



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Carin Caputo

**Avaliação da composição do meio de cultura para
produção de lipase por *Candida rugosa***

EQ/UFRJ
Rio de Janeiro
2012

Carin Caputo

**Avaliação da composição do meio de cultura para
produção de lipase por *Candida rugosa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores:

Profa. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc.

EQ/UFRJ
Rio de Janeiro
2012

C255a Caputo, Carin.

Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Candida rugosa* / Carin Caputo. Rio de Janeiro, 2012.
93 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadoras: Profa. D.Sc. Andréa Medeiros Salgado. Prof. D. Sc. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa.

1. Lipase. 2. *Candida rugosa*. 3. Meio de cultura. I. Salgado, Andrea Medeiros (Orient.). II. Pessoa, Fernando Luiz Pellegrini (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 660.634

Avaliação da composição do meio de cultura para a produção de lipase por *Candida rugosa*

Carin Caputo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada por



Prof. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc. – EQ/UFRJ
(orientadora – presidente da banca)



Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc. – EQ/UFRJ
(co-orientador)



Mônica Caraméz Triches Damaso, D.Sc. – EMBRAPA



Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc. - EQ/UFRJ



Sonia Couri, D.Sc. - IFRJ

Dedico este trabalho ao meu marido Daniel, meu primeiro e eterno amor. Aos meus pais Vládís e Edilza, minha tia Jeane e aos meus irmãos Igor, Marcos, Alexandre, Roger e as minhas sobrinhas Alana e Giovanna. Amo vocês!

"Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar."

Friedrich Nietzsche

RESUMO

CAPUTO, Carin. **Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Candida rugosa***. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

As enzimas que têm um importante papel na biotecnologia e tem sido grande foco de estudos atualmente, são as lipases, pois podem catalisar reações como hidrólise, transesterificação e esterificação, sendo o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. O alto custo de sua produção ainda é considerado uma barreira na utilização desta enzima em escala industrial. O objetivo do trabalho foi avaliar a composição do meio de cultura para a produção de lipase por *Candida rugosa*. A composição do meio de cultura foi baseada em uma série de artigos científicos obtidos após uma ampla revisão bibliográfica, sendo os artigos selecionados publicados entre os anos de 1996 e 2010. Os componentes utilizados no meio de cultura foram: Azeite, Tween 80, Sulfato de amônio, Sulfato de magnésio, Fosfato de potássio monobásico, Cloreto de Cálcio, solução de Cloreto Férrico e solução de vitaminas (Inositol e Cloridrato de Tiamina), sendo estes compostos utilizados como variáveis independentes em um planejamento fatorial fracionário tendo como variável de resposta a atividade lipásica. A detecção da atividade enzimática foi realizada pelo método titulométrico sendo a maior atividade obtida de 12,96 U/mL. Os resultados obtidos com o planejamento demonstraram a importância dos fatores principais na produção da enzima. O Tween 80 foi o fator que apresentou a maior importância dentre aqueles que apresentaram efeito positivo. Dados da literatura apresentam sua importância em diversos aspectos na produção da enzima, podendo ser utilizado como agente emulsificante, fonte de

carbono, além de apresentar outros efeitos como atuar na permeabilidade celular. O azeite teve efeito negativo na produção enzimática sugerindo que o Tween 80 foi utilizado preferencialmente como fonte de carbono e não com a finalidade inicial que seria tornar o azeite mais disponível a levedura. Outra possível explicação para o seu efeito negativo seria a inibição por substrato corroborando com dados da literatura. A solução de vitaminas apresentou efeito negativo, pois o aumento da concentração de vitaminas nos meios não foi bom para a produção da enzima, sugerindo que devem ser utilizadas em baixas concentrações. O sulfato de amônio apresentou efeito positivo na variável de resposta, o que confirmou a importância da fonte de nitrogênio na produção da enzima. O sulfato de magnésio e o cloreto férrico apresentaram efeito positivo na produção de lipase, corroborando com dados da literatura que apontam a importância de íons Mg^{+2} e Fe^{+2} na produção da enzima. O Fosfato de potássio e o Cloreto de cálcio foram compostos que não apresentaram significância estatística, sugerindo que não tiveram influência na produção da lipase nas concentrações utilizadas, porém como fatores de interação apresentaram significância estatística são fatores que não podem ser excluídos. Estes fatores podem ser utilizados em concentrações fixas em um planejamento futuro. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que os componentes que apresentaram a maior importância na produção de lipase por *C. rugosa* foram o Tween 80; $(NH_4)_2SO_4$; $FeCl_3$ e $MgSO_4$ apresentados em ordem decrescente de importância.

Palavras-chave: Lipase, *Candida rugosa*, Meio de cultura.

ABSTRACT

CAPUTO, Carin. **Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Candida rugosa***. Rio de Janeiro, 2012. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

The enzymes that play an important role in biotechnology and have been a major focus of ongoing studies are lipases, because they can catalyze reactions such as hydrolysis, transesterification and esterification, being the most important group of biocatalysts for biotechnological applications. The high cost of production is considered a barrier in the use of this enzyme on an industrial scale. The objective of this study was to evaluate the composition of culture medium for lipase production by *Candida rugosa*. The composition of the culture medium was based on a series of papers obtained after an extensive literature review, and the selected articles published between 1996 and 2010. The components used in the culture medium were olive oil, Tween 80, ammonium sulphate, magnesium sulphate, monobasic potassium phosphate, calcium chloride, ferric chloride solution and vitamin solution (Inositol and thiamine hydrochloride), these compounds being used as independent variables in a fractional factorial design with lipase activity as variable response. The detection of enzyme activity was performed by titration method and the highest activity obtained was 12.96 U/mL. The results obtained with the design shown the importance of the major factors in the production of the enzyme. Tween 80 was the factor that showed the greatest importance among those with positive effect. Literature data show its importance in various aspects in the production of the enzyme, can be used as an emulsifying agent, carbon source, besides having other effects as acting in cell permeability. The olive oil had a negative effect on enzyme production suggesting that Tween 80 was used preferably as carbon source and not

for the initial purpose as emulsifier. Another possible explanation for the negative effect would be the substrate inhibition corroborating with the literature data. The vitamin solution showed a negative effect since the concentration increasing of vitamins in the media was not good for the enzyme production, suggesting that should be used at low concentrations. Ammonium sulfate had a positive effect on the response variable, which confirmed the importance of the nitrogen source on enzyme production. Magnesium sulfate and ferric chloride showed a positive effect on lipase production, corroborating with literature data that indicate the importance of ions Fe^{+2} and Mg^{+2} in the production of the enzyme. The potassium phosphate and calcium chloride were compounds that not show statistical significance, suggesting that had no influence on the production of lipase in the concentrations used, but as interaction effects are statistically significant, these factors cannot be excluded. These factors can be used at fixed concentrations in future design of experiments. The results obtained in this study indicated that the components that showed the greatest importance in the production of lipase by *C. rugosa* were Tween 80, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 FeCl_3 , presented in descending order of importance.

Keywords: Lipase, *Candida rugosa*, Culture medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Categorias de reações que a lipase pode catalisar.....	23
Figura 02: Curva de crescimento de <i>C. rugosa</i>	61
Figura 03: Diagrama de Pareto.....	64
Figura 04: Curva padrão de peso seco de <i>C. rugosa</i>	66
Figura 05: Curva padrão de determinação de proteína.....	67
Figura 06: Gráfico de crescimento celular e atividade lipásica por ensaio. Biomassa em vermelho e atividade lipásica em azul.....	76
Figura 07: Gráfico de crescimento e concentração de proteína por ensaio. Biomassa em vermelho e concentração de proteína em verde.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Nomenclatura e classificação das enzimas.....	20
Tabela 02: Estudos de produção de lipase por microrganismos apresentando os microrganismos à esquerda e a referência à direita.....	26
Tabela 03: Relações dos microrganismos com o oxigênio.....	32
Tabela 04: Principais fontes de carbono testadas para a produção de lipase por <i>C. rugosa</i>	37
Tabela 05: Artigos utilizados para selecionar a composição do meio de cultura	57
Tabela 06: Concentrações utilizadas nos testes preliminares baseadas nos artigos da tabela 05.....	58
Tabela 07: Concentrações em %p/v dos níveis utilizados no planejamento.....	60
Tabela 08: Planejamento fatorial fracionário em termos de variáveis escalonadas	60
Tabela 09: Atividade lipásica por titulação para cada ensaio.....	62
Tabela 10: Análise de variância.....	63
Tabela 11: Estimativa dos efeitos na variável de resposta.....	65
Tabela 12: Quantificação de crescimento celular para todos os ensaios.....	66
Tabela 13: Determinação de proteína por ensaio.....	67
Tabela 14: Atividade da protease para os ensaios selecionados.....	68
Tabela 15: Ensaio com maior atividade lipásica e respectivas concentrações de Tween 80 em %p/v.....	70
Tabela 16: Ensaio sem atividade lipásica e suas respectivas concentrações de azeite em %p/v.....	71
Tabela 17: Volume de vitaminas utilizado nos ensaios com maiores atividades lipásicas.....	72
Tabela 18: Ensaio com maior crescimento celular, volume da solução de vitaminas utilizado e atividade lipásica.....	72
Tabela 19: Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em %p/v nos ensaios onde não foi detectada atividade lipásica.....	73

Tabela 20: Concentração de MgSO_4 em %p/v e volume da solução de FeCl_3 em μL nos ensaios onde não foi detectada atividade lipásica..... 74

Tabela 21: Atividade da protease e atividade da lipase por ensaio..... 75

LISTA DE SIGLAS

ANOVA Análise de Variância

AGPI Ácidos graxos poliinsaturados

BSA albumina de soro bovino

CMC concentração micelar crítica

CV coeficiente de variação

DAG diacilgliceróis

DP desvio padrão

EC Enzyme Commission

F valores da distribuição de Fisher

FES Fermentação em estado sólido

FS Fermentação submersa

GRAS generally regarded as safe

IUB União Internacional de Bioquímica

MAG monoacilgliceróis

MS médias quadráticas

MYPD “Malte Extract, Yeast Extract, Peptone, Dextrose”

OTSS oxygen transfer strategies (estratégias de transferência de oxigênio)

PEG Polietilenoglicol

SS somas quadráticas

sn1 substituição nucleófila unimolecular

sn2 substituição nucleófila bimolecular

TAG triacilgliceróis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVO.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 Enzimas.....	20
3.1.1 Exoenzimas.....	21
3.1.2 Enzimas lipolíticas.....	22
4 LIPASES.....	22
4.1 Mecanismo de ação catalítica.....	22
4.2 Fontes de obtenção das lipases.....	25
4.3 Microrganismos produtores de lipase.....	25
4.3.1 <i>Candida rugosa</i>	28
4.4 Processos fermentativos de obtenção de lipase e fatores que influenciam nestes processos.....	28
4.4.1 Temperatura.....	29
4.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)	29
4.4.3 Taxa de aeração.....	32
4.4.4 Agitação.....	33
4.4.5 Nutrientes.....	33
4.4.5.1 Fonte de carbono.....	34
4.4.5.2 Fonte de nitrogênio.....	38
4.4.5.3 Outros nutrientes.....	39
4.5 Composição de meios de cultura para obtenção microbiana de lipases.....	40
4.6 Aplicações das lipases.....	44
4.6.1 Tratamento de efluentes.....	44

4.6.2 Indústria oleoquímica.....	44
4.6.3 Resolução cinética de enantiômeros.....	45
4.6.4 Indústria de papel e celulose.....	45
4.6.5 Indústria de alimentos.....	45
4.6.6 Indústria têxtil.....	46
4.6.7 Indústria de detergentes.....	47
4.6.8 Indústria de cosméticos.....	47
4.6.9 Biorremediação.....	47
4.6.10 Biossensores.....	48
4.6.11 Síntese orgânica.....	48
4.6.12 Biodiesel.....	49
5 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS.....	50
5.1 Planejamento experimental.....	50
5.2 Estatística descritiva.....	51
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
6.1 Materiais.....	52
6.1.1 Microrganismo e meios de cultivo de reidratação e conservação.....	52
6.2 Métodos.....	52
6.2.1 Construção da Curva Padrão de peso seco.....	52
6.2.2 Quantificação do crescimento celular.....	53
6.2.3 Preparo do pré-inoculo.....	53
6.2.4 Soluções de vitaminas e de Cloreto férrico.....	54
6.2.5 Determinação da atividade lipásica.....	54
6.2.6 Determinação da atividade da protease.....	55
6.2.7 Determinação de proteína e Construção da curva padrão.....	56

6.2.8 Seleção da composição do meio de cultura.....	57
6.2.9 Testes para definir melhores condições para produção da enzima.....	58
6.2.10 Condições de cultivo.....	59
6.2.11 Planejamento experimental.....	59
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
7.1 Resultados	61
7.1.2 Curva de crescimento de <i>Candida rugosa</i>	61
7.1.3 Atividade lipásica.....	61
7.1.4 Análise de variância e Estimativa dos efeitos dos fatores.....	62
7.1.5 Quantificação de crescimento celular.....	65
7.1.6 Determinação de proteína.....	67
7.1.7 Determinação da atividade da protease.....	68
7.2 Discussão.....	69
8 CONCLUSÃO.....	79
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
APÊNDICE.....	92

1 INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em biotransformações de compostos orgânicos é conhecida há mais de 100 anos (FABER, 2004), porém apenas nas últimas décadas o verdadeiro potencial destes biocatalisadores em meios heterogêneos tem sido intensivamente investigado.

Enzimas são proteínas, com exceção de um grupo de moléculas de RNA que apresentam atividade catalítica, que catalisam reações biológicas sendo responsáveis por praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular. Estão presentes em todos os seres vivos e sua atividade catalítica depende da sua conformação estrutural. As enzimas são responsáveis pela diminuição da energia de ativação necessária para converter o substrato em produto, aumentando assim a velocidade de reação. Cerca de 4.000 enzimas são conhecidas atualmente, dentre estas, aproximadamente 200 tem uso comercial (SHARMA *et al.*, 2001).

Atualmente, com os avanços da tecnologia, conhecemos uma gama ainda maior de enzimas e suas diversas aplicações em bioprocessos tendo grande importância em diversas áreas do conhecimento. Os avanços tecnológicos também levaram a um maior conhecimento de processos biológicos catalisados por enzimas, o que as tornaram produtos de grande interesse.

A literatura apresenta uma série de estudos sobre aplicações das enzimas. Como alguns exemplos de aplicações podemos citar: diagnósticos médicos, análises químicas, cosméticos, pesquisas científicas, aplicações terapêuticas e industriais (SHARMA *et al.*, 2001), alimentos, na fabricação de detergentes e aromatizantes, na indústria farmacêutica, química fina, agroquímicos, biorremediação, cosméticos e perfumaria (HASAN *et al.*, 2006), síntese orgânica (COSTA e AMORIM, 1999), além de sua possível aplicação para produção de biodiesel (DIZGE e KESKINLER, 2008; RANGANATHAN *et al.*, 2008; TAMALAMPUDI *et al.* 2008; TAN *et al.* 2010) e a utilização em métodos analíticos (PAULIUKAITE *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2003; SETZU *et al.*, 2007).

Os benefícios da utilização de enzimas na indústria, são as suas condições brandas de reação e a redução de rejeitos (HASAN *et al.*, 2006) possibilitando a utilização de tecnologias mais limpas.

As enzimas que têm um importante papel na biotecnologia e tem sido grande foco de estudos atualmente, são as lipases, pois são extremamente versáteis devido ao grande número de reações que podem catalisar (DALMAU *et al.*, 2000), como hidrólise, transesterificação e esterificação (VAKHLU e KOUR, 2006).

As lipases fazem parte da classe das hidrolases que são primariamente responsáveis pela hidrólise de acilgliceróis. São enzimas essenciais para a bioconversão de lipídeos na natureza (VAKHLU e KOUR, 2006) e apresentam grande importância no setor industrial sendo responsáveis por cerca de 40% das biotransformações reportadas na literatura (FABER, 2004).

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes como tecidos animais, tecidos vegetais e a partir de microrganismos, sendo que atualmente as lipases microbianas têm recebido mais atenção, devido à maior estabilidade, do que as obtidas de outras fontes. Além disso, as enzimas microbianas apresentam mais vantagens do que enzimas derivadas de animais e plantas, dada a grande variedade de atividades catalíticas que podem realizar, a possibilidade de altos rendimentos nos processos, possibilidade de manipulação genética dos microrganismos produtores, suplementos regulares devido à ausência de flutuações sazonais e rápido crescimento (HASAN *et al.* 2006).

Muitos microrganismos produtores de lipases têm recebido grande atenção como catalisadores industriais, pois podem ser facilmente recuperados do meio fermentativo e não requerem cofatores ou estabilizadores (LOTTI *et al.*, 1998).

O potencial de aplicações das lipases em biotransformações - em particular as lipases de *Candida rugosa* – atualmente está bem estabelecido e bastante documentado (LINKO *et al.*, 1998; MENDES *et al.*, 2005; MITA *et al.*, 2010; SCHMID e VERGER, 1998). Esta levedura está entre os microrganismos mais estudados por biotecnologistas devido à alta capacidade de produzir lipases (TAKAÇ *et al.*, 2010).

A escolha das condições de cultivo e principalmente a composição do meio de cultura são fatores de extrema importância na produção de lipase por microrganismos, podendo resultar na obtenção de diferentes isoenzimas (enzimas codificadas por genes diferentes capazes de catalisar a mesma reação) (DALMAU *et al.*, 2000). Outro fator importante é o alto custo da produção da lipase, que ainda é considerada uma barreira na utilização desta enzima em escala industrial (DIZGE e KESKINLER, 2008; RANGANATHAN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2010). Nesse contexto torna-se necessário o estudo de diferentes suplementos e substratos na formulação

da melhor composição do meio de cultura para a produção de lipase contribuindo no sentido de encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos, utilizando substratos e condições operacionais que venham possibilitar a redução dos custos do processo de produção em escala industrial.

A produção de Biodiesel é um bom exemplo de um processo considerado mais vantajoso utilizando a rota enzimática por ser considerado mais limpo, pois diminui a quantidade de efluentes nocivos ao meio ambiente, além de produzir produtos com maior grau de pureza (RANGANATHAN *et al.*, 2008). Assim, a redução dos custos no processo de produção de lipases tem grande importância visando disponibilizar a enzima para ser empregada em escala industrial na produção de biodiesel a fim de tornar a catálise enzimática um método competitivo e viável economicamente.

2 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho consiste na avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *Candida rugosa*.

A fim de alcançar o objetivo principal do presente estudo, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

1. Realização de uma pesquisa na literatura para se obter dados relacionados aos estudos de produção de lipase por *C. rugosa* em relação aos principais componentes utilizados na formulação do meio de cultura;
2. Avaliar a importância dos principais componentes do meio de cultura, utilizando planejamento estatístico, a fim de se obter resultados relacionados aos efeitos de cada componente na produção da enzima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e são muito eficientes do ponto de vista energético, pois operam a temperaturas e pressões moderadas, além de atuarem também em uma faixa relativamente ampla de valores de pH. Cada enzima tem um caráter específico, pois atuam em um determinado substrato convertendo-o em um determinado produto (CABRAL *et al.*, 2003).

