ESTUDO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE ESTRESSE ELETROQUÍMICO EM CULTIVOS DE LEVEDURA

ANDRÉ ALANN CATARINO DE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Ofelia de Queiroz Fernandes Araujo, PhD

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

ESCOLA DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
2009

ESTUDO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE ESTRESSE ELETROQUÍMICO EM CULTIVOS DE LEVEDURA

André Alann Catarino de Oliveira

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em ciências.

Aprovada por:

Orientadores

_____

Prof[a]. Ofélia de Queiroz Fernandes Araujo, PhD

_____

Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc

Banca Examinadora

_____

Prof[a]. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

_____

Prof[a]. Celuta Sales Alviano, D. Sc.

_____

Prof[a]. Priscilla Vanessa Finotelli, D. Sc.

Rio de Janeiro, R.J. - Brasil

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

OLIVEIRA, ANDRÉ ALANN CATARINO DE

ESTUDO FISIOLÓGICO E MORFOLÓGICO DA APLICAÇÃO DE ESTRESSE ELETROQUÍMICO EM CULTIVOS DE LEVEDURA – [Rio de Janeiro] 2009.

xix, 101 p. 29,7 cm . Numero de paginas e tamanho da pagina

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2009.

1. *Saccharomyces cerevisiae*; 2. *Yarrowia lipolytica*; 3. Lipase; 4. etanol; 5. estresse eletroquímico.

I. EQ/UFRJ.

II. Título (série)

DEDICATÓRIA

"*Sendo o fim doce, que importa que o começo amargo fosse? Bem está o que acaba...*"

Hamlet

"Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada."

Albert Einstein

"Se você quer ter boas idéias, você precisa ter muitas idéias. A maioria delas estará errada, o que você precisa aprender é quais delas deve descartar."

Linus Pauling

"Se o conhecimento pode criar problemas, não é através da ignorância que podemos solucioná-los."

Isaac Asimov

Àquela que estará sempre ao meu lado em
todos os momentos, À Minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida;

A meus pais, João e Lucinda, pelo amor e confiança, bem como por todo o investimento na minha formação profissional e humana.

A todos os colegas do Laboratório 103 que colaboraram com a realização deste trabalho.

Ao amigo Cauê, pela determinação e profissionalismo ao trabalho, contando muitas cicatrizes e auxiliando nas dúvidas em Matlab, colaborando muito para a realização deste trabalho.

Ao Carlos André por ter-me apresentado ao mundo da Engenharia Bioquímica e ao estresse celular.

A Mariana pela preocupação e por se fazer presente em qualquer momento ou circunstância, sempre pronta a ajudar.

A Thiana pelo auxílio nos momentos mais difíceis, pela calma, paciência e pelas, sempre presentes, palavras de incentivo, tendo tornado-se uma grande amiga.

Ao Rafael Tini, pela amizade e paciência nos auxílios em programação, além de ser um excelente orientado e incentivador de minha capacidade.

A Thalita, aluna de suma importância, pela sua dedicação, gana de aprender, inteligência e perspicácia. Obrigado por confiar na minha capacidade e motivar a busca por mais conhecimentos para nosso desenvolvimento mútuo.

Aos meus amigos tanto de dentro como de fora da universidade por todo o apoio e compreensão pelos momentos de ausência.

A minha irmã e a toda minha família pela força e compreensão nos dias mais difíceis, mesmo nos finais de semana em que estive ausente.

A Profª Maria Alice, que mesmo não sendo minha orientadora oficialmente, sempre colaborou para a minha formação profissional e esteve presente em todos os momentos da realização desse trabalho. Receba o meu respeito e admiração. Conto sempre com sua orientação.

Agradeço as minhas orientadoras:

À Ofélia pela orientação e paciência na realização desse trabalho.

À Priscilla: Uma página seria pouco para relatar sua importância. Além de afilhada de casamento, é a pessoa que mais acreditou e confiou em mim e no meu trabalho. Uma amiga para todas as horas e momentos, uma professora com uma capacidade imensurável e uma mulher de garra, força, raça e fibra. Um exemplo de superação, de inteligência e de profissionalismo. Seus conhecimentos me fizeram compreender diversos fatores. Em resumo agradeço pela confiança e por toda a amizade em mim depositada.

Resumo da dissertação apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.).

André Alann Catarino de Oliveira

Setembro/2009

Orientadores: Prof[a]. Ofelia de Queiroz Fernandes Araujo
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca do Amaral

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular, pois seu metabolismo, semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) tornam este microorganismo uma valiosa ferramenta de estudo do metabolismo e fisiologia celular. Esta levedura destaca-se por realizar uma rápida conversão de açúcar a etanol e CO_2. O controle da concentração inicial de açúcar em valores baixos impede a fermentação, porém elevados valores de concentração promovem a repressão catabólica, acompanhada da diminuição do rendimento em biomassa. Há um interesse especial em controlar fluxos metabólicos bem como avaliar a relação entre o consumo de glicose e o ciclo celular, que é determinado pelo número de divisões que a levedura realizou, através das cicatrizes de quitina deixadas pelo processo de gemulação. *Yarrowia lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia com alta capacidade de gerar produtos de alto valor agregado (grande interesse industrial) como lipases, ácido cítrico e proteínas unicelulares, além de várias enzimas como lípases, proteases, esterases e fosfatases. Atualmente a utilização mais importante dessa levedura é a produção de lipases devido à ampla aplicabilidade desse produto, como por exemplo, degradação de óleos e gorduras. Células de *Y. lipolytica* apresentam lipases extracelulares e ligadas à célula. Células eucarióticas podem responder a uma variedade de estresses ambientais tais como disponibilidade de nutriente, entre outras (pH, temperatura, agitação, etc.). Respostas celulares a estresse elétrico foram estudadas no presente trabalho. Foi constatado através dos resultados uma melhoria no consumo de substrato e "excreção" de lipase e etanol. Além disso, notou-se que esse tipo de estresse não prejudica a viabilidade celular.

Abstract of a Final Project presented to EQ/ UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

André Alann Catarino de Oliveira

September/2009

Supervisors: Prof[a]. Ofelia de Queiroz Fernandes Araujo
Prof[a]. Priscilla Filomena Fonseca do Amaral

Programe: Technology of Chemical and Biochemical Processes

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the best models of unicellular eukaryotic system, because your metabolism, similar to higher eukaryotes, with their own mechanisms of metabolic activation (cytochrome P450) make this organism a valuable tool for studying the cellular metabolism and physiology. This yeast stands out for producing a rapid conversion of sugar to ethanol and CO_2. The control of the initial concentration of sugar in low values prevent fermentation, but high concentration values promote catabolite repression, accompanied by a decrease in biomass yield. There is a special interest in controlling metabolic fluxes and to evaluate the relationship between the consumption of glucose and the cell cycle, which is determined by the number of divisions that yeast made by the chitin scars left by the process of budding. *Yarrowia lipolytica* is a strictly aerobic yeast with high ability to produce products of high added value (large industrial interest) as lipases, citric acid and single cell proteins, and various enzymes such as lipases, proteases, esterases and phosphatases. Currently the most important use of this yeast is the production of lipase due to the wide applicability of this product, such as degradation of oils and fats. Cells *Y. lipolytica* lipases present and connected to the cell. Eukaryotic cells can respond to a variety of environmental stresses such as nutrient availability, among others (pH, temperature, agitation, etc.). Cellular responses to electric stress were studied in the present work. It was found through the results an improvement in consumption of substrate and "excretion" of lipase and ethanol. Moreover, it was noted that this kind of stress does not affect cell viability.

ÍNDICE GERAL

Capítulo I - Introdução 1
Capítulo II - Objetivos: 3
Capítulo III - Revisão Bibliografica 4
III.1 Leveduras 4
III.1.1 Características gerais 4
III.1.2 Importância econômica das leveduras 5
III.2 Yarrowia lipolytica 5
III.2.1 Lipases 8
III.3 Saccharomyces cerevisiae 27
III.3.1 Ciclo Celular 28
III.4 Estresse Celular 31
III.4.1 Estresse eletroquímico 31
Capítulo IV - Metodologias Experimentais 34
IV.1 Microrganismos 34
IV.1.1 Preservação 34
IV.1.2 Cultivos 34
IV.1.3 Experimentos em Biorreator 35
IV.1.4 Esterilização 38
IV.2 Métodos Analíticos 38
IV.2.1 Quantificação do Crescimento Celular 38
IV.2.2 Determinação de Glicose 39
IV.2.3 Determinação de Etanol 40
IV.2.4 Determinação da Atividade Lipásica 41
IV.3 Caracterização da Morfologia e Viabilidade Celular 42
IV.3.1 Análise de Imagem 42
IV.3.2 Epifluorescência com alaranjado de acridina 45
IV.3.3 Epifluorescência com Calcofluor 46
Capítulo V - Resultados e Discussões 48
V.1 *Saccharomyces cerevisiae* 48
V.1.1 Modelagem Matemática do cultivo DE *S. cerevisiae* 48
V.1.2 Morfologia Celular 58
V.2 *Yarrowia lipolytica* 61
V.2.1 Modelagem matemática do cultivo de *Y. lipolytica* 61
V.2.2 Produção de lipase 69

V.2.3 *Morfologia Celular*.....70

Capítulo VI - Conclusões..... 74
Capítulo VII - Bibliografia..... 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III-1:Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* baseada no modelo construído para lipase de Burkholderia cepacia usando o raio-X coordenado determinado. Fitas- β são representadas como flechas (vermelho amarronzado) e α-hélices como rolo (azul e amarelo); a hélice amarela pode formar uma "tampa" sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão marcados, e a posição potencial do íon Ca2+ é indicada pela bola verde (Jaeger and Reetz, 1998). 10
Figura III-2. Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado formando glicerol e ácidos graxos, ou a reação contrária (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos formando triacilglicerois (Jaeger *et. al.*, 2002 e Jaeger *et. al.*, 1998) 11
Figura III-3: Ciclo Celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira *et al.* 2005) 29
Figura IV-1: Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L. 36
Figura IV-2: Gráfico para exemplificar os experimentos 37
Figura IV-3: Reator Bioeletroquímico 37
Figura IV-4: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000. 39
Figura IV-5: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000. 39
Figura IV-6: Esquema do procedimento da técnica de Análise de Imagem para a obtenção das propriedades individuais das células de levedura *Yarrowia lipolytica* (foi utilizada nessa dissertação medidas de Fmáx/Fmin) 44
Figura IV-7: Exemplo de imagem com células de *Y. lipolytica* com alaranjado de acridina 45
Figura IV-8: Imagem obtida de *Saccharomyces cerevisiae* corada com calcofluor 46
Figura V-1: Perfis de crescimento celular obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 54
Figura V-2: Perfis de consumo de substrato obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 55
Figura V-3: Perfis de produção de etanol obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 56
Figura V-4: Perfis de consumo de oxigênio obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 57
Figura V-5: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes em experimentos conduzidos a 275 rpm. 58
Figura V-6: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes em experimentos conduzidos a 400 rpm. 59
Figura V-7: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes ao final dos experimentos controle e com potencial conduzidos a 275 rpm. 60
Figura V-8: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes ao final dos experimentos controle e com potencial conduzidos a 400 rpm. 60

Figura V-9: Perfis de crescimento celular obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 66
Figura V-10: Perfis de consumo de substrato obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 67
Figura V-11: Perfis de consumo de oxigênio obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente. 68
Figura V-12: Atividade da lipase extra-celular de *Y.* lipolytica ao longo do experimento nas 3 condições experimentais estudadas (controle, com estresse de 0.75V e 1V) 69
Figura V-13: Perfil de Imagem para *Yarrowia lipolytica* no início dos experimentos (controle, 0,75V e 1V) 70
Figura V-14: Perfil de Imagem para *Yarrowia lipolytica* ao final dos experimentos (controle, 0,75V e 1V) 71
Figura V-15: Relação percentual (entre o 3º e o 1º dia) contra circularidade em *Yarrowia lipolytica* ao final dos experimentos (controle, 0,75V e 1V) 72
Figura V-16: Histograma de distribuição de percentual de células vivas ao longo dos dias de experimento. 73
Figura V-17: Histograma de distribuição de percentual de células mortas ao longo dos dias de experimento. 73

ÍNDICE DE TABELAS

TabelaIII-1: Aplicações industriais de lipases 16
Tabela V-1: Modelos avaliados para *Saccharomyces cerevisiae* 49
Tabela V-2: Número de pontos experimentais, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, para Concentração de: substrato, celular, etanol e oxigênio dissolvido ao longo de todos os experimentos estudados 51
Tabela V-3: Resumo das condições experimentais realizadas com *Saccharomyces cerevisiae* 51
Tabela V-4: Parâmetros obtidos em experimentos utilizando *S.* cerevisiae através do modelo proposto com o auxilio do programa *MATLAB 7.1 (The Mathworks Inc.)* 53
Tabela V-5: Modelos avaliados para *Y. lipolytica* 62
Tabela V-6: Número de pontos experimentais, utilizando *Y. lipolytica*, para Concentração de: substrato, celular e oxigênio dissolvido ao longo de todos os experimentos estudados 63
Tabela V-7: Resumo das condições experimentais dos experimentos realizados com *Yarrowia lipolytica* 64
Tabela V-8: Parâmetros obtidos em experimentos utilizando *Y. lipolytica* através do modelo proposto com o auxilio do programa *MATLAB 7.1 (The Mathworks Inc.)* 65

Capítulo I - Introdução

A maioria dos bioprocessos de interesse industrial envolve o cultivo de microrganismos e o acúmulo de seus produtos, como antibióticos, vitaminas, enzimas, ácido acético, ácido cítrico, entre outros.

Nas últimas décadas observou-se um aumento maciço no uso de leveduras como modelo de organismo eucarioto para o estudo de fenômenos celulares fundamentais, em parte devido ao aumento dos conhecimentos a cerca de seu genoma, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae* que é mais amplamente utilizada e por isso categorizada no grupo das leveduras "convencionais". Além disso, leveduras consideradas "não-convencionais", diferenciando-se fisiológica, morfológica e geneticamente dos modelos tradicionais, vêm também ganhando espaço. A levedura *Yarrowia lipolytica* é a espécie mais estudada do grupo das leveduras "não-convencionais" principalmente por não apresentar patogenicidade (Barth e Gaillardin, 1997; Fickers *et al*., 2005). Atualmente tem sido utilizada como modelo para o estudo de excreção protéica, biogênese de peroxisoma, dimorfismo (Kawasse *et al*., 2003), degradação de substratos hidrofóbicos e em muitos outros aspectos (Fickers *et al*., 2005). Recentemente, a sequência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma (Fickers *et al*., 2005).

Yarrowia lipolytica é uma levedura estritamente aeróbia e apresenta dimorfismo, ou seja, a habilidade de crescer tanto na forma redonda, como em pseudo-hifas, se diferindo dos modelos tradicionais, como *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, possui a capacidade de gerar produtos de grande interesse industrial como lipases, ácido cítrico e proteínas unicelulares. A utilização mais importante dessa levedura é a produção de lipases devido à ampla aplicabilidade desse produto, essas lipases são de origem tanto intra quanto extracelular (Ota *et al.,* 1982). Porém essa levedura também secreta outras enzimas, como proteases, esterases e fosfatases.

Células eucarióticas podem responder a uma variedade de estresses ambientais tais como disponibilidade de nutriente, entre outras (pH, temperatura, etc.). Respostas celulares quando submetidas a estresse elétrico têm sido estudadas em Biotecnologia (Bartlett *et al*., 1997), técnicas bioanalíticas (Lötzbeyer *et al.,* 1996; Ci *et al*., 1997; Gheorghiu e Asami, 1998) e com propósitos médicos (Chen *et al.,* 1998; Veiga *et al*., 2005).

Campos magnéticos de baixa freqüência (300 Hz) e baixa intensidade (menos de 1 Gauss) induzem variações no comportamento celular muito semelhantes com as

obtidas ao aumentarmos a temperatura do meio (choque térmico). Entre essas alterações podemos citar uma maior produção da Hsp70; uma indução à expressão dos genes de estresse; estímulo a resistência temporária das células a outras formas de estresse. (Goodman, R., Blank, M. 1998).

É interessante notar que campos magnéticos vêm sendo usados desde a década de 70 para a cura de ossos fraturados não unidos. Essa técnica promove um grande aumento na concentração das Hsp das células das cartilagens, tendo por tanto sua explicação teórica baseada no estresse por campo magnético (Goodman, R., Blank, M. 1998).

Araujo *et al*., 2004 avaliaram a magnitude do potencial elétrico a ser aplicado e demonstraram que uma baixa tensão aplicada por períodos maiores de tempo (acima do tempo de geração da célula) possibilita uma maior permeação de nutrientes para o interior das células de *Saccharomyces cerevisiae*. A utilização do potencial também conduziu a alterações no ciclo celular, na taxa de consumo de açúcar e no perfil temporal na produção de etanol (Rocha-Leão *et al.* 2005).

Adicionalmente, Araujo *et al*. (2004) constataram oscilações na cultura de *Saccharomyces cerevisiae* quando submetida a estímulos elétricos. Os autores observaram por microscopia óticas células menores quando a cultura era submetida a crescimento sob potencial elétrico se comparada a experimentos controle (sem aplicação de potencial). Operando com bateladas com cortes, o maior consumo de glicose após a 2ª batelada também foi observado (Oliveira *et al*., 2007).

Portanto é bastante plausível propor-se que a aplicação do campo elétrico a uma célula viva promova respostas metabólicas semelhantes àquelas ligadas a outros tipos de estresses.

Neste trabalho estudou-se o efeito da aplicação do potencial elétrico no cultivo de duas leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica*, visando aumento da produção de etanol e a melhoria da produção de lipase, respectivamente.

Capítulo II - Objetivos:

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do potencial eletroquímico em dois diferentes tipos de leveduras (Saccharomyces cerevisiae *e* Yarrowia lipolytica*), visando à melhor produção de etanol e lipase respectivamente, utilizando para a monitoração do processo parâmetros morfológicos e fisiológicos.*

Os objetivos específicos foram:

a) Para *Yarrowia lipolítica*, avaliação dos dois diferentes tipos de potenciais elétricos aplicados (0,75 V e 1,0 V) em comparação com o controle, através de:

- Análise do crescimento celular.
- Análise do consumo de substrato.
- Análise da produção de lipase.
- Estudo da viabilidade celular ao longo do experimento.
- Estudo da formação de hifas ao longo do experimento.

b) Para *Saccharomyces cerevisiae*, avaliação da aplicação de potencial elétrico em comparação com o controle, através de:

- Análise do crescimento celular.
- Análise do consumo de substrato.
- Análise da produção de etanol.
- Avaliação morfológica do ciclo celular.

Capítulo III - Revisão Bibliografica

III.1 LEVEDURAS

III.1.1 Características gerais

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino Fungi. São caracteristicamente esféricas ou ovais. Apresentam, parede celular, nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, e ausência de motilidade, entre outras. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão, não serem filamentosas e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman e Fell, 1998).

São microrganismos capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, podendo utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons, o que os torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais. Na ausência de oxigênio as leveduras fermentam os carboidratos e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo úteis em processos industriais principalmente na área de alimentos (Aidoo *et al* ., 2006; Moreno-Arribas e Polo, 2005).

