

Aos Professores do curso de Química, especialmente Rogério Marcos Dallago, por compartilhar comigo as suas inúmeras idéias e dispor-se sempre em transmitir os seus conhecimentos, e Fábio Penha, Sibele Pergher e Luciana Venquiaruto, pela maravilhosa oportunidade de conviver com eles e pelos inúmeros conselhos que fizeram da nossa relação essa grande amizade que transcende a condição de professor-aluno, e também aos professores Daniel Emmerich, Natália Paroul e Maria Carolina Esmelindro.

Aos professores Marco Di Luccio e Rogério Cansian, pelas contribuições que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

Ao Fernando, meu amor e meu melhor amigo, pelo apoio incondicional às minhas decisões em todos os aspectos da vida.

À minha irmã e seu marido Adriano, pela amizade, apoio, caronas e conselhos.

À minha querida avó, pelo amor, carinho e pelas orações.

Ao meu Tio Paulo, pelo apoio, conversas e amizade.

À minha sogra e amiga Dirce Reginatto, por todas as nossas conversas e reflexões sobre a vida que me acrescentaram muito.

Às grandes amigas Chaline Detoni e Marcela Caovilla, por mesmo longe estarem sempre presentes.

À amiga Luciane Batistella, pelos conselhos e amizade.

À minha querida amiga e ajudante Aline Skovronski, pela disposição e inestimável ajuda na realização experimental desse trabalho, e também pela amizade.

Aos meus cães Fiapo (in memorian) e Mindi pelo carinho e apoio moral.

Ao pessoal da Central de Materiais pela disponibilidade.

Às secretárias do Mestrado em Engenharia de Alimentos, Karine e Andréia, pela disponibilidade e competência.

Aos demais professores do Curso de Engenharia de Alimentos, especialmente Geciane Toniazzi, Eunice Valduga, Altemir Mossi, Marcio Mazutti e Vladimir de Oliveira e aos ex-professores Alexandre Cichoski e Marcos e Fernanda Corazza.

Ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, especialmente os doutorandos Silvana Menoncin, Morgana Maloz, Daniela Ceni, Jamile Zeni, Aline Richetti e Lindomar Lerin, os mestrados Marcell Fernandes, Lenir Rigoli, Viviane Astolfi, Jonaína Gomes, Robison Scherer e Daiane Boschetto e as bolsistas Daniela Remonato (Peke), Renata Vardanega e Lídia Tiggemann pelas idéias, incentivo, ajuda e principalmente pela amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica, especialmente a doutoranda Luciana Monks, os mestrados Graciele Kuhn, Juliana Silva, Thiago Weschenfelder, Claiton Brusamarello e Cláudia Trentin e os bolsistas Giovani Zabet, André Polloni e Preta Marangoni pelas idéias, incentivo, ajuda e principalmente pela amizade.

Aos meus queridos amigos Gabriela Coffy, Adriana Castilhos, Gustavo Henrique Ceni, Andrea Mignoni Zanatta e Maria Rita Chaves Nogueira pelo incentivo e amizade.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
1.0 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
1.1 Enzimas.....	15
1.2 Lipases.....	16
1.2.1 Histórico.....	16
1.2.2 Definições.....	17
1.2.2.1 Aspectos gerais.....	17
1.2.2.2 Origem.....	18
1.2.2.3 Lipases utilizadas industrialmente.....	19
1.2.2.4 Características físico-químicas.....	22
1.2.2.5 Estrutura tridimensional e mecanismo catalítico das lipases.....	23
1.2.3 Produção de lipases microbianas.....	25
1.2.3.1 Micro-organismos produtores.....	26
1.2.3.2 Estratégias operacionais para a produção de lipases.....	26
1.2.3.3 Parâmetros físicos e bioquímicos para a produção de lipases.....	27
1.2.4 Concentração de lipases.....	29
1.2.5 Avaliação da atividade sintética em solventes orgânicos.....	31
1.2.6 Caracterização bioquímica de lipases.....	31
1.2.6.1 Especificidade ao substrato.....	31
1.2.6.2 Estabilidade térmica.....	32
1.2.6.3 Efeitos de temperatura e memória de pH na atividade enzimática.....	33
1.3 Considerações finais e Objetivos.....	34
2.0 – MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 – Micro-organismo.....	35
2.2 – Produção de células.....	35
2.3 – Condições de Cultura.....	36
2.4 – Estudo da produção de lipase.....	36
2.4.1 – Otimização da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional.....	36
2.4.2 – Cinética da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional.....	37
2.4.3 – Produção de lipase em meio industrial.....	38
2.5 – Concentração com sulfato de amônio.....	38
2.6 – Caracterização parcial das lipases produzidas.....	39
2.6.1 – Especificidade aos substratos de síntese (esterificação).....	39
2.6.2 – Estabilidade em diferentes temperaturas.....	39
2.6.2.1 – Estabilidade em temperaturas altas.....	39
2.6.2.2 – Estabilidade em temperaturas baixas.....	40
2.6.3 – Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética.....	40
2.7 – Métodos Analíticos.....	41
2.7.1 – Atividade lipásica sintética (ALS).....	41

2.7.2 – Atividade proteásica.....	42
2.7.3 – Crescimento microbiano.....	42
2.7.4 – Carbono total.....	43
2.7.5 – Proteína.....	43
3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1 – Estudo da Produção de Lipase.....	44
3.1.1 – Otimização da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional.....	44
3.1.2 – Cinética da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional.....	52
3.1.3 – Avaliação preliminar da produção de lipase em meio industrial.....	53
3.4 – Concentração com sulfato de amônio.....	54
3.5 – Caracterização parcial das lipases produzidas.....	56
3.5.1 – Especificidade aos substratos de esterificação.....	57
3.5.2 – Estabilidade em diferentes temperaturas.....	60
3.5.2.1 – Estabilidade em temperaturas altas.....	61
3.5.2.2 – Estabilidade em temperaturas baixas (armazenamento).....	65
3.5.4 – Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética.....	66
3.6 – Considerações finais.....	72
4.0 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	73
4.1 Conclusões.....	73
4.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	75
5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
6.0 – ANEXOS.....	84
Anexo I.....	84
Identificação da levedura.....	84
Anexo II.....	86
Hidrolisado de levedura.....	86
Anexo III.....	86
Solução de azocaseína 0,5%.....	86
Anexo IV.....	86
Reagente de Bradford.....	86
Anexo V.....	87
Curva de calibração para a medida de crescimento celular.....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 –	Exemplos de processos industriais empregando lipases	21
TABELA 1.2 –	Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente	22
TABELA 2.1 –	Níveis dos fatores investigados nos planejamentos experimentais seqüenciais	37
TABELA 2.2 –	Níveis investigados na avaliação do efeito da memória de pH e da temperatura na atividade lipásica sintética	0
TABELA 3.1 –	Matriz do primeiro planejamento experimental (valores reais e codificados) com as respostas em termos de atividade lipásica sintética	45
TABELA 3.2 –	Matriz do segundo planejamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de atividade lipásica sintética ...	48
TABELA 3.3 –	Coefficientes de regressão para a resposta atividade lipásica sintética (U/mL)	49
TABELA 3.4 –	Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para produção de ‘lipase sintética’	49
TABELA 3.5 –	Desvios relativos entre ALS observadas e previstas pelo modelo	50
TABELA 3.6 –	Comportamento dos extratos enzimáticos provenientes da fermentação dos meios convencional e industrial em relação à precipitação com sulfato de amônio.	55
TABELA 3.7 –	Matriz dos planejamentos experimentais realizados (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica sintética) para avaliação dos efeitos de memória do pH e temperatura ..	67
TABELA 3.8 –	Modelos propostos para o comportamento das enzimas em diferentes memórias de pH e temperaturas	69
TABELA 3.9 –	Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo proposto para ALS (U/mL) da enzima ‘IP’	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Lipase de <i>Candida rugosa</i> representada nas conformações fechada (a) e aberta (b) com a tampa em preto	24
FIGURA 3.1 – Cinética de produção de ‘lipase sintética’ ao longo de 168 horas de fermentação em um meio composto por 2,0, 0,5, 0,5 e 1,0 % (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente	44
FIGURA 3.2 – Diagrama de Pareto para o delineamento fracionário 2^{4-1}	46
FIGURA 3.3 – Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de lipase	51
FIGURA 3.4 – Cinética da produção de ‘lipase sintética’, consumo de carbono e nitrogênio e crescimento celular ao longo de 120 horas de fermentação na condição otimizada	53
FIGURA 3.5 – Atividades lipásicas sintéticas das enzimas produzidas utilizando (a) ácido butírico e (b) ácido oléico como doadores acila	58
FIGURA 3.6 – Estabilidade das enzimas a 30 °C	62
FIGURA 3.7 – Estabilidade das enzimas a 45 °C	63
FIGURA 3.8 – Estabilidade das enzimas a 60 °C	64
FIGURA 3.9 – Atividades lipásicas sintéticas relativas das enzimas ao longo do período de armazenamento em (a) geladeira (4 °C) e (b) congelador (-10 °C)	65
FIGURA 3.10 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para a avaliação do comportamento da lipase sintética em diferentes temperaturas e memórias de pH, sendo (a) ‘CB’, (b) CP’, (c) ‘IB’ e (d) ‘IP’	71
FIGURA 6.1 – Árvores filogenéticas desenhadas a partir da análise ‘neighbour-joining’ baseadas nas sequências do domínio D1/D2, alusivas às relações entre <i>Sporidiobolus pararoseus</i> e o novo isolado W8.	85
FIGURA 6.2 – Curva de calibração para medida de crescimento celular	87

RESUMO

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) pertencem à família das hidrolases e atuam em ligações de ésteres carboxílicos e vêm se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia enzimática por serem enzimas versáteis que aceitam uma ampla variedade de substratos. Atuam, por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos. Entretanto, a reação inversa, esterificação, pode ocorrer em ambientes com restrição de água. A lipase produzida por uma nova cepa isolada de *Sporidiobolus pararoseus* apresenta habilidade catalítica potencial para reações de esterificação. De forma a aumentar a sua atividade sintética, esse trabalho foi primeiramente focado na otimização da produção de ‘lipase sintética’ por fermentação submersa de um meio convencional baseado em peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva utilizando a técnica de planejamento de experimentos. De acordo com os resultados obtidos no primeiro planejamento (2^{4-1}), as concentrações de extrato de levedura e NaCl foram selecionadas para posterior maximização da atividade pela metodologia de superfície de resposta. A máxima atividade lipásica sintética obtida foi de 26,9 U/mL no meio otimizado (5,0, 6,8, 7,0 e 1,0% (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente), representando um aumento de 6,36 vezes comparado ao meio inicial. A cinética de produção de ‘lipase sintética’ na condição otimizada foi avaliada em termos de atividade lipásica sintética, atividade proteásica, biomassa e carbono total; a máxima atividade lipásica sintética foi observada durante a fase estacionária do crescimento (72 horas). Foi empregado um meio industrial substituindo-se os componentes do meio (peptona, extrato de levedura e óleo de oliva) por água de maceração de milho, hidrolisado de levedura e óleo residual de fritura, respectivamente, sendo que a atividade foi reduzida à metade. Uma etapa de concentração dos extratos com sulfato de amônio foi realizada, sendo que a saturação de 20% de sulfato de amônio foi a que promoveu as maiores atividades lipásicas sintéticas e atividades específicas. As enzimas obtidas (convencional bruta e precipitada ‘CB’ e ‘CP’ e industrial bruta e precipitada ‘IB’ e ‘IP’) foram caracterizadas parcialmente em relação à estabilidade em temperaturas altas e baixas, especificidade ao substrato de esterificação (diferentes ácidos graxos e álcoois) e faixas de memória de pH e temperatura de atuação. As enzimas apresentaram, em geral, maior especificidade pelos ácidos graxos e álcoois de cadeia mais curta. As enzimas precipitadas apresentaram uma boa estabilidade térmica, mostrando-se mais estáveis em temperaturas altas e baixas do que as enzimas brutas. As enzimas ‘CB’ e ‘CP’ apresentaram as maiores atividades em memórias de pH próximas à neutralidade (6,5) e temperatura de cerca de 40°C). Por outro lado, as enzimas ‘IB’ e ‘IP’ mantêm a atividade em uma ampla faixa de pH, porém apresentam preferência por temperaturas reacionais mais altas.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, E.C. 3.1.1.3) are a part of the hydrolase family which act in carboxylic ester bounds and have been standing out in the biotechnology field as they are versatile enzymes that accept a wide range of substrates. They act, by definition, in the organic-water interface, catalyzing the carboxylic ester bounds hydrolysis and releasing alcohols and organic acids. However, the esterification inverse reaction can occur in water restricted environments. The lipase produced by a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain possesses potential catalysis ability for esterification reactions. In order to improve its synthetic activity, this work was at first aimed at optimizing 'synthetic lipase' production by submerged fermentation of a conventional media based on peptone, yeast extract, NaCl and olive oil using experimental design technique. According to the results obtained in the first experimental design (2^{4-1}), yeast extract and NaCl concentrations have been selected to further optimization by response surface methodology. The maximum 'synthetic lipase' activity obtained was 26.9 U/mL in the optimized media (5.0, 6.8, 7.0 and 1.0% (wt/v) of peptone, yeast extract, NaCl and olive oil, respectively), representing a 6.36-fold increase compared to the initial medium. The time course of 'synthetic lipase' production in the optimized condition was evaluated in terms of synthetic activity, protease activity, biomass and total carbon; maximum synthetic activity was observed during the stationary phase of growth (72 hours). An industrial media has been employed replacing the media components (peptone, yeast extract and olive oil) by corn steep liquor, yeast hydrolyzed and residual frying oil, respectively, and the activity was reduced by half. An ammonium sulphate concentration step has been done and the 20% ammonium sulphate saturation promoted the higher synthetic activities and specific activities. The obtained enzymes (conventional crude and precipitated 'CB' e 'CP' and industrial crude and precipitated 'IB' e 'IP') has been partially characterized in terms of stability in high and low temperatures, esterification substrate specificity (different fatty acids and alcohols) and acting ranges of pH memory and temperature. The enzymes presented, in general, more specificity for the short chain alcohols and fatty acids. The precipitated enzymes presented a good thermal stability, being more stable in both temperatures than the crude enzymes. The 'CB' and 'CP' enzymes presented the higher activities at pH memories around neutrality (6.5) and medium temperature (about 40°C). On the other hand, the 'IB' and 'IP' enzymes kept the activity in a wide range of pH memory but presented preference for higher reaction temperatures.

INTRODUÇÃO

As lipases (triacylglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma família de hidrolases que atuam em ligações de ésteres carboxílicos. As lipases assumiram um importante papel no campo da biotecnologia, já que são enzimas versáteis que aceitam uma ampla faixa de substratos. Atuam, por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster e liberando ácidos orgânicos e álcoois. Contudo, a reação inversa (esterificação) ou reações de transesterificação podem ocorrer em ambientes com restrição de água (Kademi et al., 2004, Hasan et al., 2006, Lotti e Alberghina, 2007, Bon et al., 2008 e Reis et al., 2009).

As lipases são onipresentes em todos os tipos de organismos vivos e podem ser obtidas a partir de diferentes fontes como micro-organismos, animais e plantas (Lotti e Alberghina, 2007, Bon et al., 2008 e Reis et al., 2009). As enzimas de bactérias e fungos apresentam grande potencial como biocatalisadores industriais, já que apresentam altas taxas de síntese, elevada conversão de substrato em produto, grande versatilidade e simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva e facilidade de recuperação do caldo fermentativo (Lotti e Alberghina, 2007 e Bon et al., 2008).

As lipases microbianas são produzidas principalmente por cultura submersa (Sharma et al., 2001). Uma grande variedade de condições de cultura que estimulam ou suprimem a produção de lipases microbianas são descritas na literatura, e não há um procedimento geral para aumentar a sua produção (Sharma et al., 2001 e Kademi et al., 2004). A expressão de proteínas lipolíticas é frequentemente induzida e pode ser modulada por vários parâmetros (Lotti e Alberghina, 2007). Entre eles, as fontes de carbono e nitrogênio fornecidas durante a fermentação são de particular importância, assim como a adição de compostos que podem atuar como indutores, tais como as fontes de carbono lipídicas (Sharma et al., 2001, Lotti e Alberghina, 2007 e Treichel et al., 2010). Foi relatado que alguns micro-organismos eucarióticos podem produzir diferentes formas de lipases com diferentes propriedades

catalíticas, e a produção dessas lipases pode ser influenciada pelas condições de cultura (Wang et al., 2008).

As atividades hidrolítica e sintética são frequentemente utilizadas para caracterizar a habilidade catalítica da lipase, sendo a primeira mais comumente empregada. Contudo, foi proposto que as atividades sintéticas das lipases em solventes orgânicos não correspondem às suas atividades hidrolíticas, e que nem todas as lipases são capazes de catalisar reações sintéticas em solventes orgânicos. De modo a aumentar a habilidade catalítica da lipase em solventes orgânicos, os efeitos na produção de enzima devem ser estudados sistematicamente e as condições de cultura devem ser otimizadas (Wang et al., 2008, Teng e Xu, 2008 e Teng et al., 2009).

Sendo um indicador da habilidade catalítica em solventes orgânicos, a atividade sintética de lipases atrai cada vez mais o olhar dos pesquisadores (Wang et al., 2008). A produção de lipases para uso em solventes orgânicos tem vantagens como a maior solubilidade em substratos hidrofóbicos, deslocamento do equilíbrio termodinâmico em favor da síntese ao invés da hidrólise e aumento da termoestabilidade da enzima. Contudo, as atividades catalíticas são geralmente mais baixas que as expressas em meio aquoso, devido às dificuldades na homogeneização do sistema catalítico (Persson et al., 2002).

As ‘lipases sintéticas’ estão ganhando mais atenção nos dias atuais devido ao seu potencial para catalisar a produção de biodiesel, reduzindo o custo operacional associado ao processo convencional. Como o custo de produção da lipase é o maior impedimento para a comercialização do processo biocatalítico, vários esforços têm sido realizados para desenvolver sistemas mais baratos (Vieira et al., 2006 e Ranganathan et al., 2008). Além da produção de biodiesel, muitas outras aplicações da lipase com atividade sintética foram propostas, tais como reações enantiosseletivas (D’Antona et al., 2008 e Pilissão et al., 2009), síntese de vários ésteres (Pires-Cabral et al., 2007, Cramer et al., 2007 e Nyaradzo et al., 2009) e resolução cinética de compostos quirais (Ball et al., 2009).

Até a presente data as lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente (Kumar e Gupta, 2008 e Treichel et al., 2010). Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas altamente ativas com propriedades apropriadas encoraja a pesquisa por novas fontes de enzimas (Kumar e Gupta, 2008). Em um trabalho prévio desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de

Biotecnologia de Alimentos, vários microrganismos potencialmente produtores de lipases sintéticas e hidrolíticas foram isolados a partir de variadas fontes (Griebler et al., 2009).

A utilização de fontes alternativas de nutrientes para os micro-organismos, como os resíduos agroindustriais, pode auxiliar na redução de problemas de poluição ambiental associados ao descarte desses compostos no meio ambiente (Treichel et al., 2010); além de reduzir o custo global de produção da enzima pela utilização de matérias-primas de menor valor agregado.

A precipitação com sulfato de amônio é útil como uma etapa de pré-purificação de extratos enzimáticos, já que promove a separação dos outros compostos do meio, facilitando os processos subsequentes devido à ausência de possíveis interferentes (Martins et al., 2008).

O efeito de diversos fatores na atividade e estabilidade de lipases brutas e purificadas vem sendo estudado por diversos pesquisadores. Fatores como pH, temperatura, efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/surfactantes, e outros inibidores pode aumentar ou suprimir a atividade das lipases. Além disso, por ser uma enzima versátil, a lipase apresenta variadas especificidades aos substratos reacionais. A caracterização bioquímica das lipases determina a adequação da enzima para a aplicação em diferentes processos industriais (Hasan et al., 2009).

Esse trabalho relata, em um primeiro momento, o estudo da otimização da composição do meio de cultura para a máxima produção de ‘lipase sintética’ a partir de uma nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus* por fermentação submersa de um meio convencional. Na condição otimizada, foram monitoradas a atividade lipásica sintética, atividade proteásica, carbono total e biomassa ao longo de 144 horas de fermentação. Em um segundo momento, os componentes do meio convencional foram substituídos por fontes de nutrientes alternativas nas concentrações otimizadas. Os extratos enzimáticos obtidos pela fermentação dos meios convencional e industrial foram concentrados com sulfato de amônio em diferentes saturações. Devido à importância da caracterização bioquímica, as enzimas brutas e precipitadas obtidas nesse trabalho foram caracterizadas em termos de especificidade aos substratos de esterificação (ácidos graxos e álcoois), estabilidade em temperaturas altas e baixas (armazenamento) e comportamento frente a diferentes memórias de pH e temperaturas.

1.0 – REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura referente ao histórico, definição, aplicações industriais, produção e características físico-químicas e bioquímicas de lipases, a qual tem por objetivo apresentar o estado da arte e fundamentar a pesquisa em produção e caracterização de lipases de origem microbiana.

1.1 ENZIMAS

A utilização de enzimas pelo homem remonta aos períodos mais antigos da civilização. Importantes atividades humanas em comunidades primitivas como a produção de certos tipos de alimentos e bebidas, e o curtimento de peles para produzir couro para o vestuário, envolviam a aplicação de atividades enzimáticas, mesmo que inconscientemente. Contudo, apenas a partir do século 19, a natureza das enzimas e a maneira como atuam começou a ser esclarecida. Durante o século 20, o reconhecimento das enzimas como proteínas juntamente com o *design* de técnicas para a sua purificação e análise, abriram caminho para o desenvolvimento de processos voltados à sua produção e utilização industrial (Lotti e Alberghina, 2007).