Podemos admitir que, em dadas condições, uma molécula de enzima possui uma atividade característica. A determinação da atividade é um aspecto essencial na caracterização de um sistema de reação enzimática. A atividade enzimática depende de uma variedade complexa de fatores como: (1) a natureza do substrato; (2) pode requerer a presença de co-fatores; (3) a natureza do solvente; (4) o pH do meio e (5) temperatura (CABRAL *et al.*, 2003).

As enzimas são classificadas em seis classes de acordo com a reação catalisada segundo Enzyme Commission (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) (tabela 01). Cada enzima apresenta um código composto de quatro elementos precedido das letras EC (Enzyme Commission).

Tabela 01: Nomenclatura e classificação das enzimas.

1 ^o dígito	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Reação de oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de 1 átomo ou grupo entre moléculas
3	Hidrolases	Reação de hidrólise
4	Liasas	Remoção de um grupo de uma molécula (sem ser por hidrólise)
5	Isomerasas	Reações de isomerização
6	Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de 1 molécula de ATP

O primeiro dígito indica a classe a qual a enzima pertence (Tabela 01), os dígitos seguintes são referentes à subclasse, à sub-subclasse e o ordenamento da enzima em sua sub-subclasse. A subclasse e a sub-subclasse estão relacionadas aos grupos químicos envolvidos na reação. Por exemplo, a subclasse 3.1 indica a atuação em ligações de ésteres, a sub-subclasse 3.1.1 indica que atuam sobre ligações de éster carboxílico (CABRAL *et al.*, 2003).

3.1.1 Exoenzimas

A membrana citoplasmática apresenta permeabilidade seletiva, atuando de maneira a selecionar as substâncias que devem entrar e sair da célula. Esta característica é fundamental para manter o equilíbrio no interior da célula independente das condições do meio extracelular permitindo a manutenção do metabolismo normal. A seletividade impede a entrada de macromoléculas como lipídeos e proteínas no interior da célula, logo para que possam ser utilizados devem ser transformados em compostos menores.

As exoenzimas têm um papel muito importante na nutrição dos microrganismos e em sua sobrevivência. Um bom exemplo disso é a biodegradação da madeira (celulose) em celobiose e, finalmente, a glicose que é utilizada como substrato (SAND, 1997). Além disso, também são responsáveis pela hidrólise de substâncias tóxicas. O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos é através da produção de exoenzimas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Alguns exemplos de exoenzimas produzidas por *Candida albicans* associadas à patogenicidade são a fosfolipase, que degrada fosfolipídios da membrana das células; a proteinase, que pode degradar anticorpos; e a hialuronidase, que degrada o ácido hialurônico presente entre as células (MENEZES *et al.*, 2004).

As lipases são um exemplo de exoenzimas associadas ao metabolismo dos lipídios. Os lipídios são insolúveis em água e precisam ser hidrolisados extracelularmente em seus componentes mais polares para facilitar sua absorção quando são utilizados como nutrientes para a célula, portanto a maioria das lipases são excretadas extracelularmente (SAXENA *et al.*, 1999).

Esta característica torna os microrganismos capazes de produzir exoenzimas muito atrativos para a utilização em bioprocessos na indústria já que a produção de preparados de enzimas intracelulares é mais complexa, pois envolve as etapas de ruptura celular e posterior separação dos constituintes intracelulares (COELHO *et al.*, 2008).

3.1.2 Enzimas lipolíticas

As lipases e esterases são exemplos de enzimas lipolíticas que estão associadas ao metabolismo e hidrólise de lipídeos. Segundo CARVALHO *et al.* 2003 as lipases verdadeiras (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres e apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. Esta característica as diferencia das esterases que agem em ésteres solúveis em água e outras enzimas lipolíticas que hidrolizam outros lipídeos como as acilidrolases, colesterolesterase, tioesterases (BROCKMAN *et al.* 1988 *apud* CARVALHO *et al.* 2003).

4 LIPASES

As lipases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (HASAN *et al.*, 2006; JAEGER e EGGERT, 2002), sendo as provenientes de microrganismos mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo. Elas são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que lipases de outras fontes (CARVALHO *et al.*, 2003). Além disso, podemos citar ainda outros pontos positivos como: lipases são enzimas estáveis em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem uma especificidade ampla de substratos e apresentam uma enantioseletividade alta (JAEGER e REETZ, 1998).

4.1 Mecanismos de ação catalítica das lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas responsáveis pela hidrólise de acilgliceróis, além de uma série de ésteres de baixo e alto peso molecular como os tioésteres, amidas, ésteres polióis/poliácidos, entre outros, que também são aceitos como substratos por este grupo único de enzimas (GANDHI, 1997). Podem ser empregadas em uma grande variedade de reações devido à especificidade ampla de substratos em que atuam, além de ser capazes de catalisar a reação inversa da síntese (Figura 01) com a mesma eficiência (GANDHI, 1997).

As duas principais categorias de reações que a lipase pode catalisar de acordo com GANDHI (1997) são: (1) hidrólise que refere-se à quebra de um éster de ácido graxo em seu ácido constituinte e glicerol/álcool na presença de água; (2) síntese que engloba as reações de esterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise, sendo que as três últimas reações são agrupadas em um único termo – transesterificação (Figura 01).

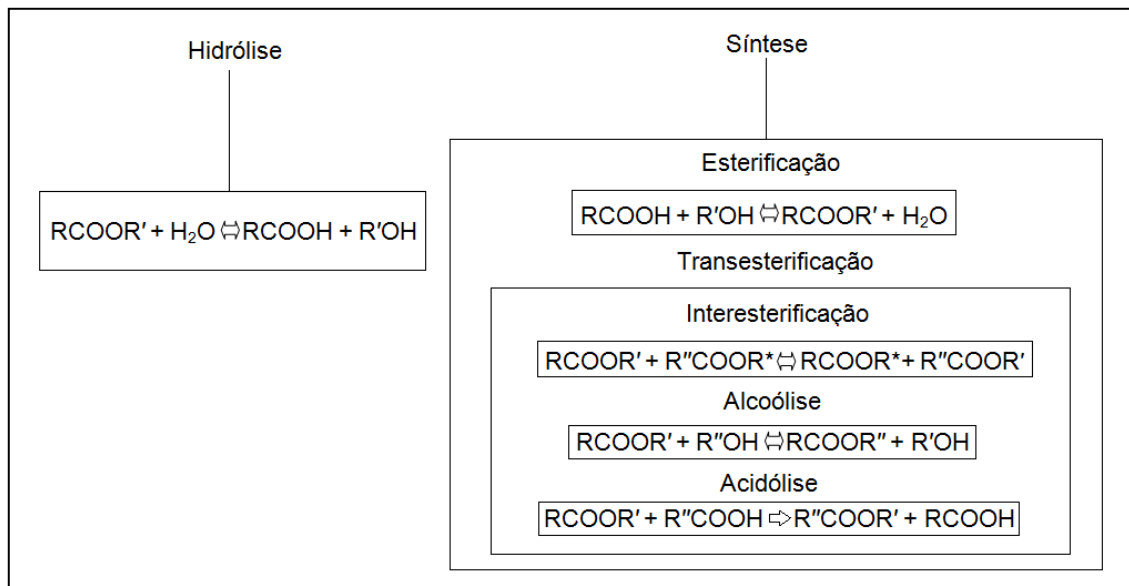


Figura 01: Categorias de reações que a lipase pode catalisar.

O termo transesterificação se refere à troca de grupos entre um éster e um ácido (acidólise), entre um éster e um álcool (alcoólise) ou entre dois ésteres (interesterificação) (BARROS *et al.*, 2010). Enquanto a esterificação produz água e éster, a transesterificação como a alcoólise, acidólise e interesterificação produz álcool, ácido ou éster ao invés de água (GANDHI, 1997). Sua habilidade em catalisar estas reações com grande eficiência, estabilidade e versatilidade torna estas enzimas altamente atrativas do ponto de vista comercial (BARROS *et al.*, 2010).

A transesterificação é realizada industrialmente por aquecimento de uma mistura de um éster anidro e outra espécie reagente a temperaturas relativamente elevadas. No entanto, a aplicação de lipases para a modificação de óleos e gorduras por transesterificação oferece vantagens como condições brandas, redução de reações indesejadas e especificidade (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

As lipases são classificadas em quatro grupos em função de sua especificidade com relação ao substrato segundo VILLENEUVE (2003). As categorias são as seguintes:

a) Substrato específicas: o substrato natural das lipases são ésteres de glicerol. Isto significa que estas enzimas são capazes de catalisar não apenas a hidrólise de TAGs, mas também DAGs e MAGs acilgliceróis além de fosfolípídeos no caso das fosfolipases. Assim, a especificidade ao substrato é definida como a habilidade da lipase de hidrolisar preferencialmente um tipo de éster de glicerol.

b) Regiosseletividade ou especificidade posicional: a regiosseletividade é a habilidade de algumas lipase de distinguir as duas posições externas da cadeia principal do triacilglicerol (éster primário) e a posição interna (éster secundário).

c) Ácido graxo específica ou tipo-seletiva: as lipases também podem ser específicas em relação a um ácido graxo em particular ou, na maioria das vezes, em relação a um grupo de ácidos graxos. Elas hidrolisam ésteres localizados em qualquer posição do triacilglicerol.

d) Esterioespecífica: esta especificidade descreve a habilidade de algumas lipases de distinguir entre as posições sn1 e sn2.

Além da diferença citada anteriormente entre as lipases e outras hidrolases, como as esterases, podemos citar ainda uma importante diferença no que diz respeito as interações físico-químicas com seus substratos. Segundo COSTA e AMORIM (1999), as esterases apresentam cinética, em geral, de acordo com o modelo de Michaelis-Menten, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato aumenta, até um limite por saturação. Já as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase, pois a lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima, chamada de concentração micelar crítica (CMC), porém somente em concentração acima desta. Este mecanismo é chamado de ativação interfacial e está associado a mudanças conformacionais na enzima. Segundo JAEGER e REETZ (1998) as reações lipolíticas que ocorrem na interface água/óleo apresentam uma cinética que não pode ser descrita pela equação de Michaelis-

Menten, já que ela é válida apenas se a reação catalítica acontece em uma fase homogênea.

Este fenômeno de ativação interfacial está associado à presença de um grupamento anfifílico peptídico cobrindo o sítio ativo (como uma tampa). Quando ocorre o contato com a interface óleo/água a enzima sofre um rearranjo conformacional abrindo a “tampa” de forma que o sítio ativo se torna acessível ao substrato (VERGER, 1997).

4.2 Fontes de obtenção das lipases

As lipases podem ser de origem animal, vegetal e microbiana. As fontes animais mais importantes são pâncreas de bovinos, ovelhas (VAKHLU e KOUR, 2006) e porcos (VAKHLU e KOUR, 2006; WITHERS-MARTINEZ *et al.*, 1996). As lipases obtidas a partir de pâncreas de animais apresentam desvantagens no que diz respeito à aplicação na indústria de alimentos, pois contêm substâncias que produzem sabores desagradáveis, além disso, podem conter vírus residuais e hormônios (VAKHLU e KOUR, 2006). Já como fonte vegetal podemos citar lipases extraídas de sementes (BARROS *et al.*, 2010), látex, folhas e caules (PAQUES e MACEDO, 2006).

4.3 Microrganismos produtores de lipases

As lipases são produzidas por uma grande variedade de microrganismos como bactérias, fungos (filamentosos e leveduras) e actinomicetos, sendo o maior número de espécies produtoras representadas pelas bactérias (SHARMA *et al.*, 2001). Porém, os fungos são uma das fontes mais importantes de obtenção de lipases para aplicações industriais, pois suas enzimas normalmente são excretadas no meio extracelular o que facilita sua extração do meio de fermentação (MAIA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2005).

As leveduras representam o grupo mais utilizado na produção. Uma vantagem da utilização de leveduras é que muitas delas apresentam “status” GRAS (*generally regarded as safe* segundo a U.S. Food and Drug Administration), ou seja, não apresentam riscos de toxicidade patogenicidade, podendo ser aplicadas na obtenção de lipases utilizadas nas mais variadas áreas como alimentos, área clínica,

entre outras (WANG *et al.*, 2007). Entre as leveduras terrestres podemos citar a utilização de *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Torulospora globosa*, *Trichosporon asteroides*, algumas espécies do gênero *Pichia* spp. além de diversas espécies dos gêneros *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. (SHARMA *et al.*, 2001).

A literatura apresenta uma série de estudos sobre produção de lipases por microrganismos (tabela 02), que são listados a seguir.

Tabela 02: Estudos de produção de lipase por microrganismos apresentando os microrganismos à esquerda e a referência à direita.

Microrganismo	Referência
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	LI <i>et al.</i> (2001); LIU <i>et al.</i> (2004)
<i>Aspergillus niger</i>	KAMINI <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus</i> sp.	JANSSEN <i>et al.</i> (1994); SANGEETHA <i>et al.</i> (2010); BECKER <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida rugosa</i>	OTA <i>et al.</i> (1968); VALERO <i>et al.</i> (1991); RAO <i>et al.</i> (1993); BENJAMIN e PANDEY (1995); BOARETO, <i>et al.</i> (2007); GORDILLO <i>et al.</i> (1998a,b); SÁNCHEZ <i>et al.</i> (1999); DALMAU <i>et al.</i> (2000); DE LA CASA <i>et al.</i> (2002); MONTESINOS <i>et al.</i> (1997); MONTESINOS <i>et al.</i> (2003); WEI <i>et al.</i> (2004); RAJENDRAN e THANGAVELU, 2007; TAKAÇ <i>et al.</i> (2010)
<i>Fusarium solani</i>	MAIA <i>et al.</i> (1999)
<i>Geotrichum</i> sp.	BURKERT <i>et al.</i> (2004); ZAREVÚCKA <i>et al.</i> (2005)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	SILVA <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium</i> sp.	CASTILHO <i>et al.</i> (2000); LI <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	SHARON <i>et al.</i> (1998); GAUR <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudomonas gessardi</i>	RAMANI <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	YANG <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	DIAZ <i>et al.</i> , (2006)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CORZO e REVAH (1999); ALI <i>et al.</i> (2010)

Abaixo serão descritos apenas alguns estudos.

MAIA *et al.* (1999) realizaram um estudo a fim de testar a produção de lipase extracelular por um fungo fitopatogênico, *Fusarium solani*. O meio basal foi composto de: 0,05 % p/v de MgSO₄.7H₂O; 0,1 % p/v de KH₂PO₄; 0,3 % p/v de NaNO₃; 3 % p/v de peptona. O meio foi suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, azeite de oliva e peptona). O pré-inóculo foi composto de 10⁵ esporos incubados em 10 mL de meio basal a 120 rpm por dois dias a 28°C. Os

valores de pH foram variados de 5,4 a 7,8 e de 8 a 8,8. Durante a produção foi observado que a adição de glicose (1% p/v) inibiu o efeito indutivo do azeite de oliva. A atividade lipásica ótima foi alcançada em pH 8,6 e temperatura de 30°C. Os autores obtiveram uma atividade de 10.500 U/L depois de 72 horas de cultivo a 25 °C e agitação de 120 rpm em meio contendo 3% p/v de peptona e 0,5% v/v de azeite de oliva.

SILVA *et al.* 2005 realizaram um estudo de produção de lipase por um fungo entomopatogênico (*Metarhizium anisopliae*) com o objetivo de analisar diferentes condições de crescimento e extração da enzima para aumentar a produção de lipase por este fungo. O meio basal foi composto de 0,2% de glicose % p/v; 0,5% de peptona % p/v; 0,01% % p/v de MgSO₄ e 0,1% p/v de K₂HPO₄, e 2% v/v de azeite de oliva, com agitação de 150 rpm. Foram avaliadas as temperaturas de 28, 32 e 36 °C, e os valores de pH de 5,7; 6,3; 7,0 e 8,0. Os autores obtiveram uma atividade específica de 108,38 U/mg com azeite de oliva como fonte de carbono, sendo o melhor pH de 5,7 e temperatura de 32°C.

YANG *et al.* 2005 realizaram um estudo para produção de lipase em batelada com o micélio imobilizado de *Rhizopus arrhizus*. A maior atividade lipásica obtida foi de 315 U/mL a uma temperatura de 26,5°C; 130 rpm e após 96h de cultivo com um meio composto de: 4,0 % p/v de farelo de soja; 1,0 % v/v óleo de amendoim; 0,1 % p/v de MgSO₄; 0,5 % p/v de K₂HPO₄; 0,2 % p/v de (NH₄)₂SO₄.

VALERO *et al.* (1991) realizaram um estudo de produção de lipase por *C. rugosa* utilizando glicose e azeite como fontes de carbono. Os autores observaram que a produção da enzima foi associada ao crescimento e a maior atividade obtida foi de 5,2 U/mL utilizando azeite como fonte de carbono com tempo de fermentação menor que 65hs.

RAO *et al.* (1993) realizaram um estudo de produção de lipase por *C. rugosa* por fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz como substrato sólido. Os autores observaram que a melhor composição do meio de cultura foi de 0,5% de ureia, 1,5% de maltose e 7,5% de óleo de arroz que apresentou uma atividade de 37 U/g.

FADILUGLU e ERKMEN (2002), realizaram um estudo sobre os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *C. rugosa*. A maior produção de enzima foi obtida no meio contendo extrato de levedura, proteose-

peptona na presença de azeite (5,58 U/mL). Na ausência de azeite, a maior atividade obtida foi no meio composto por proteose-peptona e glicose (2,21 U/mL).

4.3.1 *Candida rugosa*

A levedura *C. rugosa* é unicelular, não-esporogênica e não patogênica (AKOH *et al.*, 2004) e está entre os microrganismos mais estudados por biotecnologistas devido à alta capacidade de produzir lipases (TAKAÇ *et al.*, 2010), e é o microrganismo mais utilizado para produção de lipases (VAKHLU e KOUR, 2006). Esta levedura sintetiza uma variedade de isoenzimas que diferem nas propriedades biocatalíticas (TAKAÇ *et al.*, 2010). Sete genes de *C. rugosa* produtores de lipases já foram descritos (LIP 1 – LIP 7) sendo que as isoformas codificadas por estes genes apresentam diferentes eficiências catalíticas, especificidades por substrato e estabilidade térmica (AKOH *et al.*, 2004). As lipases de *C. rugosa* utilizadas atualmente em biotransformações consistem em uma mistura de isoenzimas (LOTTI *et al.* 1998). As lipases comerciais de *C. rugosa* apresentam notáveis variações na eficiência catalítica, especificidade de substrato e enantiosseletividade (AKOH *et al.*, 2004).

A lipase de *C. rugosa* é capaz de acomodar ésteres relativamente volumosos em seu sítio ativo, por isso é a lipase escolhida para a hidrólise seletiva de ésteres de alcoóis secundários cíclicos (FABER, 2004).

4.4 Processos fermentativos de obtenção de lipases e fatores que influenciam nestes processos

A produção de metabólitos, como as enzimas, por microrganismos é realizada por meio de dois tipos básicos de processos de fermentação: Fermentação em estado sólido (FES) e Fermentação submersa (FS).