Quanto à composição química das leveduras, elas apresentam de 68% a 83% de água além de substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas, minerais entre outros. Assim como qualquer forma de vida, as leveduras necessitam de fatores físicos e químicos importantes indispensáveis para seu crescimento e reprodução. Alguns elementos são basicamente necessários, como água, fontes de carbono e nitrogênio, oxigênio e minerais (Tortora *et al.,* 2002).

Madigan *et al.* (2007) demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono orgânico para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como a glicose, frutose e manose são assimiladas pela maioria das espécies estudadas, enquanto que alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies. O carbono pode ser fornecido às leveduras na forma de açúcar, aldeídos, sais de alguns ácidos orgânicos, glicerina ou etanol, e ocasionalmente de alguma outra forma, dependendo do tipo da levedura. Ao considerar os açúcares como fonte de carbono, é

importante lembrar a diferença que existe entre a capacidade de uma levedura em assimilar um açúcar e sua capacidade de fermentar o mesmo açúcar.

Diferenças na fermentação e assimilação de compostos de carbono são critérios importantes na taxonomia e identificação de leveduras, pois estes microrganismos apresentam uma variação na habilidade de fermentação de açúcares. Alguns grupos apresentam fermentação vigorosa da glicose como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces, Torulaspora* e *Zygosaccharomyces*, enquanto outros, como *Lipomyces* e *Sterigmatomyces* são estritamente não-fermentativos (Walt and Yarrow, 1984).

III.1.2 Importância econômica das leveduras

A importância industrial das leveduras vem se estendendo além da fermentação tradicional. Atualmente, os produtos da biotecnologia a partir de leveduras afetam muitos setores comerciais importantes, como as indústrias de alimentos, bebidas, biocombustíveis, produtos químicos, enzimas industriais, produtos farmacêuticos, produtos agrícolas e o ambiente. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de álcool etílico, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo. Esta suposição está baseada no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela produção dos principais produtos de fermentação (em termos de tonelagem mundial por ano), isto é, 60 milhões de toneladas de cerveja, 30 milhões de toneladas de vinho, 800.000 toneladas de proteína microbiana (SCP – single cell protein) e 600.000 toneladas de fermento de pão (Pretorius *et al.,* 2003).

O consumo de alimentos fermentados vem aumentando desde a década de 1970, e inclui alimentos como produtos lácteos (iogurtes, queijos, soro de leite), salsichas, bebidas fermentadas alcoólicas, vegetais, frutas, molhos, entre outros. Um dos motivos do aumento do consumo é que estes alimentos são considerados naturais e saudáveis (Giraffa, 2004).

III.2 Yarrowia lipolytica

Yarrowia lipolytica é um microrganismo estritamente aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomicetos, subclasse Hemiascomicetos, anteriormente conhecida como *Candida lipolytica* pertencente à família Dipodascaceae. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como

Endomycopsis lipolytica, *Saccharomycopsis lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (Barth e Gaillardin, 1997).

É uma espécie das chamadas leveduras "não-convencionais", cuja pesquisa científica e tecnológica está em plena ascensão. Consiste em um interessante objeto de estudo para a pesquisa básica devido às várias lacunas existentes no conhecimento de seu metabolismo, diferentemente do que ocorre com as leveduras convencionais *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Paralelamente, seu estudo também tem atraído grande interesse na área biotecnológica por possuir a capacidade de excretar diversos metabólitos em grande quantidade – ácidos orgânicos e proteínas extracelulares – sendo muito usada para superexpressão e secreção de proteínas específicas (Barth e Gaillardin, 1997). Na maioria das leveduras "não-convencionais", como *Y. lipolytica*, em contraste com *S. cerevisiae*, a respiração em presença de oxigênio é essencial para o uso de açúcares e sendo aeróbio restrito, *Y. lipolytica* não tem sua taxa de respiração, seu conteúdo de citocromos ou propriedades mitocondriais afetados por altas concentrações de glicose (Flores *et al*., 2000; Andreishcheva *et al*., 1997).

Como não é considerada patogênica, já foi utilizada em aplicações industriais como na produção de proteínas de microrganismos unicelulares, aroma de pêssego e ácido cítrico, em processos considerados seguros pela American Food and Drug Administration como GRAS (Generally Regarded As Safe) (Tsugawa *et al*., 1969). Além disso, excreta várias enzimas, como proteases, lipases, esterases e fosfatases, todas de grande interesse biotecnológico (Nicaud *et al*., 2002). Recentemente, a seqüência total dos seis cromossomos de *Y. lipolytica* foi determinada (Dujon *et al*., 2004), permitindo sua admissão nos estudos de genoma, transcriptoma e proteoma. Existe ainda um campo que vem sendo explorado com as leveduras não convencionais para pesquisa básica e também para aplicações biomédicas, que é a produção de proteínas heterólogas.

Historicamente, *Saccharomyces cerevisiae* foi usada como hospedeiro para produção de proteínas heterólogas, uma levedura sobre a qual a literatura já acumulou um grande conhecimento, mas que apresenta, neste caso, baixa produtividade, uma estabilidade de plasmídeo pobre e baixa capacidade de excreção (Madzak *et al*., 2004). Muller *et al*. (1998) testaram quatro leveduras não convencionais e *S. cerevisiae* na produção de seis enzimas fúngicas e todas as não convencionais foram mais eficientes que a levedura convencional, sendo que *Y. lipolytica* foi o hospedeiro que apresentou melhor performance e reprodutibilidade.

Y. lipolytica tem como nicho, substratos ricos em lipídios e proteínas, mas a grande maioria das cepas foi isolada do solo, de rede de tratamento de esgoto e de

ambientes contaminados com óleos. Apresenta vigoroso crescimento em diferentes valores de pH e apesar de ter crescimento ótimo a 30ºC, também é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 5 e 32ºC (Barth e Gaillardin, 1997).

Algumas espécies de leveduras exibem dimorfismo, ou seja, a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. *Yarrowia lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas (Barth e Gaillardin, 1997). Esse fenômeno atrai muita atenção devido à possibilidade de sua ligação à virulência de vários fungos patogênicos importantes, incluindo *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *Crytococcus neoformans*. A caracterização das condições que regulam a morfogênese e diferenciação das células pode levar a importantes descobertas de novos remédios ou tratamentos efetivos contra leveduras patogênicas (Szabo e Štofaníková, 2002).

Embora existam vários mecanismos envolvidos na regulação do dimorfismo, a limitação do nitrogênio parece ser um dos sinais mais importantes envolvidos no processo. A formação de pseudo-hifas em *Saccharomyces cerevisiae* tem sido identificada como uma resposta à limitação de nitrogênio (Gimeno *et al*., 1992). Em contraste com *S. cerevisiae*, Szabo (1999) apresentou resultados mostrando que a formação de hifas em culturas de *Yarrowia lipolytica* foi inibida pela limitação de nitrogênio, enquanto que a fonte de carbono, aparentemente não foi importante para a formação de filamentos.

Condições que favorecem a fermentação (ou que inibem a respiração), como a concentração de glicose, a anaerobiose ou a adição de inibidores da cadeia de transferência de elétrons, fosforilação oxidativa, assim como a inibição da síntese de proteínas mitocondriais bloqueiam a formação de hifas em *Mucor spp* (Friedenthal *et al.*, 1974 apud Szabo, 1999). O mesmo resultado foi obtido por Szabo (1999), que aplicou Antimicina A, um inibidor da transferência de elétrons da coenzima Q reduzida para o complexo III (citocromo-c redutase), em culturas de *Y. lipolytica*, indicando que o processo de conversão de energia e o metabolismo de carbono podem estar envolvidos na formação de filamentos.

Szabo (1999) mostrou que o pH do meio afeta fortemente a morfologia de células de *Yarrowia lipolytica*, mas apenas na presença de uma fonte de nitrogênio complexa, sugerindo que as células respondem mais a alterações nutritivas do meio com diferentes valores de pH do que ao próprio valor de pH. Num estudo posterior, Szabo e Štofaníkivá (2002) comprovaram a importância da presença de fontes de nitrogênio orgânico no efeito do pH na morfologia celular de *Y. lipolytica*.

Kawasse *et al.* (2003) estudaram a aplicação de estresse térmico (degrau de temperatura de 29ºC para 37ºC) e oxidativo (adição de peróxido de hidrogênio até concentrações de 1 M) em um cultivo de células de *Yarrowia lipolytica*. Através de processamento digital de imagens foi comprovado que ambas as condições de estresse fizeram com que as células de leveduras apresentassem um maior crescimento na forma de hifas.

Y. lipolytica produz lipase, enzima que apresenta grande interesse para o uso em indústria de couro ou de queijos (German patent DD-272867). É uma levedura única na habilidade de produzir e excretar no meio uma variedade de ácidos orgânicos (AOs) incluindo o citrato (Chernyavskaya *et al.*, 2000; Finogenova *et al.*, 2002).

A capacidade de mudança na morfologia entre levedura, pseudo-hifa e hifa é comumente considerada necessária para virulência de fungos patógenos de humanos, entretanto a morfologia considerada mais bem sucedida para o desenvolvimento desta virulência permanece incerta. Em *C. albicans*, pseudohifas e hifas têm demonstrado ser mais invasivas, em ensaios in vitro, podendo promover uma penetração em tecidos durante a infecção, tornando-se mais importantes para a colonização de órgãos. Porém, leveduras poderiam ser mais eficientes na disseminação através da corrente sanguínea (Berman *et al.*, 2004). Por não ser considerada patogênica, *Y. lipolytica* representa um excelente modelo alternativo para o estudo de fatores que regulam a transição morfogênica, diferentemente de *Candida albicans*. Recentemente *Y. lipolytica* foi apontada como um organismo auxiliar no desempenho do fungo *micorrízico arbuscular*, resultando na promoção do crescimento vegetal (Vassilev *et al.*, 2001; Sudbery *et al.*, 2004). Entretanto, as bases desse efeito benéfico para o fungo tampouco foram ainda exploradas.

III.2.1 Lipases

No século passado o microbiologista Eijkmann descreveu a capacidade de várias bactérias em produzir e secretar lipases. Quando se tornou aceito que as lipases se mantinham enzimaticamente ativas em solventes orgânicos, iniciaram-se vários estudos sobre estas enzimas com o objetivo de torná-las ferramentas para a indústria química (Jaeger *et al.*, 2002).

As lipases [triacilglicerol éster hidrolases, (E.C. 3.1.1.3)], ao lado de esterases e proteases, são enzimas bastante estudadas e que possuem inúmeras aplicações industriais, variando desde aplicações em detergentes até a resolução de misturas racêmicas para a produção de fármacos quirais, com grande importância na indústria

farmacêutica (Lin *et al.,* 2007*;* Chaubey *et al.,* 2006; Fernandez *et al*., 2006; Garcia *et al*., 1999; Pandey *et al*., 1999; Krieger *et al*., 1997; Watanabe *et al.*, 1995).

A superfamília de α/β-hidrolases compreende uma ampla variedade de enzimas cujas atividades dependem principalmente de uma tríade catalítica usualmente formada por resíduos de Ser, His e Asp. Esta tríade é funcionalmente (mas não estruturalmente) idêntica às de tripsina e subtilisina. Nas seqüências de aminoácidos das α/β-hidrolases os três resíduos seguintes estão na ordem Ser- Asp-His. O resíduo de serina usualmente aparece num penta-peptídeo conservado Gly-X1-Ser-X2-Gly, onde X1 é uma Try ou His. As α/β-hidrolases notavelmente incluem enzimas lipolíticas (Bornscheuer, 2002; Arpigny *et al*., 1999; Jaeger *et al*., 1999; Gill e Parish, 1997).

Outro elemento estrutural característico encontrado em muitas lipases é uma α-hélice chamada de "tampa" que cobre o sítio ativo na ausência de um substrato (Figura III-1). A "tampa" pode mover quando em contato com uma interface lipídio-água expondo a chamada conformação aberta da enzima. Esta observação serve como explicação para o fenômeno de ativação interfacial, aumentando a atividade enzimática, bem como a agregação das moléculas de substrato (Eggert et al., 2002; Jaeger et al., 1999; Gill e Parish, 1997).

Um modelo de estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*, pode der ser melhor visualizado na Figura III-1.

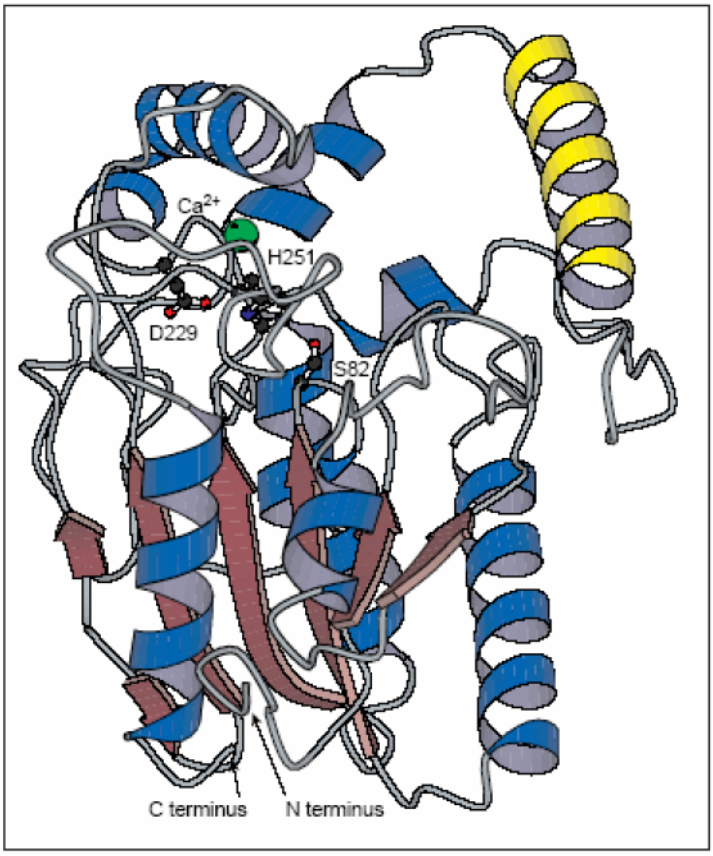

Figura III-1:Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* baseada no modelo construído para lipase de Burkholderia cepacia usando o raio-X coordenado determinado. Fitas- β são representadas como flechas (vermelho amarronzado) e α-hélices como rolo (azul e amarelo); a hélice amarela pode formar uma "tampa" sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão marcados, e a posição potencial do íon Ca2+ é indicada pela bola verde (Jaeger and Reetz, 1998).

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases e são classificadas como serina hidrolases, constituídas pela tríade catalítica G-X1-S-X2-G, onde G= glicina; S= serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico. A massa molar das lipases se encontra normalmente entre 30 kDa a 69 kDa. Atuam sobre substratos insolúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, acilgliceróis preferencialmente de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono). Além desses compostos, considerados seus substratos naturais, atuam sobre uma grande diversidade de outros substratos naturais ou sintéticos e são também capazes de catalisar reações de síntese, em ambientes aquo-restritos. As esterases (E.C. 3.1.1.1), por sua vez, também são hidrolases, enzimas largamente distribuídas na natureza, mas sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água, como pode ser observado na Figura III-2 (Wilson *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2004; Fernandes, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999; Bandmann *et al.*, 2000; Alvarez-Macarie, 1999; Dharmsthiti e Luchai, 1999; Nagao *et al.*, 1996; Jaeger *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1993).

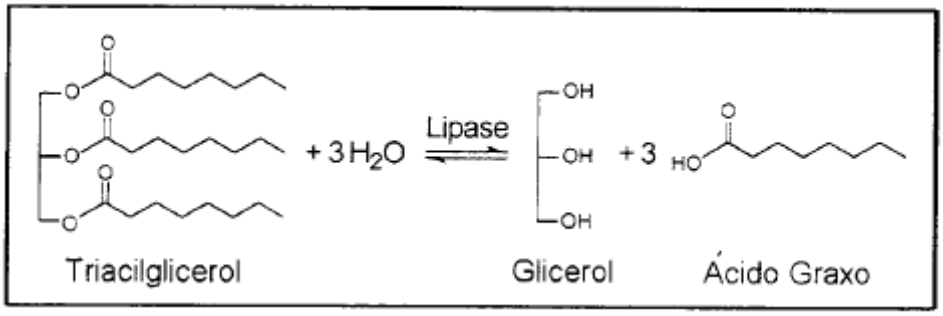

Figura III-2. Ação catalítica das lipases. Um triacilglicerol pode ser hidrolisado formando glicerol e ácidos graxos, ou a reação contrária (síntese) pode combinar glicerol e ácidos graxos formando triacilglicerois (Jaeger *et. al.*, 2002 e Jaeger *et. al.*, 1998)

A diferenciação entre lipases e esterases, entretanto, ainda não está completamente definida. As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeias com menos de 10 carbonos são tidas como esterases (Kang *et al.*, 2006; Cajal *et al.*, 2000 a, b; Jaeger, *et al.*, 1999; Verger, 1997; Egloff *et al.*, 1995; Jaeger *et al.*, 1994).

As lipases podem ser distinguidas das esterases pelo fenômeno de ativação interfacial, a qual foi unicamente observada para lipases (Bornscheuer, 2002; Holmquist *et al.*, 1997). Enquanto as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten, as lipases necessitam de uma concentração mínima de substrato para que uma alta atividade possa ser observada. Além da especificidade, onde substratos naturais para lipases são óleos e gorduras que contém ligações ésteres tríplices, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar. Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Tomic, S., 2006; Bornscheuer *et al.* 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et. al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Bier, 1955; Brockman, 1984).

A utilização de lipases como catalisadores em nível industrial apresenta diversas vantagens relativamente à catálise química e aos biocatalisadores em geral. Dentre elas, pode-se citar a elevada especificidade; a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Entretanto, sua atividade catalítica, como para todas as enzimas, é freqüentemente muito sensível a condições experimentais, como variações bruscas de temperatura, de pH e de força iônica. Contudo, um estudo otimizado na obtenção de condições apropriadas, possibilita a

catálise de forma eficiente. Além disso, um dos métodos que pode melhorar o desempenho das enzimas em biocatálise é a imobilização dos biocatalisadores sobre suportes sólidos ou por encapsulamento (Wilson *et al*., 2006; Krieger *et al*. 2004; Watanabe *et al*., 1995).

As lipases apresentam uma grande diversidade de propriedades moleculares (massas molares e pontos isoelétricos) e físico-químicas, como o pH e temperaturas ótimas para a atividade, estabilidade frente ao pH e à temperatura e especificidade frente a vários substratos. Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo (Wilson *et al*., 2006; Hasan *et al*., 2006; Sharma *et al*., 2001; Frost e Moss, 1987; Iwai e Tsujisaka, 1984).