Até os anos 60, as vendas totais de enzimas eram de apenas uns poucos milhões de dólares anuais, mas o mercado então cresceu de forma espetacular. Devido ao melhor entendimento da bioquímica de produção, dos processos fermentativos, e dos métodos de recuperação, tornou-se possível a produção de um crescente número de enzimas de forma acessível e sua introdução em produtos e processos industriais reais. Ainda, devido às diferentes transformações que as enzimas podem catalisar, o número de enzimas utilizadas comercialmente continua a se multiplicar (Sharma et al., 2001 e Kirk et al., 2002).

A biotecnologia moderna tornou possível fornecer enzimas com maiores atividades e

adaptadas às diferentes condições de processo, permitindo uma expansão do seu uso industrial. O resultado é uma indústria altamente diversificada que ainda está crescendo tanto em tamanho quanto em complexidade (Kirk et al., 2002).

Cerca de 4000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são utilizadas comercialmente (Sharma et al., 2001). Os benefícios oferecidos pelas enzimas são a especificidade (controle dos produtos produzidos e minimização de reações laterais indesejadas), as condições amenas (a planta industrial pode ser operada com menor capital e custos energéticos) e a menor produção de resíduos (menor custo no tratamento de resíduos e contribuição desprezível da enzima para a DBO) (Hasan et al., 2006).

No mínimo 75% de todas as enzimas industriais (incluindo as lipases) são hidrolíticas, sendo usadas para a degradação de várias substâncias naturais. As proteases dominam o mercado, contando com aproximadamente 40% de todas as vendas de enzimas, devido à sua utilização ampla na indústria de detergentes e panificação. Várias carbohidrases (amilases e celulasas), utilizadas em indústrias como as de amido, têxtil, de detergentes e panificação, representam o segundo maior grupo (Sharma et al., 2001 e Kirk et al., 2002).

A maioria das enzimas industriais são de origem microbiana (Sharma et al., 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos micro-organismos existentes foram testados como produtores de enzimas (Hasan et al., 2006).

1.2 LIPASES

1.2.1 Histórico

Relatos prévios da produção de enzimas capazes de degradar substratos lipídicos por células bacterianas e eucarióticas – as enzimas lipolíticas, que incluem lipases, esterases e fosfolipases – datam de cerca de um século atrás (Lotti e Alberghina, 2007). Em 1856, Claude Bernard descobriu uma lipase em suco pancreático como uma enzima que hidrolisava gotículas insolúveis de óleo e as convertia em produtos solúveis. A presença de lipases tem

sido observada desde 1901 para *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*), *B. pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*) e *B. fluorescens* (*P. fluorescens*), os quais representam as bactérias produtoras de lipases melhor estudadas atualmente. A hidrólise de triglicerídeos por enzimas vêm sendo estudada há cerca de 300 anos e a habilidade das lipases em catalisar a hidrólise e também a síntese de ésteres já foi reconhecida há cerca de 70 anos.

As lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas animal e utilizadas como auxiliar digestivo para consumo humano tanto em uma mistura bruta com outras hidrolases (pancreatina) quanto na forma purificada. O interesse inicial nas lipases microbianas foi gerado devido à escassez do pâncreas e dificuldades na coleta de material disponível (Hasan et al., 2006).

1.2.2 Definições

1.2.2.1 Aspectos gerais

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) pertencem ao grupo das hidrolases e constituem o grupo mais importante de biocatalisadores. São enzimas onipresentes de considerável importância fisiológica, indispensáveis para a bioconversão de lipídios na natureza. As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, inter-esterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise. A habilidade das lipases para realizar biotransformações altamente específicas vem tornando-as crescentemente populares em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos, síntese orgânica e farmacêutica (Castro e Anderson, 1995, Sharma et al., 2001, Hasan et al., 2006, Vakhlu e Kour, 2006, Shu et al., 2010, Hasan et al., 2009 e Treichel et al., 2010).

As lipases atuam, por definição, na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos. Entretanto, como mostrou Pottevin pela primeira vez em 1906, pode ocorrer, em ambientes com restrição de água, a reação inversa (esterificação) ou, também, diversas reações de transesterificação (Bon et al., 2008, Sharma et al., 2001, Jaeger e Reetz, 1998, Hasan et al., 2006 e Reis et al., 2008). Sua capacidade de catalisar essas reações com elevada eficiência e estabilidade, em geral, assim como as suas propriedades químio, régio ou enantiosseletivas, tornam essas enzimas muito atraentes e versáteis (Bon et al., 2008).

As duas principais categorias dentro das quais as reações catalisadas por lipases podem ser classificadas são a hidrólise e a síntese, sendo que dentro dessa segunda categoria as reações podem ser adicionalmente classificadas como esterificação, inter-esterificação, alcoólise e acidólise. As últimas três reações são frequentemente agrupadas dentro do termo geral trans-esterificação (Reis et al., 2008).

i. Hidrólise



ii. Síntese:

(a) Esterificação



(b) Interesterificação



(c) Alcoólise



(d) Acidólise



As pesquisas em lipases estão focadas particularmente na caracterização estrutural, elucidação de mecanismo de ação, cinética, sequenciamento e clonagem de genes, e caracterização geral de desempenho. Em comparação com esse esforço, relativamente pouco trabalho tem sido feito no desenvolvimento de sistemas biorreatores robustos para utilização comercial (Sharma et al., 2001).

1.2.2.2 Origem

As lipases são enzimas onipresentes em todos os tipos de organismos vivos, podendo ser obtidas de diferentes fontes, como micro-organismos, animais e vegetais (Lotti e Alberghina,

2007, Bon et al., 2008 e Reis et al., 2008). Seu papel fisiológico é hidrolisar triglicerídeos a diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, e glicerol (Kademi et al., 2004). Em eucariotos, essas enzimas podem ser encontradas dentro do lisossomo ou nos espaços de fora das células, e estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios incluindo a digestão, absorção e reconstituição de gorduras e metabolismo de lipoproteínas. Dentre as lipases de eucariotos superiores, as lipases pancreáticas de suínos vêm sendo utilizadas por vários anos como enzimas técnicas. Outras lipases de mamíferos são de interesse médico como compostos farmacêuticos. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva energética; esse tipo de enzima tem aplicações interessantes em biocatálise, já que apresenta seletividade a ácidos graxos não usuais. Em eucariotos inferiores e bactérias, as lipases podem ser intracelulares ou secretadas para degradar substratos lipídicos presentes no meio, e em alguns organismos patogênicos podem até atuar como fatores de virulência (Lotti e Alberghina, 2007 e Sharma et al., 2001).

Tal diversidade na origem, localização celular e função é refletida em um impressionante grau de variabilidade bioquímica, desde que as lipases de organismos diferentes, ou até isoenzimas produzidas pelo mesmo organismo, podem variar muito em massa molecular, pH e temperatura ótimos, modificações pós-translacionais, e especificidades ao substrato e reacionais. Essa ampla variação é importante para a biotecnologia como uma fonte potencial de biocatalisadores dotados de uma ampla faixa de ótimo e especificidades que podem ser adaptadas a variadas condições de processo. Tentativas de ampliar o poder biocatalítico das lipases disponíveis estão tomando uma série de rotas, incluindo a busca por enzimas novas produzidas por organismos adaptados a habitats não usuais, a abordagem metagenômica e a mutagênese racional e randômica de enzimas conhecidas (Lotti e Alberghina, 2007).

1.2.2.3 Lipases utilizadas industrialmente

As enzimas lipolíticas constituem um dos mais importantes grupos de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. A produção de lipases microbianas requer um entendimento detalhado do mecanismo molecular que governa a sua secreção e formação. A otimização de propriedades das lipases industrialmente relevantes tem sido estabelecida com sucesso

utilizando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e *flavors*.

As lipases são biocatalisadores que têm muitas aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce significativamente. Estima-se que, no futuro, elas terão importância industrial comparável à das peptidases, que atualmente representam 25 a 40% das vendas de enzimas industriais (Bon et al., 2008).

Alguns produtos industrialmente importantes fabricados a partir de gorduras e óleos por processos químicos podem ser produzidos por lipases com maior rapidez e melhor especificidade sob condições amenas. O comportamento quimio-, régio- e enantioespecífico dessas enzimas despertou um grande interesse por parte de pesquisadores e setor industrial.

Com a preocupação em relação às questões ambientais e de custo, a biotecnologia está ganhando espaço rapidamente devido às várias vantagens que oferece em relação às tecnologias convencionais. O campo das enzimas industriais está agora vivenciando maiores iniciativas em pesquisa e desenvolvimento, resultando no desenvolvimento de um grande número de novos produtos e na melhoria no processo e na obtenção de vários produtos existentes.

As enzimas de bactérias e fungos têm o maior potencial como biocatalisadores industriais, uma vez que têm alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva e maior facilidade de recuperação do caldo fermentativo. A maioria das lipases bacterianas são obtidas a partir de *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Chromobacterium*; e as lipases fúngicas amplamente utilizadas são produzidas por *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Aspergillus* sp. (Lotti e Alberghina, 2007 e Bon et al., 2008).

Lipases de diferentes origens encontram-se disponíveis, hoje em dia, no mercado e, desde 1979, já ocorre o emprego em larga escala de lipases como catalisadores de processos, conforme mostra a Tabela 1.1.

Impulsionadas por sua versatilidade, as lipases são aplicadas em numerosos processos industriais, incluindo as indústrias oleoquímicas, de detergentes, panificação, leiteira (fabricação de queijo), indústria agroquímica, limpeza de superfícies, assim como indústrias têxteis e de processamento de couro e papel. Ainda, a estabilidade de muitas lipases em

solventes orgânicos abre caminho para a sua exploração na síntese orgânica (esterificação, transesterificação, aminólise e oximólise), catalisando as reações de forma quimio-, régio- e/ou enantiosseletiva, encontrando aplicações nas indústrias cosmética, farmacêutica, de biodiesel, síntese de biossurfactantes e de química fina (Sharma et al., 2001, Bon et al., 2008, Reis et al., 2008, Reetz, 2002 e Lotti e Alberghina, 2007).

Tabela 1.1. Exemplos de processos industriais empregando lipases (Bon et al., 2008).

Processo	Início da operação	Empresa
Interesterificação de gorduras	1979, 1983	Fuji Oil, Unilever
Hidrólise de ésteres	1988	Sumitomo
Transesterificação	1990	Unilever
Acilação	1996	BASF

As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas incluem os fatos de que elas são (1) estáveis em solventes orgânicos, (2) não requerem co-fatores, (3) possuem uma ampla especificidade ao substrato (quimiosseletividade) e (4) exibem uma alta enantiosseletividade. Um grande número de lipases têm sido produzidas comercialmente, sendo a maioria delas originárias de fungos e bactérias (Lotti e Alberghina, 2007 e Jaeger e Reetz, 1998). Uma publicação sobre lipases comercialmente disponíveis listou enzimas de 34 fontes diferentes, incluindo 18 de fungos e 7 de bactérias (White e White, 1997). A Tabela 1.2 lista as lipases microbianas que parecem ser as mais amplamente utilizadas em biotecnologia.

Um fator limitante para o desenvolvimento de tecnologias baseadas em lipase para a síntese de novos compostos é a escassez de lipases com as características específicas de processamento requeridas. Uma quantidade crescente de lipases com propriedades adequadas está se tornando disponível no mercado, e estão sendo realizados grandes esforços para comercializar biotransformações e sínteses catalisadas por lipases (Sharma et al., 2001).

Tabela 1.2. Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente (Jaeger e Reetz, 1998).

	Organismos produtores	Aplicações biotecnológicas	Comercializada por
Fúngica	<i>Candida rugosa</i>	Síntese orgânica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntese orgânica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo em detergentes	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
Bacteriana	<i>Rhizomucor miehei</i>	Produção de alimentos	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntese orgânica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo em detergentes	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aditivo em detergentes	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica	Asahi, Biocatalysts

1.2.2.4 Características físico-químicas

As massas moleculares de lipases conhecidas variam de menos de 20 kDa como no caso das pequenas enzimas lipolíticas lipase A de *Bacillus subtilis* até 60 kDa para as lipases fúngicas maiores. Apesar disso, quase todas as lipases apresentam uma arquitetura semelhante e são estruturadas com um domínio de proteína único. Exceções são encontradas em lipases de eucariotos superiores onde funções complexas, como a interação com outras moléculas e a regulação, são alcançadas por meio de módulos estruturais adicionais.

A faixa de temperatura ótima observada é ampla, geralmente entre 30 e 60 °C. Contudo, isso diz respeito às lipases obtidas de fontes convencionais. Mais recentemente a busca por enzimas de extremófilos enriqueceu o espectro das lipases com temperatura ótima em cerca de 70 °C ou alta atividade em baixas temperaturas. Tais recursos extremos e não usuais abrem a possibilidade de aplicar essas enzimas na forma selvagem sem a necessidade de adaptá-las às condições de aplicação. Muitas lipases utilizadas em biocatálise tem um pH ótimo neutro ou alcalino, em alguns casos acima ou próximo a 9,0. Menos comuns são as lipases ácidas ativas em pH baixo como 3,0. Algumas lipases de *Bacillus* sp. são ativas em uma ampla faixa de pH (Lotti e Alberghina, 2007).

1.2.2.5 Estrutura tridimensional e mecanismo catalítico das lipases

Nos últimos anos, a elucidação da relação estrutura-função de lipases, bem como de seu mecanismo catalítico, na presença ou não de interfaces orgânico-aquosas, tem sido muito estudada. A ativação de lipases ocorre na interface água-lipídio, um fenômeno que pode ser relacionado às características estruturais únicas dessa classe de enzimas. Como as lipases e os lipídios interagem na interface ainda não está totalmente claro e é matéria de investigação intensa (Bon et al., 2008, Reetz, 2002 e Sharma et al., 2001).

As estruturas tridimensionais da lipase fúngica de *Rhizomucor michei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990. Desde então, diversas outras estruturas lipásicas foram determinadas. Essas enzimas exibem um padrão de formação característico: um dobramento básico de α - β -hidrolases. O centro ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina, o que também é encontrado em serina proteases (Jaeger e Reetz, 1998, Kademi et al., 2004, Reis et al., 2008 e Bon et al., 2008).

A resolução da estrutura tridimensional de uma lipase por difração de raios-X revelou a presença de uma estrutura α -helicoidal oligopeptídica na superfície da proteína que protege o centro ativo, denominada “tampa”. O lado hidrofóbico da hélice é virado para dentro do sítio ativo, que fica então inacessível às moléculas do substrato. Contudo, quando uma lipase se liga em uma interface lipídica, um rearranjo conformacional ocorre, causando o deslocamento da “tampa”, enquanto o sítio ativo da lipase fica totalmente acessível para o substrato. Como um resultado, o lado hidrofóbico da tampa fica exposto à fase lipídica, aumentando as interações hidrofóbicas entre a enzima e a superfície lipídica (Figura 1.1). A mecânica de abertura da tampa pode variar entre enzimas mas em todos os casos conduz à criação de um sítio ativo aberto, acessível e hidrofóbico para a ligação lipídica. Outras estruturas tridimensionais foram descritas e a presença da tampa corroborada, mas o número e a posição das α -hélices envolvidas na composição da tampa difere entre as lipases. Estudos de cristalografia mostraram, também, que a maior parte das lipases apresenta o sítio recoberto, sugerindo que o estado inativo provavelmente prevalece em solução (Jaeger e Reetz, 1998, Kademi et al., 2004, Lotti e Alberghina, 2007 e Bon et al., 2008).

De maneira geral, quando a enzima é cristalizada na presença de inibidores ou cofatores, a estrutura obtida encontra-se sempre na conformação aberta. No caso de lipases não complexadas, o estado conformacional da estrutura cristalina depende da composição e das propriedades microscópicas da solução. Assim, as estruturas de lipases até hoje determinadas são geralmente divididas em duas categorias: as que têm o sítio ativo acessível ao solvente (estrutura aberta) e as que têm o sítio ativo inacessível ao solvente (estrutura fechada). Estes estados são importantes para a função destas enzimas. Na ausência de interfaces, é observada uma baixa atividade lipolítica, sugerindo que as estruturas fechadas predominam em meios aquosos.

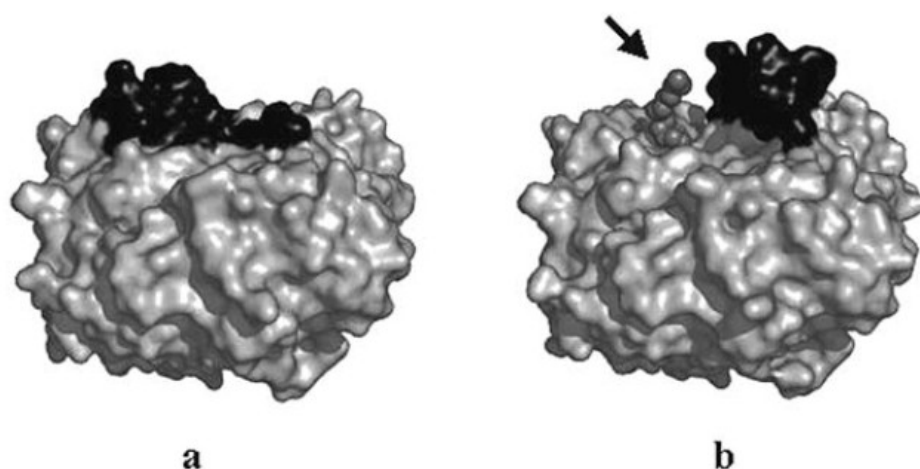


Figura 1.1. Lipase de *Candida rugosa* representada nas conformações fechada (a) e aberta (b) com a tampa em preto (Lotti e Alberghina, 2007).

As estruturas tridimensionais das lipases conhecidas até hoje mostram que o grau de mobilidade da “tampa” varia fortemente, encontrando-se desde casos em que parece haver dois estados extremos – aberto e fechado – com níveis de energia significativamente inferiores aos dos estados de transição, até casos com tampas muito móveis, com vários estados intermediários de energia comparáveis (Bon et al., 2008).

O mecanismo de reação para lipases é comum a todos os membros da família serina hidrolases, sendo os complexos acil-enzima os intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipases (Reis et al., 2008 e Reetz, 2002). As lipases são carboxilesterases que

atuam em acilglicerídeos de cadeia longa e são classificadas como serina hidrolases devido à inibição por fosfato de dietil p-nitrofenol (Kademi et al., 2004).

As reações lipolíticas ocorrem na interface lipídio-água, implicando que a cinética não pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten, já que esta é válida somente se a reação catalítica ocorre em uma fase homogênea. Os substratos lipásicos normalmente formam um equilíbrio entre os estados monomérico, micelar e emulsificado, resultando na necessidade de um sistema modelo adequado para estudar a cinética lipásica (Jaeger e Reetz, 1998).

O fenômeno denominado “ativação interfacial” foi empregado, por muito tempo, para distinguir lipases de esterases (enzimas ativas em ligações éster de moléculas solúveis que seguem a cinética clássica de Michaelis-Menten). Esse comportamento encontrou uma explicação estrutural alguns anos depois quando as primeiras estruturas tridimensionais das lipases foram elucidadas (Bon et al., 2008 e Lotti e Alberghina, 2007).

Contudo, a classificação de uma enzima lipolítica como uma verdadeira lipase (EC 3.1.1.3) com base em sua ativação na interface e na presença de uma estrutura tipo tampa não se aplica em vários casos. Lipases sem uma tampa ou com uma tampa mas nenhuma ativação interfacial já foram descritas (Lotti e Alberghina, 2007 e Bon et al., 2008). Algumas lipases não mostram ativação na presença de substratos emulsificados; ao contrário, sua atividade aumenta continuamente, indicando que essas enzimas são capazes de degradar substratos monoméricos e emulsionados, enquanto esterases verdadeiras degradam somente substratos monoméricos. Até a data, a definição mais ampla de uma lipase como uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise e a síntese de acilgliceróis de cadeia longa é geralmente aceita e parece ser adequada para descrever todas as lipases conhecidas (Lotti e Alberghina, 2007, Kademi et al., 2004 e Jaeger e Reetz, 1998).

1.2.3 Produção de lipases microbianas

As lipases microbianas têm recebido atenção especial por parte do meio industrial devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade ao substrato e representam a classe de enzimas mais amplamente empregada em aplicações biotecnológicas e química orgânica (Treichel et al., 2010).

1.2.3.1 Micro-organismos produtores

Os micro-organismos produtores de lipases são encontrados em diversos habitats como resíduos industriais, indústrias de processamento de óleo vegetal, panificadoras, solos contaminados com óleo, sementes oleaginosas, alimentos em decomposição e depósitos de carvão.

Os microrganismos produtores incluem bactérias, fungos, leveduras e actinomicetos. Os métodos para a detecção de atividades lipásicas em micro-organismos geralmente envolvem o *screening* em placas de ágar utilizando tributirina ou compostos cromogênicos como substratos; ou ainda o cultivo em meio sólido com o surfactante Tween 80, em que zonas opacas em torno das colônias indicam organismos produtores de lipases (Sharma et al., 2001).

As espécies fúngicas são preferencialmente cultivadas por fermentação em estado sólido (FES), enquanto que bactérias e leveduras são cultivadas por fermentação submersa (FS) (Treichel et al., 2010).