A FES tem sido aplicada na indústria de alimentos há muito tempo. É um processo realizado com microrganismos que crescem em um meio sólido impregnado com nutrientes, com pouca ou nenhuma água livre (WANG e YANG, 2007). Podem ser realizados com biomateriais abundantes de baixo custo (amido, celulose, lignina, hemicelulose, quitina, etc.), são relativamente simples e utilizam menos energia do que a FS (WANG e YANG, 2007). No entanto é um processo de

difícil monitoramento e homogeneização, o que dificulta os fenômenos de transferência de massa no sistema.

Apesar do processo de FES para obtenção de enzimas apresentar algumas vantagens, a produção de lipase é realizada principalmente por FS, que utiliza um meio fermentativo líquido onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis.

A FS apresenta vantagens como um melhor controle do processo, facilidade de cultivo em grande escala, pois garante a homogeneidade do meio (COUTO e SANROMÁN, 2006), além de facilitar a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa, podendo ser realizadas por centrifugação ou filtração simples para remover as células. No caso da produção de enzimas extracelulares, o sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos. Podemos citar como uma desvantagem do processo a maior probabilidade de contaminação devido à maior quantidade de água. Quando a enzima é produzida de forma extracelular, obtém-se um extrato diluído, onde se deve inserir uma etapa de concentração (ALONSO, 2001), e purificação quando necessário.

Muitos fatores influenciam no processo de produção de lipases por microrganismos, onde os principais são concentração de oxigênio, temperatura, pH, agitação, aeração, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e presença e concentração de outros nutrientes. Segundo BORZANI *et al.* (2001) a estrutura da enzima e forma do sítio ativo podem ser afetadas por qualquer agente capaz de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica provocando alterações na forma do sítio ativo. Fatores que exercem influências desse tipo na estrutura enzimática contribuem para a diminuição de sua capacidade catalítica podendo ainda levar à inativação da enzima.

A seguir será dada ênfase aos principais fatores que influenciam nos processos de produção de lipase microbiana.

4.4.1 Temperatura

A temperatura é um parâmetro de grande importância no cultivo de microrganismos, pois é um fator que pode afetar o crescimento microbiano, afetando parâmetros como o tempo de adaptação, e as reações enzimáticas.

Segundo DEACON (1997) e GRIFFIN (1994) a maioria dos fungos são mesofílicos. Organismos mesofílicos são aqueles que têm temperatura ótima de

crescimento entre 15 °C a 40 °C (BROCK *et al.*, 1994). Para organismos mesofílicos, temperaturas mais elevadas alteram a fluidez da membrana afetando suas funções fisiológicas (DEACON, 1994), além de provocar desnaturação enzimática devido à alteração da estrutura tridimensional das enzimas. A temperatura que causa desnaturação enzimática geralmente está um pouco acima da temperatura ótima de cultivo (BORZANI *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos presentes na literatura sobre a atuação dos efeitos da temperatura em microrganismos são referentes à atividade enzimática. A produção de enzimas pelos microrganismos apresenta grande importância fisiológica durante o crescimento e reprodução.

KAMINI *et al.* (1998) realizaram um estudo de produção de lipase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de gengibre, onde foram testados os efeitos da temperatura na atividade lipásica. Foram testadas as temperaturas na faixa de 25 a 60°C. Os autores observaram que a atividade ótima da enzima foi obtida a temperatura de 37°C.

TAN *et al.* (2003) observaram que a temperatura do cultivo influencia a produção da lipase. Os autores observaram que o aumento da temperatura provoca uma diminuição na atividade lipásica durante o processo de produção, sendo a temperatura ótima observada de 28°C na qual foi obtida uma atividade de 4.500 U/mL.

DIAZ *et al.* (2006) realizaram um estudo de produção de lipase pelo fungo termotolerante, *Rhizopus homothallicus*, utilizando fermentação em estado sólido e fermentação submersa. Os autores testaram os efeitos da temperatura na atividade da enzima, utilizando uma faixa de temperatura de 15 a 60°C, e a estabilidade térmica incubando a enzima a 50°C e medindo a atividade residual ao longo do tempo por titulação. Os autores observaram que em ambas as estratégias de fermentação, acima da temperatura ótima, a atividade da lipase diminuiu acentuadamente atingindo cerca de 40% da atividade máxima a 55°C na fermentação em estado sólido e 10% em fermentação submersa.

4.4.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH é um parâmetro físico-químico do meio de cultivo que tem grande importância, pois altera a carga das proteínas de membrana afetando a absorção de

nutrientes (DEACON, 1997), além de induzir mudanças morfológicas no microrganismo apresentando influência na secreção e atividade das enzimas.

Os fungos podem alterar o pH do meio por absorção e troca seletiva de íons, e também são capazes de liberar ácidos orgânicos no meio a fim de criar as condições propícias de pH (DEACON, 1997).

Segundo GRIFFIN (1994) o pH extracelular não apresenta nenhuma influência no pH citoplasmático, porém o pH extracelular pode apresentar influência indireta na superfície celular ou em compostos extracelulares. Segundo o mesmo autor a maioria dos fungos crescem bem quando o pH inicial é ajustado na faixa de 4 a 7 apresentando pouco efeito no crescimento dentro desta faixa.

Como citado anteriormente para o caso da temperatura, a maioria dos estudos presentes na literatura sobre a atuação dos efeitos do pH em microrganismos são referentes à atividade enzimática. Este parâmetro é um dos principais utilizados nos estudos de produção de lipase, já que a produção de enzimas é um fator de grande importância no crescimento e reprodução dos microrganismos. Os métodos disponíveis são capazes de medir tanto a atividade da lipase excretada no meio extracelular como a lipase produzida dentro da célula. No caso da lipase presente no interior da célula, se torna necessário o rompimento celular para obtenção do extrato enzimático.

PASTORE *et al.* (2003), realizaram um estudo de produção de lipase por uma nova linhagem fúngica de *Rhizopus* sp. isolada de restos vegetais, e testaram o efeito do pH na atividade da enzima. Para isso utilizaram diferentes soluções tampões com diversas faixas de pH: tampão acetato de sódio: pH= 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,6; tampão fosfato de sódio: pH= 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 e tampão Tris-HCl: pH= 8,0; 8,5 e 9,0. Os autores observaram que a maior atividade enzimática estava presente na faixa de pH entre 6,0 e 6,5.

WANG *et al.* (2007) realizaram um estudo com leveduras de ambiente marinho com o objetivo de detectar quais cepas são potenciais produtoras de lipases. Os efeitos do pH na atividade enzimática foram determinados incubando o sobrenadante das culturas em diferentes pHs, entre 4 e 9. Os autores observaram que o pH ótimo para as leveduras *Candida intermedia*, *Pichia guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Lodderomyces elongisporus* foi 7,5; o pH ótimo para *Candida quercitrusa* e *Candida rugosa* foi 7, e que o pH ótimo para *Aureobasidium pullulans*, *Yarrowia lipolytica* e *Rhodotorula mucilaginosa* foi de 8,5; 8,0 e 6,0; respectivamente.

4.4.3 Taxa de aeração

A condição de transferência de oxigênio está entre os fatores cruciais que afetam a obtenção de produtos em processos de fermentação. A falta de oxigênio no meio fermentativo pode restringir ou aumentar a formação de um metabólito por meio da alteração de vias metabólicas. Em alguns casos é necessário que as taxas de transferência de oxigênio sejam controladas para regular a taxa de consumo de oxigênio pelas células.

Segundo MADIGAN *et al.*, 2010 os microrganismos podem ser classificados como: Aeróbios obrigatórios, Aeróbios facultativos, Microaerófilos, Aeróbios aerotolerantes e Anaeróbios obrigatórios (tabela 03).

Tabela 03: Relações dos microrganismos com o oxigênio.

	Grupo	Relação com O ₂	Tipo de metabolismo
Aeróbios	Obrigatórios	Exigido	Respiração aeróbia
	Facultativos	Não exigido, mas com melhor crescimento em O ₂	Respiração aeróbia, Anaeróbia e Fermentação
	Microaerófilos	Exigido, mas em níveis inferiores ao atmosférico	Respiração aeróbia
Anaeróbios	Aerotolerantes	Não exigido, sem melhor crescimento em O ₂	Fermentação
	Obrigatórios	Nocivo ou letal	Fermentação ou respiração anaeróbia

TAKAÇ *et al.* (2010) realizaram um estudo propondo diferentes estratégias de transferência de oxigênio (OTSs) na produção de lipase e esterase por *C. rugosa*. Foram testadas quatro diferentes estratégias de transferência de oxigênio para investigar o efeito do controle da concentração de oxigênio dissolvido (%saturação) na atividade da lipase e esterase durante a fermentação.

Abaixo são descritas as estratégias utilizadas pelos autores:

OTS I- a fermentação foi conduzida a saturação total de oxigênio por alimentação contínua de oxigênio puro ao meio;

OTS II- iniciou com saturação total de oxigênio com posterior diminuição da concentração de oxigênio dissolvido até 60% de saturação que foi mantida constante por alimentação de oxigênio e outros gases presentes no ar;

OTS III- iniciou com saturação total de oxigênio com uma redução gradual para 80%, 60%, 40% e 30% a cada intervalo de 2 horas sendo mantida em 30% de saturação por alimentação até o final do processo;

OTS IV- a fermentação iniciou com saturação total de oxigênio com posterior diminuição na concentração de oxigênio dissolvido até 30% de saturação que foi mantida por alimentação até o final do processo, sendo esta estratégia considerada a mais eficaz.

O estudo revelou que o oxigênio é um parâmetro decisivo que afeta a atividade, produtividade e rendimento das lipases produzidas pela levedura.

4.4.4 Agitação

A agitação mecânica é um fator importante no processo de produção de lipase, pois está relacionado à difusão do oxigênio no meio, tornando-o disponível ao microrganismo. Este fato está relacionado à baixa solubilidade do oxigênio em meio aquoso, difundindo-se lentamente em meios não agitados (PAPAGIANNI, 2004).

ALONSO *et al.* (2005) realizaram um estudo com o objetivo de melhorar a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* utilizando diferentes velocidades de agitação e taxas de oxigenação. Os autores observaram máxima atividade lipásica (4.600 U/L) no final da fase estacionária de crescimento com uma agitação de 200 rpm e taxa de oxigenação de 1-2 dm³/min (0,8-1,7 vvm) quando a fonte de lipídio havia sido completamente consumida utilizando o método titulométrico, já com o método espectrofotométrico a maior atividade lipásica (6.250 U/L) foi obtida a uma taxa de oxigenação de 3 dm³/min (2,5 vvm). Os autores também observaram que velocidades de agitação muito elevadas resultam em estresse mecânico e/ou oxidativo, enquanto baixas velocidades de agitação parecem limitar os níveis de oxigênio. O aumento na disponibilidade de oxigênio a altas taxas de aeração leva a um consumo mais rápido de lipídios fazendo com que as enzimas sejam excretadas mais rápido no meio de cultura.

4.4.5 Nutrientes

A nutrição microbiana pode ser definida como o mecanismo que fornece às células as ferramentas químicas necessárias à síntese de diversos monômeros

(MADIGAN *et al.*, 2010). Cada organismo apresenta um determinado requerimento nutricional de acordo com sua fisiologia. Alguns nutrientes são necessários em uma quantidade maior pelos microrganismos denominados macronutrientes como, por exemplo, carbono, nitrogênio, hidrogênio, enxofre, magnésio, fósforo e potássio. Estes elementos participam de uma grande quantidade de substâncias produzidas pelos microrganismos que farão parte de uma série de estruturas celulares como membranas, organelas, proteínas, DNA, entre outras, sendo indispensáveis tanto ao metabolismo como ao crescimento celular. Porém, outros nutrientes são requeridos em menor quantidade, muitas vezes apenas traços, denominados micronutrientes (MADIGAN *et al.*, 2010).

Dentre os nutrientes requeridos para muitas funções fisiológicas essenciais à vida estão as vitaminas. Ao contrário de outras classes de nutrientes, as vitaminas não desempenham funções estruturais. São substâncias que apresentam utilizações altamente específicas pelos organismos e por este motivo são requeridas apenas em pequenas quantidades (COMBS, 2008).

4.4.5.1 Fonte de carbono

O carbono é o principal componente celular, por isso é considerado o macronutriente de maior importância no cultivo de microrganismos. Algumas gorduras e óleos naturais são utilizados como fontes de carbono e indutores (HIOL *et al.*, 1999). A fonte de carbono é um dos fatores mais importantes que influenciam a produção de lipase (WEI *et al.*, 2004), sendo essencial na biossíntese enzimática podendo estimular ou inibir sua produção (DALMAU *et al.*, 1998).

Segundo DALMAU *et al.* (2000), trabalhos anteriores presentes na literatura sobre a fisiologia da produção de lipase mostraram que os mecanismos de regulação da biossíntese enzimática variam bastante em diferentes microrganismos. As enzimas, como as lipases, podem ser induzíveis e/ou constitutivas (ALONSO, 2001). Enzimas constitutivas são produzidas independentemente do estado metabólico do microrganismo, são enzimas que fazem parte da maquinaria básica da célula. As enzimas induzíveis são as que têm sua produção estimulada pela presença de algum indutor no meio de cultivo. A literatura apresenta uma série de estudos de produção de lipase que utilizam lipídios, triglicerídeos, ácidos graxos e detergentes como indutores em condições aeróbicas, porém o verdadeiro papel do

indutor não é claramente conhecido (GORDILLO *et al.*, 1998b). Óleos vegetais são muito utilizados como fonte de carbono e indutores para a produção de lipases, e são considerados substratos economicamente viáveis para a produção de lipase em escala industrial (FADILOGLU e ERKMEN, 2002). Carboidratos, especialmente a glicose, apresentam efeito inibidor na produção de lipase (VALERO *et al.*, 1991; DALMAU *et al.*, 2000), apesar de suportarem altas taxas de crescimento (MONTESINOS *et al.*, 2003). DALMAU *et al.* (2000) observaram que a adição de glicose ao meio de cultura contendo ácido oléico reprime a síntese de lipase, sugerindo um mecanismo de repressão catabólica no controle da produção desta enzima. Segundo LOTTI *et al.* (1998) os genes que codificam a síntese das lipases são divididos em dois grupos, aqueles expressos constitutivamente e os induzidos por ácidos graxos, e que a síntese de enzimas são inibidas no nível transcricional pela adição de glicose

Por outro lado, FADILOGLU e ERKMEN (2002) observaram que na ausência de azeite no meio de cultura, a glicose foi considerada a melhor fonte de carbono quando comparada com a lactose. A atividade aumentou de 2,03 U/mL no meio de cultura contendo extrato de levedura e glicose para 2,21 U/mL no meio contendo proteose-peptona e glicose, enquanto que a atividade foi de 1,20 e 0,89 U/mL quando foi utilizada a lactose no lugar da glicose.

Segundo AMARAL (2007) acredita-se que os microrganismos que vivem em meio aquoso na presença de uma fonte de carbono hidrofóbica (que fica dispersa no meio na forma de gotas), tenham desenvolvido mecanismos, ao longo da evolução, para facilitar o acesso a esse substrato. Muitos microrganismos são capazes de produzir substâncias que exibem propriedades surfactantes, ou seja, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, conhecidas como biosurfactantes (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

O Tween 80 é um surfactante que pode ser utilizado como fonte de carbono para produção de lipase (OTA *et al.*, 1968; DALMAU *et al.*, 2000).

LI *et al.* 2001 realizaram um estudo de produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* utilizando Tween 80 como fonte de carbono. Os autores testaram as seguintes concentrações de Tween 80: 0,1%; 0,2%; 0,3% e 0,4% (v/v). Os autores observaram que a melhor concentração de Tween 80 foi de 0,3% (v/v) com a qual foi obtida uma atividade de 25 U/mL, indicando que altas concentrações de Tween 80 podem reprimir a produção de lipase.

BURKERT *et al.* (2004) realizaram um estudo de otimização da produção de lipase extracelular por *Geotrichum* sp. Os autores observaram que o óleo de soja foi considerado a melhor fonte de carbono sendo obtida uma atividade de 20 U/mL quando comparado com o azeite que apresentou uma atividade de 17 U/mL .

DALMAU *et al.* (2000) realizaram um estudo com o objetivo de testar o efeito de diferentes fontes de carbono para produção de lipase por *C. rugosa*. Os autores testaram várias fontes de carbono além da combinação de fontes de carbono (tabela 03). Os autores observaram que não houve atividade lipásica nas culturas que utilizaram a glicose, glicerol e lactato de sódio como únicas fontes de carbono. A fonte de carbono que apresentou a maior atividade lipásica (5,3U/mL) foi o ácido palmítico que é um ácido graxo saturado de cadeia longa. Os autores também observaram que a utilização de mais de uma fonte de carbono no meio não aumentou a produção de lipase.

WEI *et al.* (2004) realizaram um estudo com o objetivo de testar novas fontes de carbono no crescimento celular e na produção de lipase por *C. rugosa*. Foram testados ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos (tabela 04). Os autores observaram que quanto maior a cadeia carbônica do ácido graxo maior a atividade lipásica e maior a produção de proteínas extracelulares, porém apesar do ácido oléico e o ácido esteárico possuírem o mesmo comprimento de cadeia carbônica, a atividade foi de 4,25 U/mL na presença de ácido esteárico, enquanto a atividade na presença de ácido oléico foi de 8,53 U/mL, sugerindo que ácidos graxos insaturados foram mais apropriados como fonte de carbono. Já para os ésteres de ácidos graxos, os autores observaram que o tributirato de glicerol não foi uma boa fonte de carbono para produção de lipase (1,12 U/mL). O glicerol trioleato foi considerado uma boa fonte de carbono apresentando uma atividade lipásica de 14,32 U/mL. Os resultados demonstraram que tanto o tamanho da cadeia carbônica quanto a insaturação da cadeia são fatores importante na escolha da fonte de carbono para produção de lipase.

BENJAMIN e PANDEY (1995) realizaram um estudo de otimização do meio de cultura para produção de lipase por *C. rugosa*. Os autores testaram as concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15% (v/v) de azeite, e observaram que a melhor concentração foi de 10% (v/v) onde foi obtida uma atividade de 8,36 U/mL após 72hs de cultivo o que demonstrou que o aumento da concentração de azeite

até 10%(v/v) induziu a síntese de lipase e sua excreção no meio, porém concentrações acima deste valor não aumentaram o rendimento.

Tabela 04: Principais fontes de carbono testadas para a produção de lipase por *C. rugosa*.

Fonte de carbono		Referência
Ácido acético	Ácidos graxos utilizados como única fonte de carbono	WEI <i>et al.</i> , (2004)
Ácido caprílico		
Ácido dodecanóico		
Ácido mirístico		
Ácido palmítico		
Ácido oléico		
Ácido esteárico		
Ácido oléico	Ésteres utilizados como única fonte de carbono	
Tributirato de glicerol		
Estearato de metila		
Monoestearato de glicerol		
Oleato de etila		
Trioleato de glicerol		
Glicose	Utilizadas como única fonte de carbono	
Galactose		
Manitol		
Glicerol		
Lactato de sódio		
Ácido oléico		
Ácido palmítico		
Trioleina		
Tween 80		
Glicose + Ácido oléico		
Glicose + Ácido palmítico		
Glicose + Ácido esteárico		
Galactose + Ácido oléico		
Galactose + Ácido palmítico		
Galactose + Ácido esteárico		
Manitol + Ácido oléico		
Manitol + Ácido palmítico		
Manitol + Ácido esteárico		
Lactato de sódio + Ácido oléico		
Lactato de sódio + Ácido palmítico		
Lactato de sódio + Ácido esteárico		

O ácido oléico é considerado um dos melhores indutores para a produção de lipases por *C. rugosa* (GORDILLO *et al.*, 1995; GORDILLO *et al.*, 1998b; WEI *et al.*,

2004) e foi utilizado em muitos estudos como indutor e como fonte de carbono (DALMAU *et al.*, 1998; GORDILLO *et al.*, 1998a; Sánchez *et al.*, 1999; DE LA CASA *et al.*, 2002).