Lipases microbianas de modo geral apresentam atividade máxima em pH entre 6 e 8. Lipases com atividade máxima em valores ácidos de pH têm sido muito pouco freqüentemente encontradas. Entre as exceções de lipases com alta atividade em pH ácido, a maioria é produzida por fungos do gênero *Aspergillus*, com alta atividade entre pH 2,5 e 5. Entre lipases produzidas por leveduras há apenas duas exceções que apresentam atividade máxima em pH ácido: a lipase de *Ophiostoma piceae*, em pH 5 e a de *Kurtzmanomyces sp*. I-11, com atividade máxima na faixa impressionante de pH entre 1,9 e 7,2 (Mahadick *et al*., 2002; Van Heerden *et al*., 2002; Namboodiri e Chattopadhyaya, 2000; Gao e Breuil, 1998).

A temperatura para a atividade máxima varia muito entre lipases microbianas. Entre lipases fúngicas, a grande maioria é ativa na faixa de 37 a 40 °C. As lipases de *Penicillium aurantiogriseum* e de *Rhizomucor miehei* constituem exceções, com atividade a 60 e 65 °C, respectivamente. Lipases de leveduras e bactérias, entretanto, freqüentemente apresentam atividade em temperaturas mais elevadas (entre 40 e 70 °C), sendo inclusive encontrados exemplos com atividade acima de 70 °C, como as de *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus sp*. H-27, B. *stearothermophilus*, B. *thermocatenulatus* e *Kurtzmanomyces sp*. I-11, com atividade a 75 °C e *Pyrobaculum calidifontis* VA1 e *Archaeoglobus. fulgidus*, com atividade a 90 e 80 °C, respectivamente (Niu *et al*., 2006; Lima *et al*., 2004 b; Kambourova *et al*., 2003; Cho *et al*., 2000; Imamura e Kitaura, 2000; Manco *et al*., 1994; Uvarani *et al*., 1998).

A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como lipases, uma vez que muitos processos industriais usam temperaturas em torno de 50 °C. Lipases microbianas têm sido estudadas com relação à termoestabilidade. Entretanto, não há padronização nas metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até

entre isoformas produzidas por uma mesma cepa. Há vários exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70 °C, como as lipases de *Bacillus circulans*, *Pseudomonas cepacia*, *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergilus fulgidus*, *Candida rugosa* LIP4, *Kurtzmanomyces sp*. I-11, *A. niger* e *A. carneus* (Niu *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Mahadik *et al.*, 2002; Manco et *al.*, 1994).

III.2.1.i Aplicação de lipases na indústria

Desde o início do século XX, as enzimas lipolíticas são utilizadas no processamento industrial de gorduras e outros lipídeos, sendo que suas aplicações industriais estão relacionadas especialmente com o emprego em detergentes. Além disso, são aplicadas nas indústrias alimentícias, papeleira e oleoquímica; na síntese de fármacos e produtos de química fina; na produção de cosméticos, recuperação e manutenção do meio ambiente e na resolução de misturas racêmicas. As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas incluem o fato de que elas são estáveis em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem ampla especificidade de substrato e exibem alta enantiosseletividade. Alguns exemplos de alta enantioseletividade, são as lipases oriundas da bactéria *Burkholderia cepacia*, das leveduras *Candida antarctica* e *C. cylindracea*, que são utilizadas na indústria para a resolução de misturas racêmicas (Tomic and Ramek, 2006; Isaksson *et al*., 2006; Gultekin *et al*., 2004).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se principalmente à enantiosseletividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantiosseletiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, o que é extremamente vantajoso, já que em muitos casos normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica. Como exemplo, pode-se citar o ácido 2-fenil-propanóico, utilizado na síntese de drogas antiinflamatórias não esteróides (Ibuprofeno e Naxopreno) e que pode ser obtido através da reação de transesterificação ou de hidrólise do éster correspondente catalisadas por lipases. Outro exemplo trata-se da utilização da lipase de *C. antarctica* em uma resolução racêmica dos derivados do ácido tiotetrônico, para a obtenção do composto (R)-triolactomicina, que possui um átomo de carbono quaternário quiral em C5, com elevado excesso enantiomérico, (Isaksson *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 1999). Outro exemplo é a resolução racêmica de álcoois, realizada na Bend Research Inc. (USA) com a lipase de *C. cylindracea*, com vistas à obtenção de prostaglandinas e compostos esteróides (Gultekin *et al.*, 2004).

As lipases são utilizadas na indústria de detergentes para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, conseqüentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido. Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a Lipolase® (Novozymes), obtida do fungo *Thermomyces lanuginosa* e expressa em *A. oryzae*; a Lumafast® (Genencor, USA) e a Lipomax® (Gist-Brocades, Holanda), lipases bacterianas oriundas de *Pseudomonas mendocina* e *P. alcaligenes* (Jaeger e Reetz, 1998).

Na indústria de alimentos, as lipases são intensamente utilizadas, principalmente na hidrólise da gordura do leite, na intensificação do sabor dos queijos e na aceleração do processo de maturação, na fabricação de derivados de queijo e na hidrólise de gorduras e óleos (Hasan *et al.*, 2006; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999).

Na indústria de papel e polpa, os componentes hidrofóbicos denominados "Pitch" (triglicerídeos e ceras encontradas na madeira), causam sérios problemas na manufatura do papel, tais como redução da produção, aumento do custo de manutenção e operação e redução da qualidade. Enzimas têm sido utilizadas para remover estes componentes da polpa, sendo que lipases de *C. rugosa*, empregadas em uma indústria japonesa, chegam a hidrolisar 90% dos triglicerídeos encontrados na madeira (Kontkanen *et al*., 2006; Jaeger e Reetz, 1998).

O uso de lipases na indústria oleoquímica, ou seja, em processos que envolvem reações de alcoólise, acidólise, hidrólise e glicerólise, economiza energia e minimiza degradações térmicas de produtos e reagentes. As reações de hidrólise na indústria geralmente são realizadas quimicamente, em condições drásticas, através de tratamento com vapor a altas temperaturas (240 a 260 ºC) e elevadas pressões. Mediante estas condições, os ácidos graxos instaurados se decompõem e se polimerizam, formando muitas vezes produtos indesejados. Quando se realiza a hidrólise catalisada por lipases, o processo fica isento de tais problemas; mas, devido ao elevado custo destas enzimas, a hidrólise lipolítica ainda é menos econômica do que a convencional. O processo torna-se economicamente viável para casos específicos, como produtos de química fina, pois possuem um alto valor agregado (Hasan *et al.*, 2006; Lima e Angnes, 1999; Patel *et al*. 1996).

Na área ambiental, as lipases podem ser utilizadas para remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e água. Além disso, também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gorduras que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas e alimentos líquidos. A aplicação de microrganismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do

petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (Hasan *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 1999; Reetz, 1998).

Na produção de compostos opticamente ativos e resolução de racematos: nos seres vivos, a atividade biológica de uma droga é geralmente dependente da estereoquímica do composto em questão. Assim, enquanto um enantiômero apresenta um efeito benéfico, o outro pode ser tóxico ou inócuo. Alguns exemplos dos diferentes efeitos das formas enantioméricas das drogas nos seres vivos podem ser observados na tabela 2 (de Souza Pereira, 1998; Sheldon, 1996).

Em 1992, a FDA (Food and Drug Administration) adotou um programa no qual as drogas racêmicas enfrentariam processos muito mais longos e complexos de aprovação para venda nos EUA do que as drogas quirais. A partir desse ano a grande maioria das indústrias farmacêuticas tem procurado metodologias eficientes para produção de compostos opticamente puros e para resolução de racematos. Devido a sua enantioseletividade, lipases têm sido empregadas em vários processos deste tipo por meio de hidrólise em meio aquoso ou de síntese em meio orgânico (Margolin 1996; Tsai e Huang 1999).

Na produção de surfactantes não iônicos como monoglicerídeos e ésteres de açúcar que encontram uma extensa aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos não apenas por sua eficiência como agentes tensoativos mas também por seu caráter atóxico e por sua ação como agentes conservantes (Bornscheuer 1995; Hill e Rhode 1999; Thomas *et al.* 1998; Petchow *et al.* 1996). Sua produção por via química não é muito satisfatória pois a presença de catalisadores alcalinos e a alta temperatura de reação provocam a formação de produtos secundários indesejados. Além do custoso processo de purificação, a produção destes surfactantes por via química apresenta baixo rendimento (em torno de 30%) (Bornscheuer 1995).

A produção por via enzimática de monoglicerídeos pode ser alcançada tanto por hidrólise parcial de triglicerídeos usando-se lipases 1,3-específicas - neste caso a maior dificuldade consiste em se evitar a isomerização dos grupos acil da posição 2 para a posição 1, quanto por esterificação do glicerol com ácidos graxos livres ou por glicerólise – neste caso são duas as dificuldades a serem contornadas: a eficiente homogenização dos substratos e a remoção de água do meio reacional. Vários processos já foram propostos neste sentido, alguns alcançando rendimentos de até 90% em monoglicerídeos (Kwon *et al.* 1995; McNeil *et al.* 1990, 1991).

Para a produção de ésteres de açúcar que, por via enzimática, é alcançada por esterificação entre o poliálcool e ácidos graxos ou suas formas metiladas, também foram propostos diferentes processos enzimáticos envolvendo modificações dos reagentes para

melhor homogenização do meio reacional (Heo et al. 2000; Adelhorst et al. 1990; Cao et al. 1996; Björkling et al. 1989).

Outras aplicações industriais de lipase estão relacionadas na Tabela III-1.

TabelaIII-1: Aplicações industriais de lipases

Indústria	Aplicação	Referência
Couros	Remoção de gordura residual das peles	(Poroske 1984, Gandhi 1997)
Rações	Melhoria da palatabilidade	(Poroske 1984)
Medicina	Auxiliar de digestão	(Gehartz 1990)
	Análises clínicas	(Lott e Lu 1991)
Cosméticos	Auxiliar na penetração de produtos para permanentes	(Poroske 1984)
Papel e celulose	Lise de material gorduroso da pasta de celulose	(Bajpai 1999)
	Remoção de tinta em papel reciclado	(Treimanis *et al.* 1999)
Tecidos	Refino de seda	(Liu *et al*, 1989)
Química	Síntese de ésteres e poliésteres usados como lubrificantes	(Gandhi 1997)
Farmacêutica	Síntese de amidas precursoras de análogos da penicilina	(Matos *et al.* 1987)

III.2.1.ii Condição de cultivo e produção de lipase

Vários fatores influenciam na síntese de lipase pelos microorganismos. Os principais são: fontes de carbono, fontes de nitrogênio, presença de indutores, presença de estimuladores e de inibidores, presença de agentes que afetam a interface água/óleo, temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo (Hadeball, 1991, Obradors *et.al.,* 1993, Montesinos *et.al.*, 1996, Dominguez *et.al.,* 2003).

Para obter a condição ótima de produção da lipase é necessário estudar a influência desses fatores na biossíntese da lipase. Os efeitos desses fatores afetam todos os tipos de microorganismos produtores de lipase (Hadeball, 1991).

A utilização de uma intensa agitação mecânica nos biorreatores ajuda a fornecer uma área interfacial adequada. Agitação intensa e interface líquido-líquido são freqüentes durante a hidrolise de lipases (Rooney e Weatherley, 2001). Fatores físicos como pressão atmosférica e distribuição do lipídio também são determinantes para a manifestação da atividade lipásica (Jaeger *et.al.*, 1994).

A produção de lipase atinge seu ponto máximo quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento (Zarevucka, *et.al.*, 2005). A atividade lipásica diminui

rapidamente após alcançar o nível máximo, pois ocorre a proteólise catalisada por proteases produzidas durante a fase de crescimento celular (Dalmau *et.al.*, 2000).

a) Meio de cultura:

Enzimas extracelulares podem ser produzidas em meio sólido ou líquido que se diferenciam pela quantidade de água livre (aw). A produção de lipase microbiana pode ser obtida no processo de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) ou no processo de Fermentação em Substrato Líquido (FSL). Em qualquer situação deve-se empregar meio de cultura adequado que tenha um baixo custo (Lin *et.al.*, 2006). Para obter uma preparação enzimática com alto grau de pureza, com propriedades específicas, é necessário conhecer e estabelecer parâmetros como pH e temperatura (Benjamin e Pandey, 2001)

a.1) Fontes de carbono:

O carbono é o principal componente da célula e algumas gorduras ou óleos têm sido utilizados como fontes de carbono e indutores da produção de lipase por microorganismos (Tan *et.al.*, 2003). A presença da lipase permite ao microorganismo usar lipídios de fonte animal e vegetal como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Hadeball, 1991).

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como o substrato para a produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis, ácidos graxos, e até mesmo surfactantes, como o *Tween* 80 (Li *et.al.* 2001, Hadeball, 1991).

Meio de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos têm sido empregados na obtenção de um rendimento elevado na produção de lipase. A atividade lipásica tem sido detectada em meios de cultura que contém substratos lipídicos (óleo de oliva, ácido oléico, triburitina e óleo de soja), o que sugere que a enzima seja induzida por esses substratos (Shirazi *et.al.,* 1998, Deive *et.al.,*2003).

Alguns autores dizem que substratos lípidicos e seus metabólicos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipase. Outros substratos, não relacionados às gorduras e óleos, como os carboidratos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para síntese de lipase, enquanto os substratos lípidicos, principalmente os

ácidos graxos, são excelentes indutores de lipase (Lotti et al., 1998; Dalmau et al., 2000).

Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o microrganismo utiliza-o de modo seqüencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inóculo do microrganismo em glicerol e ácidos graxos livres. Em seguida o microrganismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção da lipase. Finalmente, os ácidos graxos livres são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (Montesino et al., 1996).

A fonte de carbono pode estimular ou inibir a síntese de lipase. Além disso, existem outros compostos que podem influenciar a produção de lipase por leveduras (Hadeball, 1991). A levedura *C. rugosa* consegue sintetizar a lipase mesmo sem a presença de um indutor, mas em menor quantidade quando comparada à presença de ácidos graxos como indutor (Lotti *et.al.,* 1998).

O ácido oléico é conhecido como indutor e a glicose como repressora da síntese de lipase. No estudo realizado por Obradors e colaboradores (1993), o ácido oléico foi selecionado entre outros ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica, já que se obteve eficiente rendimento de biomassa e de produção de lipase.

Amaral *et al.* (2007) obtiveram alta atividade lipásica em meio contendo 2% de glicose com suplementação de oxigênio ao meio, quando comparados experimentos controle com a utilização de PFC (um carreador de oxigênio, isto é, facilitador da transferência de oxigênio para dentro do meio, facilitando assim o acesso da célula a ele).Vale ressaltar que a glicose é uma fonte de carbono hidrofílica, o que também ajuda no acesso da célula a esse substrato.

Foi detectada alta atividade da lipase extracelular quando *Fusarium solani* foi crescido em meio contendo peptona e óleo de oliva. Entretanto, a presença de glicose parece ter mascarado o efeito estimulador do óleo de oliva. Foi verificado que a concentração de peptona abaixo de 3% (p/v) reduziu a produção de lipase enquanto que o aumento na concentração de óleo de oliva acima de 0,5% (v/v) não estimulou a produção da enzima (Maia *et al*., 1999).

Shirazi *et al.* (1998) avaliaram sete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* quanto à produção de enzima com atividade lipásica, em placas de Petri contendo agar tributirina, verificou que a cepa DMS1848 apresentou maior atividade. Quando essa cepa foi crescida em frascos agitados contendo meio de cultura líquido com glicose ou substratos lipídicos como a principal fonte de carbono, não foi detectada atividade lipásica no meio com glicose. No entanto, em meios contendo substratos lipídicos,

como óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja, houve produção da lipase, o que sugere que esses substratos induzem a formação da enzima. A produção máxima de lipase extracelular foi obtida com óleo de oliva.

Segundo Jesus *et al.* (1999) o fungo filamentoso *Penicillium restrictum* apresentou excelente produção de lipase (20 U/mL) quando crescido na presença de óleo de babaçu. Por outro lado, o baixo percentual de hidrólise obtido com o mesmo óleo foi uma indicação, segundo os autores, de provável inibição da lipase pelos ácidos graxos liberados, pois este óleo contém cerca de 45% de ácido láurico (C12:0), um acido graxo de cadeia média. Os autores ainda observaram que a enzima também apresentou baixa atividade hidrolítica com triglicerídeos de cadeia curta.

O óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico (C18:1) e é comumente utilizado com um substrato padrão para determinação da atividade lipolítica. Montesino *et al.* (1996) confirmaram que o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, é o principal indutor da produção de lipase.

Segundo Deive *et al.* (2003) meios de cultura que continham ácido oléico e tributirina propiciaram bom crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. O ácido oléico demonstrou ser boa fonte de carbono para a levedura, embora propiciasse aumento da biomassa, não promoveu a secreção da lipase, apesar de ter promovido o aparecimento de outras atividades enzimáticas. A tributirina, entretanto, apesar de não promover o crescimento do fungo, mostrou-se um indutor de produção da lipase. Isto foi explicado como possível preferência da enzima para triacilgliceróis formados com ácidos graxos de cadeia curta (Deive *et al*., 2003). Por outro lado, Montesino *et al.*(1966) observaram que a produção de lipase por *C. rugosa* estava associada ao crescimento microbiano e que o ácido oléico mostrou-se melhor indutor do que o óleo de oliva, apesar de ter ocorrido maior crescimento com o óleo de oliva. Isso sugere um papel diferente da lipase nos dois casos. Utilizando-se um substrato insolúvel como fonte de carbono, a lipase produzida facilita a associação da célula do fungo com esse substrato, permitindo assim o maior crescimento. Estes autores ainda afirmaram que leveduras acumulam lipídeos quando existe carência de algum nutriente em particular, normalmente o nitrogênio, e um excesso de carbono. Quando um determinado nutriente acaba, o crescimento celular cessa e o excesso de carbono continua sendo assimilado pela célula e transformado em lipídio.

Pastore *et al* (2003) encontraram resultados diferentes para o extrato bruto enzimático obtido de *Rhizopus sp.* que apresentou maiores valores de hidrólise para gordura de coco em comparação com outros substratos (óleo de oliva e gordura do leite de cabra). Isso indicou boa afinidade para ácidos graxos saturados de cadeia média, como o ácido láurico.

Dentre os vários óleos, triglicerídeos e ácidos graxos testados, a trioleína permitiu uma produção máxima de lipase por uma cepa de *Geotrichum*. Entretanto, os óleos de colza, de soja e de oliva também demonstraram ser efetivos para produção da lipase. Na presença de triacilglicerídeos de ácidos graxos saturados de cadeia curta (tributirina e tricaprilina) a cepa de *Geotrichum* produziu pouca lipase (Ginalska *et al.*, 2004). Segundo Obradors *et al.* (1993), o ácido caprílico, em altas concentrações, mostrou-se tóxico para *C. rugosa*, já que a levedura não conseguiu metabolizá-lo. Ácidos graxos insaturados (ácido oléico, ácido linoléico e ácido elaídico) apresentaram um efeito positivo na síntese de lipase pela *Candida lipolytica* . Mas em contrapartida, os ácidos graxos saturados não apresentaram efeitos significativos (Hadeball, 1991).

A produção de lipase pela *C. rugosa* tem sido realizada, em geral, com misturas de fontes de carbono diferentes, geralmente açucares (sacarose e glicose) e lipídios (óleos vegetais, ácidos graxos), para se obter bom crescimento microbiano e a indução de produção da enzima (Montesino *et al*., 1996).