1.2.3.2 Estratégias operacionais para a produção de lipases

Várias estratégias operacionais são utilizadas na produção de lipases: fermentação submersa (FS) em batelada, batelada repetida, batelada alimentada, ou em cultura contínua. O modo de operação é, em uma ampla escala, ditado pelas características do produto de interesse (Kademi et al., 2004 e Treichel et al., 2010). As lipases microbianas são produzidas principalmente por cultura submersa, mas métodos de fermentação em estado sólido (FES) também podem ser utilizados. Cultivos com células imobilizadas também tem sido usadas em alguns poucos casos (Sharma et al., 2001 e Wolski et al., 2009).

Nos últimos anos, surgiu um interesse considerável na utilização de fermentação em estado sólido para a produção de lipases microbianas. Nesse processo, resíduos agroindustriais (farelo de trigo, arroz, etc.) são misturados com óleos e utilizados como substratos sólidos para a produção de lipases. A FES é uma boa opção para a produção industrial de lipases microbianas. Ainda, os resíduos utilizados são de baixo custo, e as enzimas são recuperadas na forma concentrada no final da fermentação, dessa forma reduzindo o custo do tratamento de efluentes (Kademi et al., 2004).

No caso da fermentação submersa (FS), o micro-organismo e os substratos encontram-se submersos no meio líquido, o que apresenta várias vantagens em relação à FES. Devido à

homogeneidade do sistema, a transferência de calor e massa é muito mais eficiente, facilitando a manutenção do pH, temperatura e taxa de aeração. Dessa forma, o processo é mais fácil de controlar, manter e monitorar, tornando mais simples o estudo da cinética e modelagem e, conseqüentemente, a ampliação de escala. Além disso, os produtos da fermentação são em geral relativamente de simples recuperação utilizando métodos de centrifugação ou filtração. Esses fatores tornaram a fermentação submersa muito mais popular (Vogel e Todaro, 1997, Stanbury et al., 2003 e Rao, 2005).

1.2.3.3 Parâmetros físicos e bioquímicos para a produção de lipases

As lipases estão envolvidas em processos metabólicos específicos, por isso a expressão dos genes que as codificam é estreitamente regulada. A ocorrência desses mecanismos regulatórios deve ser levada em particular consideração durante a produção de lipases industriais de origem microbiana. Uma ampla variedade de condições de cultivos que estimulam ou suprimem a produção de lipases microbianas são descritas na literatura, e não há um procedimento geral para melhorar a produção da enzima (Kademi et al., 2004 e Hasan et al., 2009).

As lipases microbianas são em sua maior parte extracelulares e sua produção é fortemente influenciada pela composição do meio de cultura e por fatores físico-químicos como temperatura, pH e oxigênio dissolvido (Treichel et al., 2010). A expressão de proteínas lipolíticas é frequentemente induzida e pode ser modulada por vários parâmetros. O conhecimento da regulação da expressão gênica é de particular relevância em vários casos conhecidos, onde o organismo fonte produz isoenzimas lipásicas. Geralmente isomorfos de proteínas estão intimamente relacionados nas características bioquímicas e sequenciais, mas não são idênticos, e diferenças podem ser relevantes do ponto de vista catalítico.

Os requerimentos nutricionais para o crescimento microbiano são satisfeitos por várias alternativas de meio de cultura, como os baseados em componentes definidos (meio sintético ou convencional) como açúcares, óleos, e componentes complexos como a peptona, extrato de levedura, extrato de malte, ou em resíduos agroindustriais que contém todos os componentes necessários para o desenvolvimento do micro-organismo. Uma mistura desses dois tipos de meio também pode ser usada com o propósito de produzir lipase. Dentre os componentes do meio de cultura, as fontes de carbono e nitrogênio fornecidas durante a fermentação são de

particular importância, como é a adição de compostos que podem atuar como indutores, por exemplo, ácidos graxos, tweens e óleo de oliva (Lotti e Alberghina, 2007 e Treichel et al., 2010).

As fontes de nitrogênio devem ser cuidadosamente consideradas para o crescimento do micro-organismo e otimização da produção de lipase. Pode ser empregada uma fonte de nitrogênio orgânico como a uréia, ou uma fonte de nitrogênio inorgânica como sulfato de amônia. Ainda, um meio rico contendo peptona, triptona, ou extrato de levedura pode ser usado (Kademi et al., 2004 e Treichel et al., 2010).

O fator majoritário para a expressão de atividade lipásica é a fonte de carbono, já que as lipases são enzimas induzíveis. Essas enzimas são geralmente produzidas na presença de uma fonte de lipídios como o óleo e outro indutor como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais da bile e glicerol (Treichel et al., 2010).

Apesar de a presença de lipídios no meio de cultura parecer essencial para a produção de lipases, o tipo de lipídio utilizado pode variar muito. Frequentemente óleo de oliva ou triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa são utilizados como fontes de carbono e como uma forma de induzir a produção de lipases microbianas. Em certos casos, eles apresentam um efeito inibitório na produção. Outros óleos vegetais, incluindo os óleos de palma, césamo, côco e girassol, são menos custosos que o óleo de oliva e também apresentam um efeito positivo na produção de enzima. Fontes de carbono lipídicas parecem ser geralmente essenciais para a obtenção de um alto rendimento em lipase; contudo, alguns autores produziram bons rendimentos na ausência de óleos e gorduras (Sharma et al., 2001 e Kademi et al., 2004).

Vários açúcares, incluindo frutose, maltose e glicose, podem ter um efeito estimulante na produção enzimática. Contudo, em certos casos, a glicose causa repressão catabólica da produção de enzima. A utilização de goma arábica para emulsificar o meio de cultura contendo óleo pode aumentar a produção de enzima por melhorar a disponibilidade do substrato. O mesmo efeito é observado com Tween 80, Triton X-100, sais da bile e glicerol (Kademi et al., 2004).

Nos últimos anos, a pesquisa para a seleção de substratos adequados para processos fermentativos está sendo focada principalmente em resíduos agroindustriais, devido às suas vantagens potenciais. A utilização de resíduos agroindustriais fornece substratos alternativos e

pode auxiliar na resolução de problemas de poluição associados ao descarte desses resíduos. A natureza do substrato é o fator mais importante que afeta o processo fermentativo. A escolha do substrato depende de muitos fatores, relacionados principalmente ao custo e disponibilidade desses resíduos (Treichel et al., 2010).

Parâmetros físicos estabelecidos durante a fermentação, como o pH do meio, a temperatura e o fornecimento de oxigênio também devem ser considerados, já que a produção de lipases pode ser dependente da fase de crescimento da cultura. Além disso, a idade e o volume de inóculo, a agitação e o tempo de incubação também são fatores muito importantes a serem considerados (Lotti e Alberghina, 2007 e Hasan et al., 2009).

A aeração tem um efeito altamente variável na produção de lipases, sendo a concentração de oxigênio muitas vezes usada como um critério para determinar se uma fermentação é dependente ou independente do oxigênio. Contudo, é a taxa de transferência de oxigênio que parece ser crítica para a produção de lipases. Frascos agitados são usualmente empregados para a produção de enzimas extracelulares por organismos aeróbios para aumentar a taxa de aeração (Kademi et al., 2004 e Hasan et al., 2009).

Geralmente, são alcançadas altas produtividades por otimização do meio de cultura. A otimização da concentração de cada componente que constitui um meio de cultivo é usualmente um procedimento que consome muito tempo. A prática clássica de mudar uma variável por vez, mantendo as demais constantes, é considerada ineficiente, já que não explica os efeitos de interação entre as variáveis e seus efeitos no processo fermentativo (Treichel et al., 2010).

1.2.4 Concentração de lipases

A etapa de purificação é importante para a obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com maiores atividades enzimáticas. O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima, já que, após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que podem não ser de interesse. Independentemente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a purificação tem uma capacidade limitada no que se refere ao aumento da atividade específica (Menoncin et al., 2009).

A técnica de precipitação de proteínas com sais, aplicada como pré-tratamento do meio contendo a enzima de interesse, consiste em uma das técnicas de concentração de proteínas

para a sua separação dos outros compostos do meio, facilitando os processos subseqüentes devido à ausência de possíveis interferentes (Martins et al., 2008). A precipitação de proteínas pela adição de sais baseia-se na diminuição da sua solubilidade em altas concentrações de sal. O sal remove a água da superfície da proteína revelando as suas partes hidrofóbicas, as quais se unem ocasionando a precipitação da proteína. As proteínas mais hidrofóbicas precipitarão primeiramente, permitindo o fracionamento (Stanbury et al., 2003).

O sulfato de amônio é o sal mais utilizado, por ser inofensivo para a enzima (é usualmente empregado na conservação de enzimas) e bastante solúvel, o que proporciona forças iônicas suficientemente elevadas para precipitar quase todas as proteínas presentes no meio. Como qualquer método de precipitação, a adição de sais como o sulfato de amônio não é muito seletiva e geralmente a preparação final não apresenta pureza elevada, o que limita o uso desse método. É, contudo, útil como uma etapa inicial de concentração, já que a proteína precipitada pode ser prontamente dissolvida em uma pequena quantidade de água (Illanes, 2008 e Bon et al., 2008).

O sal é adicionado ao sobrenadante até uma porcentagem de saturação em que a enzima de interesse é precipitada e separada por centrifugação. A composição do extrato, sua concentração e temperatura podem influenciar a precipitação, no caso das enzimas a temperatura deve ser mantida baixa (4°C). A adição do sal deve ser lenta e sob agitação para favorecer a homogeneidade. Após a centrifugação o precipitado deve ser redissolvido em tampão adequado, utilizando-se um volume de aproximadamente duas vezes o volume de precipitado (Rigo, 2009).

O sulfato de amônio é bem descrito na literatura para precipitação de lipases, sendo que as concentrações utilizadas variam de acordo com os estudos, em uma faixa de 40 a 90% de saturação (Rigo, 2009). As atividades lipásicas, atividades lipásicas específicas e fatores de purificação após a precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura variam muito de acordo com as condições experimentais de fermentação e precipitação e o micro-organismo empregado. Contudo, os fatores de purificação observados são em geral menores que 10, mesmo em condições otimizadas.

1.2.5 Avaliação da atividade sintética em solventes orgânicos

As atividades hidrolítica e sintética são frequentemente utilizadas para caracterizar a habilidade catalítica da lipase, e a primeira é geralmente preferida. A atividade hidrolítica é a característica básica das lipases; é com base nessa atividade que as lipases são geralmente vendidas e garantidas pelo produtor. A atividade hidrolítica de diferentes lipases ou de uma lipase derivada de diferentes lotes de produção pode não ser sempre um bom indicativo do potencial de atividade sintética. Além disso, nem todas as lipases que apresentam atividade hidrolítica são capazes de catalisar reações sintéticas em solventes orgânicos. De modo a aumentar a habilidade catalítica da lipase em solventes orgânicos, os efeitos na produção de enzima devem ser estudados sistematicamente e as condições de cultura devem ser otimizadas (Wu et al., 1996, Wang et al., 2008, Teng e Xu, 2008 e Teng et al., 2009).

Sendo um indicador da habilidade catalítica em solventes orgânicos, a atividade sintética de lipases atrai cada vez mais o olhar dos pesquisadores (Wang et al., 2008). A produção de lipases para uso em solventes orgânicos tem vantagens como a maior solubilidade em substratos hidrofóbicos, deslocamento do equilíbrio termodinâmico em favor da síntese ao invés da hidrólise e aumento da termoestabilidade da enzima. Contudo, as atividades catalíticas são geralmente mais baixas que as expressas em meio aquoso, devido às dificuldades na homogeneização do sistema catalítico (Persson et al., 2002).

1.2.6 Caracterização bioquímica de lipases

O efeito de diversos fatores na atividade e estabilidade de lipases brutas e purificadas vem sendo estudado por diversos pesquisadores. Fatores como pH, temperatura, efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/surfactantes, e outros inibidores pode aumentar ou suprimir a atividade das lipases. Além disso, por ser uma enzima versátil, a lipase apresenta variadas especificidades aos substratos reacionais. A caracterização bioquímica das lipases determina a adequação da enzima para a aplicação em diferentes processos industriais (Hasan et al., 2009).

1.2.6.1 Especificidade ao substrato

A especificidade das lipases é geralmente crucial para a sua aplicação com propósitos analíticos ou industriais (Castro e Anderson, 1995). A especificidade ao substrato vem sendo

intensamente investigada em sistemas reacionais bifásicos e meios reacionais orgânicos. Modelos cinéticos usualmente baseados na aplicação das suposições de Michaelis-Menten foram propostos, como aqueles que empregam um fator de competição para expressar a especificidade ao substrato (Peter e Preda, 2002).

A especificidade ao substrato de lipases em reações de esterificação é importante para obter um melhor entendimento da relação estrutura-função e melhorar os parâmetros reacionais, proporcionando maiores conversões e aplicabilidade (Peter e Preda, 2002). Dependendo das características de especificidade da lipase, esta pode se tornar atraente para diferentes aplicações em áreas industriais potenciais (Sun et al., 2009).

As lipases são capazes de catalisar reações com uma ampla faixa de substratos, mas as taxas de reação variam amplamente com a estrutura das moléculas do substrato. As diferentes afinidades de uma molécula de lipase por diferentes álcoois e ácidos graxos pode ser entendida em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo das lipases. Poucos dos muitos substratos que se ligam ao sítio ativo podem liberar uma quantidade suficiente de energia de ligação para ocasionar uma mudança na conformação da lipase para uma forma mais eficiente cataliticamente (Abbas e Comeau, 2003). A especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (hidratação estérica e interações hidrofóbicas) (Reis et al., 2008 e Rigo, 2009).

1.2.6.2 Estabilidade térmica

A termoestabilidade de um biocatalisador permite uma maior temperatura operacional, o que é claramente vantajoso devido à maior reatividade (maiores taxas reacionais, menores restrições difusionais), maior estabilidade, maior rendimento de processo (solubilidade dos substratos e produtos aumentada e deslocamento favorável do equilíbrio em reações endotérmicas) e risco reduzido de contaminação microbológica (Hasan et al., 2006). Consequentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável para as lipases (Sharma et al., 2001).

Enzimas termoestáveis podem ser obtidas de organismos mesofílicos e termofílicos; até psicrofílicos podem produzir algumas enzimas termoestáveis. Enzimas termoestáveis obtidas a partir de fontes microbianas são altamente vantajosas para aplicações biotecnológicas, já que

podem ser produzidas com baixos custos e exibem alta estabilidade. Nos últimos anos, há uma grande demanda por enzimas termoestáveis na área industrial (Hasan et al., 2006).

A estabilidade térmica de uma lipase está obviamente relacionada com a sua estrutura (Sharma et al., 2001). Em baixos teores de água, como é o caso das enzimas liofilizadas, as moléculas de enzima apresentam uma certa rigidez conformacional, que é responsável por algumas consequências interessantes observadas em solventes orgânicos anidros. Uma dessas consequências é a maior estabilidade quando submetida a temperaturas elevadas, já que a conformação rígida é mais estável que a flexível (observada na forma totalmente hidratada da enzima).

Além da rigidez, outra razão para o aumento da estabilidade é que vários processos covalentes envolvidos na inativação irreversível de proteínas como a desaminação, hidrólise peptídica e decomposição da cistina requerem água. Esses processos irreversíveis são também extremamente lentos em baixos teores de água (Gupta, 1992).

Outra propriedade importante a ser avaliada é a estabilidade ao longo do período de armazenamento em baixas temperaturas (Menoncin et al., 2009). O estudo da estabilidade da enzima em baixas temperaturas indica a melhor temperatura de estocagem da enzima para aumentar a sua vida de prateleira.

1.2.6.3 Efeitos de temperatura e memória de pH na atividade enzimática

Uma outra consequência importante da rigidez conformacional das moléculas de enzima contidas nos extratos enzimáticos liofilizados é a memória de pH. Quando ‘transferida’ da água para solventes orgânicos, a ‘conformação’ da enzima no meio aquoso é mantida. Dessa forma, a conformação da enzima em diferentes pH no meio aquoso é mantida após a liofilização (Gupta, 1991).

A atividade enzimática em solventes orgânicos é criticamente dependente do pH da solução aquosa antes da liofilização, porque a memória de pH é atribuída a uma fixação das ionizações dos grupos protéicos catalíticos após a secagem da preparação biocatalítica (Sun e Xu, 2009 e Sun et al., 2009).

Muitos resultados são apresentados na literatura em relação às faixas de atuação de lipases em função do pH e da temperatura. Contudo, a comparação destes resultados torna-se difícil, já que o comportamento da enzima pode variar de acordo com os métodos

fermentativos, meios e micro-organismos são empregados, bem como diferentes sistemas e grau de purificação (Rigo, 2009). O comportamento da enzima normalmente é avaliado em valores de pH em torno da neutralidade, mas também em valores fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0); e temperaturas em torno da média (30-40 °C), mas versando entre 20 e 100 °C.

Ainda existem poucas referências na literatura em relação à avaliação do comportamento de lipases sintéticas frente a diferentes temperaturas e memórias. Dentre as referências utilizadas na discussão desse trabalho, apenas os trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009) e Sun et al. (2009) realizaram a avaliação de efeito da temperatura e memória de pH e o trabalho de Ozyilmaz (2009) avaliou o efeito da temperatura apenas na atividade sintética das lipases produzidas.

1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E OBJETIVOS

Com a revisão da literatura apresentada, é possível concluir que as lipases sintéticas de origem microbiana apresentam um grande potencial de aplicações biotecnológicas. Até a presente data as lipases de levedura de *Candida rugosa* e *Candida antarctica* são as principais fontes de muitas lipases disponíveis comercialmente (Kumar e Gupta, 2008 e Treichel et al., 2010). Ao mesmo tempo, a demanda contínua por enzimas altamente ativas com propriedades apropriadas encoraja a pesquisa por novas fontes de enzimas (Kumar e Gupta, 2008).

Neste sentido, é de grande importância a realização de estudos sistemáticos sobre condições apropriadas de produção de lipase a partir de micro-organismos isolados e pré-selecionados, incluindo o estudo da sua produção em meios de baixo custo. Portanto, o estudo da otimização da composição do meio de cultura para a máxima produção de ‘lipase sintética’ a partir de novas cepas microbianas é de grande valia.

O conhecimento das características bioquímicas das lipases produzidas, como as faixas de pH e temperatura de atuação, as estabilidades quando submetidas a altas temperaturas ou armazenadas em baixas temperaturas, e a especificidade aos substratos reacionais são de extrema importância para determinar suas possíveis aplicações. Com base nestes aspectos e também na lacuna encontrada na literatura em relação à produção e caracterização de lipases sintéticas produzidas por micro-organismos isolados e pré-selecionados, o presente trabalho teve por objetivo geral investigar estas importantes etapas de processo.

2.0 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo empregado nesse trabalho foi isolado previamente por Griebeler et al. (2009), a partir de farelo de soja, como um potencial produtor de ‘lipase sintética’, utilizando metodologias de seleção em meio sólido. O micro-organismo foi identificado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do CENA-USP-Piracicaba como a levedura *Sporidiobolus pararoseus*. A metodologia empregada para a identificação encontra-se descrita no Anexo I.

Para a manutenção do micro-organismo, este foi cultivado em meio PC (0,5, 0,1 e 0,25 % m/v de peptona, dextrose e extrato de levedura, respectivamente, em água destilada) a 30 °C por 24 hs, sendo o meio adicionado em microtubos estéreis de 1,5 mL com glicerol na proporção 1:1. Os tubos foram mantidos em freezer a -18 °C. A levedura também foi conservada em tubos com PDA inclinado com camada de óleo mineral sob refrigeração. Foram realizados repiques semanais em placas de Petri contendo meio PDA incubando-se a 30 °C por 3 a 5 dias; sendo as placas armazenadas sob refrigeração por até uma semana após a incubação.

2.2 – PRODUÇÃO DE CÉLULAS

O meio PC descrito previamente foi utilizado para a produção do inóculo. O pré-inóculo foi preparado adicionando o micro-organismo das placas em tubos de ensaio com tampa contendo 10 mL de meio PC previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A mistura foi incubada a 30 °C por 24 horas. O inóculo foi preparado pela adição do pré-inóculo em erlenmeyer de 250 mL tampado com bucha de algodão contendo 90 mL de meio PC previamente esterilizado. Os frascos foram incubados em shaker rotatório a 30 °C e

150 rpm por 24 horas. Esse caldo (inóculo) foi utilizado para a inoculação do meio fermentativo (concentração média de 0,3 g/L de massa celular seca).

2.3 – CONDIÇÕES DE CULTURA

O meio fermentativo consistia de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva ou hidrolisado de levedura (Anexo I), água de maceração de milho, NaCl e óleo residual de fritura em diferentes concentrações. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL cobertos com bucha de algodão em agitador orbital a 30°C e 150 rpm. Os meios (90 mL) foram esterilizados a 121°C por 15 minutos, resfriados e inoculados com a solução de inóculo (10%). Após a fermentação, foram coletadas amostras e filtradas sob papel Whatmann qualitativo. Os filtrados foram congelados a -80°C por 24 horas e liofilizados por cerca 48 horas até peso constante. O sólido resultante foi considerado o extrato enzimático bruto e utilizado nos ensaios analíticos.

2.4 – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

2.4.1 – Otimização da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional

A concentração dos componentes do meio, a qual poderia influenciar a produção de ‘lipase sintética’ por *Sporidiobolus pararoseus* sob fermentação submersa, foi avaliada. Previamente à otimização, foi conduzido um ensaio cinético utilizando o meio convencional otimizado por Pinheiro et al (2008). A atividade lipásica sintética em um meio constituído por 2,0, 0,5, 0,5 e 1,0 % (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente, foi monitorada ao longo de 168 horas de fermentação a 30 °C e 150 rpm.

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio preliminar, a otimização da produção de lipase por *S. pararoseus* foi realizada em 48 horas de fermentação utilizando a estratégia de planejamentos experimentais sequenciais. As concentrações dos componentes do meio foram avaliadas como fatores e a atividade lipásica sintética do extrato enzimático liofilizado, como resposta. A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar os fatores que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar as possíveis inter-relações entre as variáveis de um processo.