O azeite também é uma fonte de lipídio muito utilizada para a produção de lipase por *C. rugosa*, apresentando cerca de 70% de ácido oléico em sua composição. Este óleo vegetal apresenta um menor custo quando comparado com o ácido oléico podendo ser considerado uma alternativa na utilização para a produção de lipase em escala industrial, apresentando grande importância na redução de custos.

4.4.5.2 Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é um importante elemento constituinte de proteínas, ácidos nucleicos e vários outros compostos celulares, o que o torna um composto de grande importância na síntese de enzimas. É um elemento encontrado na natureza tanto na forma orgânica quanto inorgânica.

Fontes de nitrogênio, incluindo fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, têm um papel muito importante na síntese da enzima (TAN *et al.*, 2003). Diferentes formas de nitrogênio orgânico e inorgânico têm sido utilizadas na produção de lipases, especialmente sulfato de amônio e uréia (FERRER *et al.*, 2001).

KAMINI *et al.* (1998) realizaram um estudo de produção de lipase por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. Foram testados os efeitos da adição de fontes de nitrogênio na produção de lipase e foi observado que a adição de extrato de carne ao substrato resultou em uma atividade de 367,7 U/g de substrato seco, enquanto o controle, sem nenhuma fonte de nitrogênio, mostrou uma atividade de 363,6 U/g de substrato seco. Os autores observaram que fontes inorgânicas de nitrogênio como uréia, nitrato de amônio e fosfato de amônio dihidrogenado quando adicionadas a uma concentração de 5 % p/p, não aumentaram a produção de lipase.

TAN *et al.* (2003) realizaram um estudo de produção de lipase e de triagem de espécies de *Candida* sp. (atualmente reconhecida como do gênero *Yarrowia* sp.) produtoras de lipases. Os autores observaram que o farelo de soja (3.200 U/mL) e a caseína (3.400 U/mL) foram as melhores fontes de nitrogênio para a produção de lipase entre as fontes orgânicas. Entre as fontes inorgânicas testadas, o Sulfato de

amônio ((NH₄)₂SO₄) foi considerado a melhor fonte apresentando a maior atividade (3.400 U/mL).

FADILOGLU e ERKMEN (2002) realizaram um estudo sobre os efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *C. rugosa*. Os autores observaram que as melhores fontes de nitrogênio foram o extrato de levedura e a proteose-peptona. Ambas as fontes apresentaram a mesma atividade, de 5,58 U/mL.

4.4.5.3 Outros nutrientes

Dados da literatura vêm apontando a importância da presença de íons metálicos na produção de lipases. TAN *et al.* (2003) observaram que a presença de íons metálicos influencia a síntese de lipases durante um estudo sobre a seleção de um mutante de *Candida* sp. que apresentou elevada produção de lipase. A composição do meio utilizado foi de: 4% p/v de farelo de soja; 0,7% p/v de óleo de soja; 0,1% p/v de K₂HPO₄; 0,1%p/v de (NH₄)₂SO₄ e 0,05%p/v de MgSO₄.2H₂O. Os autores puderam observar que íons como Mg⁺², Na⁺ e K⁺ foram benéficos para a biossíntese de lipase, enquanto que outros íons como Ca⁺² formam complexos com ácidos graxos ionizados mudando sua solubilidade e seu comportamento em interfaces óleo-água, inibindo a síntese da lipase.

RAMANI *et al.* (2010) observaram que a adição de íons metálicos, como K⁺, Mg⁺², Na⁺ e Fe⁺² ao meio de cultura em uma concentração de 0,1%p/v apresentou um pequeno efeito inibitório na produção de lipase por *Pseudomonas gessardii* proporcionando 106, 98, 89 e 73U/mL de atividade, respectivamente. Entretanto, na presença de íons Ca⁺² houve um estímulo a produção da enzima, apresentando uma atividade de 139U/mL.

Muitos estudos também apontam os efeitos da presença de íons metálicos na atividade da lipase (PASTORE *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008; JI *et al.*, 2010). HIOL *et al.* (1999), observaram que na ausência de íons metálicos a lipase de *Mucor hiemalis f. hiemalis* apresentou atividade de 100U/mL e que o íon Ca⁺² aumentou a atividade para 176 U/mL. Os íons Fe⁺², Cu⁺² e Ba⁺², apresentaram efeito inibitório diminuindo a atividade da enzima para 22, 32 e 53 U/mL, respectivamente.

DIAZ *et al.* (2006) realizaram um estudo de produção de lipase pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* FS e FES. Os autores testaram o efeito de vários íons metálicos na atividade da lipase. Entre os íons testados, apenas Mn^{+2} aumentou a atividade nos dois tipos de fermentação, entretanto Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} e Co^{+2} não apresentaram efeito na lipase obtida por FES e reduziram a atividade da lipase obtida por FS. O íon Zn^{+2} não apresentou efeito significativo na atividade das lipase obtidas pelos dois métodos.

4.5 Composição de meios de cultura para obtenção microbiana de lipases

A composição do meio de cultivo é um dos fatores de maior importância no processo de produção de lipase e de outras enzimas. Os meios de cultura são formulados utilizando compostos quimicamente conhecidos (meio sintético) ou matérias-primas naturais (COELHO *et al.*, 2008).

Os meios de cultura consistem de uma associação quantitativa e qualitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao desenvolvimento (cultivo) de microrganismos fora do seu meio natural.

Os compostos químicos utilizados para a elaboração do meio sintético são caros, o que torna o cultivo de microrganismos para obtenção de enzimas em escala industrial bastante oneroso e muitas vezes inviável. Para que a produção de lipase se torne um processo viável em escala industrial, se faz necessária a realização de mais estudos em escala de bancada com o objetivo de maximizar a produção da enzima e reduzir os gastos com a elaboração do meio de cultura. Além disso, melhorias no processo de produção de lipase ainda depende da otimização das condições de cultivo incluindo a composição do meio de cultura (WEI *et al.*, 2004).

HIOL *et al.* (1999) realizaram um estudo de produção, purificação e caracterização de lipase extracelular de *Mucor hiemalis f. hiemalis*, um fungo patogênico vegetal. O meio de cultura utilizado foi composto de: 5% de polipeptona; 1% p/v de extrato de levedura; 1,4% p/v de KH_2PO_4 ; 0,24% p/v de Na_2PO_4 ; 0,04% p/v de $MgSO_4$ e 0,5% p/v de óleo de colza como indutor. A maior produção de lipase (97 U/mL) foi observada no final da fase logarítmica de crescimento. A produção da enzima foi altamente dependente da razão carbono/nitrogênio (C:N). O nível de produção de enzimas diminuiu lentamente em altas razões C:N e a maior produção de lipase foi obtida a uma razão de 0,1.

BENJAMIN e PANDEY (1996) tinham o objetivo de otimizar a composição do meio de cultura para a produção de lipase por *C. rugosa*. Foram testados sete meios de cultura com diferentes composições. A melhor composição observada foi: 1 % p/v de maltose; 0,5 % p/v de peptona; 0,3 % p/v de extrato de levedura; 0,3 % p/v de extrato de malte; 0,1 % p/v de uréia; 0,04 % p/v de KH_2PO_4 ; 0,024 % p/v de K_2HPO_4 ; 0,16 % p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,02 % p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 % p/v de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10% v/v de azeite de oliva. A atividade enzimática obtida neste meio foi de 12,55 U/ml, sendo que os maiores valores de atividade obtidos em outros meio testados foram de 8,36 U/mL e 10,34 U/mL.

DALMAU *et al.* (2000), analisaram os efeitos das fontes de carbono na produção de lipase por *C. rugosa*. A composição do meio basal foi de: 1,5 % p/v de KH_2PO_4 ; 0,55 % p/v de K_2HPO_4 ; 0,5% p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 % p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,01 % p/v de NaCl e 0,01 % p/v de CaCl_2 , 1ml/L de solução de micronutrientes e 1 ml/L de uma solução de vitamina. A solução de micronutrientes foi composta de 0,05 % p/v de H_3BO_3 ; 0,004 % p/v de CuSO_4 ; 0,01% p/v de KI; 0,02% p/v de FeCl_3 ; 0,04 % p/v de MnSO_4 ; 0,02% p/v de Na_2MoO_4 e 0,04% p/v de ZnSO_4 . A solução de vitamina foi composta de: 0,0002 % p/v de biotina; 0,04% p/v de pantotenato de cálcio; 0,0002 % p/v de ácido fólico, 0,2% p/v de inositol; 0,04% p/v de niacina; 0,02% p/v de ácido p-aminobenzóico e 0,04% p/v de hidrocloreto de piridoxina; 0,02% p/v de riboflavina e 0,04% p/v de hidrocloreto de tiamina. As fontes de carbono utilizadas em uma concentração de 0,2 % p/v foram: glicose, galactose, manitol, glicerol, lactato de sódio, ácido palmítico, ácido oléico, trioleína e Tween 80. O estudo demonstrou que o ácido palmítico foi o melhor indutor para a produção da enzima nas condições de temperatura de 30°C; agitação de 150 rpm em 48 horas de fermentação, onde foi obtida uma atividade de 5,3 U/mL.

SÁNCHEZ *et al.* (1999) tinham o objetivo de caracterizar as múltiplas formas de lipase e esterase em um preparado de enzimas de *C. rugosa* em escala de planta piloto e em batelada alimentada. O meio basal utilizado para a fermentação, pré-inóculo e para experimentos de fermentação em planta piloto foi composto de: 1,5 % p/v de KH_2PO_4 ; 0,55% p/v de K_2HPO_4 ; 0,4% p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% p/v de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,004 \times 10^{-4}$ % p/v de inositol; $0,008 \times 10^{-4}$ % p/v de biotina; $0,2 \times 10^{-4}$ % p/v de hidrocloreto de tiamina e 50 μL /L de anti-espumante Braun Biotech DF 7960. A fermentação foi realizada em um fermentador de 50L. As condições operacionais foram: 400 rpm de agitação, temperatura de

30°C, taxa de oxigenação entre 0,5 e 10 L/min para garantir que o oxigênio dissolvido não ficasse abaixo de 20% de saturação e pH de 6,3. Ácido oléico foi utilizado como fonte de carbono e adicionado ao meio em uma taxa de alimentação constante de 0,02 % p/v até atingir uma concentração final de 0,6 % p/v. Os autores foram capazes de monitorar e caracterizar quantitativamente e qualitativamente o grau de heterogeneidade das lipases secretadas por *C. rugosa*. As principais isoformas obtidas e suas atividades foram Lip2 (250 U/mg) e Lip3 (240 U/mg), diferente do perfil enzimático observado na lipase obtida comercialmente (Lip1 (230 U/mg) e Lip3 (134 U/mg)).

DE LA CASA *et al.* (2002) analisaram o efeito da modificação da atividade da lipase obtida por fermentação e da lipase comercial (Sigma), ambas de *C. rugosa*, pelo uso de dextranas no meio de produção. A fermentação foi realizada em um fermentador de 50L em batelada alimentada com as seguintes condições: agitação de 500 rpm; oxigenação de 0,1-1,0 vvm (volume de ar/volume de meio x minuto); temperatura de 30°C e pH 6,3. Ácido oléico foi adicionado ao meio em uma taxa de alimentação constante de 0,2 g/h até atingir uma concentração final de 0,6%p/v. O meio basal foi composto de: 1,5 % p/v de KH_2PO_4 ; 0,55 % p/v de K_2HPO_4 ; 0,4% p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 % p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% p/v de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,004 \times 10^{-4}$ % p/v de inositol; $0,008 \times 10^{-4}$ % p/v de biotina; $0,2 \times 10^{-4}$ % p/v de hidrocloreto de tiamina e 50 µL de anti-espumante Braun Biotech DF 7960. Os autores obtiveram uma atividade de 7 U/mg da lipase produzida e 2,8 U/mg utilizando a lipase comercial, obtida usando o método titulométrico.

TAKAÇ *et al.* (2010) propuseram diferentes OTSs para aumentar a produção de lipase e esterase por *C. rugosa*. O meio para produção de lipase foi composto de: 0,2% p/v de trioleína; 0,4% p/v de uréia; 1,5% p/v de KH_2PO_4 ; 0,55% p/v de K_2HPO_4 ; 0,1% p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% p/v de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 10 mL de uma solução de vitamina composta por 0,04% p/v de tiamina; 0,0002% p/v de biotina e 0,0002% p/v de inositol com um pH de 6,2. Os experimentos de produção foram realizados em um biorreator de 2L com um volume de trabalho de 1L. As condições foram as seguintes: temperatura de 30°C; agitação de 500 rpm e taxa de oxigenação de 0,6 vvm (volume de ar/volume de meio x minuto). O pH não foi controlado ao longo da fermentação. Os autores empregaram quatro estratégias de oxigenação e os resultados mostraram que altas concentrações de oxigênio restringiram a excreção de lipase. A maior atividade da lipase obtida foi de 23,3 U/mL onde a oxigenação

empregada foi a de saturação completa no início da fermentação com uma redução até 30% de saturação que foi mantida constante, que corresponde a estratégia OTS IV.

GORDILLO *et al.* (1998a), realizaram um estudo com objetivo de aumentar a produção de lipase por *C. rugosa* a partir de testes de diferentes estratégias de controle da fermentação em batelada alimentada. O meio de cultura utilizado foi composto de: 1,5% p/v de KH_2PO_4 ; 0,55% p/v de K_2HPO_4 ; 0,1% p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4% p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,001% p/v de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $0,008 \times 10^{-4}$ % p/v de biotina; $0,2 \times 10^{-4}$ % p/v de hidrocloreto de tiamina e $0,004 \times 10^{-4}$ % p/v de inositol. A fermentação foi realizada em um fermentador de 6L com 5L de volume de trabalho. Ácido oléico foi utilizado como fonte de carbono sendo adicionado separadamente utilizando uma microbureta automática. As condições operacionais foram as seguintes: 10% de inóculo, pH de 6,3; agitação de 500 rpm; temperatura de 30°C; oxigenação entre 0,5 e 3 L/min para garantir que o nível de oxigênio dissolvido não ficasse abaixo de 20% de saturação. Os autores observaram que a melhor taxa de alimentação foi $q_0=2\text{g/h}$ apresentando uma atividade lipásica total de 14,2 U/mL. Já para a taxa de crescimento específica (μ) foi observado que uma taxa de crescimento específica intermediária ($\mu = 0,04\text{h}^{-1}$) apresentou uma atividade lipásica total de 142,5 U/mL o que sugere uma tendência de acúmulo da lipase dentro da célula em altas taxas de crescimento específico, o que foi obtido com a alimentação periódica de ácido oléico.

WEI *et al.* (2004), testaram a utilização de novas fontes de carbono para produção de lipase por *C. rugosa* empregando um co-solvente. A composição do meio de cultura para produção de lipase foi a seguinte: 1,5 %p/v de KH_2PO_4 ; 0,6 %p/v de Na_2HPO_4 ; 0,6 %p/v de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1%p/v de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e micronutrientes (0,001 %p/v de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,0000004 %p/v de inositol; 0,0000008 %p/v de biotina e 0,00002 %p/v de hidrocloreto de tiamina). A fonte de carbono foi adicionada para se obter uma concentração final de 1%p/v. Foram testados como fonte de carbono sete ácidos graxos e seis ésteres. A fermentação foi realizada em um fermentador de 5L com 3L de volume de trabalho e as condições operacionais foram: 10% de inóculo; pH 6,3; agitação de 500rpm; temperatura de 30°C e aeração de 0,5-5 L/min para garantir que o nível de oxigênio dissolvido não ficasse abaixo de 20% de saturação. Devido a insolubilidade da maioria dos ácidos graxos utilizados, foram testados dois co-solventes (etanol e dodecano) que são ditos como

compostos que melhoram a solubilidade dos substratos e do oxigênio. Os autores observaram que o etanol não foi um bom co-solvente, pois inibe o crescimento do microrganismo. O dodecano ofereceu melhor dispersão dos dois substratos testados (glicerol triolato e metil esterato) e também aumentou o oxigênio dissolvido mantendo em 68%. A presença deste co-solvente aumentou o crescimento celular, de cerca de 10 g/L para 15 g/L, e a atividade lipásica de 55 U/mL para 77 U/mL.

4.6 Aplicações das lipases

4.6.1 Tratamento de efluentes

Os principais compostos orgânicos das águas residuárias são os lipídeos, proteínas e carboidratos. Os lipídios são compostos que causam muitos danos ao meio ambiente, principalmente ao meio aquático, pois formam filmes de óleos que impedem a difusão de oxigênio do ar provocando a mortandade dos organismos aquáticos. Estes compostos se encontram preferencialmente na forma de triacilgliceróis o que torna possível a utilização das lipases no tratamento destes efluentes, fato este de grande relevância na preservação dos ecossistemas e sua biodiversidade (MENDES *et al.*, 2005).

4.6.2 Indústria oleoquímica

A utilização de lipases na indústria oleoquímica tem se tornado bastante atrativo em diversos aspectos. As reações de hidrólise na indústria geralmente são realizadas quimicamente em condições de alta temperatura e pressão o que demanda um alto gasto energético. A utilização de lipases na hidrólise apresenta vantagens como a capacidade de minimizar degradações térmicas de produtos e reagentes que formam compostos indesejáveis, pois permitem a redução da temperatura além da economia de energia. Porém o custo elevado das enzimas ainda torna o processo de hidrólise lipolítica menos econômico do que o convencional (LORENZETTI, 2007).

4.6.3 Resolução cinética de enantiômeros

Compostos quirais têm grande importância na indústria farmacêutica, agroquímica e em síntese orgânica. Como em todos os compostos racêmicos, os dois enantiômeros apresentam diferentes atividades funcionais, por isso a preparação de compostos enantiomericamente puros vem atraindo bastante atenção nos últimos tempos. YANG *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a resolução enzimática do composto 2-(1-hidroxi-3-butanona)-5-metil furano que é um intermediário importante de remédios, produtos agroquímicos e perfumes, utilizando a lipase imobilizada de *Rhizopus arrhizus*.

4.6.4 Indústria de papel e celulose

As lipases são utilizadas na indústria de papel e celulose para remover componentes hidrofóbicos da madeira (triglicerídeos e ceras) que dificultam a manufatura do papel, pois causam problemas como redução da produção, aumento do custo de manutenção e operação e redução da qualidade (JAEGER e REETZ, 1998). A indústria Japonesa Nippon Paper desenvolveu um método de controle desses componentes hidrofóbicos utilizando a lipase de *C. rugosa* para hidrolisar mais de 90% dos triglicerídeos (JAEGER e REETZ, 1998; SHARMA *et al.*, 2002).