Ginalska *et al.* (2004) não conseguiram bons resultados empregando carboidratos simples (maltose, galactose, xilose, frutose, lactose e sacarose) como fonte de carbono única, apesar da atividade ter sido detectada. A cepa *Geotrichium -like* R59 cresceu e produziu lipase em todos os meios testados, sendo a inibição da produção de lipase por alguns açúcares, explicada pela capacidade dos microrganismos de metabolizar rapidamente tais carboidratos ou pela formação de certos metabólitos lipídicos inclusive durante o metabolismo.

A adição de gorduras e óleos (0,2%) ao meio de cultura, aumentou a produção da lipase pela levedura *Torulopsis ernobii* de 18% para 97%, em 40 horas. A maior produção foi obtida com o óleo de oliva, no entanto, quantidades de óleo de oliva maiores que 0,8% conferiram um menor aumento (60%). Triglicerídeos e ácidos graxos de peso molecular elevado (ácidos esteárico, palmítico e oléico) também aumentaram a atividade lipásica, enquanto os ácidos graxos de baixo peso molecular (ácido láurico) inibiram a produção de lipase. Já o glicerol não apresentou nenhum efeito na produção de lipase (Yoshida *et al.*, 1968).

Pereira-Meirelles (1997) reportaram que nenhuma atividade lipolítica foi detectada no meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono para *Yarrowia lipolytica* 583. Esse resultado foi justificado pela detecção de uma atividade invertásica extremamente baixa para esta cepa e, conseqüente, ausência de consumo de sacarose. Neste mesmo trabalho, o consumo de sacarose e a atividade invertásica para outras cepas de *Y. lipolytica* foram acompanhados durante o cultivo e o comportamento observado foi o mesmo.

Pereira-Meirelles (1997) comparou a utilização de glicose e óleo de oliva no meio de cultivo de *Y. lipolytica*, obtendo o dobro da atividade lipolítica com a adição do óleo. Além disso, manteve altos valores de atividade por um maior período de tempo, o que foi atribuído pelo autor a níveis inferiores de proteases encontrados no meio contendo óleo de oliva. A utilização concomitante dos dois substratos também foi testada e o pico de atividade foi deslocado para tempos superiores (400 h), em relação ao meio com óleo puro (150 h), sugerindo o consumo preferencial de glicose nessas condições. A máxima atividade lipolítica no cultivo de *Y. lipolytica* foi obtida quando a concentração inicial de óleo foi igual a 1% (p/v), que foi a mesma concentração ótima encontrada por Ellaiah *et al.* (2004) na produção de lipase por células de *Aspergillus niger* livres ou imobilizadas. Para *S. cerevisiae* 1525 e *Williopsis californica* 1639 isolados de óleo de oliva extravirgem, a produção de lipase foi maior quando a água foi adicionada ao óleo de oliva (fonte de carbono) na razão de 0,25% (v/v) e 1% (v/v) respectivamente para cada microrganismo facilitando assim a transferencia de massa (Ciafardini *et al.*, 2006).

Os óleos vegetais (oliva, soja, girassol, gergelim, semente de algodão, milho e amendoim), quando usados como fonte de carbono, resultam, geralmente, em altos níveis de atividade lipásica (Sharma *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003; Burkert *et al.*, 2004). Esses óleos são considerados substratos economicamente viáveis para a produção de lipase em escala industrial. O trabalho de Corzo e Revah (1999) demonstrou que os óleos de oliva e de milho foram os melhores para o caso da produção de lipase de uma cepa de *Yarrowia lipolytica*. De fato, o óleo de oliva é freqüentemente utilizado na composição de meios de cultura para produção de lipases. Os óleos animais, ao contrário dos vegetais, quase sempre inibem a produção de lipases (Tan *et al.*, 2003).

Sendo o glicerol um dos produtos finais da reação de hidrólise do triacilglicerol é de se esperar que este composto possa reprimir a produção de lipase. Os resultados obtidos por Corzo e Revah (1999) e Pereira-Meirelles (1997) confirmam tal fato já que, trabalhando com *Y. lipolytica*, os pesquisadores não detectaram atividade lipolítica significativa no meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono. No entanto, o ácido oléico pode ser usado como fonte de carbono para alguns microrganismos com bons resultados como para *Y. lipolytica* (Pereira-Meirelles, 1997; Fickers *et al.*, 2004) e *C. rugosa* (Wei *et al.*, 2004).

WEI *et al.* (2004) utilizaram também um cosolvente, o dodecano, o que aumentou a solubilidade dos substratos sólidos e do oxigênio, resultando em uma melhora na produção de lipase realizada em reator batelada.

a.2) Fontes de Nitrogênio

A fonte de nitrogênio é um fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas lipolíticas. Tanto o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico, apresentam um importante papel na síntese da enzima (Tan *et al.*; 2003). Dentre os compostos nitrogenados usados para produção de lipase, as fontes de nitrogênio mais comuns empregadas têm sido: hidrolisados ácidos de proteínas; água de maceração de milho; farinha de soja; hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas); aminoácidos; uréia; nitrato e sais de amônia (Hadeball, 1991; Montesinos *et al.*, 1996). A seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do microrganismo usado e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (Montesinos *et al.*, 1996).

Tan *et al.* (2003) mostraram que a soja e a caseína foram as melhores fontes de nitrogênio orgânico para produção de lipase pela levedura *Candida sp*. A soja contém além da proteína o óleo que favorece a síntese de lipase. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico testadas o $(NH_4)_2SO_4$ apresentou o melhor resultado. No entanto, os trabalhos de Ginalska et al. (2004) e Shirazi et al. (1998) mostraram que fontes inorgânicas de nitrogênio tais como nitrato de amônio e sulfato de amônio apresentaram efeito inibitório para a produção de lipase. Geralmente os microrganismos apresentam alta produção de lipase quando se utiliza fonte orgânica de nitrogênio e a uréia foi considerada a melhor fonte de nitrogênio para a produção da lipase por *Geotrichium* (Ginalska *et al.*, 2004).

Shirazi *et al.* (1998) testaram várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, como peptonas, extrato de lêvedo, extrato de carne, extrato de malte, uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, em meios contendo 1% de óleo de oliva como fonte de carbono. O extrato de levedura propiciou a maior produção de lipase.

Para verificar a influência sobre o crescimento da *Y. lipolytica* e a produção de lipase, várias fontes de nitrogênio (mineral e orgânica) foram testas por Shirazi *et al.* (1998). As fontes de nitrogênio mineral não demonstraram efeito significante tanto no crescimento da levedura quanto na produção de lipase. No entanto, observou-se um aumento da produção de lipase em meios contendo determinadas fontes de nitrogênio orgânico. Maior produção de lipase foi obtida na presença de hidrolisado de caseína, mais especificamente com triptona N1 (um hidrolisado tríptico de caseína, rico em amino-ácidos livres e peptídios pequenos), que se sobressaiu em relação aos outros substratos de nitrogênio orgânico e mineral. Desse modo, a utilização da triptona N1 pode ser considerada interessante do ponto de vista tecnológico mas, infelizmente, é de custo alto. (Fickers *et al.*, 2004).

Novotny *et al*. (1988) mostraram que a uréia foi a melhor fonte de nitrogênio para aumentar a atividade lipolítica em seis leveduras diferentes, entre elas *Y. lipolytica*

e *C. deformans*. Corzo e Revah (1999) também obtiveram este resultado para *Y. lipolytica* 681, o que sugere que a uréia é excelente fonte de nitrogênio para esta levedura. Quando os autores utilizaram peptona como fonte de nitrogênio, resultados positivos para a produtividade da lipase só foram obtidos com a utilização concomitante deste composto com uréia e, mesmo assim, melhores resultados foram alcançados utilizando-se apenas uréia. No entanto, esses resultados contrastam com o reportado por Pereira-Meirelles *et al.* (1997) que encontram valores muito inferiores de atividade lipolítica quando empregaram uréia no meio de cultivo (150 $U.L^{-1}$) em comparação com a utilização de peptona (2700 $U.L^{-1}$). Certamente o efeito desses compostos depende da cepa utilizada.

Muitos trabalhos reportam o efeito repressor do sulfato de amônio sobre o crescimento de algumas cepas de *Y. lipolytica* e baixa atividade lipolítica são encontradas quando este composto é utilizado como fonte de nitrogênio (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997; Corzo e Revah, 1999 e Novotny *et al.*, 1988).

O extrato de lêvedo apresenta resultados razoáveis para a produção de lipases e induz o crescimento de biomassa, já que não é apenas uma fonte de nitrogênio, mas também de vitaminas (Alonso, 2001; Li *et al.*, 2004).

a.3) Relação carbono-nitrogênio

A produção de enzimas microbianas depende da relação carbono – nitrogênio (Hiol *et al.*, 1999). Um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação 10:1 garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior, como 50:1, favorece a acumulação de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares. Dessa maneira, deve-se tomar o devido cuidado e atenção com a relação carbono – nitrogênio durante o cultivo em processos fermentativos (Carlile & Watkinson, 1997).

a.4) Quantidade de água disponível

Muitos estudos da produção de enzimas lipolíticas por bactérias, fungos e leveduras têm sido realizados em culturas submersas, isto é, em meios de culturas líquidos, ou seja, com alta atividade de água (Dominguez *et al.*, 2003), identificada como Fermentação em Substrato Líquido (FSL).

Nos estudos de Deive *et al.* (2003), a levedura *K. marxianus*, muito utilizada na produção comercial de enzimas, foi cultivada em um meio líquido suplementado de compostos essenciais, para obtenção de alta concentração de lipase.

A produção de enzimas microbianas pelo processo de Fermentação em Substrato Sólido (FSS) tem aumentado bastante nos últimos anos. Uma cultura em estado sólido pode ser definida como aquela em que há crescimento microbiano em materiais sólidos, com baixa quantidade de água livre (Dominguez *et al.*, 2003). A utilização do meio sólido faz com que haja um rápido crescimento da população de fungos filamentosos, permitindo a detecção de enzimas específicas (Alves *et al.*, 2002).

Recentemente tem havido grande interesse da indústria em utilizar subprodutos gerados no processamento de alimentos, para a produção de lipase por fungos cultivados em meio de cultura semi-sólido. Várias pesquisas têm sido destinadas a investigar a síntese de lipase por leveduras, usando este tipo de cultura. Com o cultivo semi-sólido o tipo de substrato utilizado pode incrementar a produção de lipases, podendo ser empregado alimentos não utilizados e sobras agrícolas, ricos em ácidos graxos, triacilgliceróis e/ou açúcares (Dominguez *et al.*, 2003). Utilizando-se essa matéria-prima barata o custo do processo fica mais baixo fazendo com que o total de capital investido na produção de lipase seja significativamente menor em culturas sólidas do que em submersas.

Na fermentação em substrato sólido o microrganismo não apenas cresce na superfície ou próximo a ela, como também penetra profundamente nos espaços intercelular e intracelular do suporte, havendo contato muito próximo entre o suporte e o microrganismo (Dominguez *et al.*, 2003).

A adição de diferentes substratos lipídicos (óleos de girassol, de milho e de oliva) ao meio de cultura aumentou a produção de lipase em quantidades que variaram de acordo com o substrato empregado (Dominguez *et al.*, 2003).

a.4) Outros Nutrientes:

Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade porque participam da quase totalidade das substâncias celulares. O carbono, o hidrogênio e o oxigênio são fornecidos sob a forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular, e de água. Já o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica). Os outros elementos (S, P, Mg e K) são fornecidos sob a forma de sais (Colen, 2006).

b) Condições Operacionais:

b.1) Influência da Temperatura

Os fungos, na sua maioria, são mesofílicos, isto é, apresentam faixa ótima de temperatura de crescimento entre 25-40ºC. Alguns toleraram temperaturas próximas ao congelamento da água e outros temperaturas acima de 40°C (termotolerantes). A temperatura afeta os diferentes parâmetros de crescimento microbiano, como, o tempo de adaptação (fase lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento em células, bem como influencia tanto o metabolismo primário quanto o secundário de vários modos (Carlile & Watkinson, 1997).

Corzo e Revah (1999) detectaram que a temperatura foi o fator que mais influenciou a produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* 681 entre os demais fatores estudados (pH e tempo de incubação). Através de uma análise estatística, encontraram a temperatura de 29,5ºC como sendo a melhor temperatura para a produção de lipase desta cepa.

b.2) Influência do pH

Na literatura há deficiência de informações sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do cultivo. O metabolismo do fungo altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo o tamponamento é difícil de ser obtido, pois as próprias substâncias usadas como tampões podem ser assimiladas ou podem ser tóxicas naquelas quantidades que seriam necessárias para se conseguir efetivo tamponamento. Apenas em biorreatores do tipo fermentadores o pH pode ser mantido constante durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio em um meio de cultura pode afetar o crescimento microbiano indiretamente, pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou, diretamente, pela sua ação nas superfícies celulares (Carlile & Watkinson, 1997).

A produção de lipases também é bastante sensível a mudanças no pH. Na maioria dos casos, o pH adequado à produção de lipases por células de leveduras deve

ser mantido próximo à neutralidade ou ligeiramente ácido (5,5 a 7,0) (Pereira-Meirelles, 1997).

Parece haver relação direta entre a temperatura e o pH ótimos para o crescimento microbiano e a formação de produtos. Corzo e Revah (1999) obtiveram resultados que evidenciam este fato, pois a análise estatística mostrou que a interação entre os fatores pH e temperatura foram mais importantes na produção de lipases do que o fator pH por si só.

b.3) Influência da aeração e do oxigênio

A influência da aeração e do oxigênio são parâmetros de suma importância no estudo da produção de qualquer metabólito por microorganismo. Para a produção de lipase pela levedura *Y. lipolytica*, microorganismo estritamente aeróbico, o oxigênio é utilizado preferencialmente como aceptor final de elétrons reoxidando os cofatores na cadeia respiratória.

Amaral (2007) relatou que a produção de diversas substâncias em escala laboratorial é realizada tradicionalmente em erlenmeyers incubados em banhos agitados. Portanto, nesses casos, para se estudar a influência da concentração de oxigênio na produção de lipases é comum variar o volume de meio de cultura em frascos com volume constante. Desta forma, quanto maior o volume de meio, menor é a disponibilidade de oxigênio, pois se reduz à superfície de contato com o ar.

Trabalhos têm demonstrado que a agitação e a aeração são parâmetros que influenciam diretamente a produção de lípases, dentre eles podemos citar: Chen *et al*., 1999; Elibol e Ozer, 2000 e Tan *et al*., 2003. Chen *et al*. (1999) verificaram que o aumento da velocidade de agitação, no cultivo de *Acinetobacter radioresistens*, levou à obtenção de maiores valores de atividade lipásica como também a diminuição do tempo de obtenção do valor máximo de atividade. Nesse mesmo trabalho, o aumento da concentração de oxigênio dissolvido aumentou significativamente os valores de atividade, mas concentrações superiores a 20% não alteraram a produção. Resultados semelhantes foram obtidos por Elibol e Ozer (2000) na produção de lipase de *Rhizopus arrhizus* e por Tan *et al*. (2003) na produção de lipase de *Candida sp*.

Alonso *et al.* (2005) na produção de lipases de *Y. lipolytica* em um fermentador de 2 L utilizando óleo de oliva como fonte de carbono detectaram um aumento na produção de lipase de quase 5 vezes na atividade máxima com o aumento da velocidade de agitação de 100 para 200 rpm. O aumento na velocidade de agitação resultou em menor rendimento e produtividade, o que foi atribuído pelos autores aos danos celulares causados por estresse mecânico, que foi constatado pela perda de viabilidade celular

nessas condições. Alonso *et al.* (2005) também estudaram o efeito do aumento da vazão de oxigênio na produção da lipase e observaram o aumento da produtividade volumétrica dessa enzima com o aumento da vazão de ar.

Uma forma de aumentar a transferência de oxigênio na produção de lipases, sem causar danos aos microrganismos e que vem sendo cogitada é a adição dos carreadores de oxigênio, substâncias que comprovadamente aumentam o K_La do sistema. Elibol e Ozer (2000) observaram o aumento da produção de lipases com a adição de 10% de PFC. Amaral (2003) obteve um aumento na produtividade da lipase de *Y. lipolytica* de 24 vezes com a inclusão de 20% de PFC no meio de cultivo.

III.3 Saccharomyces cerevisiae

O gênero *Saccharomyces* tem passado por inúmeras mudanças desde a sua descoberta, há 150 anos. Quando a primeira publicação sobre taxonomia de leveduras foi compilada por Guilliermond, em 1912, o gênero *Saccharomyces* compreendia 46 espécies divididas em 06 grupos separados de acordo com a atividade fermentativa sobre os açúcares. Em 1952, o número total de espécies deste gênero foi reduzido a 30, uma vez que várias espécies foram agrupadas como sinônimos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* variedade *elipsoideus*, *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces willianus*, enquanto novas espécies foram introduzidas ao gênero.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão, ela foi classificada como microrganismo geralmente considerado seguro (GRAS – generally regarded as safe) (Ostergaard *et al.,* 2000).

Além disso, os processos fermentativo e tecnológico bem estabelecidos para a produção em larga escala com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fazem este microrganismo ser bastante atrativo para muitos processos biotecnológicos. Outra importante razão para a aplicabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* dentro do campo da biotecnologia é a sua susceptibilidade a modificações genéticas pela tecnologia do DNA recombinante, que vem sendo bastante facilitado pela publicação, em 1996, do genoma completo da levedura (Ostergaard *et al.* 2000).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular porque seu metabolismo possui, semelhantemente aos de

eucariotos superiores, mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450), tornando este microorganismo uma valiosa ferramenta de estudo do metabolismo e fisiologia celular. Os ensaios realizados com microorganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. (Soares *et al.*, 2005).

Esta levedura destaca-se por realizar uma rápida conversão de açúcar a etanol e gás carbônico (CO_2). Sabe-se que a glicose e outros açúcares exercem um efeito repressivo na síntese de um grande número de enzimas. A esse fenômeno é dado o nome de repressão catabólica. De uma outra maneira, a glicose pode realçar a síntese enzimática. As primeiras são enzimas mitocondriais ou enzimas ligadas à respiração celular, já as segundas são enzimas ligadas ao metabolismo fermentativo.

O ambiente externo e suas mudanças influenciam fortemente o comportamento fisiológico da levedura. O controle da concentração inicial de açúcar em valores baixos impede a fermentação, porém, elevados valores desta concentração promovem a repressão catabólica acompanhada da diminuição do rendimento em biomassa. Em aplicações industriais, o interesse especial no controle de fluxos metabólicos é direcionar a produção para o metabólico de interesse (etanol ou biomassa, por exemplo). A relação entre o consumo de glicose e o ciclo celular é portanto relevante para o desenvolvimento de processos biotecnológicos através do domínio de técnicas para o estímulo de uma cultura por variáveis externas.