Além disso, permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma determinada resposta (Rodrigues et al., 2005).

No primeiro planejamento experimental, os efeitos das concentrações dos componentes do meio foram avaliados utilizando um Delineamento Fracionário 2^{4-1} . Após a análise estatística, um segundo planejamento experimental (Delineamento Completo 2^2) foi realizado mantendo constantes as concentrações de peptona e óleo de oliva (5,0 e 1,0 % m/v, respectivamente). De modo a otimizar a produção de lipase, três concentrações de NaCl (7,0, 8,0 e 9,0 % m/v) foram avaliadas em ensaios conduzidos em triplicata, mantendo constantes as concentrações de peptona, extrato de levedura e óleo de oliva (5,0, 6,8 e 1,0 % m/v, respectivamente). A Tabela 2.1 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para os delineamentos experimentais realizados. A resposta avaliada em todos os experimentos foi a atividade lipásica sintética (descrita no item 2.8.1) e os resultados foram avaliados por meio do software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., 2001).

Tabela 2.1. Níveis dos fatores investigados nos planejamentos experimentais sequenciais.

Variáveis/Níveis	Primeiro Planejamento (2^{4-1})		
	-1	0	1
Peptona (%m/v)	2	5	8
Extrato levedura (%m/v)	0	1,75	3
NaCl (%m/v)	0	1,75	3
Óleo de oliva (%m/v)	0	1	2
	Segundo Planejamento (2^2)		
	1,2	4	6,8
Extrato levedura (%m/v)	1,2	4	6,8
NaCl (%m/v)	1,2	4	6,8

2.4.2 – Cinética da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional

A atividade lipásica sintética, a atividade proteásica, o crescimento microbiano (massa celular seca) e o carbono total foram monitorados ao longo de 120 horas de fermentação na condição otimizada. As metodologias analíticas empregadas estão descritas no item 2.8.

2.4.3 – Produção de lipase em meio industrial

As concentrações dos componentes do meio fermentativo otimizadas para o meio convencional foram empregadas substituindo-se os componentes do meio por fontes alternativas de carbono, nitrogênio e carbono lipídico. A peptona, o extrato de levedura e o óleo de oliva foram substituídos pela água de maceração de milho, hidrolisado de levedura e óleo residual de fritura nas concentrações de 5,0, 6,8 e 1,0 % (m/v), sendo que o NaCl foi mantido no meio na mesma concentração (7,0 % m/v). As demais condições de cultura foram as mesmas descritas no item 2.3.

A água de maceração de milho é um resíduo da indústria de extração de amido e glúten e foi fornecida pela empresa Corn Products. O hidrolisado de levedura foi preparado no próprio laboratório segundo a metodologia descrita no Anexo I. O óleo residual de fritura foi fornecido por uma rede de *fast-food* da cidade de Erechim-RS e submetido à centrifugação a 3000 rpm em temperatura ambiente por 30 minutos para a separação do material sólido em suspensão.

2.5 – CONCENTRAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A concentração dos caldos fermentados foi realizada pela precipitação de proteínas com sulfato de amônio de forma direta e fracionada. A primeira foi realizada de acordo com os resultados otimizados por Menoncin (2009) em relação às condições de precipitação de lipase de *P. verrucosum*, consistindo de saturações de sulfato de amônio de 40 e 60% (m/v) e tempo de precipitação de 6 horas. A precipitação fracionada foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Benjamin e Pandey (2000). O sulfato de amônio foi adicionado aos caldos fermentados na saturação de 20% (m/v) e tempo de precipitação de 12 horas; e após a centrifugação o sobrenadante foi submetido a uma segunda etapa de concentração com sulfato de amônio a 40% por 12 horas.

Aos caldos fermentados provenientes das fermentações dos meios convencional e industrial, previamente filtrados sob papel Whatman qualitativo, foi acrescentado sulfato de amônio sólido na saturação desejada. Esta etapa foi realizada em agitador magnético em banho de gelo (4°C) com controle de pH (7,0) ajustado com adição de NaOH 20% (m/v) até completa dissolução do sal. O extrato foi colocado em tubos de centrífuga, permanecendo a -10 °C para

a precipitação da amostra, por períodos de 6 e 12 horas para as precipitações simples e fracionada, respectivamente.

Decorrido o tempo de precipitação, as amostras foram então centrifugadas a 4°C e 5400 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado removido com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (Shu et al., 2006). As amostras foram congeladas a -80 °C e liofilizadas por cerca de 48 horas até peso constante. Os extratos precipitados liofilizados foram armazenados em geladeira para posterior medida de atividade lipásica sintética e proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

2.6 – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS

As lipases produzidas (convencional bruto, ‘CB’, e precipitado, ‘CP’; industrial bruto, ‘IB’, e precipitado, ‘IP’) foram parcialmente caracterizadas em relação à especificidade aos substratos de esterificação, à estabilidade em temperaturas altas e baixas e ao comportamento frente a diferentes memórias de pH e temperaturas.

2.6.1 – Especificidade aos substratos de síntese (esterificação)

A especificidade das lipases produzidas (convencional bruto, ‘CB’, e precipitado, ‘CP’; industrial bruto, ‘IB’, e precipitado, ‘IP’) em relação a diferentes substratos para a reação de esterificação foi avaliada. A atividade lipásica sintética foi medida conforme descrito no item 2.7.1 utilizando-se como ácidos graxos os ácidos oléico, butírico e láurico, e como álcoois o metanol, etanol, propanol e butanol nas proporções molares de 1:2 (ácido graxo:álcool).

2.6.2 – Estabilidade em diferentes temperaturas

2.6.2.1 – Estabilidade em temperaturas altas

Para a determinação da estabilidade térmica das lipases produzidas (convencional bruto, ‘CB’, e precipitado, ‘CP’; industrial bruto, ‘IB’, e precipitado, ‘IP’), as amostras liofilizadas foram incubadas em diferentes temperaturas (30, 45 e 60 °C). A atividade lipásica sintética (ALS) foi monitorada até a perda total de atividade (período de 184 horas) em intervalos de 24 horas.

2.6.2.2 – Estabilidade em temperaturas baixas

Foram armazenadas amostras das enzimas produzidas (convencional bruto, ‘CB’, e precipitado, ‘CP’; industrial bruto, ‘IB’, e precipitado, ‘IP’) em geladeira (4 °C) e congelador (-10 °C). A atividade lipásica sintética de cada uma das enzimas foi medida após 7 dias e posteriormente a cada 10-15 dias, a fim de monitorar a estabilidade das enzimas produzidas em baixas temperaturas.

2.6.3 – Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética

As enzimas produzidas (convencional bruto, ‘CB’, e precipitado, ‘CP’; industrial bruto, ‘IB’, e precipitado, ‘IP’) foram pré-incubadas em diferentes tampões de pH (de 3,0 a 10,0) por 20 minutos a 4°C e liofilizadas, de acordo com a metodologia descrita por Sun, Xu e Wang (2009). A atividade lipásica sintética das amostras foi medida em diferentes temperaturas (de 11,8 a 68,2 °C) seguindo a metodologia descrita no item 2.7.1.

Os fatores pH e temperatura foram avaliados por meio de Delineamentos Centrais Rotacionais 2^2 , com dois pontos axiais para cada variável e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos para cada enzima (‘CB’, ‘CP’, ‘IB’ e ‘IP’). A Tabela 2.2 apresenta os níveis de pH e temperatura nos quais o comportamento de cada uma das enzimas foi avaliado.

Tabela 2.2. Níveis investigados na avaliação do efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética.

Variáveis/níveis	Temperatura (°C)	pH
-1,41	11,8	3,0
-1	20,0	4,0
0	40,0	6,5
1	60,0	9,0
1,41	68,2	10,0

2.7 – MÉTODOS ANALÍTICOS

2.7.1 – Atividade lipásica sintética (ALS)

Para a dosagem da atividade lipásica sintética foi empregada a metodologia proposta por Rigo (2009), utilizando-se ácido oléico (Sigma-Aldrich) e etanol (Merck) como substratos para a reação de esterificação. A uma massa de 0,1 g de enzima liofilizada foram adicionados os substratos reacionais na proporção molar de 1:2 e a mistura foi incubada por 40 minutos a 40 °C sob agitação de 150 rpm. Após a incubação, foram retiradas alíquotas (triplicata) de 300 µL e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,02 N. Os brancos reacionais foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de 300 µL previamente à incubação e interrompendo-se a reação com 20 mL da solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os brancos foram também titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,02 N. As dosagens de atividade foram feitas em triplicata para cada amostra liofilizada. Uma unidade de atividade lipásica sintética foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas, determinada por meio da Equação 2.1.

$$\text{Atividade lipásica (U/mL)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot N \cdot 1000 \cdot V_t}{t \cdot V_{al} \cdot V_{am}} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde:

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra

V_b = volume de NaOH gasto na titulação do branco

N = Normalidade da solução de NaOH padronizada

V_t = Volume reacional total (5,6 mL)

t = tempo de reação (40 min)

V_{al} = volume de alíquota (0,3 mL)

V_{am} = volume de extrato enzimático equivalente à massa de extrato liofilizado

2.7.2 – Atividade proteásica

A atividade proteásica foi medida de acordo com a metodologia proposta por Vargas (2004) adaptada de Charney e Tomarelli (1947). Em tubos de polipropileno de 1,5 mL foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína 0,5% (m/v) preparada em tampão acetato 50 mM pH 5,0 (Anexo II). Os tubos foram então incubados durante 15 minutos a 37 °C. Após o período de incubação a reação enzimática foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v), em banho de gelo. Os tubos com a mistura foram centrifugados a 12.000 x g por 20 minutos. Retirou-se então 1 mL do sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de solução de hidróxido de potássio 5 N. A determinação da absorbância da solução foi monitorada por espectrofotometria (Agilent 8453) em 428 nm. O branco das reações foi preparado adicionando-se a amostra após a adição do TCA. O branco do aparelho foi preparado substituindo-se o volume de amostra por tampão acetato 50 mM pH 5,0. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma diferença unitária de absorbância por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições de ensaio. A atividade proteásica foi determinada por meio da Equação 2.2.

$$\text{Atividade proteásica (U/mL)} = \frac{(\text{Abs}_a - \text{Abs}_b \cdot f_b)}{t \cdot V_a} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Onde:

Abs_a = leitura de absorbância da amostra

Abs_b = leitura de absorbância do branco

f = fator de diluição

t = tempo de reação em minutos

V_a = volume de amostra (mL)

2.7.3 – Crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi determinado em termos de concentração de biomassa (g/L) (Pelczar, 1996). Foram adicionados 1 mL de caldo fermentado (triplicata) em tubos de polipropileno de 1,5 mL e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado lavado com 1 mL de água destilada e centrifugado novamente, sendo esse procedimento repetido duas vezes. A densidade óptica foi monitorada em 650 nm (Espectrofotômetro Agilent 8453). Foi construída uma curva de calibração relacionando massa celular seca e densidade óptica a 650 nm, apresentada no Anexo I.

2.7.4 – Carbono total

A concentração de carbono total foi monitorada pela análise do caldo fermentado em um equipamento Total Organic Carbon Analyzer (TOC-V CSH Shimadzu).

2.7.5 – Proteína

Para a determinação de proteína foi empregada a metodologia proposta por Bradford (1976). Foi utilizado o Reagente de Bradford e uma curva padrão de albumina (1 mg/mL) em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5, preparados conforme descrito no Anexo III. As leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro (Agilent 8453) em 595 nm.

Para cada análise foi pesada uma amostra de aproximadamente 4 mg de extrato liofilizado. A amostra foi diluída em 200 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e deste, então, retirados 100 µL para a leitura de absorbância, sendo a concentração de proteína calculada conforme a Equação 2.3.

$$\text{Concentração de proteína (mg/mL)} = \frac{\text{Abs}}{\text{fator}} \cdot 10 \cdot d \quad (\text{Equação 2.3})$$

onde:

Abs= absorbância a 595nm

d= diluição das amostras

fator = valor obtido na curva de calibração

3.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

3.1.1 – Otimização da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional

Previamente à otimização da produção de lipase, foi realizado um ensaio cinético empregando o meio otimizado por Pinheiro et al. (2008). A Figura 3.1 apresenta a cinética de produção de ‘lipase sintética’ ao longo de 168 horas de fermentação. É possível observar que a maior atividade lipásica (4,23 U/mL) foi obtida em 48 horas de fermentação. Desse modo, esse tempo foi fixado para a realização dos planejamentos experimentais sequenciais.

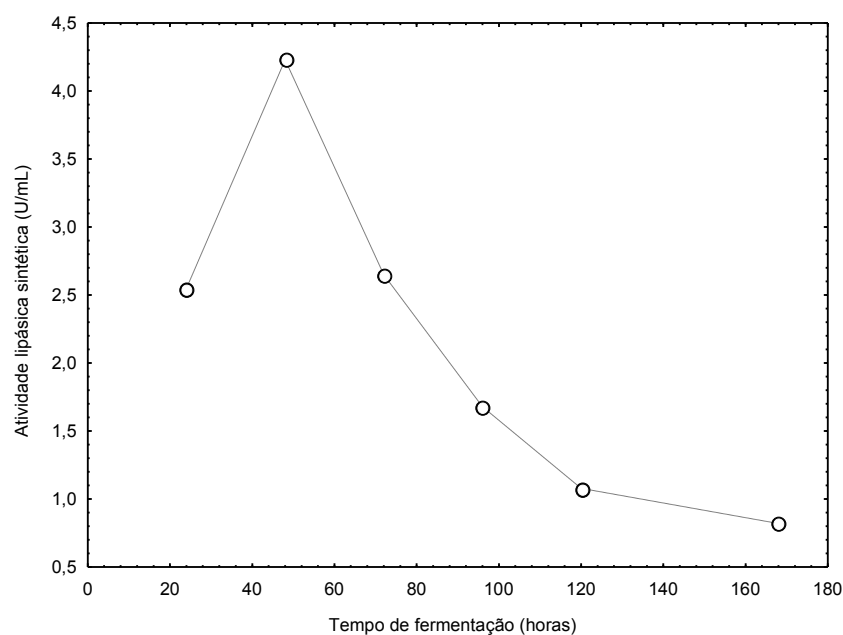


Figura 3.1. Cinética de produção de ‘lipase sintética’ ao longo de 168 horas de fermentação em um meio composto por 2,0, 0,5, 0,5 e 1,0 % (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente.

A Tabela 3.1 apresenta a matriz do Delineamento Experimental Fracionário 2^{4-1} realizado na primeira etapa da otimização, com os valores reais e codificados das variáveis independentes (concentrações de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva) e a resposta em termos de atividade lipásica sintética em 48 horas de fermentação. A partir da Tabela 3.1 é possível observar que a maior atividade lipásica (7,98 U/mL) foi obtida no ensaio cujo meio continha as maiores concentrações dos componentes (ensaio 8). Contudo, a atividade lipásica obtida nessa condição experimental é bastante similar à atividade referente aos pontos centrais ($7,05 \pm 0,85$ U/mL – ensaios 9, 10 e 11). De acordo com o teste de Tukey, esses valores não apresentaram diferença significativa em um nível de confiança de 95%.

Tabela 3.1. Matriz do primeiro planejamento experimental (valores reais e codificados) com as respostas em termos de atividade lipásica sintética.

Ensaio	Peptona (% m/v)	Extrato levedura (% m/v)	NaCl (% m/v)	Óleo oliva (% m/v)	ALS (U/mL)
1	-1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	0,25
2	+1(8)	-1(0)	-1(0)	+1(2)	1,16
3	-1(2)	+1(3)	-1(0)	+1(2)	2,48
4	+1(8)	+1(3)	-1(0)	-1(0)	2,28
5	-1(2)	-1(0)	+1(3)	+1(2)	2,46
6	+1(8)	-1(0)	+1(3)	-1(0)	1,07
7	-1(2)	+1(3)	+1(3)	-1(0)	4,89
8	+1(8)	+1(3)	+1(3)	+1(2)	7,98
9	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1)	7,82
10	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1)	7,19
11	0(5)	0(1,75)	0(1,75)	0(1)	6,14

Para uma análise mais consistente desses resultados, os dados obtidos foram tabulados e analisados utilizando o software Statística®, no módulo de Planejamento de Experimentos. A Figura 3.2 apresenta o Diagrama de Pareto, construído com o objetivo de verificar o efeito de cada variável independente estudada na resposta (atividade lipásica sintética). É possível

observar que, em um nível de confiança de 90%, as concentrações de extrato de levedura e de NaCl apresentaram efeitos positivos significativos na atividade lipásica sintética.

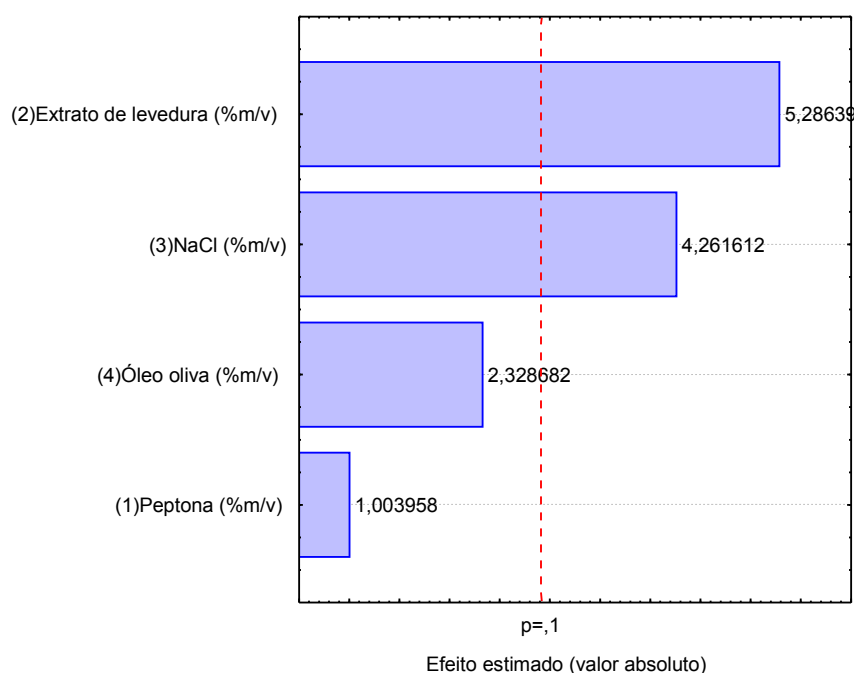


Figura 3.2. Diagrama de Pareto para o Delineamento Fracionário 2^{4-1} .

Geralmente, os micro-organismos produtores de lipases fornecem altos rendimentos quando fontes orgânicas de nitrogênio são utilizadas, tais como peptona e extrato de levedura. O extrato de levedura é uma das fontes de nitrogênio mais importantes para a produção elevada de lipases por diferentes micro-organismos. Além desse papel, fornece vitaminas e elementos traço fundamentais para o seu crescimento e aumenta a produção de lipases (Ebrahimpour et al., 2008).

No trabalho desenvolvido por Rajendran e Thangavelu et al. (2009), a peptona e o extrato de levedura apresentaram efeitos positivos na produção de lipase hidrolítica por *Rhizopus arrhizus*. A peptona também aumentou eficientemente a produção de lipase extracelular de acordo com vários outros pesquisadores. Na produção de lipase sintética 'whole-cell' por *Rhizopus chinensis* em fermentação sólida, a suplementação de 2,0 % (m/m) de peptona resultou na maior atividade (16855 U/Kg de substrato). De acordo com esses autores, o aumento na atividade sintética é provavelmente devido a alguns co-fatores de

aminoácidos contidos na peptona; os quais acidentalmente suprem os requerimentos fisiológicos para a biosíntese da lipase sintética ‘whole-cell’ (Sun e Xu, 2008). Na otimização do meio de fermentação submersa para a produção de lipase sintética ligada à membrana a partir de *Rhizopus chinensis*, a concentração de peptona foi o fator mais importante para a produção de lipase, seguida pela concentração de óleo de oliva (Wang et al., 2008).

Muitos pesquisadores publicaram seus resultados a respeito do efeito de óleos no aumento das atividades lipásicas sintética e hidrolítica (Sun e Xu, 2008). Contudo, alguns poucos autores produziram altos rendimentos em lipases hidrolíticas na ausência de óleos e gorduras (Sharma et al., 2001). No trabalho realizado por Deive et al. (2009) avaliando a influência da presença de diferentes compostos lipídicos na produção de diferentes lipases (intracelular, extracelular e ligada à membrana) por *Thermus thermophilus* por fermentação submersa, foi mostrado que a presença de óleo de oliva melhorou a produção das lipases intracelular e ligada à membrana, mas não a produção de lipases extracelulares.

A salinidade foi um fator crítico na produção de lipase hidrolítica por uma cepa de *Pseudomonas* sp. isolada. Na ausência de cloreto de sódio, apenas traços de produção de enzima e de crescimento celular foram observados. A produção de lipase atingiu o valor mais alto quando o meio produtivo continha 1,5 % (m/v) de NaCl (Kiran et al., 2008).

Com base nos resultados obtidos a partir da análise estatística, as concentrações de extrato de levedura e NaCl foram selecionadas como fatores a serem estudados em um Delineamento Experimental Completo 2². Apesar de a peptona e o óleo de oliva não terem apresentado efeito significativo a 95% de confiança, as maiores respostas foram observadas nos maiores níveis (+1) para todas as variáveis e nos pontos centrais. Neste sentido, no delineamento completo 2² as concentrações de peptona e óleo de oliva foram mantidas nos seus respectivos valores centrais (5,0 e 1,0 % m/v, respectivamente), enquanto que os níveis das outras variáveis foram deslocados para cima.