4.6.5 Indústria de alimentos

A modificação de gorduras e óleos é uma das principais áreas na indústria de processamento de alimentos e demanda novas exigências econômicas e tecnologias verdes (HASAN *et al.*, 2006). Estes compostos são constituintes importantes dos alimentos (SHARMA *et al.*, 2001). O valor nutricional, sensorial e as propriedades físicas dos triglicerídeos são fortemente influenciados por fatores como a posição do ácido graxo na cadeia principal do triglicerídeo, comprimento da cadeia do ácido graxo, e o grau de insaturação. As lipases permitem modificar as propriedades dos lipídios, a localização do ácido graxo no glicerídeo e substituir um ou mais ácidos graxos por outros (SHARMA *et al.*, 2001). Podemos citar ainda diversas aplicações das lípases como o desenvolvimento de aromatizantes para produtos como, queijo, manteiga, margarina, bebidas alcoólicas, leite, chocolate e

doces, por meio da hidrólise seletiva de triglicerídeos liberando ácidos graxos livres que atuam como aroma ou precursor de aroma (JAEGER e REETZ, 1998).

Podemos citar ainda sua aplicação na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) que pertencem às séries ômega-3 e ômega-6 possuem funções indispensáveis ao metabolismo e alguns como o ácido linolênico e o ácido linoléico, não podem ser sintetizados pelo nosso organismo. Estes ácidos graxos são precursores de outros ácidos graxos de grande importância ao organismo, por isso são considerados essenciais e devem estar presentes na dieta. Atualmente existem muitos métodos utilizados na concentração de AGPI de fontes naturais, dentre eles se encontra a reação catalisada por lipase.

CARVALHO *et al.* (2003) realizaram um estudo com o objetivo de enumerar e discutir as principais publicações relacionadas à aplicação de lipases microbianas na obtenção de produtos com níveis aumentados em AGPI. Para isso os autores relataram estudos das reações catalisadas por lipases microbianas, que têm sido empregadas para obtenção dos concentrados de AGPI a partir de diferentes fontes e em variadas condições experimentais e, em seguida realizaram uma comparação do processo enzimático com outros métodos físicos e químicos que permitem remover os componentes mais saturados do óleo.

4.6.6 Indústria têxtil

Enzimas têm sido utilizadas na indústria de couros por muitos anos e também têm sido introduzidas nas indústrias têxteis modernas, sendo as lipases empregadas na remoção de lubrificantes a fim de proporcionar um tecido com maior absorção melhorando o tingimento (HASAN *et al.*, 2006).

A utilização do poliéster na fabricação de tecidos proporciona características como toque macio, resistência a manchas e a abrasão. Fibras sintéticas, como o poliéster, são modificadas enzimaticamente para o uso na produção de fios, tecidos e tapetes (HASAN *et al.*, 2006).

4.6.7 Indústria de detergentes

O campo comercial mais importante de aplicação de lipases, devido a sua habilidade em hidrolisar gorduras, é a sua adição em detergentes (JAEGER e REETZ, 1998). Existe uma série de vantagens da utilização de enzimas em detergentes como: economia de energia, pois permitem uma diminuição na temperatura de lavagem, reduz a utilização de produtos químicos nocivos, são biodegradáveis e não produzem resíduos nocivos, não apresentam impacto negativo sobre os processos de tratamento de esgoto e não apresentam riscos aos organismos aquáticos (HASAN *et al.*, 2006).

4.6.8 Indústria de cosméticos

A capacidade de lipase hidrolisar triacilgliceróis a torna uma biomolécula com grande potencial de aplicação na indústria de cosméticos como a utilização em produtos de tratamento da pele e cabelos oleosos, além de produtos que auxiliam no tratamento da celulite entre outros produtos (LORENZETTI, 2007).

A utilização de lipases na indústria cosmética vem se intensificando na síntese de matérias-primas que são utilizadas nos cosméticos (BOUSQUET *et al.*, 1998; KENG *et al.*, 2009; RAHMAN *et al.*, 2001; SABEDER *et al.*, 2006).

4.6.9 Biorremediação

Desreguladores endócrinos são um grupo de produtos químicos que interferem no sistema endócrino causando efeitos adversos nos processos reprodutivos e de desenvolvimento além de causar doenças metabólicas. Podem atuar como anti-estrógenos ou anti-andrógenos dependendo da sua ação nos hormônios masculinos ou femininos. Como exemplos destes produtos nocivos podemos citar: bifenilos policlorados, dioxinas, alguns pesticidas, alquilfenóis, ftalatos, polibromados utilizados como retardadores de chamas, fitoestrógenos e alguns metais pesados.

MITA *et al.* (2010) realizaram um estudo de degradação do dimetilftalato utilizando lipase imobilizada de *C. rugosa*. O estudo demonstrou que a remoção de ftalatos por meio de tratamento enzimático foi adequada já que apresenta efeito

apenas sobre a molécula alvo, deixando a concentração de outros componentes inalterada. Este fato é de grande importância já que outros tratamentos podem alterar a concentração de outras substâncias necessárias ao equilíbrio do ecossistema a ser biorremediado.

4.6.10 Biossensores

Biossensores podem ser definidos como instrumentos analíticos que utilizam material biológico ligado a um sistema adequado de transdução que converte um sinal biológico em um sinal elétrico quantificável e processável (COELHO *et al.*, 2008). Possuem a finalidade de detecção/quantificação de substâncias bioquímicas nas mais variadas aplicações, como por exemplo, no diagnóstico de doenças e no monitoramento do meio ambiente por meio da detecção de substâncias químicas nocivas.

REDDY *et al.* (2003) realizaram um estudo de formulação de um biossensor baseado no método potenciométrico utilizando lipase de pâncreas de porco imobilizada em sílica porosa para a detecção de triglicerídeos. A hidrólise do triglicerídeo resulta na formação de ácidos graxos que causam uma mudança no pH da solução. Esta mudança no pH é proporcional à quantidade de triglicerídeo presente na solução. Os autores concluíram que o biossensor tem um grande potencial de utilização na estimativa da quantidade de triglicerídeos em amostras de óleo e sangue, pois apresentou uma alta reprodutibilidade e também apresentou uma alta sensibilidade, de 30 mV por mudança de uma unidade de pH.

4.6.11 Síntese orgânica

As lipases tem se tornado o grupo de enzimas mais importante para aplicação em síntese orgânica. Podem ser utilizadas como biocatalizadores na produção de compostos biodegradáveis, pois catalisam reações de síntese de ésteres e transesterificação em sistemas de solvente orgânico podendo ser empregadas na produção de poliésteres biodegradáveis (HASAN *et al.*, 2006; LINKO *et al.*, 1998), além da produção de biocombustíveis (SHIMADA *et al.*, 2002; DIZGE e KESKINLER, 2008; RANGANATHAN *et al.*, 2008; TAMALAMPUDI *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2010).

4.6.12 Biodiesel

As questões ambientais referentes à emissão de gases pelo uso de combustíveis fósseis têm encorajado o uso do biodiesel, que tem ganhado importância nos últimos tempos por ser considerado uma fonte de energia renovável (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

A capacidade das lipases em catalisar a hidrólise de acilgliceróis em ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, a torna um biocatalisador interessante que pode ser utilizado na produção de biodiesel a partir de fontes de triacilglicerol como os óleos vegetais. A sua utilização elimina as desvantagens do processo químico, produzindo produtos com alto grau de pureza, com menor complexidade operacional, além de fácil separação do catalisador e a possibilidade da utilização de etanol hidratado na reação (RANGANATHAN *et al.*, 2008).

A transesterificação enzimática é um método potencial de modificação das propriedades físicas e químicas dos óleos e gorduras (DOSSAT e COMBES, 2002), o que torna o processo de catálise enzimática um sistema promissor para a produção de biodiesel em escala industrial. A tecnologia enzimática será capaz de competir com a rota química se processos seletivos e estáveis forem desenvolvidos (DOSSAT e COMBES, 2002). Porém, o custo da lipase é considerado o principal obstáculo para a comercialização do processo de catálise enzimática (FEOFILOVA *et al.*, 2010), tornando necessária a realização de mais estudos para desenvolver sistemas de baixo custo.

Atualmente existe uma série de estudos de produção de biodiesel via catálise enzimática.

TAMALAMPUDI *et al.* (2008) realizaram um estudo de produção de biodiesel a partir do óleo de *Jatropha curcas* (conhecida como pinhão-mansão) utilizando células imobilizadas de um fungo filamentoso (*Rhizopus oryzae*) produtor de lipase. Os autores observaram que a lipase imobilizada de *R. oryzae* catalisou a metanólise do óleo de *Jatropha* de forma mais eficiente do que a lipase comercial (Novozym 435). Os resultados sugerem que a utilização de células imobilizadas de *R. oryzae* podem ser utilizadas como biocatalisadores de baixo custo para a produção de biodiesel a partir do óleo de *J. curcas*.

DIZGE e KESKINLER (2008) realizaram um estudo de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em espuma de poliuretano para ser utilizada na

transesterificação de óleo de canola com metanol. Eles mostraram que a lipase de *T. lanuginosus* foi imobilizada com sucesso em espumas de poliuretano contendo poliglutaraldeído. Os autores observaram que as condições ótimas para o processamento de 20g de óleo de canola com metanol foram: 430 µg; uma razão molar de óleo/metanol de 1:6; 0,1g de água e 40°C. Os autores também observaram que a lipase imobilizada apresentou uma boa estabilidade e pouca perda de atividade após ser utilizada repetidas vezes.

GUAN *et al.* (2010) realizaram um estudo combinando duas lipases para catalisar a metanólise do óleo de soja em um meio aquoso para produção de biodiesel. Os genes das lipases de *Rhizomucor miehei* e *Penicillium cyclopium* foram clonados e expressos com sucesso em *Pichia pastoris*. A utilização da lipase de *Rhizomucor miehei* apresentou uma taxa de conversão de biodiesel de 68,5%, já a combinação das duas lipases demonstrou uma taxa de conversão superior a 95%. Os resultados sugeriram que a combinação de lipases com diferentes especificidades para conversão enzimática de substratos lipídicos mais complexos é uma estratégia potencial para a produção de biodiesel.

5 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS

5.1 Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta estatística muito importante que utiliza modelos matemáticos para descrever fenômenos utilizando o mínimo possível de experimentos. É uma ferramenta que permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise de dados obtidos resultando em objetividade científica nas conclusões (CALADO e MONTGOMERY, 2003). É de grande importância que antes de começar o planejamento de experimentos devemos escolher com cuidado o modelo mais adequado ao que se deseja estudar, assim como as variáveis envolvidas, a faixa de variação das variáveis selecionadas, os níveis e a variável de resposta.

O planejamento fatorial é uma técnica muito utilizada quando se tem duas ou mais variáveis independentes (fatores) permitindo uma combinação de todas as variáveis em todos os níveis, obtendo-se assim uma análise de uma variável sujeita a todas as combinações das demais (MONTGOMERY e RUNGER, 2003). É um

modelo bastante útil para medir os efeitos ou influências de uma ou mais variáveis na resposta de um processo. Em um planejamento fatorial, quando o número de fatores for muito grande, o número necessário de experimentos será muito elevado acarretando em alta demanda de tempo e custos (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Além disso, o aumento do número de fatores leva ao aumento de interações de ordem elevadas que apresentam menos importância podendo ser negligenciadas, logo, os termos principais e de interação inferiores podem ser obtidos através de uma fração do planejamento fatorial completo (MONTGOMERY e RUNGER, 2003).

5.2 Estatística descritiva

O desvio padrão é calculado a partir da variância que é definida como a média das diferenças quadráticas de n valores em relação a sua média aritmética, ou seja:

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

O desvio padrão apresenta valores da medida de dispersão na mesma dimensão das observações, dado pela fórmula:

$$DP = \sqrt{S^2}$$

Porém o desvio padrão pode ser considerado grande ou pequeno dependendo da ordem de grandeza da variável. Uma maneira de se expressar a variabilidade dos dados tirando a influência da ordem de grandeza da variável é através do coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV) relaciona o desvio padrão (DP) de um conjunto de valores a sua média (X). É uma medida de variabilidade relativa e é calculado a partir da seguinte fórmula:

$$CV = (DP \times 100) / X$$

É um valor adimensional expresso em porcentagem, indicando o percentual que o desvio padrão é menor ou maior do que a média (DIAZ e LOPEZ, 2007).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do estudo de avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *C. rugosa* por meio de fermentação submersa em batelada.

6.1 Materiais

A albumina de soro bovino (BSA), Extrato de malte e o reagente “Coomassie brilliant blue” BG-250 foram obtidos da SIGMA. A Peptona obtida da Bacto™. O Azeite da marca Andorinhas foi utilizado como fonte de carbono.

Todos os demais reagentes utilizados no presente estudo foram obtidos da VETEC.

6.1.1 Microrganismo e meios de cultivo de reidratação e conservação

O microrganismo utilizado no estudo foi a levedura *Candida rugosa* (ATCC 10571) que foi gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS - FIOCRUZ) e foi obtida na forma liofilizada.

A reidratação foi realizada utilizando o meio YMPD composto de: 0,3% p/v de Extrato de malte; 0,3 % p/v de Extrato de levedura; 0,5 % p/v de Peptona e 1% p/v de Glicose. As condições de cultivo utilizadas na reidratação foram as seguintes: temperatura de 27°C e agitação de 150 rpm por um período de 48hs.

As células de *C. rugosa* foram conservadas a 4°C após 72 horas de crescimento em tubos de ensaio contendo meio de cultivo YMPD onde foi adicionado Agar-agar (2%p/v).

Os meios citados anteriormente foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm (111°C) por 15 minutos.

6.2 Métodos

6.2.1 Construção da curva padrão de peso seco

Para a construção da curva padrão de peso seco foi realizado um pré-inóculo em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura MYPD (sem

Agar) utilizando 5 mL da cultura reidratada e agitada em um shaker por 72hs, 27°C e 150 rpm. Após este período, volumes de suspensão celular foram centrifugados a 3.000 rpm por 20 minutos a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e a massa de células foi ressuspensa com solução salina, obtendo-se 40 mL de volume final. Deste volume, foram utilizados 30mL para a realização de microfiltração a vácuo em três membranas de 0,45 μm e 47 mm previamente secas para se obter a massa de células. A biomassa foi obtida após secagem e pesagem das membranas. Após as etapas anteriores foram realizadas diluições sucessivas em triplicata e medidas as absorbâncias a 600 nm de cada diluição para a construção da curva padrão.

Após a elaboração da curva padrão de peso seco foi calculado o fator da curva que foi utilizado no cálculo da quantificação do crescimento celular.

O fator (f) de correspondência entre a absorbância e a concentração é dado pelo inverso do coeficiente angular (a) obtido a partir da equação da curva.

$$f = 1/a$$

6.2.2 Quantificação do crescimento celular

A quantificação de crescimento foi realizada retirando-se uma alíquota de 5 mL da cultura de células e centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm a 25°C. O sobrenadante foi descartado e a massa de células ressuspensa com aproximadamente 5mL de solução salina (0,9%p/v). Em seguida foi realizada uma diluição e a absorbância medida em espectrofotômetro a 600nm, sendo realizada em triplicata e calculada a média. A concentração de células foi obtida correlacionando a absorbância a concentração de células utilizando o fator da curva padrão descrito anteriormente (no item 6.2.1), multiplicando pela diluição, sendo fornecida a concentração de células em mg de peso seco de células/mL de meio.

6.2.3 Preparo do pré-inoculo

A realização do pré-inoculo teve como objetivo a obtenção da massa celular a ser utilizada como inoculo e foi realizado utilizando as células preservadas em meio sólido (YMPD com Agar-agar) inoculadas, com uma alça de platina em Erlenmeyers contendo 100mL de meio YMPD e levado a um shaker rotatório a uma temperatura

de 27°C e agitação de 150 rpm por um período de aproximadamente 48 horas. Decorrido o tempo necessário foi retirada uma alíquota de 5 mL, para a quantificação do crescimento celular e cálculo do volume necessário a ser centrifugado para a realização do inóculo, com a finalidade de se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, $1,0 \pm 0,1$ mg p.s. cel/mL de meio de cultivo. O volume necessário foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e adicionado ao meio de cultivo. Os meios utilizados como pré-inóculo foram esterilizados por calor úmido como citado anteriormente no item 6.1.1 e todo processo foi realizado assepticamente.

Os meios a serem descartados contendo microrganismos foram autoclavados a 1 atm (121°C) por 20 minutos para evitar contaminação ambiental.

6.2.4 Soluções de vitaminas e de cloreto férrico

A solução de vitaminas foi elaborada a fim de se utilizar um volume referente às concentrações desejadas. A primeira etapa consistiu na elaboração de uma solução mãe que passou posteriormente por uma diluição devido as baixas concentrações necessárias. Após a diluição foram calculados os volumes necessários para se obter as concentrações desejadas. A solução de vitaminas foi composta por Inositol e Cloridrato de Tiamina nas concentrações de 0,0004 %p/v e 0,02 %p/v respectivamente.

A tiamina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, susceptível a destruição por diversos fatores como condições neutras e alcalinas, calor, oxidação e radiação ionizante (COMBS, 2008).

A solução de Cloreto Férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi elaborada com a concentração de 0,5%p/v. Após a elaboração da solução foram calculados os volumes necessários para se obter as concentrações desejadas.

Ambas as soluções foram elaboradas com água Milli-Q, e esterilizadas por microfiltração utilizando membranas de acetato de celulose 0,22 μm .

6.2.5 Determinação da atividade lipásica

A atividade enzimática foi determinada por meio do método titulométrico descrito por SOARES *et al.* (1999) com algumas adaptações, utilizando substrato

lipídico sob a forma de emulsão. O substrato foi preparado utilizando 50 mL de azeite e 50 mL de reagente de emulsificação (composto por 43 mL de tampão fosfato de sódio 100mM e 7 mL de Tween 80) e homogeneizado com o auxílio de um agitador por 6 minutos. A mistura reacional foi composta por 1 mL de extrato enzimático bruto, 4 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7) e 5 mL de emulsão. Após 15 minutos a 35°C a reação foi interrompida com a adição de uma solução de acetona/etanol/água destilada (1:1:1). No branco, o volume de extrato foi adicionado após a solução utilizada para interromper a reação.

Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,05M) utilizando um titulador automático (Metrohm). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μ mol de ácido graxo por minuto, de acordo com as condições de ensaio.

O cálculo da atividade é realizado a partir da Equação abaixo:

$$Atv = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_{enz}}$$

Onde:

Atv = atividade lipásica (U/mL);

V_a = Volume de NaOH utilizado para titular a amostra (mL);

V_b = Volume de NaOH utilizado para titular o branco (mL);

N = normalidade do NaOH;

t = tempo de reação;

V_{enz} = volume de enzima utilizado.

6.2.6 Determinação da atividade da protease

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com o método descrito por PINTO (1998). Foi utilizado como substrato uma solução de azocaseína 0,5% p/v em tampão acetato (50mM, pH 5). A determinação da atividade foi feita incubando-se 0,5 mL de substrato e 0,5 mL de extrato enzimático por 40 minutos a 32°C em banho-maria. Decorrido o tempo de reação foi adicionado 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (15% p/v). Em seguida as amostras foram

centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo recipiente onde foi adicionado 1mL de solução de KOH 5N gerando uma cor alaranjada. A intensidade da coloração foi lida em espectrofotômetro a 428 nm utilizando um branco onde o ácido tricloroacético foi adicionado antes do extrato enzimático. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade de atividade (U) foi definida como o aumento de 0,01 de absorvância que a amostra apresentou em relação ao branco por minuto nas condições de reação. Os brancos utilizados por amostra foram elaborados com a mesma composição da amostra sendo que o extrato foi adicionado após o ácido tricloroacético.