III.3.1 Ciclo Celular

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui quatro fases assimétricas durante o seu ciclo celular controladas pelo seu crescimento (Hartwell & Unger, 1977), como ilustrado na Figura III-1. Durante o estágio G1, o evento START ocorre somente após a célula adquirir uma determinada massa. Após o START, a célula começa a replicar o seu material genético e também o citoplasma. Componentes sintetizados após o START, durante as fases S e G2 são direcionados para uma gêmula**,** que cresce progressivamente. No final da fase M, a gêmula se desprende da mãe, gerando uma célula filha com tamanho menor que o da célula mãe. Como a filha é menor, necessitará de um tempo maior para alcançar a massa mínima para o START. Portanto, o ciclo celular da célula filha será maior que o da célula mãe, exceto para cepas que crescem mais rapidamente (Creator & Joyne, 1993).

O envelhecimento da levedura é determinado pelo número de ciclos que a mesma realizou, ou seja, quantas vezes ela se duplicou. *Saccharomyces cerevisiae* se

reproduz assexuadamente por gemulação e, como consequência desse processo, a célula mãe retém uma cicatriz de quitina no ponto de gemulação. Como a célula continua se dividindo, os locais onde houve gemulação raramente são re-utilizados (Sinclair *et al.*,, 1998). O número de cicatrizes na parede celular está, portanto, diretamente relacionado ao número de vezes que aquela determinada célula se dividiu e é um marcador biológico para definir a idade de uma determinada célula. Tal mecanismo da reprodução induz a co-existência de duas subpopulações: células gemulantes e células não gemulantes (Figura III-3).

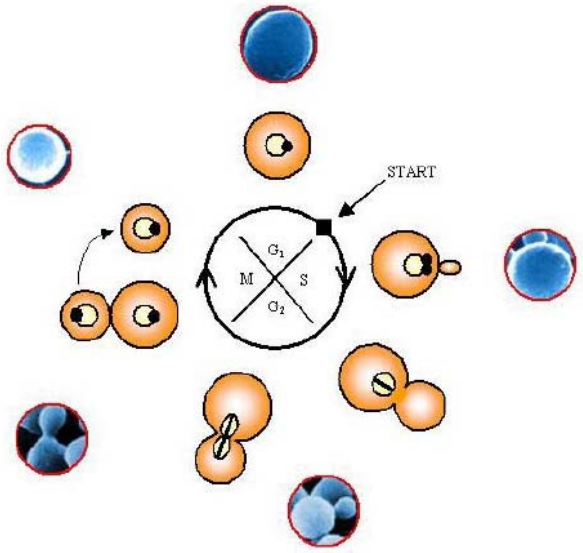

Figura III-3: Ciclo Celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira *et al.* 2005)

Depois de algumas divisões, a célula mãe torna-se substancialmente maior do que a filha gerada (Sinclair *et al.*, 1998). Kevin *et al.* (2003) observaram que células mãe muito velhas tendem a produzir filhas grandes. Por outro lado, células com carência de nutrientes durante períodos prolongados mostram um decréscimo na duração da vida especialmente no que tange à entrada no ciclo celular (Ashrafi *et al.*, 1999): a levedura deficiente em nutrientes pode sobreviver por períodos prolongados durante a fase estacionária, porém se for adicionado nutriente ao meio de cultura, estas células voltam a se replicar. Os autores observaram que o tempo de vida é reduzido em decorrência do estresse nutricional, e que esse decréscimo não estaria associado a mudanças genéticas nas células filhas.

III.3.1.i Produção de Etanol

A ampla diversidade e versatilidade dos microrganismos têm conduzido ao desenvolvimento e ampliação das fermentações industriais nos dias atuais. Esses microrganismos atuam como catalisadores da síntese de produtos, que podem ser desde pequenas moléculas (como etanol) ou macromoléculas extremamente complexas (como enzimas) (Mazid, 1993).

O desenvolvimento de pesquisas para a produção de biocombustíveis alternativos tem sido bastante significativo nos últimos anos, devido principalmente à preocupação com a exaustão das reservas de combustíveis fósseis, como por exemplo o petróleo. Desta forma a produção de etanol tem emergido como uma das estratégias mais viáveis no que diz respeito a fontes não convencionais de energia, uma vez que esse bioproduto tem inúmeras aplicações tanto na área farmacêutica, quanto na química ou alimentícia (Zafar *et al.,* 2005).

A importância socioeconômica da produção biológica de etanol no Brasil e no mundo, tendo em vista a utilização deste produto como fonte combustível ecologicamente correta tem ganhado atenção das últimas décadas, principalmente pelas tentativas de implantação do uso de combustíveis alternativos, visando à redução do consumo de combustíveis fósseis, além dos avanços nas pesquisas e nos procedimentos tecnológicos do processo fermentativo (Marques, 2004).

A utilização de etanol como combustível decorreu da necessidade de reduzir a dependência do país à importação de petróleo, desta forma foi criado o PROALCOOL, que inicialmente foi atrativo aos usineiro e produtores de cana-de-açúcar. Entretanto, foi estabelecida uma situação complexa envolvendo órgãos governamentais e a PETROBRÁS que questionaram a eficiência do plano a ser adotado e a impossibilidade de sua implantação com sucesso (Santos, 2002).

Apesar disso, o PROALCOOL foi implementado com pesados investimentos estatais e privados e obteve enorme sucesso entre as décadas de 70 e 80, todavia com aumentos no preço do açúcar e a necessidade de ampliação das áreas de cultivo a atratividade da produção de etanol por essa via foi reduzida, demonstrando a necessidade de melhores métodos de planejamento, no que tange a variáveis sociais, ambientais e econômica (Santos, 2002).

Simultaneamente ao desenvolvimento do PROALCOOL, outras alternativas de produção de etanol têm sido desenvolvidas com relativo êxito. Como por exemplo, a utilização de resíduos agrícolas (como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, trigo, soja e milho) por microrganismos geneticamente modificados para a bioconversão dos açúcares em etanol com alta produtividade. Melo *et al*. (2008) têm estudado a produção de etanol, a partir de hidrolisado de bagaço mamona por exemplo.

Com a perspectiva de crescimento da demanda de álcool combustível, como aditivo de função ambiental (pela redução das emissões de CO dos carros) tecnologias capazes de melhorar a performance do processo ganham importância fundamental no país, assim ganhos em eficiência da produção e diminuição de custos de operação são fatores preponderantes para a competitividade em mercados mundiais.

Em vista disso, Queiros (2003) desenvolveu uma levedura modificada em laboratório capaz de sedimentar logo depois de terminada a fermentação, reduzindo assim custos de separação com centrifugação, tanto em energia quanto de manutenção de equipamentos.

Nos Estados Unidos a indústria que produz etanol como combustível a ser adicionado à gasolina, como forma de redução da dependência na importação de petróleo e estímulo a economia nacional principalmente nas áreas rurais, tem tido um crescimento explosivo nos últimos 15 anos (Taylor, 1996). A partir disso, interesse no melhoramento do processo de produção de etanol tem conduzido a pesquisas no sentido de melhorar a modelagem e operação dos fermentadores pela introdução do uso de fermentadores em cascata contínua com separação do produto final (Taylor, 1996).

III.4 Estresse Celular

A capacidade de responder rapidamente às variações de temperatura, nutrientes, bem como, outras alterações ambientais é importante para a atividade geral da célula e sua sobrevivência. A compreensão a respeito da resposta das células às alterações ambientais é um tópico de grande interesse porque pode oferecer pistas sobre os aparatos moleculares que permitem as células a se adaptarem a novos ambientes. Os mecanismos moleculares que estão envolvidos na regulação do remodelamento da expressão gênica em virtude da adaptação a novos ambientes são a chave para a elucidação de muitas respostas sobre o comportamento celular perante estímulos adversos.

Dentre esse tipos de estresse são conhecidos: oxidativo, térmico, bárico e o eletroquímico.

III.4.1 Estresse eletroquímico

Respostas celulares de microorganismos submetidos a potencial elétrico têm sido reportadas na literatura em biotecnologia (Bartlett *et al*., 1997), em técnicas bioanalíticas (Lötzbeyer *et al*., 1996; Ci *et al*., 1997; Gheorghiu and Asami, 1998) e com propósitos médicos (Chen *et al*., 1998; Veiga *et al*., 2005).

Araújo *et al.* (2004) constataram variações no ciclo celular em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* quando submetidas a estímulos elétricos. Adicionalmente,observaram através da microscopia ótica que as células se apresentaram menores em culturas submetidas ao estresse quando comparadas aos experimentos sem aplicação de potencial elétrico. Os autores relatam que a aplicação de potencial elétrico forçou o sincronismo da população. A observação de sincronismo em *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada em várias outras condições experimentais como após pulsos de baixas concentrações de substrato, pH, aeração ou outra alteração ambiental (Münch et al., 1992).

Zackem *et al* (2006) notaram que a aplicação de potencial elétrico em células de *S. cerevisiae* reduziu a morte celular além de facilitar a excreção de metabólitos intracelulares.

Amat *et al.* (2006) propuseram um mecanismo primário que visa explicar os efeitos do metabolismo em células expostas a luz, através de uma simulação com campo magnético.

Arronson *et al.* (2004) fizeram estudos com pulsos elétricos em cultura de *Escherichia coli* para estudar seu crescimento em relação a inativação e a quantidade de células. Foi constatado um aumento no crescimento celular.

Otulona *et al.* (2008) investigaram a eficácia de pulsos de campo elétrico no controle do crescimento microbiano no leite. Kishore *et al.* (2007), também relatou estudos na parte de esterilização de alimentos com potencial elétrico.

É importante notar que o estresse promovido por campo elétrico, ou "estresse eletroquímico" apresenta vantagens industriais sobre outros tipos de estresse; pois não envolve nenhuma adição de produtos químicos externos, que aumentariam os custos de separação do produto e do tratamento de efluentes. O estresse eletroquímico apresenta dinâmica favorável; pois a resposta não está sujeita a inércia apresentada pelo volume reacional, como por exemplo, no estresse térmico.

III.4.1.i Influência do Estresse na Membrana Celular

Respostas na membrana celular vêm sendo estudadas quando essas são submetidas a todos os tipos de estresse com o intuito de estudar todos os fenômenos ocorridos ao longo do estresse.

Heerklotz (2001), afirmou que o estresse celular facilita a permeabilização da membrana, onde o mesmo utilizou a titulação isotérmica calorimétrica e vários modelos de sistemas. Foram estimados a entalpia, entropia e energia livre e analisados os dados de captação frente aos de liberação. Chegando assim a conclusão de tal permeabilidade.

Pereira e Geibel (1999) analisaram as respostas, através da microscopia eletrônica, da membrana celular em células de *Saccharomyces cerevisiae* quando submetidas a estresse oxidativo e averiguaram que há a formação de poros na membrana ao longo do estresse onde a diferença do tamanho do poro controle para o poro da célula com estresse seria de aproximadamente 100%.

Shearman *et al.* (2007) constataram que a pressão dentro da membrana celular pode atingir 50 atm, sendo por esse motivo indicada pelos autores como um novo modelo nano chamado nano celular. Tal constatação pode explicar a facilidade da permeabilidade em condição de estresse, o que aumentaria os poros por causar "rachaduras" na membrana pela diferença de pressão interna e externa.

Fox (2006) estudou a inativação em um biorreator com a utilização do potencial elétrico e em sua tese constatou que a aplicação de potencial elétrico entre 0.5 e 1V aumenta a porosidade da membrana celular.

Capítulo IV - Metodologias Experimentais:

IV.1 Microrganismos

1) Levedura selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2) Levedura *Saccharomyces cerevisie* S228C (ATCC 26108, GLC mal gal 2)

IV.1.1 Preservação

As células foram conservadas a 4ºC após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD ("***Y****east Extract*, ***P****eptone*, ***D****extrose*") contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 2%.

IV.1.2 Cultivos

A

- *Yarrowia lipolytica*

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 29ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era determinada e, em seguida as células eram centrifugadas de forma. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, 1,0 ± 0,1 mg p.s. (peso seco) cel/mL nos meios de cultivo.

- *Saccharomyces cerevisiae:*

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 48 horas em um incubador rotatório a 29ºC, 160 rpm, a absorvância (570 nm) de uma amostra deste cultivo era lida para a quantificação da concentração inicial de células de aproximadamente 0,7±0,1 mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo.

IV.1.3 Experimentos em Biorreator

- *Yarrowia lipolytica*

Foi utilizado um biorreator de bancada (*Multigen, New Brunswick Scientific Co.,* EUA) com capacidade de 2 L(Figura IV-1). O equipamento contendo sistema de aeração, agitação magnética e controle de temperatura era provido de duas turbinas e duas chicanas. Uma sonda polarográfica de oxigênio (Lutron DO-5510, *Lutron Electronics Co., Inc*) foi utilizada para medição da concentração de oxigênio dissolvido no interior do biorreator. O suprimento de oxigênio foi realizado com ar atmosférico com auxílio de um sistema de aeração submerso através de 12 orifícios na haste de agitação com 7 mm de diâmetro localizados a 1,82 cm de distância do fundo do biorreator. Antes de entrar no biorreator, o ar atravessava dois filtro de ar (*Advantec, Toyo Roshi Kaisha,* Japão) com porosidade de 0,2 μm.

Figura IV-1: Foto do Biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co., EUA) com capacidade de 2 L.

- *Saccharomyces cerevisiae:*

O biorreator conta com sistemas de agitação mecânica, sensores de oxigênio dissolvido (Actron OX2000), pH (Actron PH2000) utilizados na monitoração do bioprocesso.

O experimento com cortes foi conduzido através de duas bateladas seqüenciais, ou seja, retirada de metade do volume do mosto quando da exaustão de substrato e adição de meio novo mantendo a mesma concentração inicial de substrato, de acordo com a Figura IV-2com temperatura constante e agitações de 275 rpm e 400 rpm.

Foram retiradas alíquotas no início e no final do experimento para a quantificação da idade celular e o potencial elétrico foi aplicado no início da 2ª batelada.

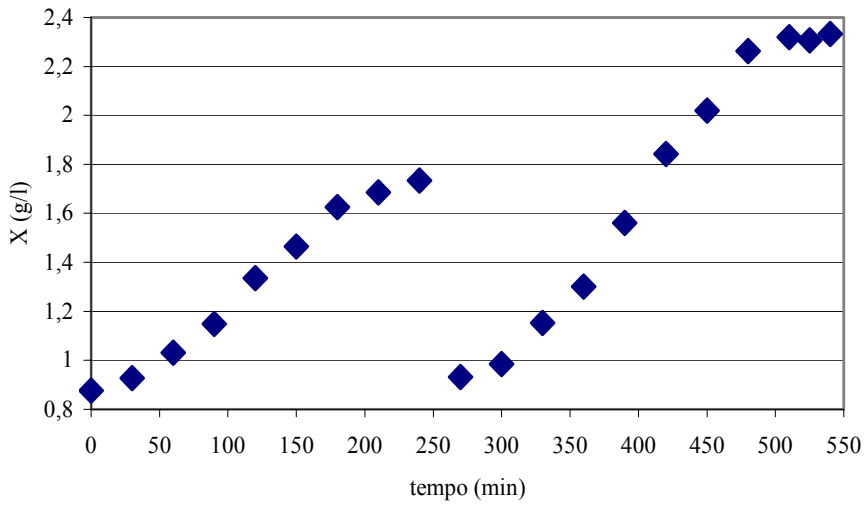

Figura IV-2: Gráfico para exemplificar os experimentos

- Aplicação do Potencial elétrico

O potencial elétrico aplicado para o estudo de estresse elétrico foi de 0,75 V e 1V (Araújo *et al.*, 2004). Para a aplicação de potencial utilizou-se potenciostato (Palm Sens Instrument), eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de platina e eletrodo de referência de calomelano saturado, conforme apresentado na Figura IV-3.

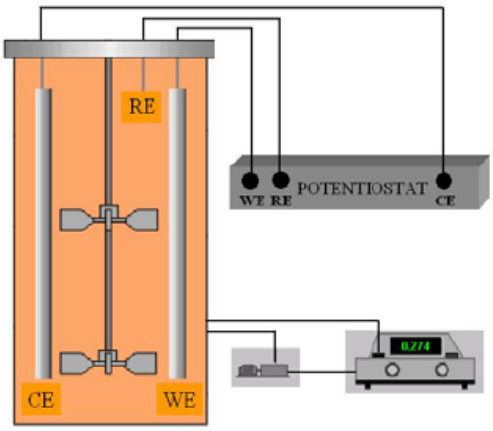

Figura IV-3: Reator Bioeletroquímico

RE = eletrodo referência (SCE); CE = contra-eletrodo (Pt);

WE = eletrodo de trabalho (Pt), potenciostato e espectrofotômetro acoplado.

IV.1.4 Esterilização

Todos os componentes do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 15 minutos. O biorreator, as pipetas, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 25 minutos. O eletrodo de oxigênio foi desinfetado à parte, mergulhando-o em uma solução de álcool etílico 70% (v/v) por 30 minutos.

IV.2 Métodos Analíticos

IV.2.1 Quantificação do Crescimento Celular

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000 a 570 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cel/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura IV-4 e IV-5.

A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retira-se uma amostra (10 mL), que é filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão são feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e então se mede a absorvância em espectrofotômetro a 570 nm, obtendo-se a curva de peso seco.

- *Yarrowia lipolytica*

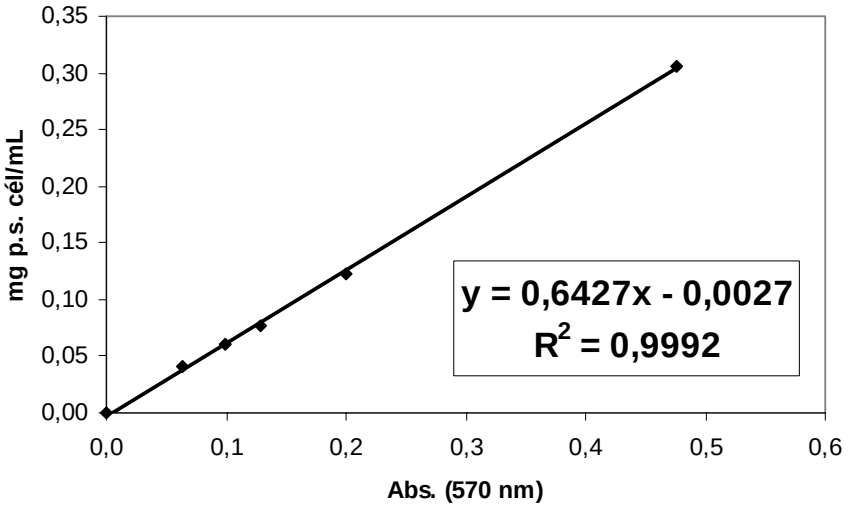

Figura IV-4: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.