A Tabela 3.2 apresenta a matriz do Delineamento Completo 2² realizado nessa etapa, com os valores reais e codificados para as variáveis independentes e a resposta em termos de atividade lipásica sintética. A partir dessa tabela pode-se observar que a maior atividade lipásica (19,13 U/mL) foi obtida nas maiores concentrações dos componentes do meio (ensaio 4).

Tabela 3.2. Matriz do segundo planejamento experimental (valores reais e codificados) com a resposta em termos de atividade lipásica sintética.

Ensaio	Extrato levedura	NaCl	ALS
	(% m/v)	(% m/v)	(U/mL)
1	-1(1,2)	-1(1,2)	6,03
2	+1(6,8)	-1(1,2)	5,10
3	-1(1,2)	+1(6,8)	13,00
4	+1(6,8)	+1(6,8)	19,13
5	0(4)	0(4)	7,91
6	0(4)	0(4)	7,79
7	0(4)	0(4)	8,90

A análise estatística dos dados do segundo planejamento experimental revelou que a concentração de NaCl exibiu um efeito positivo significativo ($p < 0,05$) na produção de lipase sintética. A concentração de extrato de levedura e a interação linear entre as concentrações de extrato de levedura e NaCl não mostraram efeitos significativos em um nível de confiança de 95%. A Tabela 3.3 apresenta os coeficientes de regressão dos fatores para a resposta.

Desse modo, a Equação 1 apresenta o modelo empírico de primeira ordem proposto a partir do delineamento completo 2^2 para a produção de ‘lipase sintética’, como uma função das concentrações de extrato de levedura e de NaCl no meio.

$$\begin{aligned} \text{Atividade lipásica (U / mL)} = & 9,69 + 1,30.\text{extrato de levedura (L)} + 5,25.\text{NaCl (L)} \\ & + 1,76.\text{extrato de levedura (L).NaCl (L)} \end{aligned} \quad \text{Equação (3.1)}$$

A Tabela 3.4 apresenta os resultados da Análise de Variância para o modelo empírico proposto, de acordo com a qual foi possível observar que o modelo foi validado com 95 % de confiança ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), com uma porcentagem de variação explicada de 91%.

Tabela 3.3. Coeficientes de regressão para a resposta atividade lipásica sintética (U/mL).

	Coefficientes de regressão	Erro Padrão	t(2)	p
Média	9,69	0,23	12,58	0,000*
(1) Extrato levedura (L)	1,30	0,30	1,27	0,060
(2) NaCl (L)	5,25	0,30	5,15	0,003*
1 L x 2L	1,77	0,30	1,73	0,030*

*termos estatisticamente significativos a 95% de confiança

Tabela 3.4. Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para produção de ‘lipase sintética’.

	Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	129,48	3	43,16	10,40
Resíduos	12,46	3	4,15	
Falta de ajuste	11,72	1		
Erro puro	0,74	2		
Total	141,94	6		

Coefficiente de correlação: $R^2=0,91$, $F_{3;3; 0,95} = 9,28$

A Tabela 3.5 apresenta os desvios relativos entre as atividades lipásicas sintéticas observadas no delineamento completo 2^2 e as previstas por meio do modelo proposto (Equação 3.1). É possível observar que os desvios relativos versam entre 3 e 28% aproximadamente, o que é aceitável em se tratando de um processo biotecnológico. Ainda, os menores desvios relativos foram observados para os ensaios 3 e 4, que apresentam as maiores respostas em termos de ALS (U/mL), e também para duas repetições do ponto central.

O modelo permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 3.3. Pode-se observar a partir da superfície de resposta e da curva de contorno para a produção de ‘lipase sintética’ em função das concentrações de extrato de levedura e de NaCl que existe uma clara tendência de incremento na produção em maiores concentrações de NaCl.

Tabela 3.5. Desvios relativos entre ALS observadas e previstas pelo modelo.

Ensaio	YE (%)	NaCl (%)	ALS observada (U/mL)	ALS predita (U/mL)	Desvio relativo (%)
---------------	---------------	-----------------	-----------------------------	---------------------------	----------------------------

1	-1(1,2)	-1(1,2)	6,03	4,90	23,06
2	+1(6,8)	-1(1,2)	5,10	3,98	28,14
3	-1(1,2)	+1(6,8)	13,00	11,88	9,43
4	+1(6,8)	+1(6,8)	19,13	18,00	6,28
5	0(4)	0(4)	11,07	9,69	14,24
6	0(4)	0(4)	7,79	9,69	9,29
7	0(4)	0(4)	9,72	9,69	0,31

Dessa forma, a próxima etapa para a otimização da produção de lipase foi aumentar a concentração de NaCl. As concentrações da peptona e do óleo de oliva foram mantidas nos mesmos níveis e a concentração do extrato de levedura foi fixa no nível +1 (6,8 % m/v) do delineamento 2². As atividades lipásicas sintéticas obtidas foram 26,9±1,4^a, 6,9±1,1^b e 0,0±0,0^c U/mL para 7,0, 8,0 e 9,0 % (m/v), respectivamente. O teste de Tukey foi realizado e as diferentes concentrações mostraram diferença significativa entre si em um nível de 95% de confiança. Esses resultados mostram que a produção de lipase é inibida em maiores concentrações de NaCl.

De acordo com esses resultados, a condição otimizada para a produção de ‘lipase sintética’ a partir de *S. pararoseus* por fermentação submersa de um meio convencional são as concentrações de 5,0, 6,8, 7,0 e 1,0 % (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente. A máxima atividade lipásica sintética obtida foi de 26,9 U/mL em 48 horas de fermentação, o que representa um aumento de 6,36 vezes em relação ao meio não otimizado.

No estudo da produção de lipase sintética ‘whole-cell’ a partir de *Rhizopus chinensis* por fermentação sólida utilizando um substrato combinado de farinha e farelo de trigo, a atividade sintética máxima de 24,447 U/kg de substrato foi alcançada com um nível de umidade de 70%, pH inicial de 6,5, suplementação de peptona (2 % m/m) como fonte de nitrogênio e óleo de oliva (2% v/m) como indutor; representando um aumento de 15,27 vezes na atividade lipásica sintética comparado ao meio inicial (Sun e Xu, 2008).

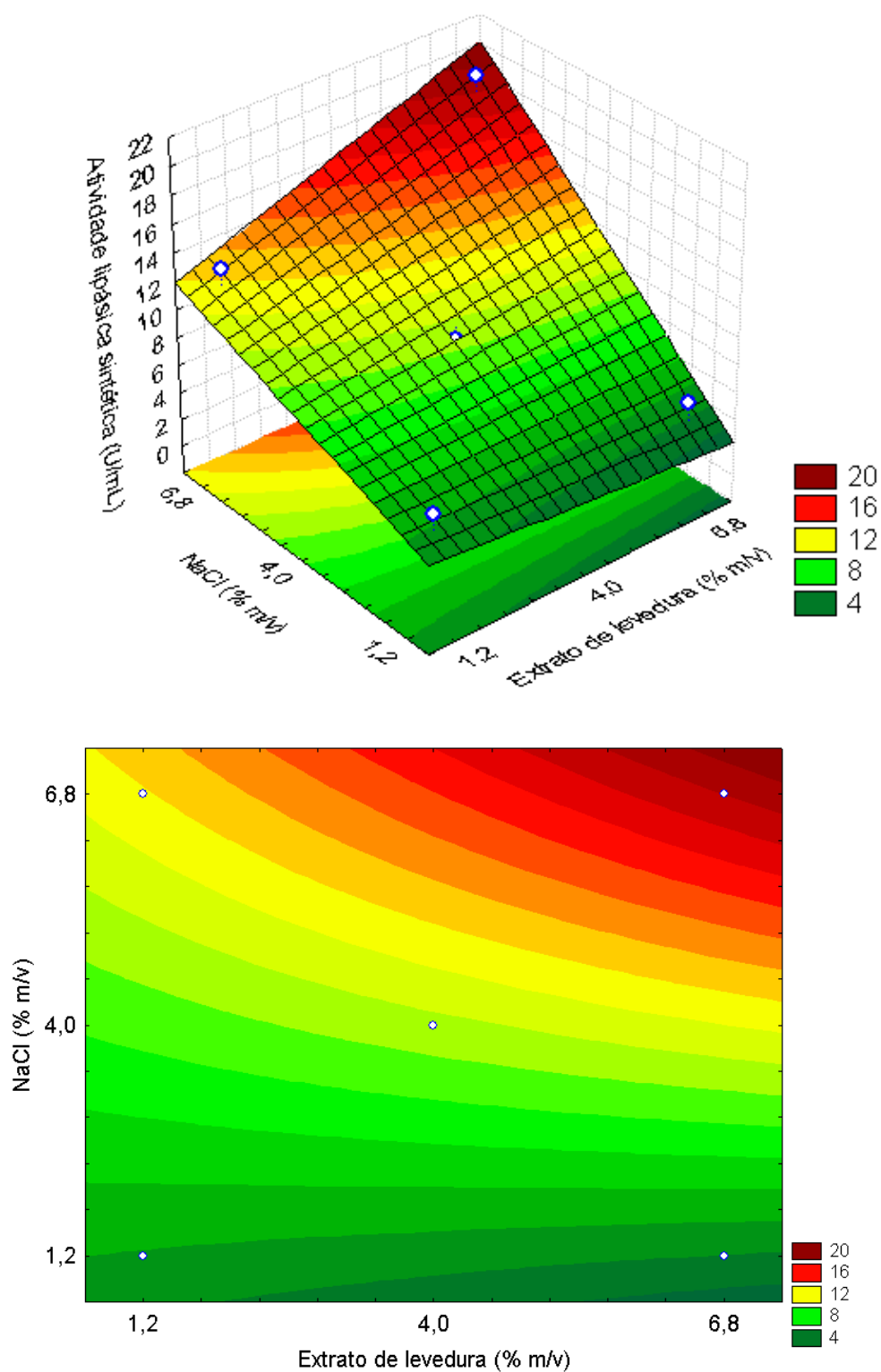


Figura 3.3. Superfície de resposta e curva de contorno para a produção de lipase.

Os fatores agitação, inóculo, concentrações de maltose, óleo de oliva e K_2PO_4 , pH e volume de meio fermentativo na produção de ‘lipase sintética’ a partir de *Rhizopus chinensis* por fermentação submersa foram estudados. Sob condições ótimas, o resultado experimental foi de 13,875 U/L, o que representou um aumento de 120% em relação à condição não otimizada (Teng e Xu, 2008).

O meio otimizado composto por maltose, peptona, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and K_2HPO_4 para a produção de lipase sintética ‘whole-cell’ por fermentação submersa a partir de *R. chinensis* aumentou em 61,5% a atividade sintética da lipase ligada à membrana produzida (470 U/g_{célula seca}) (Wang et al., 2008). Uma atividade lipásica sintética de 694 U/g_{célula seca} foi obtida quando 20 g/L de óleo de soja foram adicionados ao meio anterior (Teng et al., 2009).

3.1.2 – Cinética da produção de ‘lipase sintética’ em meio convencional

Os perfis de atividade lipásica sintética, crescimento microbiano (massa celular seca) e concentrações totais de carbono e nitrogênio para a produção de lipase no meio convencional otimizado são apresentados na Figura 3.4. A partir desse perfil pode ser observado que a maior atividade lipásica foi obtida em 72 horas de fermentação utilizando o meio otimizado. Não foi detectada atividade proteásica ao longo da fermentação.

Como descrito para muitas lipases extracelulares, a atividade lipásica máxima foi obtida durante a fase estacionária de crescimento. Esse resultado está de acordo com a produção de lipase hidrolítica em fermentação submersa por *Clostridium tetanomorphum* (7 U/mL) (Petersen e Daniel, 2006), *Pseudomonas* sp. (750 U/mL) (Kiran et al., 2008), *Trichosporon asahii* (104 U/mL) (Kumar e Gupta, 2008) e *Rhizopus arrhizus* (2,98 U/mL) e com a produção de ‘lipase sintética’ em fermentação sólida por *Rhizopus chinensis* (24,447 U/kg) (Sun e Xu, 2008).

Também pode ser observado que há uma tendência à estabilização no crescimento microbiano enquanto o carbono total continua decrescendo lentamente. A taxa máxima de consumo de carbono no início da fermentação coincide com a taxa máxima de crescimento celular, o que significa que a maior parte do carbono presente no meio foi consumida para o crescimento microbiano.

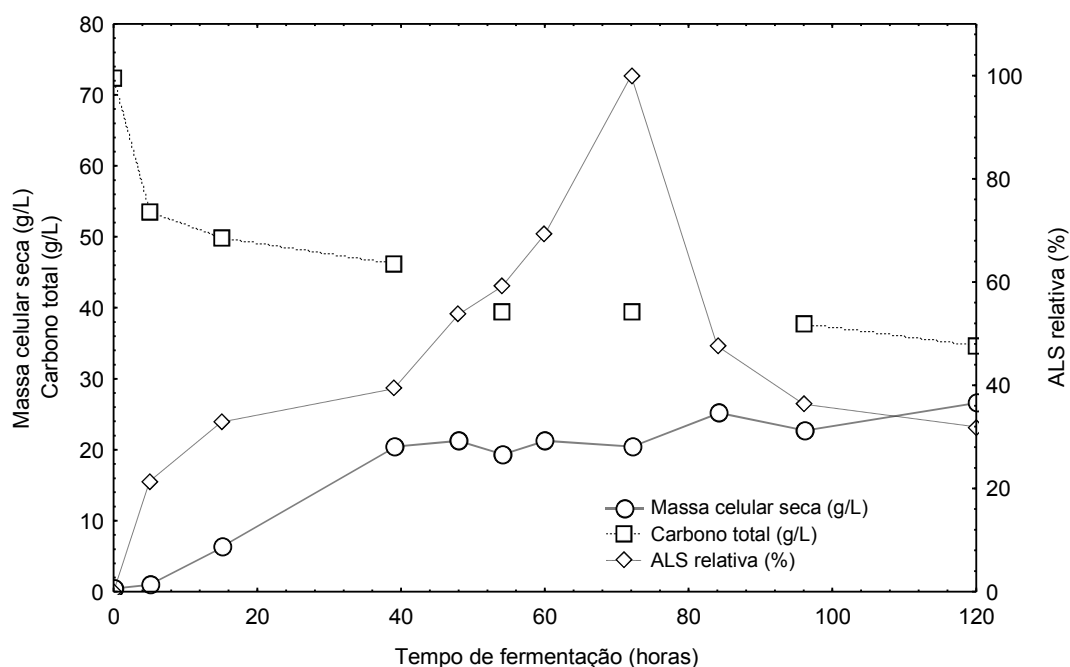


Figura 3.4. Cinética da produção de ‘lipase sintética’, consumo de carbono e nitrogênio e crescimento celular ao longo de 120 horas de fermentação na condição otimizada.

3.1.3 – Avaliação preliminar da produção de lipase em meio industrial

Os componentes do meio convencional foram substituídos por fontes alternativas nas concentrações ótimas determinadas no item anterior. A peptona, o extrato de levedura e o óleo de oliva foram substituídos pela água de maceração de milho, hidrolisado de levedura e óleo residual de fritura nas concentrações de 5,0, 6,8 e 1,0 % (m/v), e o NaCl foi mantido no meio na mesma concentração (7,0 % m/v).

A utilização de fontes alternativas de nutrientes para os micro-organismos, como os resíduos agroindustriais, pode auxiliar na redução de problemas de poluição ambiental associados ao descarte desses compostos no meio ambiente (Treichel et al., 2010); além de reduzir o custo global de produção da enzima pela utilização de matérias-primas de menor valor agregado.

O extrato enzimático liofilizado obtido após 72 horas de fermentação do meio industrial por *S. pararoseus* apresentou uma atividade lipásica sintética de $12,3 \pm 0,5$ U/mL, cerca de 2,2 vezes menor que a atividade da enzima obtida pela fermentação do meio convencional. Apesar da enzima obtida a partir do meio industrial apresentar uma atividade lipásica sintética

consideravelmente menor, o menor custo do meio de cultura utilizado para a sua produção justifica o estudo de suas propriedades.

É importante pontuar que nem a água de maceração de milho nem o hidrolisado de levedura podem ser considerados fontes exclusivas de nitrogênio, carbono ou outros sais minerais e vitaminas, porque esses substratos apresentam uma composição complexa, cujo emprego simultâneo pode resultar em um excesso de nutrientes e consequentemente inibir a produção de enzima (Pinheiro et al., 2008). Desse modo, como não foi realizado um estudo sistemático de otimização da composição do meio industrial para a produção de lipase sintética; as concentrações dos componentes empregadas não são necessariamente aquelas que promoveriam a atividade lipásica sintética máxima para tal composição de meio.

Esse resultado está de acordo com o obtido por Pinheiro et al. (2008) no estudo da otimização de meios convencional e industrial em fermentação submersa para a produção de lipase hidrolítica por *Penicillium verrucosum*. A atividade lipásica hidrolítica da enzima proveniente do meio convencional foi cerca de 1,2 vezes maior que a da enzima derivada do meio industrial.

Na avaliação de Immanuel et al. (2008) em relação à produção de lipase extracelular em fermentação submersa por *Serratia rubidaea*, a triptona foi substituída por fontes de nutrientes equivalentes de baixo custo, sendo que a caseína foi a fonte de nitrogênio considerada mais adequada. Bapiraju et al. (2005), durante a otimização da produção de lipase por uma cepa mutante de *Rhizopus* sp., consideraram o amido de batata, a água de maceração de milho e o óleo de oliva como as melhores fontes de carbono, nitrogênio e lipídios, respectivamente.

3.4 – CONCENTRAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada para os caldos fermentados obtidos a partir da fermentação dos meios convencional e industrial nas condições descritas anteriormente. A Tabela 3.6 apresenta os resultados obtidos para a concentração com sulfato de amônio em termos de atividade lipásica sintética ($\text{U/g}_{\text{extrato liofilizado}}$), concentração de proteínas (mg/mL) e atividade lipásica sintética específica ($\text{U/mg}_{\text{proteína}}$) para a precipitação direta a 40 e 60% de saturação (D40 e D60) e para a precipitação fracionada nas primeira e segunda etapas com 20 e 40% de saturação, respectivamente (F20 e F40).

Tabela 3.6. Comportamento dos extratos enzimáticos provenientes da fermentação dos meios convencional e industrial em relação à precipitação com sulfato de amônio.

Amostra	ALS (U/g _{extrato liofilizado})	Proteína (mg/g _{extrato liofilizado})	ALS específica (U/mg _{proteína})	Fator de purificação
Convencional				
Bruto	127,31	0,26	489,65	-
D40	115,69	4,12	28,07	0,057
D60	119,31	3,76	31,74	0,065
F20	154,57	0,26	594,5	1,214
F40	103,10	1,03	100,09	0,204
Industrial				
Bruto	58,31	0,11	530,10	-
D40	86,65	2,33	37,18	0,070
D60	77,56	3,02	25,68	0,048
F20	120,96	0,44	274,91	0,519
F40	95,63	2,20	43,47	0,082

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.6, é possível observar que a primeira etapa da precipitação fracionada (20% saturação de sulfato de amônio) foi a que promoveu os melhores fatores de purificação tanto para o extrato enzimático proveniente da fermentação do meio convencional quanto para o oriundo do meio industrial (fatores de purificação de 1,2 e 0,5, respectivamente). Ainda, esses extratos enzimáticos precipitados foram os que apresentaram as maiores atividades lipásicas sintéticas (154,57 e 120,96 U/g_{extrato liofilizado}, respectivamente) e as menores concentrações de proteína.

A precipitação de proteínas pela adição de sais baseia-se na diminuição da sua solubilidade em altas concentrações de sal. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado, por ser inofensivo para a enzima (é usualmente empregado na conservação de enzimas) e bastante solúvel, o que proporciona forças iônicas suficientemente elevadas para precipitar quase todas as proteínas presentes no meio (Illanes, 2008).

O sal remove a água da superfície da proteína revelando as suas partes hidrofóbicas, as quais se unem ocasionando a precipitação da proteína. As proteínas mais hidrofóbicas

precipitação primeiramente, permitindo o fracionamento (Stanbury et al., 2003). A precipitação utilizando uma saturação mais baixa de sulfato de amônio (20%) pode ter proporcionado o isolamento de uma fração enzimática mais hidrofóbica, e portanto mais ativa em reações de síntese; sendo que o sítio ativo da lipase se encontra na porção mais hidrofóbica da enzima (Lotti e Alberghina, 2007).

Rigo (2009) obteve um fator de purificação de 1,48 vezes para uma lipase produzida por *Penicillium* sp. em fermentação sólida utilizando 60% de saturação de sulfato de amônio. A solução enzimática produzida por *B. licheniformis*, após a precipitação com 70% de sulfato de amônio, apresentou um fator de purificação de 4,26 (Chakraborty e Raj, 2008). Kashimiri et al. (2006) obtiveram uma atividade lipásica hidrolítica de 298 U/mL e atividade específica de 328 U/mg na concentração de uma lipase produzida por *Trichoderma viride*. A lipase de *Antrodia cinnamomea* precipitada com 70% de sulfato de amônio apresentou um fator de purificação de 1,2 e atividade específica de 12,7 U/mg (Shu et al., 2006). A lipase sintética de *Rhizopus chinensis* apresentou um fator de purificação de 2,3, atividade específica de 1,6 U/mg e atividade lipásica sintética de 9,8 U/mL quando precipitada com 70% de sulfato de amônio (Sun et al., 2009).