O cálculo da atividade foi realizado utilizando a Equação abaixo:

$$Atv = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{Branco})}{(0,01) \times t \times V_{amostra}}$$

Onde:

Atv = atividade proteolítica;

Abs_{amostra} = absorvância da amostra;

Abs_{Branco} = absorvância do branco;

t = tempo de reação;

V_{amostra} = volume de extrato enzimático.

6.2.7 Determinação de proteína e Construção da curva padrão

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada de acordo com o método descrito por BRADFORD *et al.* (1976). As amostras foram submetidas às mesmas etapas que as utilizadas para a elaboração da curva padrão.

A curva padrão foi elaborada utilizando albumina de soro bovino como padrão (BSA), correlacionando os valores de absorvância ao conteúdo de proteína de soluções com concentrações conhecidas (entre 5 e 40 mg/mL). A curva padrão foi utilizada para a determinação de proteínas em amostras com concentrações desconhecidas. A quantificação para a construção da curva padrão foi realizada incubando-se 0,1mL das soluções com concentrações conhecidas e 1mL de reagente a base do corante "Coomassie brilliant blue" BG-250 a temperatura

ambiente por 5 minutos. Após o tempo reacional a absorvência das amostras foi lida a 595 nm e foram realizadas em triplicata.

Este procedimento elimina a maioria dos problemas de interferências de alguns compostos nas análises de proteína realizadas por outros métodos e permite a realização de análise de um grande número de amostras (BRADFORD *et al.*, 1976).

6.2.8 Seleção da composição do meio de cultura

A composição do meio de cultura foi baseada em uma série de artigos científicos obtidos após uma ampla revisão bibliográfica, sendo os artigos selecionados publicados entre os anos de 1996 e 2010 (tabela 05). A partir dos artigos selecionados foi realizada uma seleção dos componentes do meio a ser testado e a concentração a ser utilizada.

Tabela 05: Artigos utilizados para selecionar a composição do meio de cultura.

Artigo	Título	Autores e Ano de publicação
1	Optimization of liquid media for lipase production by <i>Candida rugosa</i> .	BENJAMIN e PANDEY, 1996
2	Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a <i>Candida rugosa</i> pilot-plant scale fed-batch fermentation.	SÁNCHEZ <i>et al.</i> , 1999
3	Effect of different carbon sources on lipase production by <i>Candida rugosa</i> .	DALMAU <i>et al.</i> , 2000
4	Modification of the activities of two different lipases from <i>Candida rugosa</i> with dextrans.	DE LA CASA <i>et al.</i> , 2002
5	Oxygen transfer strategy modulates the productions of lipase and esterase enzymes by <i>Candida rugosa</i> .	TAKAÇ <i>et al.</i> , 2010
6	Enhancement of <i>Candida rugosa</i> Lipase Production by Using Different Control Fed-Batch Operational Strategies.	GORDILLO <i>et al.</i> , 1998a
7	Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by <i>Candida rugosa</i> .	WEI <i>et al.</i> , 2004

A seleção foi realizada com base nas necessidades nutricionais de *C. rugosa* e nos compostos presentes nas referências citadas na tabela 05 (APÊNDICE A). Os componentes selecionados para compor o meio de cultura foram: Azeite, Tween 80, Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), Cloreto de Cálcio dihidratado

(CaCl₂.2H₂O), Cloreto Férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O), Inositol, Cloridrato de Tiamina. Os meios de cultura foram elaborados com água deionizada.

6.2.9 Testes para definir melhores condições para produção da enzima

Após a seleção dos compostos foram selecionadas as concentrações (tabela 06) para a realização de testes preliminares a fim de definir a forma de elaboração do meio de cultura, a solução para ajuste de pH, a forma de preparo da solução de vitaminas.

Tabela 06: Concentrações utilizadas nos testes preliminares baseadas nos artigos da tabela 05.

Composto	Conc. %p/v
Azeite	0,2
Tween 80	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	1,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,0004
Inositol	0,0000004
Tiamina	0,00002

Foram testadas duas soluções para ajuste de pH (KOH 10M, NH₄OH 4M). A solução de KOH se mostrou ineficiente no ajuste do pH pois provocou a precipitação dos sais. Já a solução de NH₄OH não apresentou este problema, então foi a utilizada no ajuste do pH dos meios.

Testes para definir a melhor maneira de elaboração do meio de cultura, foram realizados já que alguns artigos utilizados como base da composição do meio (tabela 05) realizavam a elaboração do meio composto de sais sendo esterilizados separadamente. Os testes consistiram na elaboração do meio orgânico (composto por Tween 80 e azeite), e meio composto de sais para posterior formulação do volume final, além da formulação do meio completo. A elaboração do meio completo foi considerada a melhor maneira sendo obtida uma atividade de 14,9 U/mL, já que no meio confeccionado separadamente foi obtida uma atividade de 11,4 U/mL.

A princípio seriam utilizadas três vitaminas no estudo, porém foram detectados problemas na esterilização por microfiltração devido à baixa solubilidade do ácido fólico, por este motivo esta vitamina ficava retida na membrana durante a microfiltração. Depois foi constatado em dados da literatura que o ácido fólico apresenta baixa solubilidade em pH abaixo de 10 (YOUNIS *et al.*, 2009). Sendo assim, esta vitamina não foi utilizada no estudo.

6.2.10 Condições de cultivo

As condições de cultivo utilizadas na produção de lipase foram: pH 6,3; temperatura de 30°C, agitação de 180 rpm por 72 horas. O volume do meio de cultivo foi de 25 mL em Erlenmeyers de 250 mL. Esta proporção foi escolhida com o objetivo de facilitar a oxigenação, já que este parâmetro não foi controlado.

6.2.11 Planejamento experimental

Devido ao grande número de fatores, o planejamento fatorial fracionário (2^{k-p}) foi escolhido como modelo. Este planejamento permite selecionar quais fatores têm os maiores efeitos (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Como o objetivo foi avaliar a composição do meio de cultura para a produção da lipase, os fatores (variáveis independentes) utilizados foram os componentes do meio que foram os seguintes: Azeite, Tween 80, Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), solução de Cloreto Férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) e solução de vitaminas, totalizando oito fatores (Tabela 07). Foi utilizada uma meia-fração dando um total de 16 ensaios. De modo a estimar todos os parâmetros desse modelo devemos adicionar pontos centrais. Foram adicionados 3 pontos centrais, somando assim 19 ensaios. A variável dependente (ou variável de resposta) utilizada foi a atividade lipásica.

O software utilizado no presente estudo foi o Statistica versão 7.0 e foi realizado com intervalo de confiança de 95%.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Resultados

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente estudo.

7.1.2 Curva de crescimento de *Candida rugosa*

A curva de crescimento foi realizada utilizando as mesmas condições de pré-inóculo como descrito anteriormente no item 6.2.3. As quantificações de crescimento foram realizadas no intervalo de 3 a 168 hs, sendo obtida a curva a seguir.

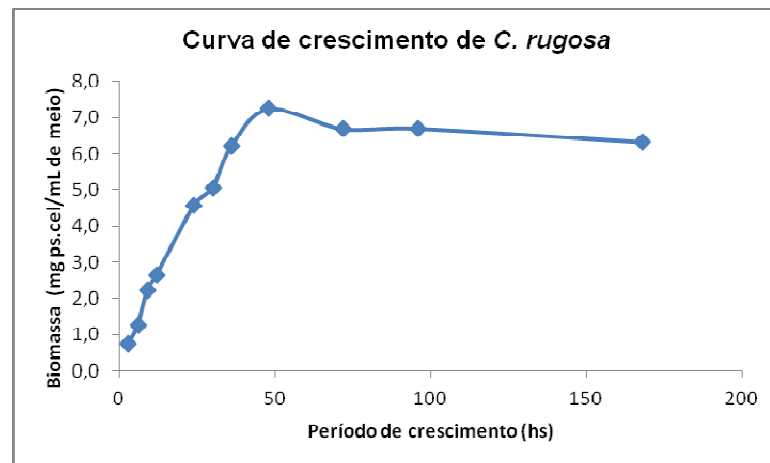


Figura 02: Curva de crescimento de *C. rugosa*.

O tempo de pré-inóculo utilizado no presente estudo foi de 48 hs que corresponde, segundo a curva de crescimento (figura 02), ao final da fase exponencial de crescimento.

7.1.3 Atividade lipásica

A tabela 09 apresenta os resultados, por ensaio, de atividade lipásica obtidos pelo método de titulação com os volumes do branco, da amostra em triplicata, suas respectivas médias, atividade lipásica, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

Tabela 09: Atividade lipásica por titulação para cada ensaio.

Ensaio	Média	DP	CV(%)	Atividade (U/mL)
1	7,812	0,0504	0,64	0
2	7,785	0,2777	3,57	0
3	10,386	0,2910	2,80	0,72
4	7,665	0,3182	4,15	0
5	12,094	0,7703	6,37	5,12
6	10,961	0,2162	1,97	4,13
7	10,646	0,3783	3,55	4,60
8	12,412	2,0614	16,61	10,39
9	11,342	0,4581	4,04	3,85
10	8,174	0,4568	5,59	1,75
11	12,601	1,5452	12,26	12,96
12	6,536	0,0564	0,86	0
13	8,445	0,2998	3,55	0,64
14	8,572	0,1770	2,07	0,26
15	13,836	1,2127	8,77	11,11
16	12,321	0,3505	2,84	3,79
17	10,904	1,0983	10,07	5,91
18	11,479	1,6096	14,02	5,77
19	11,055	0,8644	7,82	6,29

A tabela 09 mostra que os desvios padrões apresentam valores mais altos que os obtidos anteriormente nos dados de quantificação de crescimento celular, porém ainda são considerados valores baixos de desvio, variando entre 0,05 e 1,6. Os coeficientes de variação apresentaram valores entre 0,6% e 16,6%, indicando também uma baixa dispersão dos dados em torno da média.

7.1.4 Análise de variância e Estimativa dos efeitos dos fatores

A Análise de variância foi realizada a fim de se analisar a significância estatística dos fatores em relação a variável de resposta utilizando o critério de significância do *p-level*. A tabela 10 apresenta a Análise de variância.

Tabela 10: Análise de variância (ANOVA).

	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	13,1616	1	13,16162	181,7903	0,005456
(1)Azeite	21,8089	1	21,80890	301,2279	0,003303
(2)Tween 80	48,3720	1	48,37203	668,1219	0,001493
(3)(NH ₄) ₂ SO ₄	26,9361	1	26,93610	372,0456	0,002677
(4)MgSO ₄	5,5225	1	5,52250	76,2776	0,012858
(5)KH ₂ PO ₄	0,1640	1	0,16403	2,2655	0,271216
(6)CaCl ₂	0,2116	1	0,21160	2,9227	0,229471
(7)FeCl ₃	8,1510	1	8,15103	112,5832	0,008766
(8)Vitaminas	35,5812	1	35,58123	491,4534	0,002029
1 by 2	8,6142	1	8,61423	118,9810	0,008300
1 by 3	10,3684	1	10,36840	143,2099	0,006910
1 by 4	45,0241	1	45,02410	621,8798	0,001604
1 by 5	0,8010	1	0,80103	11,0639	0,079725
1 by 6	43,1649	1	43,16490	596,2003	0,001673
1 by 7	8,4972	1	8,49722	117,3650	0,008413
1 by 8	13,8756	1	13,87563	191,6523	0,005177
Pure Error	0,1448	2	0,07240		
Total SS	290,3993	18			

O planejamento fatorial fracionário com 8 fatores com uma meia fração de 4 apresenta uma resolução IV onde nenhum efeito principal é confundido ou superposto com outros efeitos principais ou com qualquer outro efeito de interação de segunda ordem, porém interações de segunda ordem são confundidas entre si (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Segundo o princípio da esparsidade dos efeitos, o sistema é geralmente dominado pelos efeitos principais e interações de ordens baixas. As interações de terceira ordem e superiores são geralmente negligenciadas. Isso significa que nem todos os efeitos podem ser calculados já que existe superposição entre eles, e por isso estes efeitos são adicionados ao termo do erro na análise de variância (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Se considerarmos que certas interações de ordens elevadas são negligenciáveis, de acordo com o princípio citado acima, a análise do planejamento é capaz de fornecer informações sobre os efeitos principais e interações de ordens baixas. Podemos observar na tabela 10 que apenas alguns fatores de interação podem ser calculados.

A ANOVA (tabela 10) mostra os termos principais e alguns termos de interação. Os coeficientes de correlação R^2 e R_{Adj} obtidos na Análise de variância foram 0,9995 e 0,9955, respectivamente. Logo podemos observar que o modelo pode explicar em torno de 99% da variância demonstrando um ótimo ajuste.

Quanto menor o valor de *p-level* mais significativo é o efeito do fator. A ANOVA (tabela 10) apresenta os fatores que tiveram significância estatística (em vermelho) e os fatores que não apresentaram significância estatística (em preto), logo podemos observar que os fatores que não foram considerados significativos foram: (5)KH₂PO₄ ($p=0,2712$) e (6)CaCl₂ (0,2294). O termo de interação (1by5) foi considerado marginalmente significativo ($p=0,0797$).

O diagrama de Pareto (figura 03) é outra ferramenta utilizada na análise de quais fatores foram estatisticamente significativos. Os fatores são apresentados em ordem decrescente de significância e aqueles que não são considerados estatisticamente significativos estão à esquerda da linha vermelha onde o *p-level* é igual a 0,5.

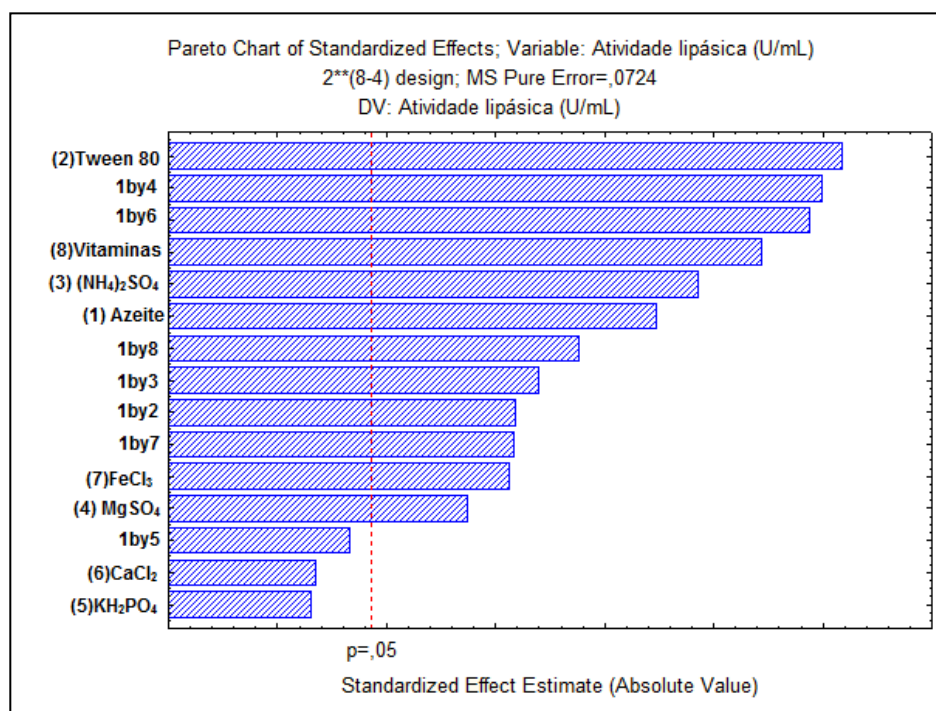


Figura 03: Diagrama de Pareto.

O Diagrama de Pareto confirma o observado na ANOVA (tabela 10) de que existem três fatores que não foram considerados significativos: (5)KH₂PO₄ e (6)CaCl₂ e (1by5). Porém, nenhum fator principal pode ser ignorado nas análises subsequentes, já que o termo de interação (1by6) foi considerado significativo

(0,0017), e o termo de interação (1by5) foi considerado marginalmente significativo ($p=0,0797$).

O planejamento fatorial fracionário permite avaliar os efeitos dos fatores na variável de resposta (atividade lipásica). O efeito de um fator pode ser entendido como a variação causada na resposta quando percorremos todos os níveis desse fator. O efeito principal de um fator é a diferença entre a resposta média no nível alto e a resposta média no nível baixo e ele nos dá o valor em unidades que faz a resposta média aumentar quando ocorre a variação do nível baixo para o nível alto do fator em questão. Como o objetivo inicial foi avaliar a importância dos termos principais na variável de resposta, a tabela dos efeitos (tabela 11) apresenta apenas os efeitos destes termos.

Tabela 11: Estimativa dos efeitos dos fatores na variável de resposta.

	Effect	Std.Err.	t	p
Mean/Interc.	3,7075	0,0862	43,0262	0,00003
Curvatr.	4,5650	0,4337	10,5256	0,00183
(1)Azeite	-2,3350	0,1723	-13,5490	0,00087
(2)Tween 80	3,4775	0,1723	20,1785	0,00027
(3)(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5950	0,1723	15,0577	0,00064
(4)MgSO ₄	1,1750	0,1723	6,8180	0,00645
(5)KH ₂ PO ₄	0,2025	0,1723	1,1750	0,32476
(6)CaCl ₂	0,2300	0,1345	1,7096	0,22947
(7)FeCl ₃	1,4275	0,1723	8,2832	0,00369
(8)Vitaminas	-2,9825	0,1723	-17,3062	0,00042

A Tabela 11 apresenta as variáveis que resultaram em um efeito positivo ou negativo na variável de resposta. Dentre os termos principais ((1) a (8)) podemos observar que o termo (2) Tween 80 apresentou efeito positivo e foi considerado o efeito de maior importância, seguido por (3) (NH₄)₂SO₄, (4) MgSO₄ e (7) FeCl₃, que também apresentaram efeitos positivos. O termo (8) Vitaminas apresentou o maior efeito negativo em relação a variável de resposta, seguido pelo termo (1) Azeite.

7.1.5 Quantificação de crescimento celular

A quantificação do crescimento celular dos ensaios foi realizada baseada na curva padrão de peso seco abaixo (figura 04). A tabela 12 apresenta a média dos

valores de absorbância obtidos, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e crescimento.

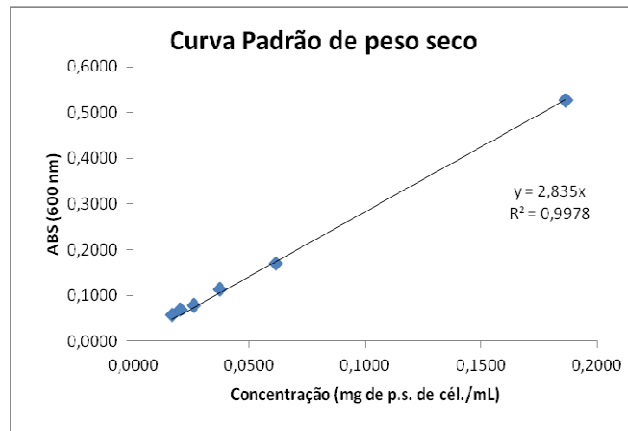


Figura 04: Curva padrão de peso seco de *C. rugosa*.