- *Saccharomyces cerevisiae:*

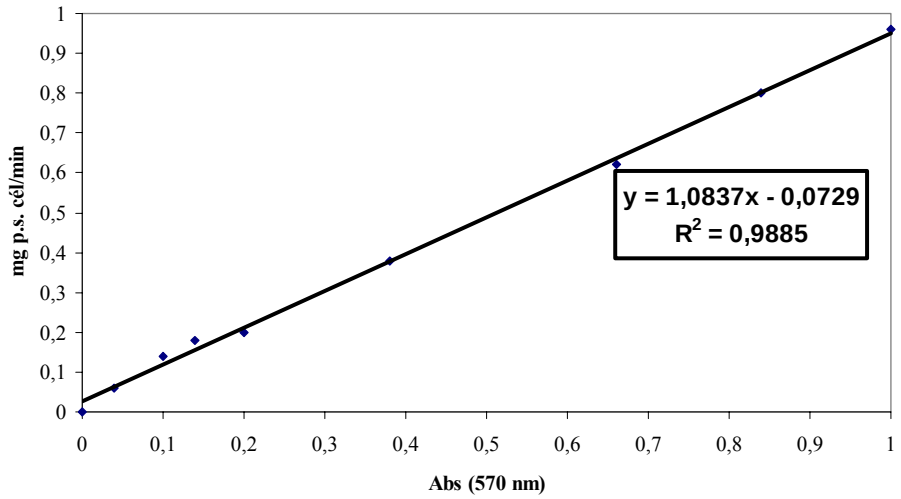

Figura IV-5: Curva de peso seco para quantificação do crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* através de medidas de absorvância em espectrofotômetro HACH DR/4000.

IV.2.2 Determinação de Glicose

A concentração de glicose presente do meio de cultivo foi medida pelo método da glicose oxidase utilizando um *kit* enzimático para medida colorimétrica de glicose (*HUMAN GmbH* -

Germany). Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 500 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático. Tomam-se alíquotas de 12 µL de amostra e completa-se com 1200 µL de Reagente Enzimático. Após a homogeneização, incuba-se por 20min a 25°C, sendo a absorbância da amostra e do padrão mensuradas em no máximo 60 minutos.

O padrão de glicose pertencente ao *kit* enzimático possui uma concentração de 100 mg.dL^{-1} e o Reagente Enzimático contém: tampão fosfato (pH 7,5) 100 mmol.L^{-1}; 4-aminofenazona 0,25 mmol.L^{-1}; Fenol 0,75 mmol.L^{-1}; Glicose oxidase 15000 U.L^{-1}; Peroxidase 1500 U.L^{-1}; Mutarotase 2000 U.L^{-1}.

O cálculo de concentração de glicose é realizado através da Equação IV-1:

$$C = 100 * \left(\frac{Aa}{Ap} \right) \qquad \textbf{(IV-1)}$$

onde:

Aa = Absorvância da amostra;

Ap = Absorvância do padrão;

C = concentração de glicose na amostra (mg.dL^{-1})

IV.2.3 Determinação de Etanol

A concentração de etanol presente do meio de cultivo foi medida utilizando um *kit* enzimático para medida colorimétrica (*Boehringer Mannhein/R-Biopharm*). Nesse método, a absorvância da reação enzimática é medida em espectrofotômetro a 340 nm, contra o branco de reação, que é composto apenas pelo Reagente Enzimático.

Foi dissolvido 4 mg de NAD com aproximadamente 0,8 U, em 3 ml de tampão fosfato com pH=9,0. Em seguida, adiciona-se 10 µL da amostra e decorridos 3 min, é obtido o valor da absorvância (Abs_1).

A seguir é adicionado 5 µL de uma solução de ADH (álcool desidrogenase) com aproximadamente 7000U na cubeta onde foi lida a Abs_1 sendo então obtida uma nova absorvância (Abs_2).

O principio do método é realizado a partir das reações 1 e 2 mostradas a seguir:

Etanol + $NAD^+ \leftrightarrow$ acetaldeído + NADH + H^+ (1)

Acetaldeído + NAD^+ + $H_2O \longrightarrow$ ácido acético + NADH + H^+.....(2)

O cálculo de concentração de etanol é realizado através das Equações. (IV.2 e IV.3):

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{amostra} - (A_2 - A_1)_{branco} \text{ .....(IV-2)}$$

onde:

A_2 = Absorvância 2;

A_1 = Absorvância 1;

ΔA = Variação de Absorvância

$$c = \frac{V * PM}{\varepsilon * d * v * 2 * 1000} * \Delta A \text{ .....(IV-3)}$$

onde:

c= concentração de etanol (g/L)

V= volume final (ml)

v= volume de amostra (ml)

PM= peso molecular do etanol (g/mol)

d= caminho ótico (cm)

ε= coeficiente de extinção de NADH

IV.2.4 Determinação da Atividade Lipásica

.

A atividade da lipase foi medida através do método espectrofotométrico, sendo estimada mediante a variação de absorvância a 410 nm em espectrofotômetro (HACH, DR-4000) devido à oxidação do *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) com uma concentração de 0,162 $mg.mL^{-1}$ em tampão fosfato de potássio (0,05 M), pH 7,0 (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

O substrato (*p*-NFL) é preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, uma alíquota de 0,1 ml é diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio (0,05 M). Um tubo de ensaio contendo 1,8 mL do substrato previamente preparado é aclimatado a 37ºC por, aproximadamente, 15 minutos. Após esse tempo, é adicionado 0,2 mL do sobrenadante do meio de cultura e a absorvância acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco de reação (0,2 mL do tampão fosfato de potássio adicionados a 1,8 mL do substrato).

O cálculo da atividade é realizado utilizando a Equação IV-4.

$$A = \frac{(\Delta Abs) * D * f * V_r}{(\Delta t) * V_s} \qquad \textbf{(IV-4)}$$

onde:

A = atividade da enzima ($U.L^{-1}$), onde *1 Unidade enzimática (1U) corresponde a quantidade de enzima capaz de produzir 1μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio*;

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

V_r = volume reacional, que é o volume da solução de p-NPL em tampão e o volume da amostra, em litros;

V_s = volume da solução enzimática utilizada no ensaio, em litros;

f = fator de conversão (245 μmol/L), obtido através da construção de uma curva padrão de *p*-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu mol.mL^{-1}$.

IV.3 Caracterização da Morfologia e Viabilidade Celular

IV.3.1 Análise de Imagem

As imagens adquiridas foram registradas através da utilização de um microscópio óptico, *Olympus*, modelo BX51 com uma câmara de fotografia digital, *Olympus,* acoplada. A ampliação utilizada foi de 1000x do microscópio óptico e 4x do *zoom* óptico da máquina fotográfica digital, que perfaz uma ampliação de 4000x. As imagens recolhidas foram posteriormente tratadas

através da medição da área ocupada pelas células (em pixels) com uma rotina computacional desenvolvida em MatLab® 6.1 (MATH WORKS INC., 1997). Para cada placa foram registradas em torno de 10 imagens.

O programa desenvolvido para determinar o diâmetro das micelas de emulsões (FREIRE *et al*., 2005) foi adaptado para determinar a área ocupada pelas células. Este programa é dividido em três componentes principais: a binarização das imagens obtidas, a quantificação da área e o cálculo de parâmetros estatísticos.

A binarização consiste na conversão da imagem obtida para uma imagem preto e branco, com o seu subseqüente tratamento de forma a eliminar possíveis ruídos. Desta forma transforma-se uma matriz com três dimensões em uma matriz com duas dimensões composta simplesmente por elementos 0's (pixies *off*) e 1's (pixeis *on*). A segunda componente do programa efetua a quantificação das células, apresentando resultados como diâmetro, diâmetro ao cubo, área e circularidade. Por último existe uma componente que reúne os dados de um determinado número de imagens já quantificadas anteriormente fornecendo como resultado final o número de objetos analisados, o desvio padrão da medição do diâmetro, o diâmetro médio final e a área total ocupada por células e a área não ocupada.

Pode-se visualizar um breve esquema do funcionamento desta ferramenta na Figura IV-6.

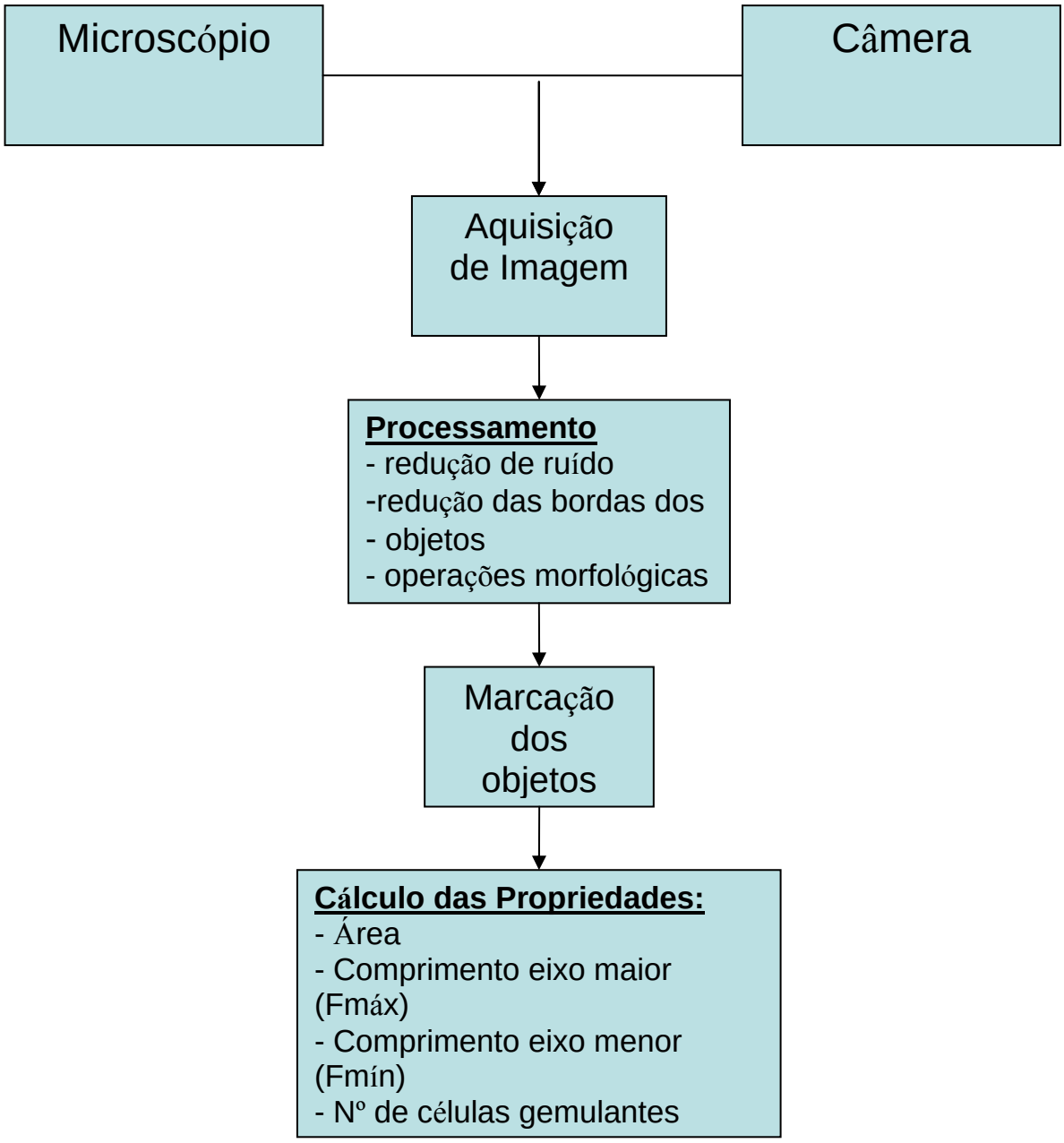

Figura IV-6: Esquema do procedimento da técnica de Análise de Imagem para a obtenção das propriedades individuais das células de levedura *Yarrowia lipolytica* (foi utilizada nessa dissertação medidas de Fmáx/Fmin)

Essa ferramenta tem como objetivo a medição da circularidade ao longo dos experimentos, com o objetivo de verificar se há ou não a formação de hifas com a aplicação do estresse através da análise de $F_{máx}/F_{min}$ (ou pode ser chamado também de análise de circularidade).

No Experimento: Alíquotas foram retiradas no primeiro ponto de cada dia ao longo do experimento. Foram registradas fotos no início do 1º dia e no início do 3º dia de experimento de maneira que continham no mínimo 100 objetos.

IV.3.2 Epifluorescência com alaranjado de acridina

A técnica de microscopia de fluorescência tem sido utilizada por diversos autores (Hobbie *et al.*, 1977; Rodrigues e Kroll, 1985; Raynal *et al.*, 1994; Pinheiro *et al.*, 1998) na contagem da viabilidade celular. De fato, este corante (alaranjado de acridina) é usado em kits de biologia molecular para a determinação da viabilidade celular de leveduras.

Quando as moléculas de alaranjado de acridina se ligam à cadeia de RNA (ácido ribonucleico), que está presente nas células em grande quantidade quando estas crescem exponencialmente, as células apresentam uma fluorescência laranja/vermelha (Figura IV-7). Pelo contrário, quando se liga ao DNA (ácido desoxirribonucleico), que predomina nas células mortas ou com baixa taxa de reprodução, as células fluorescem verde/amarelo (Figura IV-7).

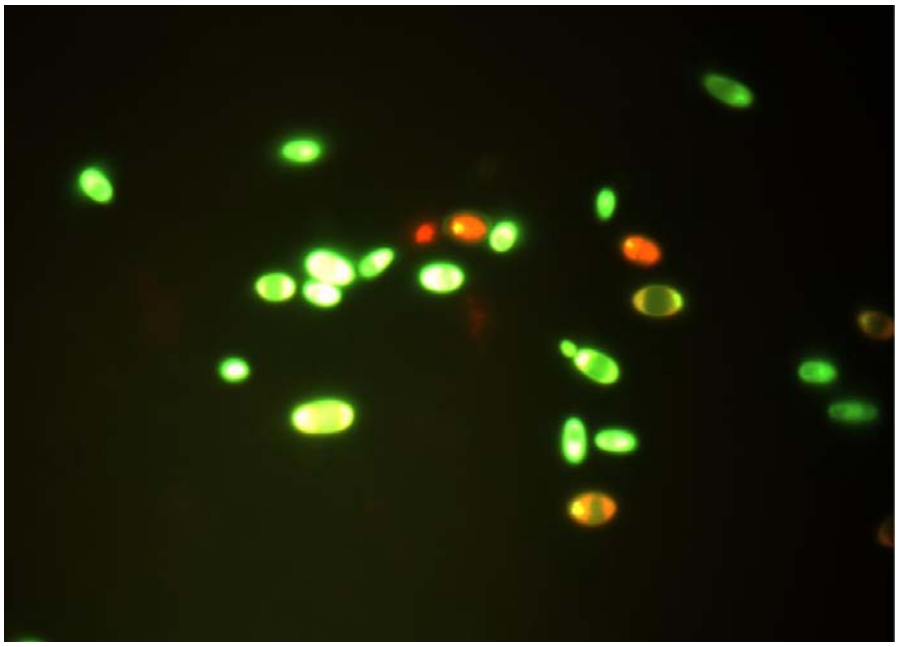

Figura IV-7: Exemplo de imagem com células de *Y. lipolytica* com alaranjado de acridina

- **Procedimento experimental** (Pinheiro, 2004)

Para a preparação da fluorescência lavaram-se as células 4 vezes com solução tampão fosfato de sódio 50 mmol·L^{-1}, pH 7.0. De seguida efetuou-se uma diluição à suspensão de forma a obter uma concentração celular inferior ou igual a 0.06 g·L-1. Adicionou-se, à preparação diluída, uma solução de alaranjado de acridina 0.1 % (p/v) de maneira a obter uma concentração final de 0.01 % (p/v).

Deixou-se a incubar durante 15 min, na ausência de luz. De seguida, a preparação foi observada ao microscópio de fluorescência com o filtro apropriado de UV 450 nm-490 nm.

A fração de células viáveis é estimada pela razão entre o número de células de cor laranja/vermelho e o número total de células.

IV.3.3 Epifluorescência com Calcofluor

Calcofluor é um corante utilizado na microscopia de fluorescência, que tem sido usado para branquear têxteis e de papel devido à sua capacidade de hidrogenar a celulose. Além disso, este composto também foi utilizado na localização topológica de celulose (Haigler et al., 1980) e quitina (Herth, 1980).

As células de calcofluor se ligam a parede celular corando os pontos de brotamento da célula, onde há a formação de cicatriz, ou seja há uma coração do anel de quitina formado a cada processo de gemulação; exibindo assim no microscópio uma coloração azul clara como pode ser vista na Figura IV-8.

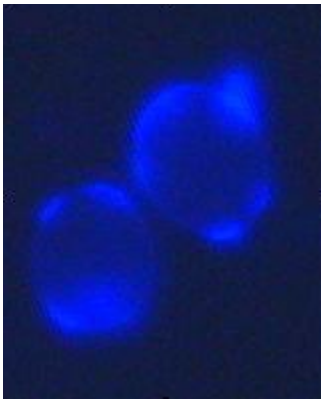

Figura IV-8: Imagem obtida de *Saccharomyces cerevisiae* corada com calcofluor

- Procedimento experimental

Para a determinação do histograma de idade populacional foi utilizada metodologia descrita por Elorza *et al*, (1983). A contagem de cicatrizes é realizada com auxílio de calcofuor: 0,5 mL de amostra foi lavado com água deionizada duas vezes, adicionando-se 0,5 ml de solução de 2µg/ml calcofluor (corante) sendo mantidos no escuro por 10 minutos. O corante foi retirado por centrifugação e lavado, novamente, com água deionizada. As células foram suspensas em 0,3ml de água destilada sendo posteriormente preparadas lâminas a fresco para observação em microscópio com magnificação total de 100x, utilizando fluorescência na faixa de 320 a 350 nm. Foram contadas cicatrizes de aproximadamente 50 células em cada lâmina.

Capítulo V - Resultados e Discussões

V.1 Saccharomyces cerevisiae

V.1.1 Modelagem Matemática do cultivo de *S. cerevisiae*

Para o estudo do comportamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente à aplicação de estresse eletroquímico, com base nas observações experimentais, foi proposto um modelo descrito na Tabela V-1.

No modelo proposto, adota-se cinética de Monod com a influência da concentração de oxigênio, isto é, sendo este considerado um segundo substrato limitante, como mostra a Eq. (V-1).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_s + S} * \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \quad \textbf{.....(V-1)}$$

Onde:

$\mu_{máx}$ - taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})

S – concentração do primeiro substrato limitante (glicose) (g/L)

K_s – constante de saturação para o primeiro substrato limitante

O_2 – concentração de oxigênio dissolvido (ppm)

K_{O_2} – constante de saturação para o oxigênio

Tabela V-1: Modelos avaliados para *Saccharomyces cerevisiae*

MODELO	$\frac{dX(t)}{dt}$	$\frac{dS(t)}{dt}$	$\frac{dP(t)}{dt}$	$\frac{dO_2(t)}{dt}$
	$\mu * X$	$-\frac{dX(t)}{dt} * \frac{1}{Y'_{XS}} - \frac{dP(t)}{dt} * \frac{1}{Y'_{PS}}$	$\frac{1}{Y'_{XP}} * \frac{dX(t)}{dt}$	$K_L a * (O_2^* - O_2) - q_{O_2}$

Onde:

μ - taxa específica de crescimento (h^{-1})

X – concentração celular (g/L)

Y'_{XS} – fator de rendimento de célula em relação ao substrato consumido para crescimento (gX/gS)

Y'_{PS} – fator de rendimento de produto em relação ao substrato consumido para produto (gP/gS)

$K_L a$ - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

O_2^* - concentração de saturação de oxigênio dissolvido, adotada igual a 7 ppm.