As atividades lipásicas, atividades lipásicas específicas e fatores de purificação após a precipitação com sulfato de amônio relatadas na literatura variam muito de acordo com as condições experimentais de fermentação e precipitação e o micro-organismo empregado. Contudo, os fatores de purificação observados são em geral menores que 10, mesmo em condições otimizadas. Como qualquer método de precipitação, a adição de sais como o sulfato de amônio não é muito seletiva (Illanes, 2008) e geralmente a preparação final não apresenta pureza elevada, o que limita o uso desse método (Bon et al., 2008). É, contudo, útil como uma etapa inicial de concentração, já que a proteína precipitada pode ser prontamente dissolvida em uma pequena quantidade de água.

3.5 – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LIPASES PRODUZIDAS

De acordo com os resultados apresentados nas seções anteriores, foram realizadas novas fermentações para a produção dos extratos enzimáticos a serem caracterizados parcialmente, provenientes de ambos os meios fermentativos (convencional e industrial), na forma bruta e precipitada com 20% (m/v) de sulfato de amônio. Os extratos enzimáticos derivados da

fermentação do meio convencional foram denominados ‘CB’ e ‘CP’ (‘convencional bruto’ e ‘convencional precipitado’) e os extratos oriundos do meio industrial, ‘IB’ e ‘IP’ (‘industrial bruto’ e ‘industrial precipitado’).

3.5.1 – Especificidade aos substratos de esterificação

Ésteres etílicos sintetizados a partir de ácidos graxos são um grande grupo de *flavors* e fragrâncias amplamente empregados em indústrias de alimentos e bebidas (Xu et al., 2002). As atividades lipásicas sintéticas das enzimas produzidas (convencional bruto e precipitado, ‘CB’ e ‘CP’, e industrial bruto e precipitado, ‘IB’ e ‘IP’) foram avaliadas de acordo com as condições descritas no item 2.6.1.

Foram testados três ácidos graxos com cadeias carbônicas diferentes: ácido butírico e ácido láurico, com cadeia carbônica saturada (4 e 12 carbonos, respectivamente) e ácido oléico (18 carbonos e cadeia insaturada). As atividades lipásicas sintéticas das enzimas empregando cada ácido graxo foram avaliadas utilizando quatro álcoois com diferentes números de carbono nas cadeias; metanol, etanol, 1-propanol e 1-butanol, que apresentam, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 carbonos na cadeia carbônica.

As atividades lipásicas sintéticas relativas às iniciais dos extratos enzimáticos liofilizados quando do emprego dos ácidos butírico e oléico como substratos para as reações de esterificação utilizando diferentes álcoois estão apresentadas nas Figuras 3.5 (a) e (b), respectivamente.

A partir da Figura 3.5 é possível observar que, em um aspecto geral, o emprego do ácido butírico como doador acila resultou nas maiores atividades lipásicas sintéticas, com um pico de atividade de 404,3 U/g_{extrato liofilizado} para a enzima ‘IB’ utilizando metanol. Ainda, essa enzima apresentou a maior atividade lipásica sintética quando da utilização do ácido oléico, também empregando metanol como álcool (181,4 U/g_{extrato liofilizado}).

Também pode ser observada uma tendência de maior especificidade para os álcoois metanol e butanol quando do emprego de ácido butírico como ácido graxo. A mesma tendência pode ser observada para o ácido oléico apenas para as enzimas provenientes do meio industrial (‘IB’ e ‘IP’). Em relação às enzimas oriundas do meio convencional, utilizando ácido oléico, as maiores atividades foram observadas com metanol, etanol e propanol para as enzimas ‘CB’ e ‘CP’, respectivamente.

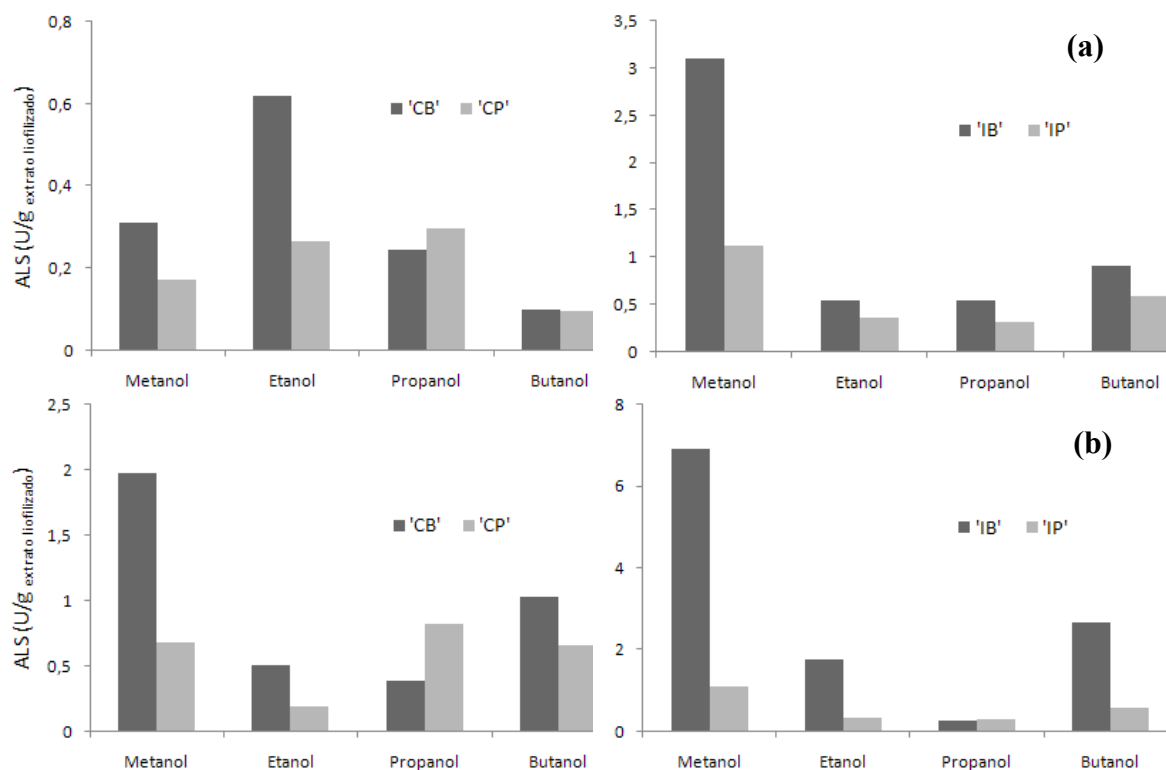


Figura 3.5. Atividades lipásicas sintéticas das enzimas produzidas utilizando (a) ácido oléico e (b) ácido butírico como doadores acila (lado esquerdo- convencional; lado direito - industrial).

Em relação ao emprego do ácido láurico como doador acila, apenas as enzimas provenientes do meio industrial 'IB' (43,2 U/g_{extrato liofilizado}) e 'IP' (20,7 U/g_{extrato liofilizado}) apresentaram atividade lipásica sintética, utilizando o metanol como substrato para a reação de esterificação. Não foram observadas atividades para as enzimas provenientes do meio convencional ('CB' e 'CP') com nenhum dos álcoois empregados, e nem para as enzimas 'IB' e 'IP' utilizando etanol, propanol ou butanol. Esse fato pode ser devido à maior especificidade das enzimas avaliadas para ácidos graxos de cadeia longa insaturados, como o ácido oléico, e não saturados, como o ácido láurico.

De acordo com esses resultados, de uma forma geral, as enzimas apresentaram maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta (ácido butírico) e ao álcool de menor cadeia carbônica (metanol). A maior especificidade em relação ao ácido graxo de cadeia curta está de acordo com Peter e Preda (2002), que avaliaram a especificidade de uma lipase de

pâncreas de porco em relação a diversos ácidos graxos (de 3 a 18 carbonos). Segundo esses autores, a lipase avaliada apresentou uma elevada especificidade em relação aos ácidos valérico (C5) e butírico (C4), e uma taxa de esterificação significativamente menor para ácidos com números de carbono menores (propiónico) e maiores (C6-C16). A especificidade voltou a aumentar para ácidos de cadeia longa (C18), porém permaneceu significativamente mais baixa que para os substratos anteriores.

Abbas e Comeau (2003) avaliaram a especificidade da lipase imobilizada de *Mucor* sp. em relação a ácidos graxos de cadeia curta (ácidos propiónico, butírico e capróico). Apesar de estes ácidos terem sido previamente relatados na literatura como possíveis inibidores das propriedades catalíticas das lipases, todos foram capazes de realizar a reação de esterificação empregando diversos álcoois. Contudo, as maiores taxas e rendimentos reacionais foram observados para o ácido com maior número de carbonos (capróico).

Outros trabalhos encontrados na literatura avaliando a especificidade de lipases em relação a ácidos graxos com diferentes cadeias carbônicas em geral relatam maior especificidade dessas enzimas em relação a ácidos graxos de cadeia média a longa (C8 a C16), como nos trabalhos desenvolvidos por Sun e Xu (2009) e Sun, Xu e Wang (2009) para lipases sintéticas e Gaur, Gupta e Khare (2008) e Wang et al. (2009) para lipases hidrolíticas (hidrólise de ésteres).

Quanto à especificidade em relação ao tamanho da cadeia carbônica dos álcoois, a lipase estudada por Abbas e Comeau (2003) apresentou uma afinidade particular por álcoois de cadeia mais curta, como metanol, etanol, 2-propen-1-ol e butanol. Esse resultado discorda de outros apresentados na literatura, como Langrand et al. (1990) e Sun, Xu e Wang (2009), em que os rendimentos decresceram com o aumento do número de átomos de carbono nos álcoois.

De acordo com Ghandi et al. (1995) e Abbas e Comeau (2003), as variadas afinidades de uma lipase por diferentes álcoois podem ser entendidas em termos da energia de ligação que é liberada quando um substrato se liga ao sítio ativo. Substratos como o metanol e etanol, que são pequenos, não liberariam energia suficiente para uma alteração na conformação da lipase para a sua forma ativa. Contudo, apesar de álcoois de cadeia maior serem capazes de liberar maiores energias de ligação, uma parte dessa energia é requerida para modificar a conformação do substrato para que este caiba no sítio ativo. Então, apenas uma pequena parte da energia liberada estaria disponível para a mudança na conformação da enzima.

Assim sendo, essas alterações na conformação da lipase para torná-la ativa dependem de ambos os substratos que estão sendo empregados na reação de esterificação – o ácido graxo e o álcool. Sendo então a afinidade das enzimas pelos substratos interdependente em relação à cadeia carbônica e à estrutura de ambos, a especificidade não pode ser avaliada separadamente.

Devido à variabilidade de comportamento das enzimas estudadas nesse trabalho sobre a especificidade por diferentes álcoois e ácidos graxos, seria adequada a realização de um estudo mais aprofundado, avaliando o comportamento em relação a ácidos graxos e álcoois com números sequenciais de carbonos nas cadeias.

Foram realizados testes preliminares de aplicação das enzimas ‘CB’, ‘CP’, ‘IB’ e ‘IP’ previamente imobilizadas em carvão ativado e encapsuladas em alginato de cálcio. As enzimas foram testadas em reações de esterificação (ácido palmítico/etil-hexanol) e transesterificação (óleo de soja/etanol) em condições pontuais otimizadas em outros trabalhos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa para enzimas comerciais. Devido aos resultados apresentados em relação à especificidade dessas enzimas por ácidos graxos e álcoois de cadeia mais curta, não foi observada conversão aos produtos desejados nas condições avaliadas.

Entretanto, de acordo com os resultados apresentados, as enzimas produzidas apresentam potencial para realizarem reações de esterificação entre álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, produzindo ésteres usualmente empregados na indústria como *flavors*. Esses ésteres em geral são obtidos por via química, porém o seu valor de mercado é muito inferior ao dos ésteres provenientes de fontes naturais. Esses compostos, por outro lado, podem ser considerados naturais se produzidos por síntese intermediada por lipases. Existem poucas referências na literatura em relação à afinidade de lipases microbianas não-comerciais por substratos de cadeia curta, já que essas moléculas podem exercer efeitos inibitórios sobre a enzima (Abbas e Comeau, 2003 e Ozyilmaz e Gezer, 2009). Desse modo, a produção de ésteres *flavor* intermediada pelas lipases produzidas nesse trabalho é uma alternativa de aplicação que pode ser considerada.

3.5.2 – Estabilidade em diferentes temperaturas

As taxas reacionais aproximadamente dobram para cada 10 °C de aumento da temperatura. Assumindo que uma enzima é estável em temperaturas altas, a produtividade de

uma reação pode ser elevada operando-se em temperaturas relativamente altas. Consequentemente, a estabilidade térmica é uma característica desejável nas lipases (Sharma et al., 2001).

Embora existam poucos relatos na literatura, uma característica muito importante a ser avaliada é a estabilidade da enzima quando armazenada em baixas temperaturas. Esta característica é importante para determinar o tempo em que a enzima poderá permanecer armazenada sem perder suas características iniciais em termos de atividade enzimática.

3.5.2.1 – Estabilidade em temperaturas altas

A estabilidade térmica dos extratos enzimáticos liofilizados (convencional bruto e precipitado, 'CB' e 'CP', e industrial bruto e precipitado, 'IB' e 'IP') nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C foi monitorada ao longo de 184 horas. A 'ALS' relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 horas). As Figuras 3.6, 3.7 e 3.8 apresentam a atividade lipásica sintética relativa (%) ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 30, 45 e 60 °C, respectivamente.

A partir da Figura 3.6 é possível observar que as enzimas sofrem uma espécie de ativação quando incubadas a 30 °C. As enzimas provenientes da fermentação do meio convencional apresentam picos de atividade lipásica sintética após 20 horas de incubação, com aumentos de 5,3 e 3,4 vezes para as enzimas 'CB' e 'CP', respectivamente. Os extratos enzimáticos liofilizados provenientes do meio industrial também apresentam picos de atividade lipásica sintética após 92 e 20 horas de incubação, com aumentos de 2,8 e 1,3 vezes, respectivamente, para as enzimas 'IB' e 'IP'. Pode-se notar que as enzimas brutas são as que sofrem maior ativação quando submetidas a essa condição, contudo, sofrem desativação completa após 136 horas de incubação. Por outro lado, as enzimas precipitadas apresentam maior estabilidade, mantendo a atividade até 160 horas de incubação.

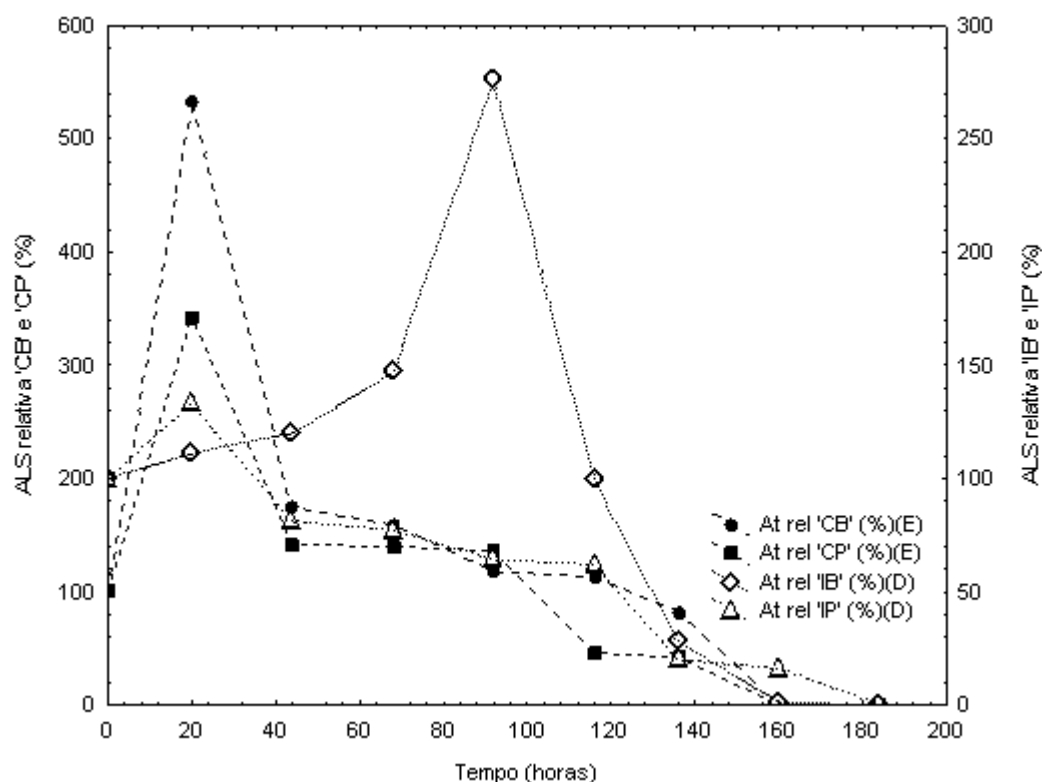


Figura 3.6. Estabilidade das enzimas a 30 °C.

Esse processo de ativação a 30 °C também foi observado por Fernandes et al. (2004) quando do estudo de reações de hidrólise e síntese catalisadas por uma lipase proveniente de *Thermomyces lanuginosa* em sistema micelar reverso AOT/isooctano. A enzima apresentou um pico de atividade com aumento de mais de 20% em relação à atividade inicial após 20 minutos de incubação; mantendo a sua atividade por até 60 minutos.

No trabalho desenvolvido por Casa et al. (2006), a estabilidade térmica em solventes orgânicos a 30 °C de duas lipases brutas foi avaliada, sendo os perfis de desativação de ambos os biocatalisadores ajustados a um decaimento exponencial simples. Os tempos de meia vida calculados foram de 5 e 6,6 dias.

Segundo Sun, Xu e Wang (2009), que avaliaram a estabilidade de duas lipases purificadas em relação à atividade hidrolítica, uma das lipases foi extremamente estável na faixa de temperatura de 30-50 °C por um período de incubação de 60 minutos.

Na temperatura de 45 °C, de acordo com a Figura 3.7, as enzimas brutas 'CB' e 'IB' sofreram uma pequena ativação térmica após 20 horas de incubação (35 e 10 % da atividade

inicial, respectivamente). Contudo, a enzima ‘CB’ apresentou atividade até 44 horas de incubação e a ‘IB’, até 92 horas. A enzima precipitada ‘CP’ apresentou um pequeno aumento de atividade após 44 horas de incubação (10 %) e permaneceu ativa até 92 horas, enquanto que a enzima ‘IP’ não apresentou ativação mas manteve a atividade até 116 horas.

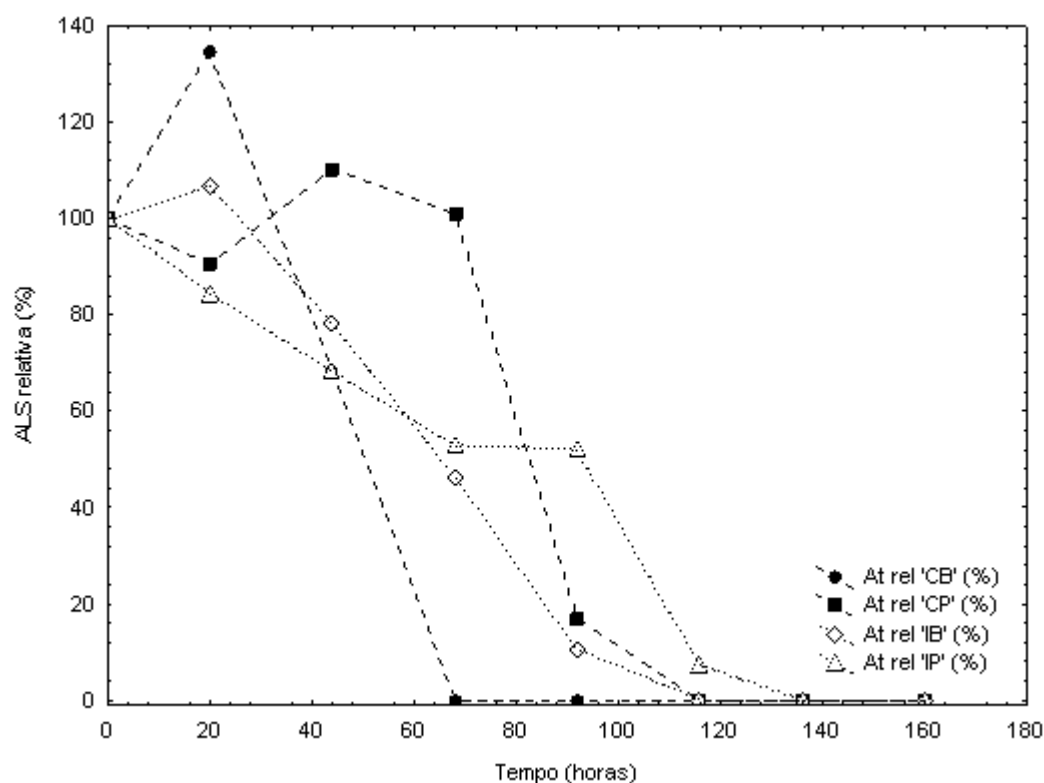


Figura 3.7. Estabilidade das enzimas a 45 °C.

De acordo com a Figura 3.8, a 60 °C todas as enzimas apresentaram uma alta desativação térmica, sendo a enzima bruta ‘CB’ a mais sensível à temperatura elevada (desativação total após 44 horas de incubação). As demais enzimas mantiveram a atividade até 92 horas de incubação.

Cao et al. (2009) estudaram a estabilidade de uma lipase sintética de *Burkholderia cepacia* encapsulada em sílica a 60 °C. Foi observado um aumento de cerca de 40% na atividade após 1 hora de incubação, porém após 12 horas a atividade foi reduzida à cerca de 50% do valor inicial. No trabalho realizado por Fernandes et al. (2004), em temperaturas

maiores (37, 50 e 60 °C) a enzima perdeu a sua atividade rapidamente, mantendo menos de 40% da atividade inicial após 30 minutos de incubação.