Tabela 12: Quantificação de crescimento celular para todos os ensaios.

Ensaio	Média Abs	DP	CV(%)	Biomassa (mg/mL)
1	0,134	0,0021	1,53	2,37
2	0,110	0,0045	4,13	2,33
3	0,267	0,0401	15,05	18,81
4	0,128	0,0019	1,47	2,26
5	0,150	0,0052	3,51	2,64
6	0,317	0,0228	7,18	22,36
7	0,097	0,0094	9,65	2,06
8	0,165	0,0105	6,39	2,90
9	0,184	0,0083	4,53	12,98
10	0,166	0,0237	14,25	2,35
11	0,281	0,0102	3,63	4,96
12	0,211	0,0215	10,18	14,86
13	0,125	0,0042	3,34	1,77
14	0,113	0,0037	3,31	1,59
15	0,211	0,0124	5,86	2,98
16	0,183	0,0118	6,43	12,91
17	0,210	0,0029	1,40	2,96
18	0,198	0,0030	1,53	2,79
19	0,202	0,0029	1,42	2,85

Podemos observar na tabela 12 que entre as triplicatas os desvios encontrados foram baixos, variando de 0,0021 a 0,0401. Os coeficientes de variação também apresentaram valores baixos, sendo o maior valor observado no ensaio 3, com cerca de 15% e o menor observado no ensaio 19, com cerca de 1,4%. Baixos

valores de desvio padrão e coeficiente de variação indicam baixa dispersão das triplicatas em torno da média.

7.1.6 Determinação de proteína

Para a determinação da concentração de proteína foi elaborada uma curva padrão a fim de se obter a concentração de proteínas existente em amostras desconhecidas. A figura 05 apresenta a curva padrão obtida e a tabela 13 apresenta a média das absorbâncias obtidas por ensaio, DP, CV e concentração de proteína.

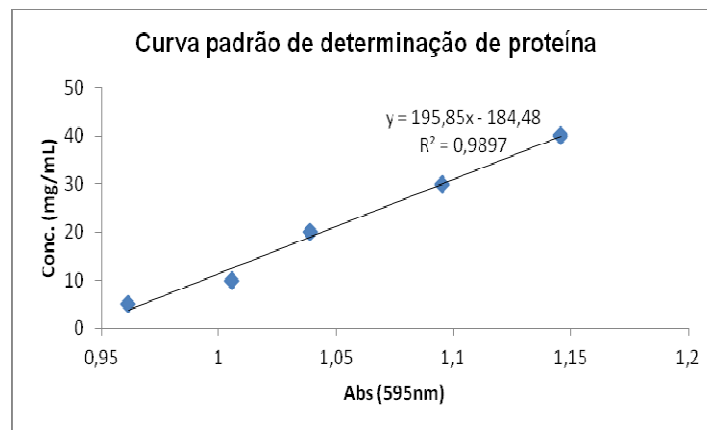


Figura 05: Curva padrão de determinação de proteína.

Tabela 13: Determinação da concentração de proteína por ensaio.

Ensaio	Média Abs	DP	CV(%)	ptn (mg/mL)
1	0,989	0,006	0,623	9,22
2	0,981	0,010	1,009	7,65
3	0,999	0,007	0,698	33,52
4	0,982	0,011	1,135	7,78
5	0,986	0,013	1,328	8,69
6	1,019	0,008	0,813	45,27
7	0,979	0,007	0,757	7,19
8	0,997	0,018	1,842	10,85
9	0,985	0,010	1,058	25,30
10	0,978	0,009	0,872	7,06
11	1,007	0,010	1,013	12,81
12	0,992	0,014	1,406	29,41
13	0,975	0,005	0,558	6,41
14	0,972	0,006	0,572	5,95
15	1,011	0,019	1,850	13,46
16	0,973	0,007	0,746	18,25
17	1,001	0,017	1,723	11,63
18	0,995	0,010	0,993	10,33
19	0,999	0,020	1,980	11,11

Os ensaios de determinação da concentração de proteína foram os que apresentaram os menores valores de desvio padrão (entre 0,005 e 0,020) e coeficiente de variação (entre 0,5% e 1,9%) o que indica baixa dispersão das triplicatas em torno da média.

7.1.7 Determinação da atividade da protease

Para a determinação de atividade enzimática da protease foram selecionados apenas alguns ensaios. A tabela 14 apresenta a média das absorbâncias por ensaio, DP, CV e atividade.

Tabela 14: Atividade da protease para os ensaios selecionados.

Ensaio	Média Abs	DP	CV (%)	Atividade (U/mL)
1	0,158	0,0102	6,48	0,50
3	0,136	0,0165	12,19	0,32
6	0,643	0,0395	6,14	0,73
9	0,509	0,0949	18,65	1,78
12	0,266	0,0071	2,69	0,15
16	0,350	0,0213	6,10	1,39

Como podemos observar na tabela 14 que foram obtidas baixas atividades, variando de 0,15 para o ensaio 12 e 1,39 para o ensaio 16. Os desvios padrões também foram baixos (entre 0,0071 e 0,0949) e coeficientes de variação mais altos quando comparados com os ensaios anteriores (entre 18,65% e 2,69%), porém ainda podem ser considerados valores baixos de coeficiente de variação indicando baixa dispersão das triplicatas em torno da média.

A análise dos desvios padrões e coeficientes de variação para os ensaios de quantificação de crescimento, atividade lipásica, determinação de proteína e atividade da protease, no geral, demonstrou baixa dispersão, o que indica uma boa repetibilidade entre as réplicas.

7.2 Discussão

A análise dos dados do planejamento permitiu observar quais fatores tiveram mais importância na produção de lipase. O Tween 80 foi o fator que apresentou a maior importância dentre aqueles que apresentaram efeito positivo.

O Tween 80 é um agente tensoativo não iônico e emulsificante de origem vegetal. A finalidade inicial da utilização do Tween 80, no presente estudo, foi para tornar a fonte de carbono (azeite) mais disponível a levedura pela formação de uma emulsão. Muitos estudos apontam a importância da utilização do Tween 80 no processo de produção de lipase de diversas formas além de aumentar a desempenho da enzima.

Surfactantes são aplicados em meios de cultura para produção de lipase a fim de aumentar a área interfacial lipídio-água aumentando as taxas de reações catalisadas pelas lipases (VEERARAGAVAN, 1990). Segundo SANGEETHA *et al.* (2010), a presença do Tween 80 aumenta a produção de lipases o que pode ser atribuído a ação de emulsificação do Tween 80 facilitando a absorção do substrato.

Segundo FEITOSA (2009) os surfactantes como Triton X, Tween e Polietilenoglicol (PEG) atuam de forma específica na produção de enzimas lipolíticas, levando a uma estabilidade térmica durante o processo, a redução do tempo durante a produção e a geração de uma maior quantidade de enzimas.

ESPINOSA *et al.* (1990) realizou um estudo sobre os fatores nutricionais que afetam a produção de lipase por *Rhizopus delemar* e observou um duplo efeito do Tween que serviu como indutor devido a sua natureza química semelhante à de alguns substratos naturais, assim como surfactante atuando no estímulo a liberação da enzima no meio.

LI *et al.* (2001) realizaram um estudo de produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* utilizando Tween 80 como fonte de carbono e obtiveram uma atividade máxima de 25 U/mL após 6 horas de fermentação. Os autores também observaram a importância da presença do surfactante no meio de cultura comparando a fermentação na ausência de Tween 80 utilizando apenas azeite como fonte de carbono e obtiveram 2,5 U/mL de atividade.

CORZO e REVAH (1999) estudaram o efeito do Tween 80 na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. Os autores observaram que a máxima atividade lipolítica foi obtida entre as concentrações de 0,5 e 2g/L (entre 15 U/mL e 13 U/ml).

Os resultados sugerem que o Tween 80 pode estar atuando na permeabilidade da célula e, portanto, aumentando a excreção da lipase no meio. Os autores também observaram que altas concentrações de Tween 80 (acima de 2g/L) apresentou o efeito de diminuição da produção de lipase extracelular.

DALMAU *et al.* (2000) observaram efeitos semelhantes na realização de um estudo sobre o efeito de diferentes fontes de carbono para a produção de lipase por *C. rugosa*. Os autores observaram que o Tween 80 estimulou a biossíntese da lipase e excreção da enzima no meio. O meio suplementado com Tween 80 apresentou atividade enzimática de 0,4 U/mL, similar quando comparada com meios contendo outros lipídios (ácido oléico (0,4 U/mL) e trioleína (0,3 U/mL)), e baixa atividade da enzima ligada a célula (1 U/g_{cel}) indicando que a biossíntese foi seguida por sua quase completa excreção. Com isso os autores foram capazes de observar que o Tween 80, além de estimular a biossíntese da lipase (atuando como indutor) também é capaz de aumentar a permeabilidade celular facilitando assim a exportação de diversos compostos em toda a célula através de sua membrana.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o Tween 80 foi utilizado principalmente como fonte de carbono além de ter atuado como indutor na produção da lipase. Os ensaios onde foram obtidas as maiores atividades foram os que apresentaram a maior concentração de Tween 80 entre os níveis utilizados (4%p/v) (tabela 15).

Tabela 15: Ensaios com maior atividade lipásica e respectivas concentrações de Tween 80 em %p/v.

Ensaio	Atividade da lipase (U/mL)	Conc. Tween 80 (%p/v)
8	10,39	4
11	12,96	4
15	11,11	4

O efeito negativo do azeite em relação a produção da enzima também sugere que a levedura utilizou o Tween 80 preferencialmente como fonte de carbono. A maioria dos ensaios, onde não foi obtida atividade lipásica, apresentou as maiores concentrações de azeite entre os níveis utilizados (tabela 16).

Tabela 16: Ensaios sem atividade lipásica e suas respectivas concentrações de azeite em %p/v.

Ensaio	Atividade lipásica (U/mL)	Conc. Azeite (%p/v)
1	0	4
2	0	8
4	0	8
12	0	8

BOEKEMA *et al.* (2007), em um estudo de produção de lipase pela bactéria *Burkholderia glumae*, também observaram que o Tween 80 aumentou a produção de lipase extracelular (de 8U/mL para 12 U/mL) no meio de cultura contendo azeite como fonte de carbono. O Tween 80 induz a expressão do gene da lipase no meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono, mas não tiveram este efeito no meio contendo glicose, sugerindo que a expressão do gene da lipase está propenso a repressão catabólica.

MURALIDHAR *et al.* 2001 realizaram um estudo de comparação de duas fontes de carbono (glicose e azeite) para produção de lipase por de *C. cylindracea* (atualmente conhecida como *C. rugosa*) e observaram que a utilização do Tween 80 melhorou a produção de lipase no meio de cultura contendo azeite como fonte de carbono. Foram obtidas atividades de 17,86 U/mL no meio contendo glicose e 47,93 U/mL no meio contendo azeite.

Os resultados obtidos no presente estudo não corroboram com os resultados obtidos nos estudos citados anteriormente, uma vez que o azeite teve efeito negativo na atividade o que sugere o Tween 80 foi utilizado preferencialmente como fonte de carbono e não com a finalidade inicial que seria tornar o azeite mais disponível a levedura. Outra possível explicação para o efeito negativo do azeite seria a inibição por substrato. GORDILLO *et al.* 1998b, observaram que a produtividade específica da lipase diminui em altas concentrações de substrato, sugerindo que o excesso de substrato causa um efeito negativo na produção da lipase. Porém o resultado obtido no presente estudo aponta para a necessidade da realização de estudos comparando estes dois compostos como fonte de carbono.

Vale lembrar que o ácido oléico é o principal produto da hidrólise de indutores, como o azeite e o Tween 80 (LI *et al.* 2001; GORDILLO *et al.* 1995), que é um

composto utilizado como fonte de carbono em uma série de estudos (GORDILLO *et al.* 1998b; SÁNCHEZ *et al.* 1999; DALMAU *et al.* 2000; WEI *et al.* 2004).

A análise dos efeitos dos fatores na atividade lipásica indica que as vitaminas apresentaram efeito negativo na produção da enzima. Como podemos observar pela tabela 17 as maiores atividades da lipase foram obtidas com o menor volume de vitaminas entre os níveis testados.

Tabela 17: Volume de vitaminas utilizado nos ensaios com maiores atividades lipásicas.

Ensaio	Volume de vitaminas (µL)	Atividade Lipásica (U/mL)
8	25	10,39
11	25	12,96
15	25	11,11

Os resultados obtidos no presente estudo também sugerem que o aumento do volume de solução de vitaminas no meio de cultura apresentou um papel importante no crescimento da levedura. A partir da tabela 18 podemos observar que os ensaios que apresentaram o maior crescimento foram aqueles onde a concentração de vitaminas foi maior.

Tabela 18: Ensaios com maior crescimento celular, volume da solução de vitaminas utilizado e atividade lipásica.

Ensaio	Biomassa (mg/mL)	Volume de vitaminas (µL)	Atividade Lipásica (U/mL)
3	18,81	50	0,72
6	22,36	50	4,13
9	12,98	50	3,85
12	14,86	50	0
16	12,91	50	3,79

A tabela 18 também apresenta as atividades obtidas nestes ensaios demonstrando que o aumento da concentração de vitaminas no meio realmente não aumentou a atividade lipásica, sendo que em um destes ensaios não foi detectada atividade enzimática, corroborando com o que foi obtido no planejamento estatístico.

MONTESINOS *et al.* 2003 testaram duas soluções de vitaminas no cultivo de *C. rugosa* para produção de lipase. A solução **A** apresentava a seguinte composição (em %p/v): 0,0008 de biotina; 0,02 de tiamina e 0,0004 de inositol. A solução **B**

apresentava a seguinte composição (em %p/v): 0,0002 de biotina; 0,04 de pantotenato de cálcio; 0,0002 de ácido fólico; 0,2 de inositol; 0,04 de niacina; 0,02 de ácido p-amino benzóico; 0,04 de piridoxina; 0,02 de riboflavina e 0,04 de tiamina. Os autores observaram que a atividade da lipase não apresentou diferença em relação a utilização da solução de vitaminas A ou B, logo, a presença de uma maior variedade de vitaminas no meio de cultura não apresentou variação significativa na produção da enzima.

O sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizado como fonte de nitrogênio, foi um dos fatores que apresentou o maior efeito positivo na produção da lipase. Os resultados apontam para grande importância deste composto na produção da enzima, como podemos observar na tabela 19. Os ensaios onde não foi detectada atividade lipásica foram aqueles onde o sulfato de amônio foi utilizado em concentração mais baixa entre os níveis utilizados no planejamento.

Tabela 19: Concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em %p/v nos ensaios onde não foi detectada atividade lipásica.

Ensaio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%p/v)	Atividade Lipásica (U/mL)
1	0,1	0
2	0,1	0
4	0,1	0
12	0,1	0

TAN *et al.* 2003 também observaram que, entre as fontes de nitrogênio inorgânico testados no estudo, o sulfato de amônio foi considerado a melhor fonte de nitrogênio, pois foi capaz de aumentar a atividade de 1.100 U/mL para 3.400 U/mL.

Segundo GORDILLO *et al.* 1998b a falta de uma fonte de nitrogênio provoca uma diminuição da síntese protéica, sendo a síntese da lipase suprimida. MONTESINOS *et al.* 2003 ao realizarem um estudo de produção de lipase por *C. rugosa*, utilizando a mesma fonte de nitrogênio do presente estudo, observaram que durante a limitação de nitrogênio, não houve detecção de atividade enzimática sugerindo supressão da produção da enzima em baixas concentrações de nitrogênio. O que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. Porém, RAMANI *et al.* 2010 observaram efeito inibitório na produção de lipase por

Pseudomonas gessardii ao adicionarem 0,1%p/v de fontes de nitrogênio como peptona, sulfato de amônio, cloreto de amônio e ureia apresentando atividades de 76, 72, 67 e 54 U/ml sendo a atividade obtida sem adição destas fontes de nitrogênio de 139 U/mL.

Dados da literatura demonstram que a presença de íons metálicos no meio de cultura afeta a biossíntese da lipase (TAN *et al.* 2003; RAMANI *et al.* 2010). Compostos que geralmente são utilizados para fornecer estes íons aos microrganismos são os seguintes sais: MgSO₄, KH₂PO₄; CaCl₂ e FeCl₃.

O presente estudo demonstrou que o sulfato de magnésio (MgSO₄) e o cloreto férrico (FeCl₃) apresentaram efeito positivo na produção de lipase. A tabela 20 mostra a concentração de MgSO₄ em %p/v e volume da solução de FeCl₃ dos ensaios onde não foi detectada atividade lipásica. Podemos observar que a maioria dos ensaios apresenta as menores concentrações entre os níveis testados, sugerindo que houve limitação destes compostos no meio de cultura, o que corrobora com o que foi obtido no planejamento de que o aumento da concentração destes compostos provocou um aumento na produção da enzima de interesse.

Tabela 20: Concentração de MgSO₄ em %p/v e volume da solução de FeCl₃ em µL nos ensaios onde não foi detectada atividade lipásica.

Ensaio	MgSO ₄ (%p/v)	FeCl ₃ (µL)	Atividade Lipásica (U/mL)
1	0,02	10	0
2	0,02	30	0
4	0,02	10	0
12	0,1	10	0

JANSSEN *et al.* (1994) observaram que houve um aumento da produção de lipase por *Bacillus* sp. na presença de íons Mg⁺² e Fe⁺². SHARON *et al.* (1998) observaram que a redução de íons magnésio no meio causaram a redução da produção de lipase, por *Pseudomonas aeruginosa*, em cerca de 50% demonstrando que a presença de íons Mg⁺² estimulou a produção de lipase. Porém, RAMANI *et al.* 2010, observaram que ao adicionarem 0,1%p/v de íons Mg⁺² e Fe⁺² houve um pequeno efeito inibitório na produção da enzima.

O Fosfato de potássio (KH₂PO₄) e o Cloreto de cálcio (CaCl₂) foram compostos que não apresentaram significância estatística de acordo com o

planejamento, o que sugere que foram fatores que não tiveram influência na produção de lipase nas concentrações utilizadas nos níveis do planejamento. Como houve significância estatística nos termos de interação de segunda ordem destes dois compostos com o azeite existe uma indicação de que estes dois compostos são importantes na produção da enzima. Este fato aponta para a realização de mais estudos utilizando estes compostos em concentrações diferentes da utilizada no presente estudo. Vale lembrar que o fosfato de potássio não deve ser utilizado em concentrações muito elevadas por ser uma substância que acidifica o meio de cultura, o que dificulta o ajuste de pH.

TAN *et al.* (2003) observaram que o íon K^+ foi benéfico para a biossíntese da lipase, enquanto que o íon Ca^{+2} , que é conhecido por formar complexos com ácidos graxos ionizados alterando sua solubilidade e comportamento em interfaces óleo-água, apresentou efeito inibitório na produção de lipase. SHARON *et al.* (1998) observaram que a presença de íons Ca^{+2} não estimularam o crescimento celular e nem a produção de lipase, mas apresentaram um grande efeito estabilizador na lipase purificada.