O_2 – concentração de oxigênio dissolvido (ppm)

q_{O2} – taxa de consumo de oxigênio (ppm*h)

O procedimento adotado de regressão dos parâmetros aplica o algoritmo de otimização Nelder & Mead (disponível no *Toolbox* de Otimização do MATLAB, função *fminsearch*) para minimizar a função objetivo da Eq. (V-2).

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{NPTEt}\left(P_{calc}(i) - P_{\exp}(i)\right)^2 + \sum_{j=1}^{NPTS}\left(S_{calc}(i) - S_{\exp}(i)\right)^2 + \sum_{k=1}^{NPTX}\left(X_{calc} - X_{\exp}\right)^2 + \sum_{k=1}^{NPTO2}\left(O2_{calc} - O2_{\exp}\right)^2 \quad \textbf{(V-2)}$$

onde, P(t) (totalizando NPTEt (número de pontos totais de etanol) medições, em g/l), S(t) (totalizando NPTS (número de pontos totais de substrato) medições, em g/l), X(t) (totalizando NPTX (número de pontos totais de célula) medições, , em g p.s./l) e O2(t) (totalizando NPTO2 (número de pontos totais de oxigênio) medições, em ppm), são, respectivamente, as concentrações de etanol, glicose (substrato), células e oxigênio dissolvido.

Os sub-índices calc e exp representam respectivamente os valores calculados pelo modelo e os valores experimentais. O problema de otimização formulado é descrito na Eq.(V-3).

$$\min_{\{\underline{p}\}} F_{obj} \qquad \textbf{(V-3)}$$

Como o algoritmo de otimização empregado é irrestrito, com a finalidade de estabelecer limites e normalizar o espaço de busca da otimização, é implementada a transformação de variáveis mostrada na Eq. (V-4).

$$\underline{\theta} = \sqrt{\frac{\underline{p} - \underline{l\inf}}{\underline{l\sup} - \underline{p}}} \qquad \textbf{(V-4)}$$

onde $\underline{\theta}$ é o parâmetro normalizado, $\underline{p}$ valor do parâmetro, $\underline{l\inf}$ é o limite inferior e $\underline{l\sup}$ o limite superior. No cálculo da função objetivo, o valor do parâmetro é restaurado pela Eq. (V-5).

$$\underline{p} = \underline{l\inf} + \frac{\left(\underline{l\sup} - \underline{l\inf}\right)\underline{\theta}^2}{1 + \underline{\theta}^2} \qquad \textbf{(V-5)}$$

Na Tabela V-2 são apresentados os números de pontos experimentais utilizados para a implementação do modelo proposto.

Tabela V-2: Número de pontos experimentais, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, para Concentração de: substrato, celular, etanol e oxigênio dissolvido ao longo de todos os experimentos estudados

Experimento	Concentração de substrato (glicose)	Concentração Celular	Concentração de Etanol	Concentração de Oxigênio Dissolvido
1	13	13	8	13
2	13	13	0	13
3	12	12	8	12
4	12	12	0	12
5	12	12	8	12
6	15	15	0	15
7	12	12	7	12
8	14	14	0	14
SUB-TOTAL	103	103	31	103
TOTAL DE MEDIÇÕES (NT)	**340**			

As condições experimentais investigadas para *S. cerevisiae* estão brevemente resumidas na Tabela V-3.

Tabela V-3: Resumo das condições experimentais realizadas com *Saccharomyces cerevisiae*

Experimento	Potencial	Medições após Corte	RPM
1	Não	Sim	**275**
2	Não	Sim	**275**
3	0,75V	Sim	**275**
4	0,75V	Sim	**275**
5	0,75V	Sim	**400**
6	0,75V	Sim	**400**
7	0,75V	Sim	**400**
8	0,75V	Sim	**400**

O modelo, para um dado conjunto de valores dos parâmetros, definidos no vetor p, foi integrado com o *solver ode45.m* do *MATLAB 7.1* (*The Mathworks Inc.*). Os parâmetros, com os valores finais e unidades obtidos são mostrados na Tabela V-4.

Estudos anteriores (Oliveira *et al.* 2007 e 2009) revelaram que o valor de μ_{max}, ou seja a taxa específica máxima de crescimento celular, não sofre influência do estresse eletroquímico, então foi adotada tal medida no modelo. Fox (2006) em seu estudo constatou que a aplicação de potencial elétrico aumenta a porosidade da membrana celular do microorganismo, facilitando assim a entrada e saída de metabólitos da célula. Adicionalmente, a observação experimental indica uma aceleração da dinâmica de consumo de substrato quando o cultivo foi submetido a estresse eletroquímico. Assim, adota-se nesse trabalho que as duas condições experimentais (controle e com aplicação de potencial elétrico) são mais adequadamente representadas com valores distintos de Ks. Com a aplicação de potencial elétrico o substrato consegue permear mais facilmente para o interior da célula, ou seja, tal valor mais baixo caracteriza uma maior afinidade da célula pelo substrato, como está apresentado na Tabela V-4.

Para o parâmetro Y'_{XS}, adotou-se a dependência no potencial elétrico aplicado. Os resultados apresentados na Tabela V-4 mostram que o valor numérico deste parâmetro foi maior em experimentos com estresse, o que caracteriza um maior rendimento em células quando se aplica o estresse eletroquímico. Contudo, nota-se que para os valores obtidos para Y'_{PS} há um comportamento contrário. Portanto, com aplicação do potencial elétrico o fluxo de substrato está sendo deslocado para a produção de células e não de produto. Para Y'_{XP} o maior valor indica maior quantidade de célula em relação ao substrato o que comprova a explicação de que a aplicação de pontencial elétrico faz com que o fluxo de substrato seja deslocado para a produção de c´leulas e não de produto.

Como não há evidência experimental de que o transporte de O_2 para a célula sofra alteração com a aplicação de potencial elétrico, adota-se que um único valor do parâmetro K_{O_2} é capaz de representar o transporte de O_2. Justifica-se tal decisão também com base no tamanho da molécula de oxigênio quando comparada com a molécula de glicose. A molécula de oxigênio é tão menor que a molécula de glicose, que a alteração na porosidade da membrana celular não afeta seu fluxo para o interior da célula, diferentemente da glicose.

Os valores diferentes de K_La para as agitações estudadas são condizentes com a literatura, pois a presença de células como partículas apresenta certa influência na transferência de oxigênio quando o sistema é agitado lentamente (até 250 rpm), havendo uma redução do valor de K_La.. Entretanto, com maior velocidade de agitação (a partir de 350 rpm) a interferência das células na transferência de oxigênio passa a ser positiva de acordo com Amaral (2007).

Tabela V-4: Parâmetros obtidos em experimentos utilizando *S.* cerevisiae através do modelo proposto com o auxilio do programa *MATLAB 7.1 (The Mathworks Inc.)*

Parâmetros	Valor Final	Unidade
μ_{max}	0.5952	h^{-1}
K_S	sem potencial: 6.6877 com potencial: 1.2692	g/l
K_{O_2}	0.3569	g/l
$\frac{1}{Y'_{XS}}$	sem potencial: 0.9579 com potencial: 0.8480	g S/ g X (p.s.)
$\frac{1}{Y'_{PS}}$	sem potencial: 0.6652 com potencial: 1.0005	g P / g S
$\frac{1}{Y'_{XP}}$	sem potencial: 0.5328 com potencial: 0.9658	g X / g P
K_La **(275 rpm)**	2.9704	h^{-1}
K_La **(400 rpm)**	13.1574	h^{-1}
q_{O_2}	19.8365	ppm/l OD / g X (p.s)

A qualidade do ajuste obtido é apresentada nas Figuras V-1 a V-4, que representam respectivamente o crescimento celular, consumo de substrato, produção de etanol e consumo de O_2. Nota-se que os parâmetros atenderam satisfatoriamente os experimentos em estudo.

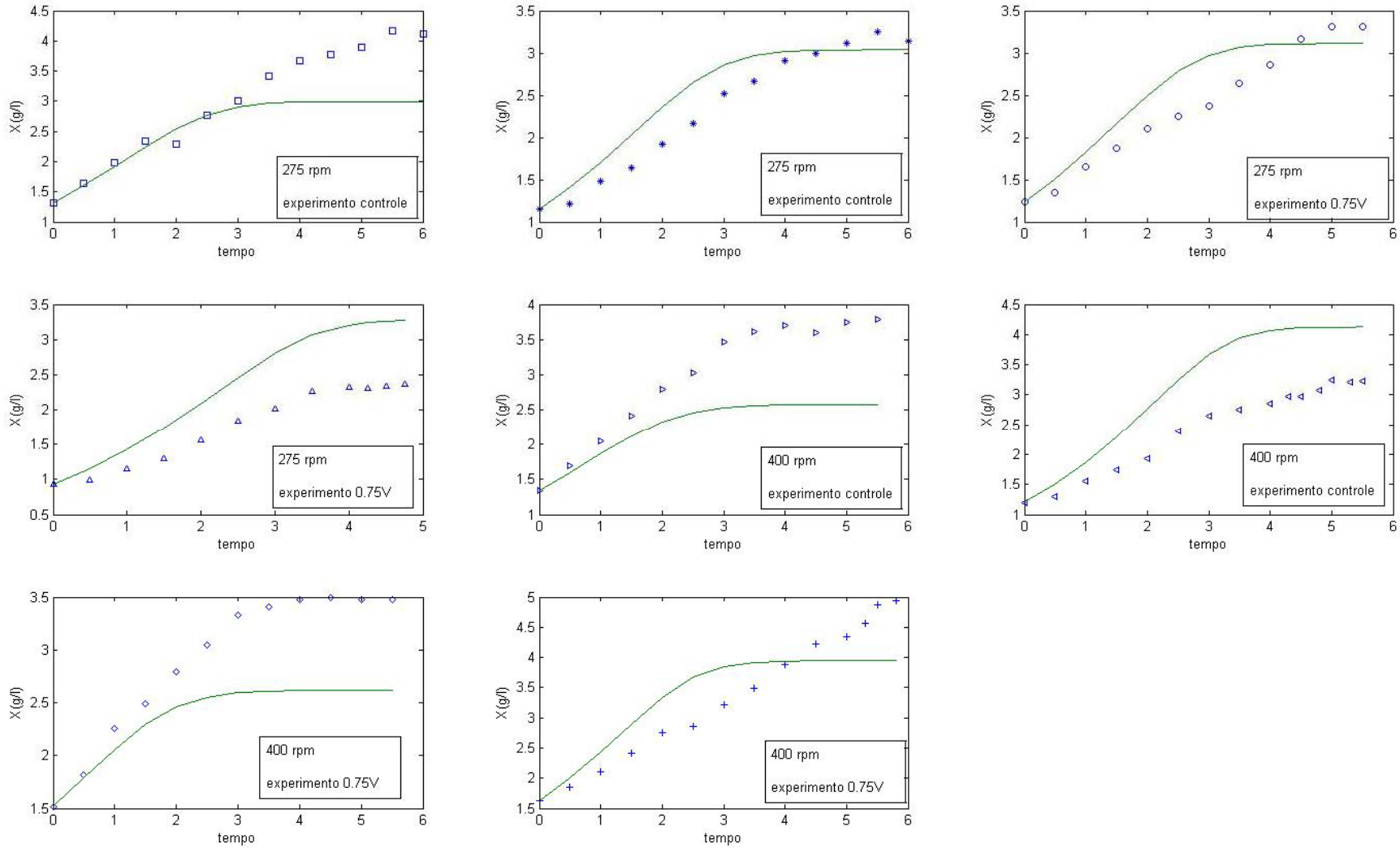

Figura V-1: Perfis de crescimento celular obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

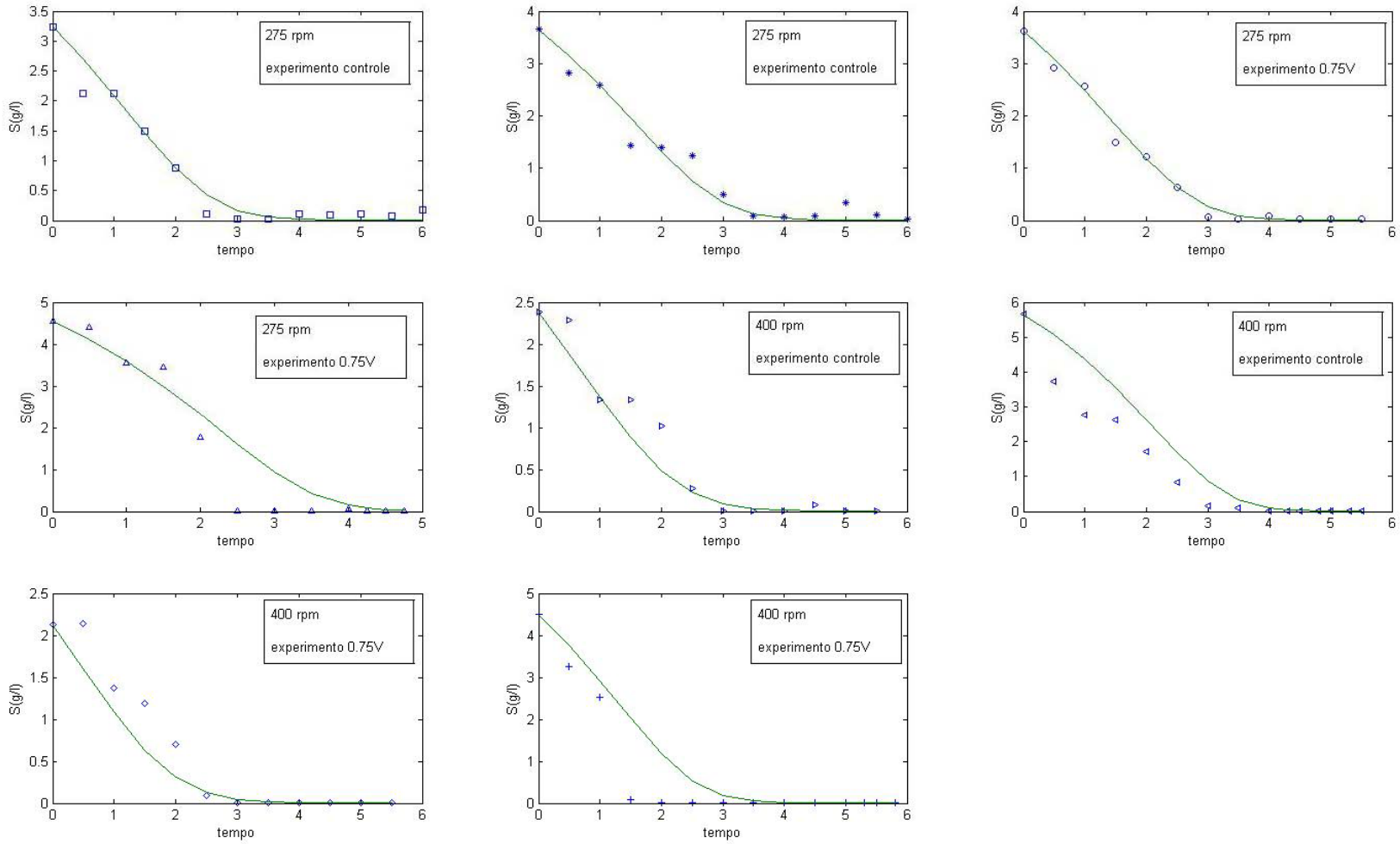

Figura V-2: Perfis de consumo de substrato obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

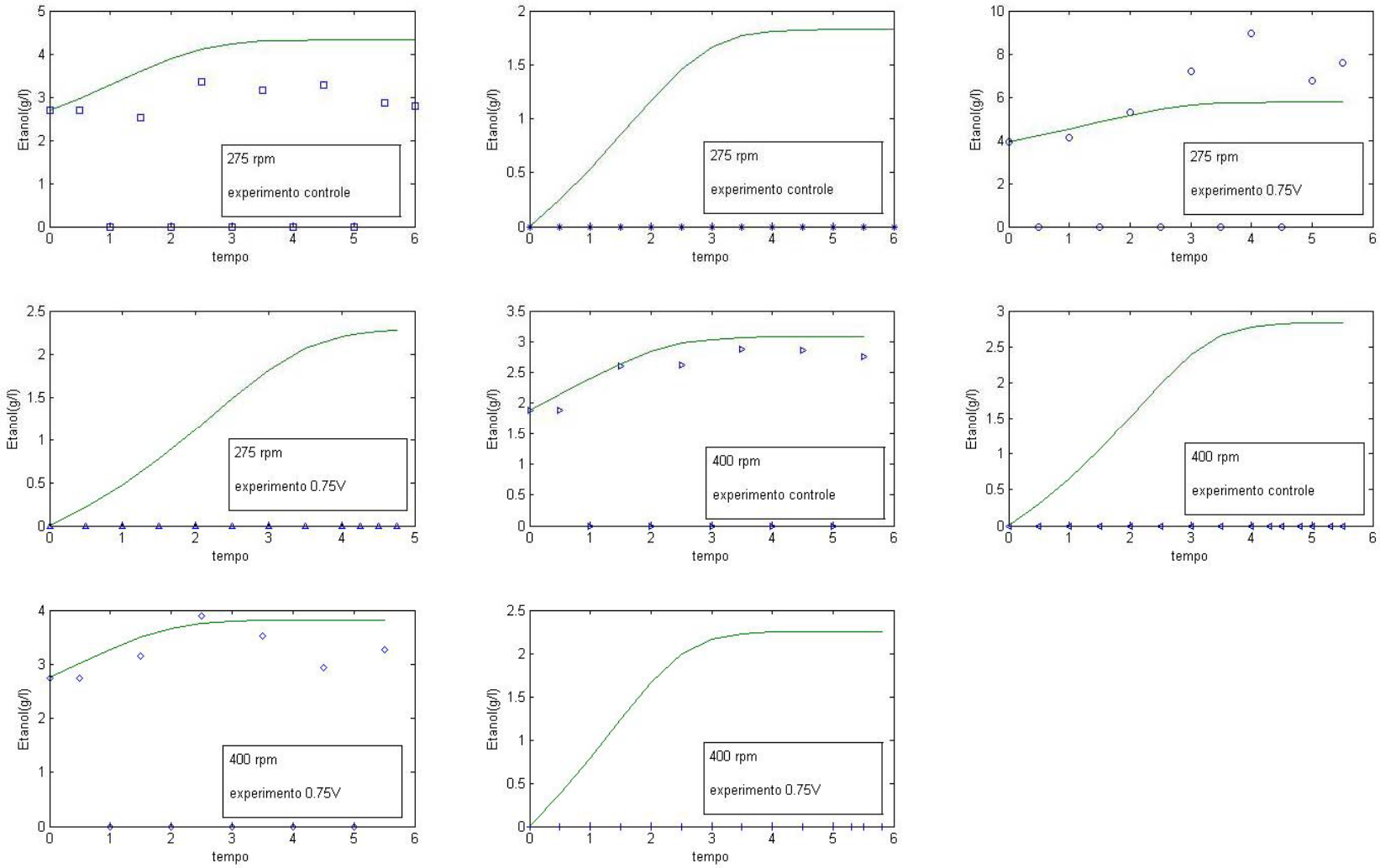

Figura V-3: Perfis de produção de etanol obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