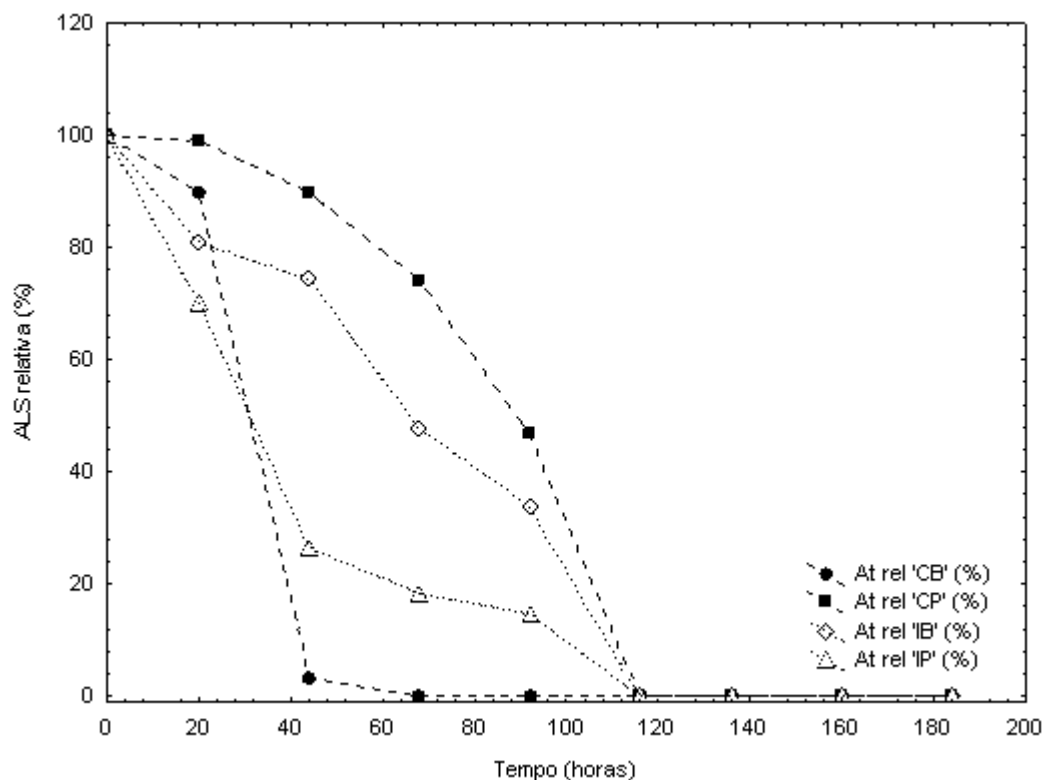


Figura 3.8. Estabilidade das enzimas a 60 °C.

Assim como no trabalho desenvolvido por Fernandes et al. (2004), a perda de atividade enzimática para as enzimas avaliadas nas diferentes temperaturas não pôde ser descrita por um modelo simples de primeira ordem. Dessa forma, não foi possível calcular constantes de velocidade e tempos de meia vida para a desnaturação térmica.

De acordo com Sharma et al. (2001), a estabilidade térmica de uma lipase está relacionada com a sua estrutura, sendo influenciada por diversos fatores ambientais. O fator mais importante é o meio em que a enzima se encontra, já que a presença de água diminui fortemente a termoestabilidade (Reetz, 2002). Dessa forma, a escala de comparação entre extratos enzimáticos liofilizados e não liofilizados é diferente, pois os primeiros apresentam atividade de água extremamente baixa, o que influi positivamente na termoestabilidade. Por esse motivo, as enzimas estudadas no presente trabalho e por de Casa et al. (2006)

apresentaram-se estáveis por vários dias, enquanto que nos demais trabalhos referenciados a estabilidade foi estudada em períodos mais curtos de incubação.

3.5.2.2 – Estabilidade em temperaturas baixas (armazenamento)

As estabilidades dos extratos enzimáticos liofilizados (convencional bruto e precipitado, ‘CB’ e ‘CP’, e industrial bruto e precipitado, ‘IB’ e ‘IP’) armazenados em geladeira (4 °C) e congelador (-10 °C) foram monitoradas ao longo de cerca de 60 dias. A ‘ALS’ relativa (%) foi associada à atividade inicial da enzima (tempo = 0 horas). As Figuras 3.9 (a) e (b) apresentam os perfis de atividade lipásica sintética relativa (%) ao longo do tempo de armazenamento em geladeira (4 °C) e congelador (-10 °C), respectivamente.

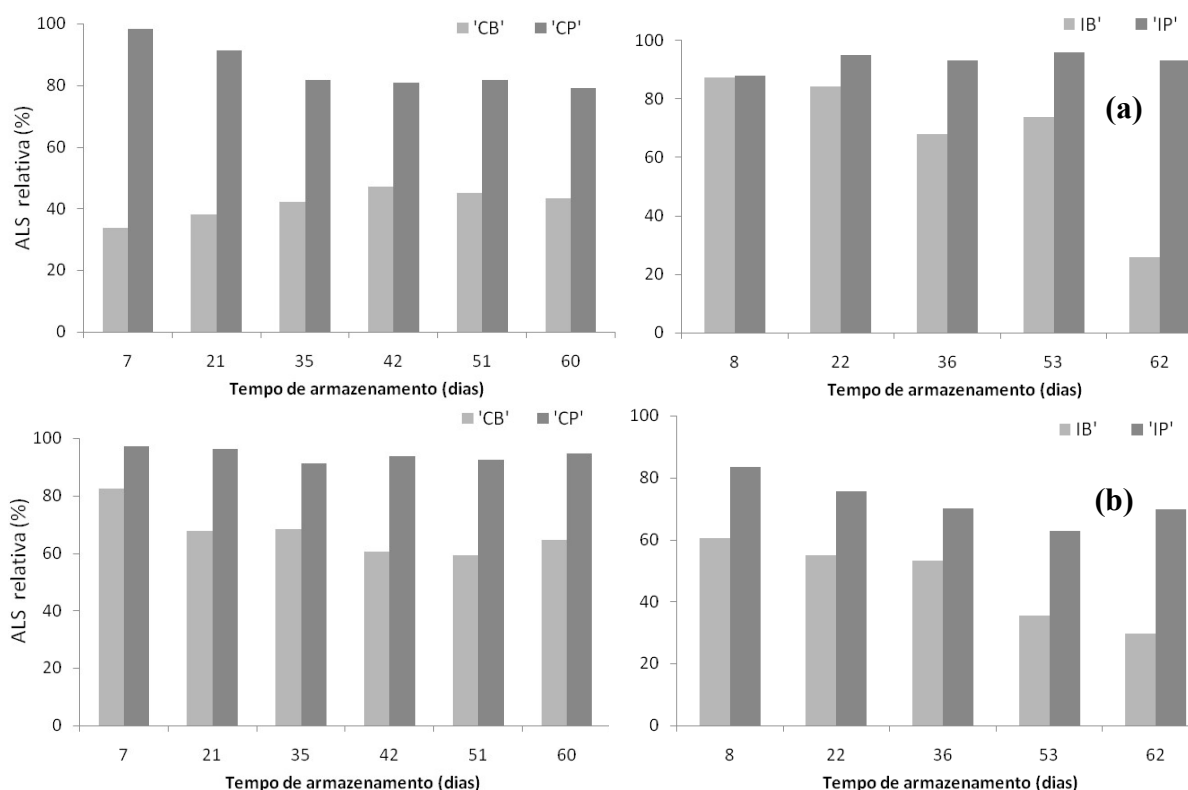


Figura 3.9. Atividades lipásicas sintéticas relativas das enzimas ao longo do período de armazenamento em (a) geladeira (4 °C) e (b) congelador (-10 °C) (lado esquerdo- convencional; lado direito - industrial).

A partir da Figura 3.9, é possível observar que as enzimas precipitadas (‘CP’ e ‘IP’) apresentaram maior estabilidade em ambas as temperaturas do que as enzimas brutas. As

enzimas ‘CP’ e ‘IP’ mantiveram a atividade relativa próxima a 100% da inicial quando conservadas no congelador (-10°C) e na geladeira (4°C), respectivamente. Esse resultado está de acordo com o apresentado por Menoncin (2009), em que a atividade de hidrólise de um extrato enzimático concentrado proveniente de fermentação sólida de *Penicillium verrucosum* manteve-se praticamente igual após 90 dias de armazenamento tanto na geladeira (4 °C) quanto no congelador (-10 °C).

Esse resultado pode ser considerado uma grande vantagem dos extratos enzimáticos concentrados frente aos brutos. Apesar de a precipitação não ter conduzido a um aumento significativo da atividade lipásica sintética específica das enzimas, os extratos precipitados apresentaram uma estabilidade térmica muito superior quando submetidos a temperaturas altas e quando armazenados em temperaturas baixas.

No trabalho realizado por Wolski et al. (2009), a estabilidade durante o armazenamento de extratos enzimáticos brutos provenientes de fermentação sólida e submersa de *Penicillium* sp. em baixas temperaturas foi avaliada em relação à atividade de hidrólise dos extratos. As atividades foram mantidas até cerca de 100 dias quando do armazenamento a 10 °C e cerca de 125 dias, a -10 °C. Tempos maiores de armazenamento conduziram a um decaimento gradual na atividade lipásica e os extratos foram parcialmente inativados.

Demir e Tükel (2009) avaliaram a estabilidade ao longo do armazenamento a temperatura ambiente e 5 °C de uma lipase de *Spirulina platensis* purificada, em relação à atividade de hidrólise. As estabilidades da lipase foram praticamente as mesmas em ambas as temperaturas até os 5 dias de armazenamento. Contudo, a lipase reteve 51% de sua atividade inicial após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente e 38% da sua atividade inicial após o mesmo período a 5 °C.

3.5.4 – Efeito da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética

De acordo com Sun, Xu e Wang (2009) e Sun e Xu (2009), as enzimas liofilizadas exibem uma “memória de pH”, isto é, a atividade da enzima liofilizada em solventes orgânicos é criticamente dependente do pH da solução aquosa antes da liofilização. A memória de pH é atribuída a uma fixação das ionizações dos grupos protéicos catalíticos após a secagem do biocatalisador, sendo que os grupos funcionais ionizáveis aparentemente mantêm o seu estado de ionização em meios não-aquosos.

Nesta etapa foram avaliados os efeitos da temperatura e memória de pH na atividade lipásica sintética dos diferentes extratos enzimáticos liofilizados (convencional bruto e precipitado, ‘CB’ e ‘CP’, e industrial bruto e precipitado, ‘IB’ e ‘IP’).

Para a determinação do comportamento das enzimas nessas condições, foram realizados Delineamentos Completos Centrais Rotacionais 2² com 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, sendo a matriz dos planejamentos bem como os resultados obtidos em termos de atividade lipásica sintética (ALS, em U/ g_{extrato liofilizado}) apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Matriz dos planejamentos experimentais realizados (valores codificados e reais com as respostas em termos de atividade lipásica sintética) para avaliação dos efeitos de memória do pH e temperatura.

Ensaio	pH	T °C	ALS (U/g _{extrato liofilizado})			
			‘CB’	‘CP’	‘IB’	‘IP’
1	-1(4,0)	-1(20)	26,87	4,65	18,42	9,09
2	+1(9,0)	-1(20)	22,54	4,61	32,56	0,00
3	-1(4,0)	+1(60)	52,55	8,96	92,41	50,96
4	+1(9,0)	+1(60)	114,51	42,47	39,92	42,80
5	0(6,5)	0(40)	143,57	64,78	32,90	8,52
6	0(6,5)	0(40)	159,20	59,86	38,10	9,26
7	0(6,5)	0(40)	132,44	66,66	44,21	8,44
8	0(6,5)	-1,41(11,8)	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0(6,5)	+1,41(68,2)	0,00	0,00	85,9	48,46
10	-1,41(3,0)	0(40)	56,62	52,54	0,00	0,00
11	+1,41(10,0)	0(40)	7,44	0,00	0,00	0,00

Pode-se observar que os maiores valores de ALS foram obtidos para a enzima ‘CB’ na região do ponto central (média de 145,07 U/ g_{extrato liofilizado}), em um valor de memória de pH próximo à neutralidade (6,5) e temperatura de 40 °C. As melhores respostas para a enzima ‘CP’ também foram obtidas nos pontos centrais (média de 63,77 U/g_{extrato liofilizado}), o que mostra que as enzimas provenientes da fermentação do meio convencional apresentam atividades maiores em condições mais amenas (pH neutro e temperatura mediana). Nos valores extremos de temperatura (11,8 e 68,2 °C, equivalentes aos ensaios 8 e 9), não foi observada atividade

enzimática. No pH alcalino mais elevado (10,0), houve uma perda significativa da atividade enzimática. Em valores mais baixos de pH (3,0) as enzimas mantiveram suas atividades, mostrando a preferência dessas enzimas por pH mais ácido ou próximo à neutralidade.

Para as enzimas provenientes da fermentação do meio industrial, os maiores valores foram obtidos para o ensaio 3 (pH 3,0 e temperatura de 60 °C) e para o ensaio 9 (pH 6,5 e temperatura de 68,2 °C), mostrando que essas enzimas são ativas em uma ampla faixa de pH (de 4,0 a 9,0), mas atuam melhor em uma faixa de temperatura mais alta (de 40 a 68,2 °C). Nas condições de temperatura mais baixas e nos extremos de pH não foi observada atividade enzimática para nenhuma das enzimas provenientes da fermentação do meio industrial.

Nos trabalhos desenvolvidos por Sun, Xu e Wang (2009) e Sun e Xu (2009), as enzimas estudadas exibiram máxima atividade sintética em memórias de pH levemente ácidos e próximos à neutralidade (de 5,5 a 7,5). As memórias das enzimas em valores de pH alcalinos (acima de 8,0) e ácidos (abaixo de 6,0) resultaram em perda completa da atividade enzimática, assim como foi observado para as enzimas provenientes do meio convencional em pH alcalino no presente trabalho. Segundo esses autores, a perda na atividade pode ser devida a uma alteração significativa nos estados de ionização dos grupos amino nas proteínas liofilizadas.

Os mesmos autores estudaram o comportamento de lipases sintéticas em diferentes temperaturas em memória de pH fixas em 6,0, 6,5 e 7,0, sendo observadas as maiores atividades em valores medianos de temperatura (30-40 °C). As enzimas também apresentaram atividade em temperaturas mais altas (50 e 60 °C). Contudo, em temperaturas menores (20 °C) a atividade foi baixa, provavelmente devido à reação se processar mais lentamente em tais condições, tal como foi observado neste trabalho.

Ozyilmaz (2009) avaliou o efeito da temperatura nas atividades sintética e hidrolítica de uma lipase comercial de *Candida rugosa* livre e imobilizada em sílica gel. As máximas atividades lipásicas sintéticas para as enzimas livres foram observadas na faixa de 30-35 °C. As enzimas imobilizadas exibiram valores máximos de atividade na faixa de 35-40 °C.

A Tabela 3.8 apresenta os modelos empíricos propostos a partir dos delineamentos completos 2² para a avaliação dos comportamentos das enzimas frente a diferentes temperaturas e memórias de pH.

Tabela 3.8. Modelos propostos para o comportamento das enzimas em diferentes memórias de pH e temperaturas.

Amostra	Modelo: ALS (U/mL) =
‘SB’	$144.92 - 1.47.pH(L) - 47.00.pH(Q) + 14.75.T(L) - 63.12.T(Q) + 16.57.pH(L).T(L)$
‘SP’	$63.75 - 5.09.pH(L) - 18.27.pH(Q) + 5.29.T(L) - 31.48.T(Q) + 8.39.pH(L).T(L)$
‘IB’	$153.27 - 12.87.pH(L) + 99.83.T(L) - 19.84.pH(L).T(L)$
‘IP’	$8.69 - 2.16.pH(L) - 0.96.pH(Q) + 10.18.T(L) + 11.23.T(Q) + 0.23.pH(L).T(L)$

Todos os modelos propostos foram validados por meio de Análise de Variância (ANOVA) em um nível de confiança de 90% ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), com percentuais de variação explicada de 81, 80, 85 e 90% para as enzimas ‘CB’, ‘CP’, ‘IB’ e ‘IP’, respectivamente. A Tabela 3.9 apresenta a análise de variância dos modelos propostos para as enzimas ‘CB’, ‘CP’, ‘IB’ e ‘IP’.

A validação dos modelos permitiu a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 3.10.

De acordo com a Figura 3.10, é possível observar que as enzimas provenientes da fermentação do meio convencional apresentam as maiores atividades em memórias de pH próximas à neutralidade (6,5) e temperatura mediana (cerca de 40 °C). Por outro lado, as enzimas resultantes da fermentação do meio industrial mantêm a atividade em uma ampla faixa de pH, porém apresentam preferência por temperaturas reacionais mais altas.

Tabela 3.9. Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a atividade lipásica sintética (U/mL) das enzimas.

Enzimas		Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
‘CB’	Regressão	30178,05	5	6035,61	4,24
	Resíduos	7113,31	5	1422,661	
	Falta de ajuste	361,42	3		
	Erro puro	6751,88	2		
	Total	37291,36	10		

‘CP’	Regressão	6768,35	5	1353,67	3,96
	Resíduos	1710,69	5	342,14	
	Falta de ajuste	24,66	3		
	Erro puro	1686,03	2		
	Total	8479,04	10		
‘IB’	Regressão	42119,73	3	14039,91	5,73
	Resíduos	7356,25	3	2452,08	
	Falta de ajuste	64,10	2		
	Erro puro	7292,16	1		
	Total	49475,98	6		
‘IP’	Regressão	3788,41	5	757,68	8,70
	Resíduos	435,61	5	87,12	
	Falta de ajuste	0,41	3		
	Erro puro	435,20	2		
	Total	4224,01	10		

Coeficiente de correlação: $R=0,90$, $F_{5;5; 0,90} = 3,45$, $F_{3;3; 0,90} = 5,39$

Gutarra et al. (2009) estudando a caracterização de uma lipase bruta produzida por fermentação sólida de torta de babaçu utilizando *Penicillium simplissimum* avaliaram os níveis ótimos de temperatura de pH para a atividade lipásica hidrolítica por meio de um DCCR, variando a temperatura na faixa de 25 a 45 °C e o pH na faixa de 5,0 a 7,0. Um modelo de 2ª ordem foi validado por Análise de Variância, sendo que os valores máximos de atividade lipásica foram obtidos para temperaturas entre 37 e 45 °C e valores de pH entre 5,0 e 6,0. Baseados nesses resultados, os autores realizaram novos experimentos para determinar a atividade lipásica em temperaturas entre 45 e 70 °C e pH 4,0-6,0, alcançando atividades máximas a 50 °C e pH 4,0 e 5,0.

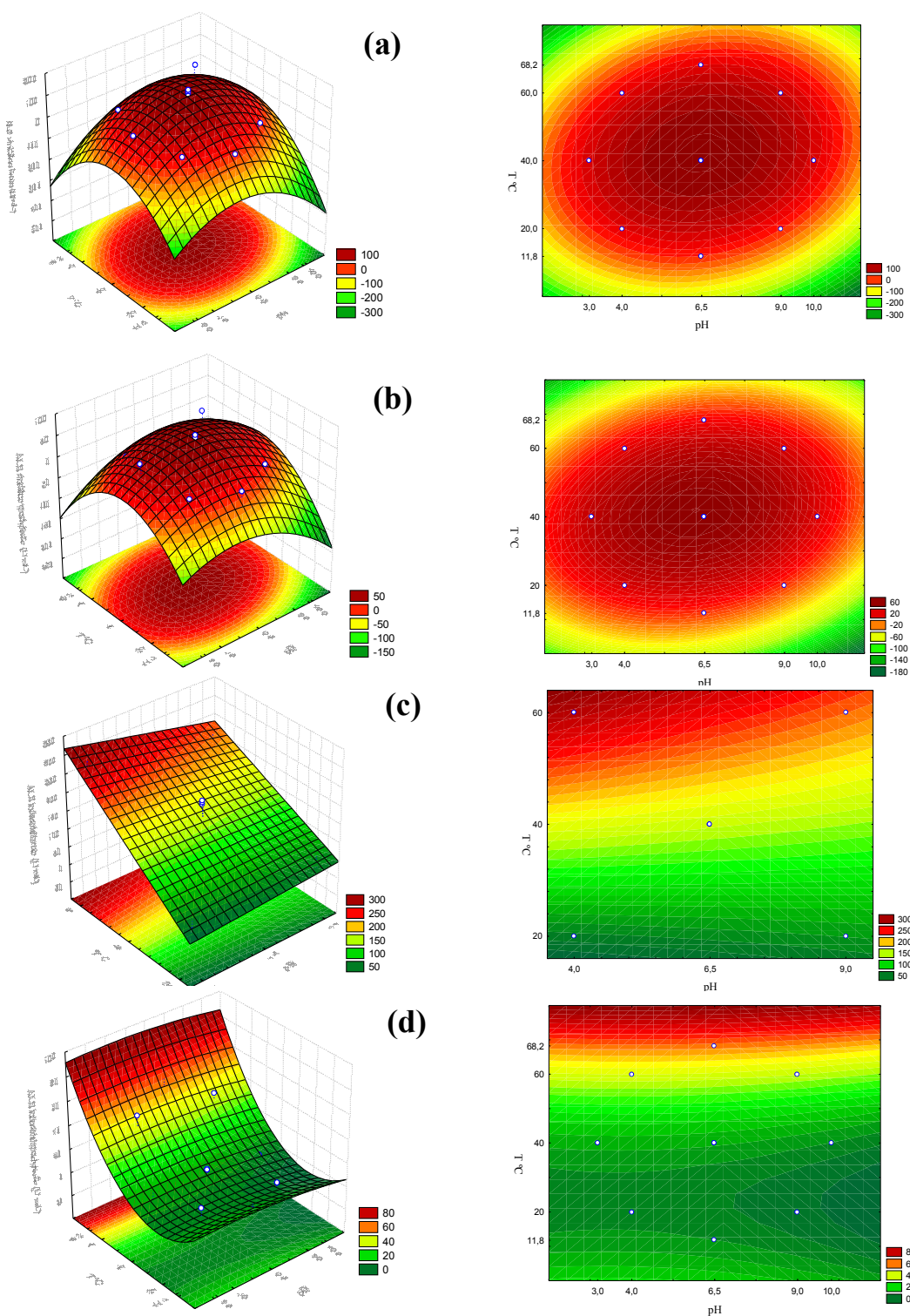


Figura 3.10. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a avaliação do comportamento da lipase sintética em diferentes temperaturas e memórias de pH, sendo (a) ‘CB’, (b) ‘CP’, (c) ‘IB’ e (d) ‘IP’.