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade da protease demonstraram que a levedura também produziu esta enzima. Como a protease hidrolisa ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, sua presença no extrato pode alterar a estabilidade da lipase dando uma indicação de que, apesar de não podermos observar um padrão de comportamento, pode ter ocorrido interferência da protease na atividade da lipase (tabela 21).

Tabela 21: Atividade da protease e atividade da lipase por ensaio.

Ensaio	Atividade da protease (U/mL)	Atividade lipásica (U/mL)
1	0,50	0
3	0,32	0,72
6	0,73	4,13
9	1,78	3,85
12	0,15	0
16	1,39	3,79

Segundo BUSSAMARA *et al.* (2010), ao realizarem um estudo de seleção de leveduras produtoras de lipase, observaram que é possível que outras proteínas

influenciem a atividade da lipase durante a fermentação, principalmente as proteases. Foi observada a presença de protease no meio de cultura após 19 hs de cultivo (2,33 U/mL), e como a atividade da lipase reduziu no período de cultivo de 19hs (de 1.232 U/L em 18 h para aproximadamente 1.000 U/L), é possível que a protease tenha sido um dos fatores responsáveis pela redução da atividade da lipase durante a fermentação.

Os resultados de crescimento e atividade lipásica, quando comparados, sugerem que não houve associação da produção da enzima com o crescimento celular (figura 06). Os ensaios que apresentaram o maior crescimento celular (ensaios 3, 6, 9, 12 e 16) não foram os que apresentaram as maiores atividades. Os ensaios que apresentaram as maiores atividades (ensaios 8, 11 e 15) apresentaram crescimento entre 2,90 e 4,96 mg/mL.

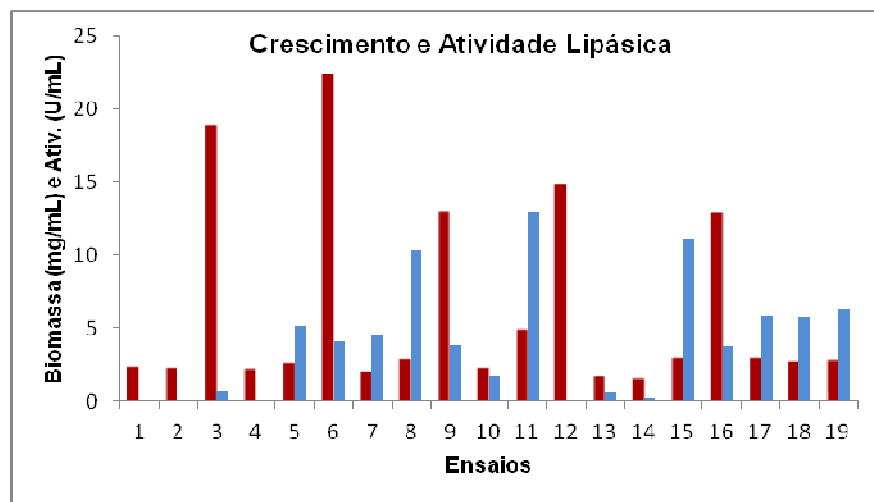


Figura 06: Gráfico de crescimento celular e atividade lipásica por ensaio. Biomassa em vermelho e atividade lipásica em azul.

MONTESINOS *et al.* (2003) observaram que existe um acúmulo de lipase dentro da célula em altas taxas específicas de crescimento, e em baixas taxas específicas de crescimento quase toda lipase foi secretada no meio de cultura. Os resultados obtidos pelos autores sugerem que existe algum passo limitante no transporte da lipase quando o ácido oléico é utilizado como única fonte de carbono aumentando a atividade da lipase ligada à célula.

GORDILLO *et al.* (1998b) observaram que a produção da lipase está associada ao crescimento celular. Foi obtida uma atividade de 58 U/mL em baixas taxas de alimentação e houve uma tendência de acúmulo da lipase dentro da célula em altas taxas de alimentação de substrato no meio de cultura. Considerando que a

produção da lipase é associada ao crescimento os autores utilizaram a estratégia de batelada alimentada e observaram que em taxas de crescimento específico baixas houve um aumento da atividade enzimática para 117 U/mL e que em taxas de alimentação constante foram atingidas altas taxas de crescimento específico e houve acúmulo da enzima dentro da célula.

Já em relação à determinação de proteína nos ensaios, podemos observar que a concentração de proteínas nas amostras foi bastante alta (figura 07), quando comparada ao crescimento celular. No entanto, não foram encontrados estudos na literatura com o mesmo tempo de pré-inóculo e tempo de cultivo e que tenham utilizado a mesma metodologia de análise de proteína a fim de se realizar uma comparação.

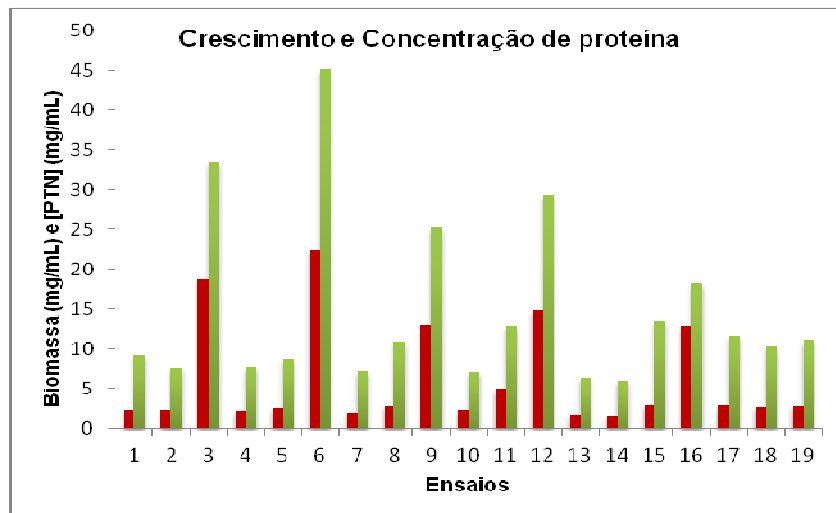


Figura 07: Gráfico de crescimento e concentração de proteína por ensaio. Biomassa em vermelho e concentração de proteína em verde.

Vale ressaltar que as amostras utilizadas na análise apresentavam aspecto leitoso, o que dificultou bastante sua determinação devido à dificuldade de se obter a diluição correta a fim de realizar a análise. Este fato nos dá uma indicação de que as amostras realmente apresentam uma alta concentração de proteínas. Uma possível explicação para as altas concentrações de proteínas nas amostras seria que os microrganismos, após um determinado tempo de cultivo tenham parado de se multiplicar, mas tenham continuado a realizar suas funções fisiológicas o que inclui a produção e excreção de enzimas e outras proteínas no meio. Todos os extratos apresentaram certa quantidade de azeite, indicando que ainda havia fonte de carbono disponível para a levedura. Outra possível explicação seria a presença de

azeite nos extratos, o que poderia causar interferência nas análises já que o método consiste na utilização de espectrofotometria. Segundo Zaia *et al.* (1998) existem diversas substâncias que podem causar interferência na análise de determinação de proteína de diversos métodos conhecidos. Segundo o mesmo autor citado anteriormente, o método de Bradford pode sofrer interferência de substâncias presentes nos extrato como: açúcares, compostos fenólicos, sulfato de amônio, detergentes, lipídios entre outras substâncias.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que os componentes que apresentaram a maior importância na produção de lipase por *C. rugosa* foram o Tween 80; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; FeCl_3 e MgSO_4 apresentados em ordem decrescente de importância. Os resultados sugerem que a levedura utilizou o Tween 80 primariamente como fonte de carbono, fato este que pode ter influenciado no efeito negativo do azeite obtido no estudo, já que dados da literatura apontam para o efeito negativo do excesso da fonte de carbono no meio para a produção da enzima. Este resultado aponta para a importância de se comparar estes dois compostos como fonte de carbono, já que os resultados obtidos no estudo indicam que a levedura tem mais facilidade de assimilar o Tween 80.

As vitaminas apresentaram efeito negativo na variável de resposta permitindo concluir que concentrações elevadas de vitaminas no meio de cultura não foram benéficas para a produção da enzima. Já os compostos KH_2PO_4 e CaCl_2 não apresentaram efeito significativo, porém seus efeitos de interação tiveram significância estatística, o que aponta para a importância da utilização de um planejamento estatístico, em estudos futuros, que permita avaliar melhor seus efeitos na produção da enzima.

Os resultados obtidos na atividade da protease também apontam a importância da realização de estudos futuros a fim de evitar a ação desta enzima na enzima de interesse. Vale lembrar que esta é uma enzima que quebra as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, propriedade esta que permite a inativação da lipase presente no extrato bruto.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo desenvolvido apresentou resultados valiosos, mas não encerra as possibilidades de investigações futuras. Pretende-se continuar os estudos abordando os seguintes pontos:

1- Otimização da composição do meio de cultura

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial fracionário permitiram avaliar a importância dos fatores principais na atividade lipásica. Para realizar a otimização da composição do meio de cultura devemos aumentar o planejamento com corridas axiais, resultando em um planejamento chamado de composto central (central composite design) que permite a elaboração de superfícies de resposta. As superfícies de respostas são utilizadas quando as variáveis de resposta são influenciadas por muitas variáveis independentes e são ferramentas importantes quando o objetivo é a otimização de um processo.

2- Protease

Os resultados também apontaram a presença de protease no extrato bruto, logo se pretende realizar um estudo de utilização de substâncias inibidoras de protease com a finalidade de evitar a degradação da lipase durante o processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, P. F. F. 2007. “**Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico**”. Tese de doutorado (Doutor em Ciências), Escola de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

ALI, S.; RAFI, H.; HAQ, I. Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design. **Engineering in Life Sciences**, v.10, n. 5, p. 465–473, 2010.

ALONSO, F.O.M. 2001. “**Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**”, Dissertação (Mestre em Ciências), Departamento de Fármacos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2001.

ALONSO, F.O.M. et al. “Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels”. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 9-18, 2005.

AKOH, C.C.; LEE, G.; SHAW, J. Protein Engineering and Applications of *Candida rugosa* Lipase Isoforms. **Lipids**, v.39, n. 6, p. 513-526, 2004.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties – A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15 – 29, 2010.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. **Bioresource Technology**, v. 55, p.167-170, 1996.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Enhancement of lipase production during repeated batch culture using immobilized *Candida rugosa*. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 5, p. 437-440, 1997.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology. **Yeast**, v.14, p. 1069–1087, 1998.

BOARETO, A. J. M. et al. A hybrid neural model (HNM) for the on-line monitoring of lipase production by *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 319–327, 2007.

BOEKEMA, A.B. et al. Hexadecane and Tween 80 Stimulate Lipase Production in *Burkholderia glumae* by Different mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n.12, p. 3838–3844, 2007.

BOUSQUET, M. et al. Lipase-catalyzed α -butylglucoside lactate synthesis in organic solvent for dermo-cosmetic application. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 61–69, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. "Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design". **Bioresource Technology**, v.91, p. 77–84, 2004.

BUSSAMARA, R. et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 268–275, 2010.

BROCK, T. D. et al. **Biology of Microorganisms**. 7. ed. New York: Prentice-Hall International, 1994.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Editora Lidel. Lisboa – Porto – Coimbra, 2003.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro. E-Papers, 2003.

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n.5, p. 520-529, 1998.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

COELHO, M. A. Z; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. 1^a edição. Rio de Janeiro: EPUB, 2008. ISBN: 978-85-87098-83-2.

COMBS, G. F. **The Vitamins - Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. 3^a edição. Ithaca, New York: Elsevier Academic Press, 2008. ISBN-13: 978-0-12-183493-7

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v.22, n. 6, p. 863-871, 1999.

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

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2006.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657–663, 2000.

DALMAU, E. et al. Study of the drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. **Journal of Biotechnology**, v 59, p. 183–192, 1998.

DEACON, J. W. **Modern Micology**. 3. ed. Oxon – New York: Blackwell Science, 1997. ISBN: 0-632-03077-1.

DE LA CASA, R. M. et al. Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 30–40, 2002.

DIAZ, J. C. M. et al. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DIAZ, F. R.; LOPEZ, F. J. B. **Bioestatística**. Editora Thomson Learning. São Paulo, 2007. ISBN: 85-9732-341-6

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Energy**, v.32, p. 1274-1278, 2008.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; Marty A. Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using a continuous solvent-free process. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 117–124, 2002.

Enzyme Nomenclature. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> Acesso em: 10 abr. 2011, 10:30.

ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRES, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delamer* CDBB H313. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 3, p. 209-214, 1990.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 5ª edição. Springer-Verlag: Berlin /Heidelberg, 2004. ISBN:978-3-642-17392-9.

FADILUĞLU, S.; ERKMEN, O. Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by *Candida rugosa*. **Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences**, v. 26, p. 246-254, 2002.

FEITOSA, I. C. 2009. “**Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**”, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2009.

FEOFILOVA, E. P.; SERGEEVA, Y. E.; IVASHECHKIN, A. A. Biodiesel Fuel: Content, Production, Producers, Contemporary Biotechnology (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 369–378, 2010.

FERRER, P. et al. Production of Native and Recombinant Lipases by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, p. 221-255, 2001.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v.74, n. 6, p. 621 – 634, 1997.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K.. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**, v. 43, P. 1040–1046, 2008.

GORDILLO, M. A. et al. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 38–4, 1995.

GORDILLO, M. A. et al. Enhancement of *Candida rugosa* Lipase Production by Using Different Control Fed-Batch Operational Strategies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 2, p. 156–168, 1998a.

GORDILLO, M. A. et al. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 131–142, 1998b.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 edição. New York: Wiley-Liss, 1994. ISBN: 0-471-16615-4.

GUAN, F. et al. Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1677–1682, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2,, p. 235-251, 2006.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f.hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p. 80-87; 1999.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinium in Biotechnology**, v.13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JANSSEN, P. H.; MONK, C. R.; MORGAN, H.W. A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its p-nitrophenyl-palMITate esterase activity. **FEMS Microbiology Letters**, v.120, n. 1-2, p. 195–200, 1994.

JI, Q. et al. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 264–269, 2010.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.

KENG, P.S. et al. Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. **Industrial crops and products**, v. 29, p. 37–44, 2009.

KUMAR, S. et al. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n.1, p. 38–44, 2005.

LI, C.-Y.; CHENG, C.-Y.; CHEN, T.-L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 258–263, 2001.

LINKO, Y.-Y. et al. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41–50, 1998.

LIU, J.; XU, J; HU, Y. Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , v. 10, p. 523–529, 2000.

LIU, Z. et al. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 445–451, 2008.

LORENZETTI, D. L. 2007. “**Estudos de aplicação de lipases em formulações cosméticas**”, Dissertação (Mestre em Química), Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2007.

LOTTI, M. et al. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 143–148, 1998.
MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology** 1999, v.70, p. 1-15.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK**. Prentice-Hall. 10ª edição, 2010. ISBN 13: 9788587918512

MAIA, M.M.D. et al. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic Fungus *Fusarium Solani* Fs1. **Revista de Microbiologia**, v.30, p. 304-309, 1999.

MENDES, A.A. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p. 296-305, 2005.

MURALIDHAR, R.V. et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 17–23, 2001.

MENEZES, E. A. et al. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MITA, L. et al. Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 133–141, 2010.

MONTESINOS, J.L. et al. Improvement of lipase productivity in bioprocesses using a structured mathematical model. **Journal of Biotechnology**, v. 52, p. 207–218, 1997.

MONTESINOS, J. L.; DALMAU, E.; CASAS, C.. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p. 753–761, 2003.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 4ª edição. LTC. 2009. ISBN: 9788521616641

OTA, Y.; MIYAIRI, S.; YAMADA, K. Sterol requirement for the lipase production by *Candida cylindracea*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 1476–1478, 1968.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolic production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 93-99, 2006.

PAULIUKAITE, R. et al. Application of room temperature ionic liquids to the development of electrochemical lipase biosensing systems for water-insoluble analyte. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n (1-2), p. 96-101, 2011.

PASTORE, G.M.; COSTA, V.S.R.; KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p. 135-140, 2003.

PINTO, G. A. S. 1998. “**Produção de uma mistura enzimática hidrolítica por *Aspergillus niger* 3T5B8 em fermentação submersa**”. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química/UFRJ – Rio de Janeiro, 1998.

RAHMAN, N. F. A. et al High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2168–2176, 2011.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 643-655, 2007.

RAMANI, K. et al. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1683–1691, 2010.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975–3981, 2008.

RAO, P. V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C. M. Production of Lipase by *Candida rugosa* in Solid State Fermentation. 2: Medium Optimization and Effect of Aeration. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 391-395, 1993.

REDDY, R. R. K.; CHADHA, A.; BHATTACHARYA, E.; Porous silicon based potentiometric triglyceride biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p. 313–317, 2001.

REDDY, R. R. K. et al. Estimation of triglycerides by a porous silicon based potentiometric biosensor. **Current Applied Physics**, v. 3, p. 155–161, 2003.

SABEDER, S.; HABULIN, M., KNEZ, Z. Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 880–886, 2006.

SÁNCHEZ, A. et al. Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 214–223, 1999.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* vsg1: Production, purification and characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 179-185, 2010.

SAND, W. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates - A general mechanistic Overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 40, n. 2, p. 183–190, 1997.

SAXENA, R. K. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.

SETZU, S. et al. Porous silicon-based potentiometric biosensor for triglycerides. **Physica status solidi (a)**, v. 204, n. 5, p. 1434–1438, 2007.

SCHMID R.D., VERGER R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v.37, n. 12, p.1608 – 1633,1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHARON, C. et al. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.20, n. 5, p. 304–307, 1998.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.17, p. 133 –142, 2002.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. (1-3), p. 745-757, 1999.

TAMALAMPUDI, S. et al. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 185–189, 2008.

TAN, T. et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TAKAÇ, S.; UNLU, A. E.; ERDEM, B. Oxygen transfer strategy modulates the productions of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 150–154, 2010.

VALERO, F. et al. Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n.5, p. 399–401, 1991.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, n.1, p. 69-85, 2006.

VEERARAGAVAN, K. A Simple and Sensitive Method for the Estimation of microbial Lipase Activity. **Analytical Biochemistry**, v. 186, p. 301-305, 1990.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases - Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32–38, 1997.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113–148, 2000.

VILLENEUVE, P. Plant Lipases and Their Applications in Oils and Fats Modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 6, 308-317, 2003.

YANG, G. et al. Enantioselective resolution of 2-(1-hydroxy-3-butenyl)-5-methylfuran by immobilized lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 847–853, 2009.

YOUNIS, I. R. et al. Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, p. 97–102, 2009.

WANG, L.; YANG, S. Solid State Fermentation and Its Applications. In: YANG, S.-T. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. 1a Edição. ed. [S.l.]: Elsevier, 2007. Cap. 18, p. 465-489.

WANG, L. et al. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 495-501, 2007.

WEI, D.; ZHANG, L.; SONG, Q. Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *Candida rugosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p.133–136, 2004.

WITHERS-MARTINEZ, C. et al. A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity: crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. **Structure**, v. 4, n. 4, p. 1363–1374, 1996.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZAREVÚCKA, M. et al. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 481–486, 2005.