Os resultados de avaliação do efeito da temperatura e memória de pH apresentados nesse trabalho são semelhantes aos observados por outros autores. Porém, cabe reiterar que o planejamento de experimentos mostrou-se uma ferramenta valiosa nesse caso, já que existem interações importantes entre os fatores que não são consideradas quando da análise dos efeitos da memória de pH e da temperatura individualmente.

3.6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados apresentados, a estratégia de fermentação submersa empregada foi eficiente para a produção de ‘lipase sintética’ pela nova cepa de *Sporidiobolus pararoseus*, obtendo-se boas atividades lipásicas sintéticas tanto para o meio convencional quanto para o meio industrial. Esse resultado é importante tendo em vista a escassez de publicações na literatura em relação à produção de lipases avaliando a atividade lipásica sintética como resposta.

As caracterizações bioquímicas mostraram, em geral, uma boa estabilidade térmica e faixas amplas de temperatura e memória de pH de operação, o que é interessante do ponto de vista da aplicabilidade das enzimas produzidas. A partir do estudo de especificidade, foi possível vislumbrar a possibilidade de aplicação das enzimas na produção de bioaromas, devido à sua maior especificidade por ácidos graxos de cadeia curta. Os aromas produzidos a partir de micro-organismos, considerados naturais, são de grande interesse para as indústrias de alimentos e cosméticos.

4.0 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1 CONCLUSÕES

A cepa *Sporobolomyces ruberrimus* isolada rendeu bons resultados para a produção de uma ‘lipase sintética’ por fermentação submersa de um meio convencional. A condição otimizada para a produção de ‘lipase sintética’ foi de 5,0, 6,8, 7,0 e 1,0 % (m/v) de peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva, respectivamente, a 30°C e 150rpm e 10% de inóculo. A lipase produzida nas condições otimizadas apresentou uma atividade lipásica sintética de 26,9 U/mL em 72 horas de fermentação, um aumento de 6,36 vezes em relação ao meio não otimizado.

A substituição dos componentes do meio de cultura por fontes alternativas (hidrolisado de levedura, água de maceração de milho e óleo residual de fritura) promoveu a produção de uma lipase com atividade lipásica sintética cerca de 2,2 vezes menor (12,3 U/mL). Apesar disso, a utilização de fontes alternativas pode auxiliar na redução da poluição ambiental associada aos resíduos agroindustriais, além de reduzir o custo global de produção da enzima, o que justifica o estudo de suas propriedades.

A concentração dos extratos enzimáticos com 20% de saturação de sulfato de amônio foi a que promoveu os melhores fatores de purificação para ambos os extratos enzimáticos (convencional e industrial), com fatores de purificação de 1,2 e 0,5, respectivamente. Ainda, esses extratos enzimáticos precipitados foram os que apresentaram as maiores atividades lipásicas sintéticas (154,57 e 120,96 U/g_{extrato liofilizado}, respectivamente).

Os extratos enzimáticos produzidos (convencional bruto e precipitado, ‘CB’ e ‘CP’, e industrial bruto e precipitado, ‘IB’ e ‘IP’) foram parcialmente caracterizados em termos de especificidade ao substrato de esterificação, estabilidade em temperaturas altas e baixas e comportamento frente a diferentes memórias de pH e temperaturas.

Na avaliação da especificidade dos extratos enzimáticos frente a diferentes substratos de esterificação, as enzimas apresentaram, de uma forma geral, maior especificidade pelo ácido graxo de cadeia curta (ácido butírico) e pelo álcool de menor cadeia carbônica (metanol). Esse foi um resultado interessante já que existem poucas referências na literatura em relação à afinidade de lipases microbianas não-comerciais por substratos de cadeia curta. Esses substratos produzem ésteres empregados na indústria como *flavors*, geralmente obtidos por via química (com valor de mercado muito inferior ao dos provenientes de fontes naturais); porém considerados naturais se produzidos por síntese intermediada por lipases. Desse modo, a produção de ésteres *flavor* intermediada pelas lipases produzidas nesse trabalho é uma alternativa de aplicação que pode ser considerada.

Quanto à estabilidade das enzimas quando submetidas a temperaturas altas, observou-se uma espécie de ativação quando incubadas a 30 °C, com aumentos de atividade lipásica sintética de até 5,3 vezes após 20 horas de incubação. As enzimas brutas sofrem maior ativação, contudo, perdem totalmente a atividade após 136 horas de incubação, enquanto as enzimas precipitadas mantêm a atividade por até 160 horas de incubação. Na temperatura de 45 °C, as enzimas brutas sofreram uma pequena ativação térmica após 20 horas de incubação, mas sofreram desativação completa após 44 horas e 92 horas de incubação para as enzimas 'CB' e 'IB', respectivamente. As enzimas precipitadas mantiveram a atividade por até cerca de 100 horas. A 60 °C, todas as enzimas apresentaram uma alta taxa de desativação térmica.

Em relação à estabilidade em baixas temperaturas, observou-se uma tendência geral de melhor manutenção das atividades enzimáticas a -10 °C. As enzimas precipitadas apresentaram maior estabilidade em ambas as temperaturas, o que pode ser considerado uma grande vantagem dos extratos enzimáticos concentrados frente aos brutos. Apesar de a precipitação não ter conduzido a um aumento significativo da ALS específica das enzimas, os extratos precipitados apresentaram uma estabilidade térmica muito superior quando incubados em temperaturas altas e armazenados em temperaturas baixas.

Na avaliação do comportamento das enzimas frente a diferentes temperaturas e memórias de pH, as enzimas provenientes do meio convencional apresentam as maiores atividades em memórias de pH próximas à neutralidade (6,5) e temperatura mediana (cerca de 40 °C). Por outro lado, as enzimas oriundas do meio industrial mantêm a atividade em uma ampla faixa de pH, porém apresentam preferência por temperaturas reacionais mais altas.

4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, a seguir são apresentadas algumas sugestões de trabalhos que podem ser realizados:

- Avaliação da estabilidade dos extratos enzimáticos em diferentes memórias de pH;
- Avaliação da estabilidade dos extratos enzimáticos em solventes orgânicos em diferentes temperaturas e memórias de pH;
- Estudo de otimização da produção de lipase sintética utilizando meio industrial (incluindo a avaliação de outros resíduos agroindustriais) por meio da técnica de planejamento de experimentos;
- Estudo da produção de lipase sintética por fermentação submersa em biorreator em escala de bancada, incluindo a otimização de variáveis ambientais de fermentação como temperatura, pH, agitação e aeração;
- Estudo de otimização da produção de lipase sintética por *Sporidiobolus pararoseus* utilizando fermentação em estado sólido;
- Aprimoramento da metodologia empregada para a determinação da atividade lipásica sintética;
- Estudo da purificação e imobilização dos extratos enzimáticos concentrados;
- Estudo de aplicação das enzimas obtidas em reações de esterificação visando a produção de aromas (ésteres de cadeia curta).

5.0 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, H. e Comeau, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32:589-595.

Bai, F.Y., Zhao, J.H., Takashima, M., Jia, J.H., Boekhout, T., Nakase, T. Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phaffii* sp. nov. *Int J Sys Evol Microbiol*. 2002; 52, 2309–2314.

Ball, A. J., Corr, S., Micklefield, J. Lipase-catalysed kinetic resolutions of secondary alcohols in pressurized liquid hydrofluorocarbons. *Tetrahedron Letters*. 2009; 50:3543-3546.

Bapiraju, K. V. V. S. N., Sujatha, P., Ellaiah, P. e Ramana, T. Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus* sp. BTNT-2. *Journal of Basic Microbiology*. 2005;45:257-273.

Bon, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L. Enzimas em biotecnologia. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

Cao, X., Yang, J., Shu, L., Yu, B. e Yan, Y. Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in sílica by bioimprinting with substrate analogues. *Process Biochemistry*. 2009;44:177-182.

Casa, R. M., Sinisterra, J. V. e Sánchez-Montero, J. M. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38:599-609.

Castro, H. F. e Anderson, W. A. Fine chemicals by biotransformations using lipases. *Química Nova*. 1995;6:6-15.

Chakraborty, K., Raj, P. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*. 2008;109:727-736.

Charney, J. E. e Tomarelli, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biologic Chemistry*. 1947; 171:501-505. Cramer, J. F., Duenholm, M. S., Nielsen, S. B., Pedersen, D. S., Wimmer, R. e Pedersen L. H. Controlling the degree of esterification in lipase catalysed synthesis of xylitol fatty acid esters. *Enzyme Microbial Technology*. 2007, 41:346-352.

D'Antona, N, Lambusta, D, Nicolosi, G. e Bovicelli, P. Preparation of regioprotected morins by lipase-catalysed transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008; 52-53:78-81.

Deive, F. J., Carvalho, E., Pastrana, L., Rúa, M. L., Longo, M. A. e Sanroman, M. A. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresource Technology*. 2009; 100:3630-3637.

Demir, B. S. e Tükel, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, in press DOI:10.1016/j.molcatb.2009.09.011.

Ebrahimpour, A, Rahman, R. N. Z. R. A, Ch'ng, D. H. E, Basri, M. e Salleh, A. B. A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus sp.* strain ARM. *BMC Biotechnology*. 2008; 8:96-111.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred.I. Accuracy Assessment. *Genome Res*. 1998; 8, -175185.

Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 3:1351-1371.

Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783-791

Fernandes, M. L. M., Krieger, N., Baron, A. M., Zamora, P. P., Ramos, L. P. e Mitchell, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalyzed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004;30:43-49.

Ghandi, N., Sawant, S. B., Joshi, J. B. Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. *Biotechnology Progress*. 1995;11:282-287.

Gordon, D., Abajian, C., Grenn, P. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res*. 1998; 8, 195-202.

Griebler, N., Polloni, A., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J., Di Luccio, M., Oliveira, D, Treichel, H, Cansian, R, Rigo, E e Ninow, J. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*. 2009; in press DOI 10.1007/s11947-008-0176-5.

Gupta, M. N. Enzyme function in organic solvents. *European Journal of Biochemistry*. 1992;203:25-32.

Gupta, A. e Khare, S. Cellular response mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* PseA during growth in organic solvents. *Letters in Applied Microbiology*. 2009;49:372-377.

Gutarra, M. L. E., Godoy, M. G., Maugeri, F., Rodrigues, M. I., Freire, D. M. G., Castilho, L. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. 2009; 100:5249-5254.

Hasan, F., Shah, A. A. e Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technology*. 2006; 39:235-251.

Illanes, A. Enzyme Biocatalysis – Principles and Applications. New York: Springer, 2008.

Immanuel, G., Esakkiraj, P., Jebadhas, A., Iyapparaj, P. e Palavesam, A. Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*. *Food Technology Biotechnology*. 2008; 46:60-65.

Kademi, A., Leblane, D. e Houde, A. Lipases. In: Pandey A. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. New York: The Haworth Press Inc., 2004:552-561.

Kashmiri, M. A., Adnan, A., Butt, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5:878-882.

Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Arunkumar, M., Thangavelu, T. and Natarajaseenivasan, K. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas sp.* (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2008; 31:483-492.

Kumar, S. e Gupta, R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry*. 2008; 43:1054-1060.

Kurtzman, C. P. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*. 2006; 47:6571.

Kurtzman, C. P. e Robnett, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large sub- unit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998; 3:331-371.

Langrand, G., Triantaphylides, C. e Baratti, J. Lipase-catalysed formation of flavor esters. *Biotechnology Letters*. 1988;10:549-554.

Lotti, M. e Alberghina, L. Lipases: Molecular Structure and Functions. In: Polaina J and MacCabe A P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Dordrecht:Springer, 2007, 263-282.

Martins, V.G., Kalil, S.J. e Costa, J.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química nova*. 2008;31:1942-1947.

Menoncin, S., Domínguez, N.M., Freire, D.M.G., Toniazzo, G., Cansian, R.L., Oliveira, J.V., Di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state

fermentation of soybean bran, *Food and Bioprocess Technology: An International Journal*. 2009. DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

Nyaradzo, T. L., Chingorimbo-Murefu, Riva, S, Burton, S. G. Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 56:277-282.

Ozyilmaz, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009;56:231-236.

Ozyilmaz, G. e Ezer, G. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009, in press DOI:10.1016/j.molcatb.2009.04.013.

Pelczar, M. J; Chan, E.C.S; Krieg, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações. São Paulo: Makron, 1996.

Persson, M., Mladenoska, I., Wehtje, E. e Adlercreutz, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microbial Technology*. 2002; 31:833-841.

Peter, F. e Preda, G. Characterization of pancreatic lipase substrate specificity in organic reaction media by kinetic method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002;19-20:467-472.

Petersen, M. e Daniel, R. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Clostridium teatnomorphum*. *World Journal of Microbiol Biotechnology*. 2006; 22:431-435.

Pilissão, C, Carvalho, P. O., e Nascimento, M. G. Enantioselective acylation of (RS)-phenylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochemistry*. 2009; 44:1352-1357.

Pinheiro, T. F., Menoncin S., Domingues, N. M., Oliveira, D., Treichel, H., Di Luccio, M., Freire, D. M. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008; 28:444-450.

Pires-Cabral, P., Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S. Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. *Biochemistry Engineering Journal*. 2007; 33:148-158.

Rajendran, A. and Thangavelu, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *LWT – Food Science and Technology*. 2009; 42:985-992.

Rao, D. G. Introduction to biochemical engineering. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 2005.

Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L. e Muthukumar, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*. 2008; 99:3975-3981.

Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., Miller, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009; 147-148:237-250.

Rigo, E. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. 2009. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Saitou, N, Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol E*. 1987; 4:406–425.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001; 19:627-662.

Shu, C-H, Xu, C-J e Lin G-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 2006;41:734-738.

Shu, Z-Y, Jiang, H, Lin, R-F, Jiang, Y-M, Lin, L e Huang, J-Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;62:1-8.

Stanbury, P. F., Whitaker, A. e Hall, S. J. Principles of fermentation technology. London: Butterworth-Heinemann, 2003.

Stirling D. (2003). DNA extraction from Fungi, Yeast and Bacteria. p. . In: Barlett, J. M. S.; Stirling, D. [Eds]. PCR Protocols. 2nd ed. Humana Press, V.226, 2003.

Sun, S. Y. and Xu, Y. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*. 2008; 43:219-224.

Tamura, K, Dudley, J, Nei, M e Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlabs.net/publications>).

Teng, Y. and Xu, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology*. 2008; 99:3900-3907.

Teng, Y., Xu, Y. and Wang, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2009; 57:292-298.

Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*. 2010; 3:182-196.

Vargas, G. D. L. P., Treichel, H., Oliveira, D., Beneti, S. C., Freire, D. M. G., Di Luccio, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *Journal of Chemistry Technology Biotechnology*. 2008;83:47-54.

Vakhlu, J. e Kour, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Eletronic Journal of Biotechnology*. 2006;9.

Vieira, A. P., Silva, M. A. P. e Langone, M. P. Biodiesel production via esterification reactions catalysed by lipase. *Latin America Applied Research*. 2006; 36:283-288.

Vogel, H. C. e Todaro, C. L. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. New Jersey: Noyes Publications, 1997.

Wang, D., Xu, Y. e Shan, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 41:30-37.

Wolski, E., Menusi, E., Remonatto, D., Vardanega, R., Arbter, F., Rigo, E., Ninow, J., Mazutti, M., di Luccio, M., Oliveira, D., Treichel, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *LWT – Food Science and Technology*. 2009;42:1557-1560.

Wu, X. Y., Jääskeläinen, S. e Linko, Y-Y. An investigation of crude lipases of hydrolysis, esterification, and transesterification. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996;19:226-231.

6.0 – ANEXOS

ANEXO I

Identificação da levedura

Primeiramente, a cepa foi incubada em meio PDA a 28 °C por 24 horas. O DNA da levedura foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Stearling (2003) e quantificado em um espectrofotômetro modelo NanoDrop, ND-1000 (NanoDrop Technologies).

O domínio D1/D2 DO rDNA 26S, que forneceu uma identificação similar quando comparado com a reassociação de DNA, é uma metodologia fácil e rápida para leveduras (Kurtzman, 2006). Utilizando ‘primers’ NL1 e NL4 (Kurtzman e Robnett, 1998 e Fell et al., 2000), essa região foi amplificada em um volume de 25 µL contendo: 2,0 µL de DNA; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 0,2mM de cada ‘primer’ e 0,2 µl de Platinum® Taq Polymerase 5 U/µl (Invitrogen). As reações foram realizadas utilizando um termociclo, modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguidos por 33 ciclos de 94°C por 30 s, 52°C por 45 s e 72°C por 1 min; e uma extensão final de 72°C por 10 min. A visualização do DNA amplificado foi realizada por eletroforese em 1.5% de agarose em tampão 0,5 X TSB corante com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA), utilizando como padrão molecular 2 µl de Low Mass 47 DNA Ladder (Invitrogen Technology). O produto foi purificado com o kit GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante e sequenciado em um sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Para a construção da sequência, os programas Phred/Phrap (Ewing et al., 1998) e Consed (Gordon et al., 1998) foram utilizados. Essa sequência foi comparada com os dados do *GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e sequências de referência

ANEXO II

Hidrolisado de levedura

O hidrolisado de levedura foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Vargas (2004). Foram dissolvidos 120 g de fermento biológico em 171 mL de H₂O (70 % m/v), gotejando H₂SO₄ até atingir pH 2,0. A mistura foi incubada por 2 horas entre 70 e 80 °C e posteriormente resfriada e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado.

ANEXO III

Solução de azocaseína 0,5%

A solução de azocaseína foi preparada de acordo com a metodologia descrita por Vargas (2004). Foi pesada 1 g de azocaseína e adicionados 20 mL de água destilada, acrescentando solução de hidróxido de sódio 40% até chegar em pH 12,0. Foi adicionado ácido acético até atingir pH 5,0, completando-se o volume com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0.

ANEXO IV

Reagente de Bradford

O reagente de Bradford foi preparado de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976). Para o preparo do reagente, 100 mg de Laomassi Brilhante Blue foram dissolvidos em 50 mL de etanol e transferidos para um balão volumétrico de 1 L. Foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução resultante foi diluída até o volume final de 1 L. A solução foi filtrada e transferida para um frasco âmbar identificado.

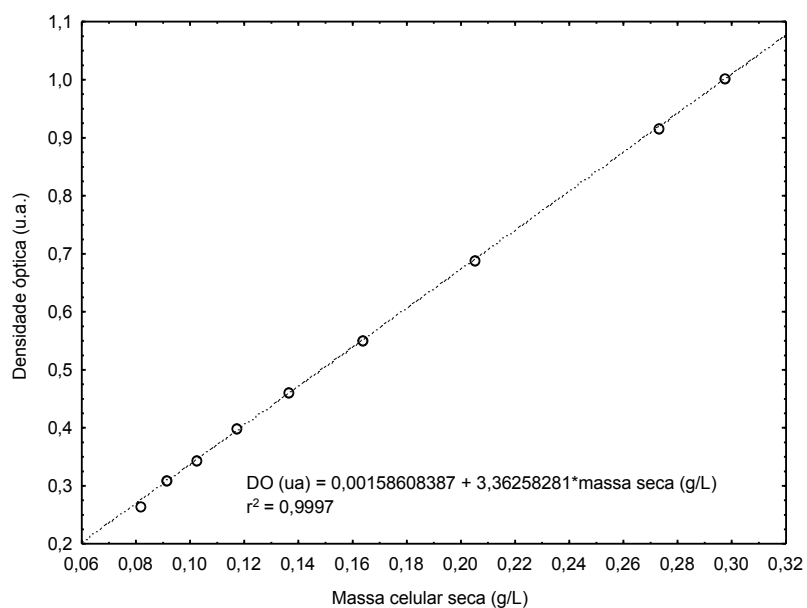
Uma curva padrão de albumina foi preparada conforme a Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Curva padrão de albumina para medida de proteína.

Tubo	Reag. Bradford (mL)	Vol. tampão pH 6,5 (μL)	Vol. solução padrão albumina (mL)	Proteína (mg)
0	3	100	0	0,00
1	3	80	20	0,02
2	3	70	30	0,03
3	3	60	40	0,04
4	3	40	60	0,06
5	3	30	70	0,07

ANEXO V**Curva de calibração para a medida de crescimento celular**

A Figura 6.2 apresenta a curva de calibração obtida para a densidade óptica (u.a.) em função da concentração celular em termos de massa celular seca (g/L).

**Figura 6.2.** Curva de calibração para a medida de crescimento celular.