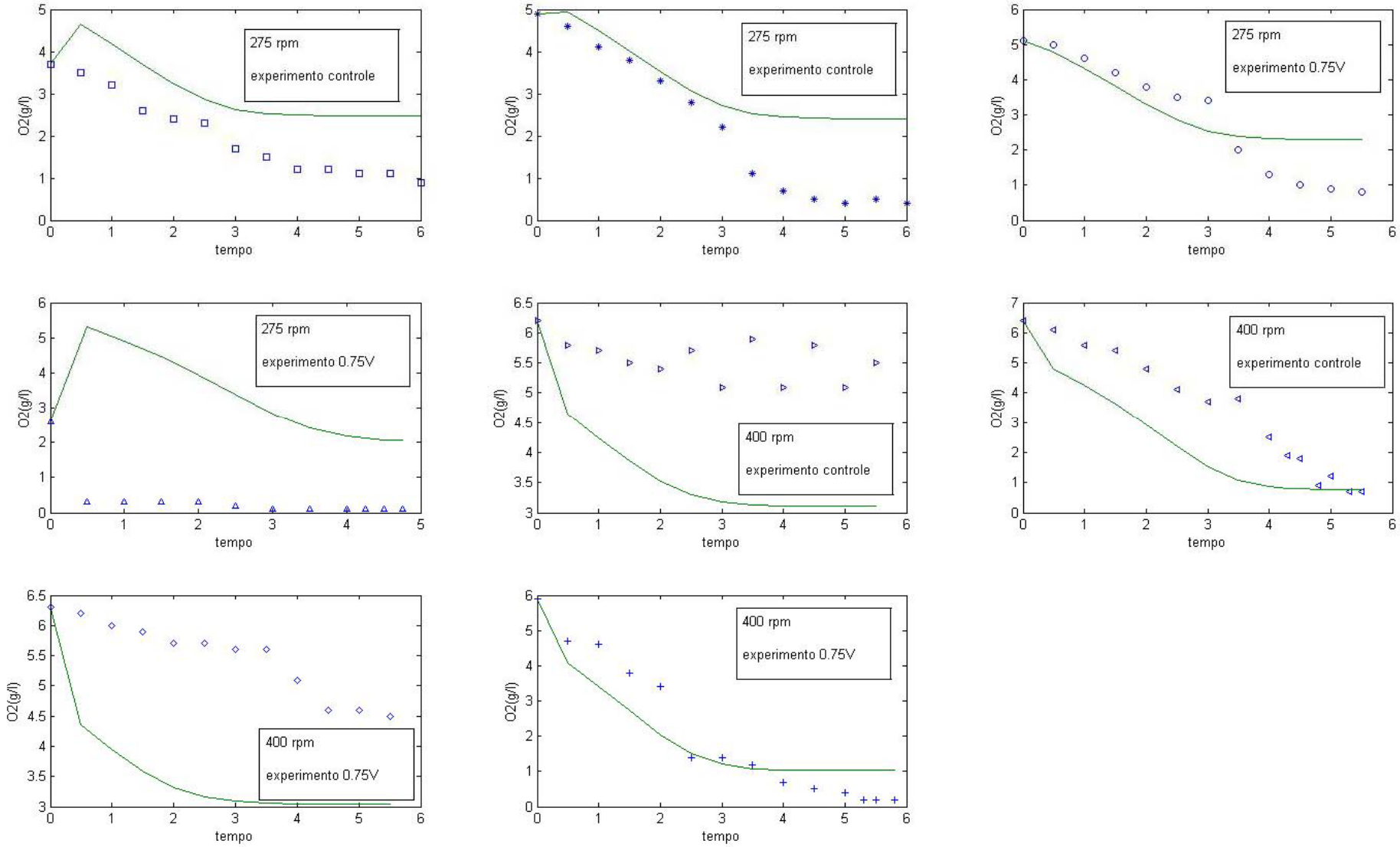

Figura V-4: Perfis de consumo de oxigênio obtidos para o cultivo de *S. cerevisiae* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

V.1.2 Morfologia Celular

a) Epifluorescência com calcofluor

O corante calcofluor é utilizado para a quantificação da idade celular visto que se liga a quitina da parede celular, isto é a cada cicatriz deixada pelo processo de gemulação da célula, emitindo uma coloração azulada. A idade celular é atribuída devido ao número de cicatrizes que a célula é detentora.

O cultivo de *S. cerevisiae* foi realizado em batelada por cortes, ou seja, retirada de metade do volume do mosto quando da exaustão de substrato e adição de meio novo mantendo a mesma concentração inicial de substrato, e o potencial elétrico aplicado apenas na 2ª batelada em ambas agitações estudadas. Os pontos para análise morfológica foram adquiridos no início, na troca de meio e ao final de cada experimento.

Com o intuito de averiguar o comportamento da morfologia celular antes da aplicação do potencial elétrico foram retiradas alíquotas no ponto de corte (antes da 2ª batelada) para as duas condições de agitação estudadas, 275 rpm e 400 rpm. Os resultados são observados nas Figuras V-5 e V-6, respectivamente.

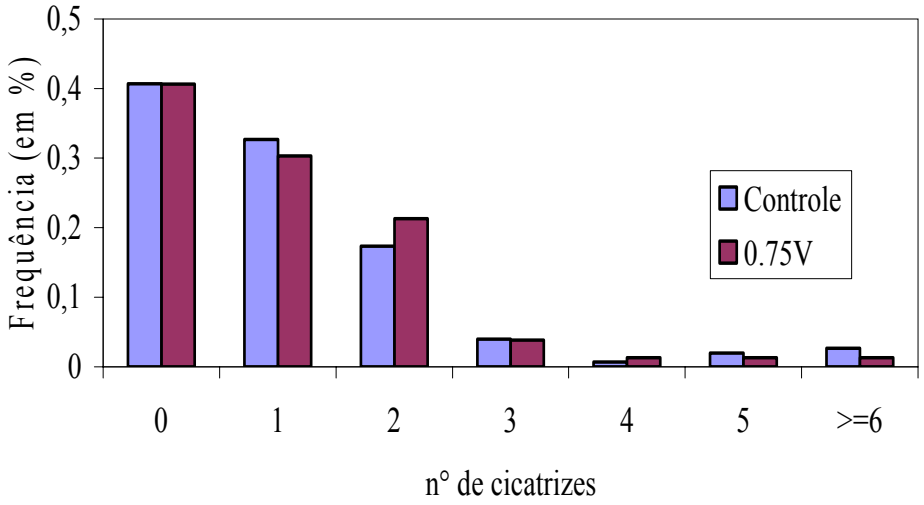

Figura V-5: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes em experimentos conduzidos a 275 rpm.

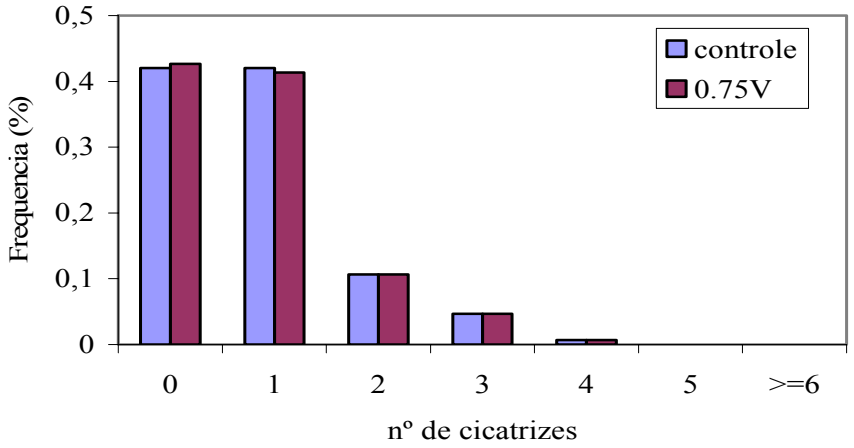

Figura V-6: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes em experimentos conduzidos a 400 rpm.

Analisando as Figuras V-5 e V-6 separadamente, pode-se constatar que as células encontram-se em sincronia celular antes da segunda batelada, ou seja, no experimento controle e no experimento em que foi aplicado potencial. Porém relacionando as duas figuras há uma diferença quando o experimento é conduzido em diferentes velocidades de agitação. Quando o sistema é agitado a 400 rpm não há células com 5 ou mais cicatrizes, enquanto que para o sistema agitado a 275, há um deslocamento do histograma para um maior número de cicatrizes.

Posteriormente, para avaliar o comportamento do ciclo celular dos cultivos sem e com aplicação de potencial elétrico foram analisadas amostras no final de cada experimento de 275 e 400 rpm, que são apresentadas nas Figuras V-7 e V-8, respectivamente.

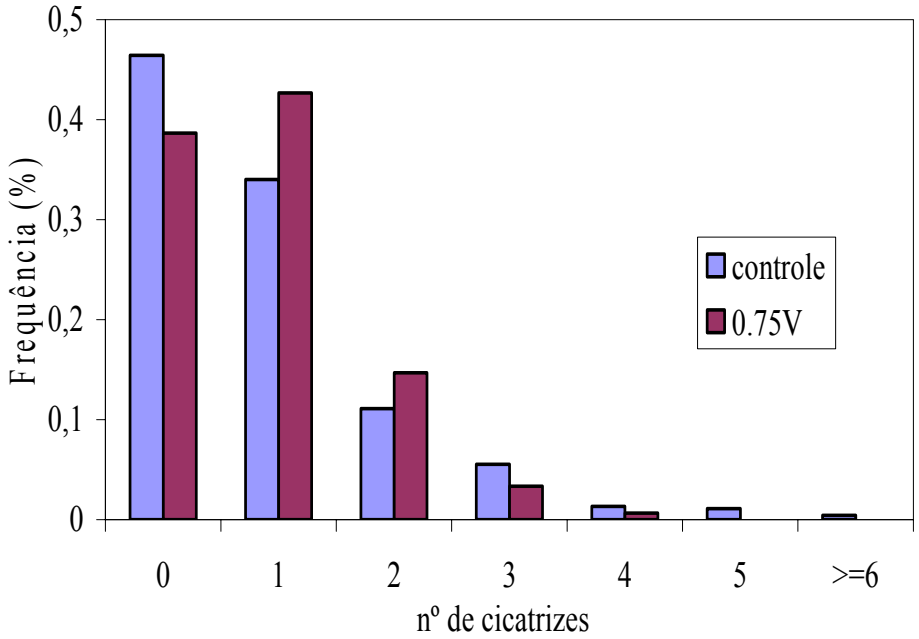

Figura V-7: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes ao final dos experimentos controle e com potencial conduzidos a 275 rpm.

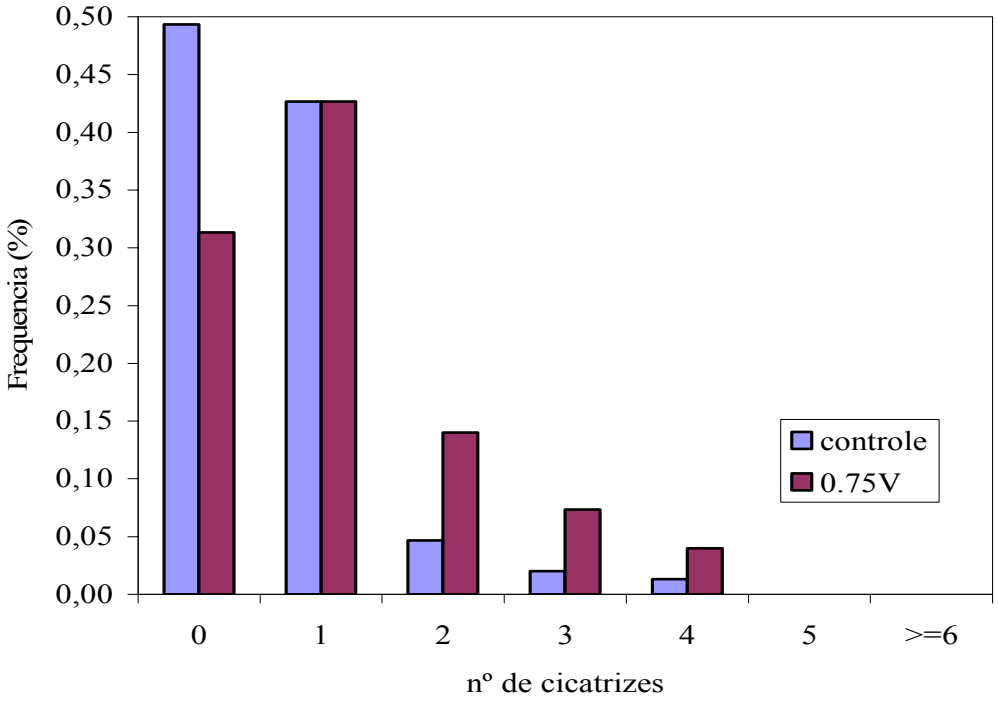

Figura V-8: Histograma de freqüência de células por número de cicatrizes ao final dos experimentos controle e com potencial conduzidos a 400 rpm.

A agitação exerce forte influencia no número de células com menos que duas cicatrizes, o que é facilmente visualizado em experimentos controle. Quanto menor a agitação aplicada maior será o número de células que possuem mais de duas cicatrizes.

Hartwell e Unger (1977) mostraram que células de *S. cerevisiae* sofrem divisão assimétrica e que seu ciclo celular é controlado por massa: há uma massa mínima que a célula deve alcançar para iniciar o processo de divisão. Isso sugere através dos resultados obtidos que a aplicação de potencial elétrico favorece o aumento de células em processo de divisão pela diminuição de seu tamanho crítico. Segundo Duarte (2006) células-filhas são menores que células-mãe resultando em um tempo maior para que as filhas completem o ciclo de divisão, ou seja o potencial elétrico também pode estar acelerando o relógio biológico da célula.

V.2 Yarrowia lipolytica

V.2.1 Modelagem matemática do cultivo de *Y. lipolytica*

Foi proposto para *Y. lipolytica* um modelo análogo ao da *S. cerevisiae* para realizar os estudou metabólicos com os dados experimentais obtidos. Nesse modelo foi utilizado a Equação de Monod modificada (Eq. V-1) onde o oxigênio é o substrato limitante. A Tabela V-5 apresenta os modelos adotados. Na Tabela V-6, são apresentados os dados experimentais empregada para ajuste de parâmetros do modelo.

Tabela V-5: Modelos avaliados para *Y. lipolytica*

MODELO	$\frac{dX(t)}{dt}$	$\frac{dS(t)}{dt}$	$\frac{dO_2(t)}{dt}$
	$\mu * X$	$-\frac{dX(t)}{dt} * \frac{1}{Y_{XS}}$	$K_L a * (O_2^* - O_2) - \frac{q_{O_2} * X * S}{(K_{OS} + S)}$

Onde:

μ - taxa específica de crescimento celular (h^{-1})

X - concentração celular (g/l)

Yxs – fator de rendimento de célula em relação ao substrato consumido total

$K_L a$ – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})

O_2* - concentração de saturação de oxigênio dissolvido, adotada igual a 7 ppm.

O_2 – concentração de oxigênio dissolvido (ppm)

K_{OS} – constante saturação para o substrato em relação ao oxigênio consumido

qO2 – taxa de consumo de oxigênio (g/l*h)

S – concentração do substrato (g/L)

Tabela V-6: Número de pontos experimentais, utilizando *Y. lipolytica*, para Concentração de: substrato, celular e oxigênio dissolvido ao longo de todos os experimentos estudados

Experimento	Concentração de substrato (glicose)	Concentração Celular	Concentração de Oxigênio Dissolvido
1	17	17	17
2	18	18	18
3	12	12	12
4	18	18	18
5	18	18	18
6	21	21	21
7	12	12	12
8	17	17	17
9	10	10	10
SUB-TOTAL	143	143	143
TOTAL DE MEDIÇÕES (NT)	**429**		

As condições experimentais para o cultivo de *Yarrowia lipolytica* estudadas são brevemente resumidas na Tabela V-7.

Tabela V-7: Resumo das condições experimentais dos experimentos realizados com *Yarrowia lipolytica*

Experimento	Potencial
1	Não
2	Não
3	Não
4	0.75V
5	0.75V
6	0.75V
7	0.75V
8	1.0V
9	1.0V

Para o estudo foi adotada a dependência dos parâmetros K_s e Y_{XS} com a aplicação do potencial elétrico no modelo proposto para *Y. lipolytica,* porque em estudos anteriores de Oliveira (2007 e 2009) foi verificado que esse tipo de estresse exerce influência nesses dois parâmetros.

Pelo mesmo motivo já mencionado anteriormente os valores de μmax foram considerados constantes em ambas condições experimentais.

Os valores da constante de saturação do modelo de Monod (Ks) sugerem que com a aplicação do potencial elétrico a afinidade da célula pelo substrato aumenta isso pode ser justificado através do aumento da porosidade da célula, já comprovado por Fox (2006), o que provavelmente aumenta permeabilidade celular ao substrato.

Como não há evidência experimental de que o transporte de oxigênio para a célula sofra alteração com a aplicação de potencial elétrico, adota-se que um único valor do parâmetro é capaz de representar o transporte de oxigênio. Justifica-se tal decisão também com base no tamanho da molécula de oxigênio, com melhor permeabilidade através da membrana celular quando comparada com a molécula de glicose.

O valor de Y_{XS} foi maior em experimentos com estresse, o que caracteriza um maior rendimento em células. Tal fato é plausível visto que há uma maior facilidade de acesso ao

substrato pela célula. A glicose já é um substrato facilmente assimilável pela célula. Há um maior fluxo de glicose para o interior da célula.

O resultado obtido de K_La se mostrou bastante equiparado com o obtido por Amaral (2007), visto que o autor relata em sua tese valores em diferentes agitações e na agitação de 350 rpm possui um K_La de 23,4 h^{-1}. Como o trabalho se realiza em 550 rpm e o aumento da agitação gera um aumento do K_La o valor obtido se mostra dentro do esperado.

Tabela V-8: Parâmetros obtidos em experimentos utilizando *Y. lipolytica* através do modelo proposto com o auxilio do programa *MATLAB 7.1 (The Mathworks Inc.)*

Parâmetros	Valor Final	Unidade
μ_{max}	0.3592	h^{-1}
K_S	sem potencial: 8.5138 com potencial: 4.7559	g/l
K_{O_2}	0.2444	g/l
K_{OS}	0.0104	g/l
$\frac{1}{Y_{XS}}$	sem potencial: 1.7824 com potencial: 1.2974	g S/ g X (p.s.)
K_La	31.1894	h^{-1}
q_{O_2}	10.1464	g/l OD / g X (p.s)

Para verificar analiticamente se o modelo consegue representar os pontos experimentais, foram obtidos gráficos que representam respectivamente o crescimento celular, consumo de substrato e o consumo de O_2, como podem ser vistos nas Figuras V-9 até V-11. Nota-se que os parâmetros atenderam satisfatoriamente os experimentos.

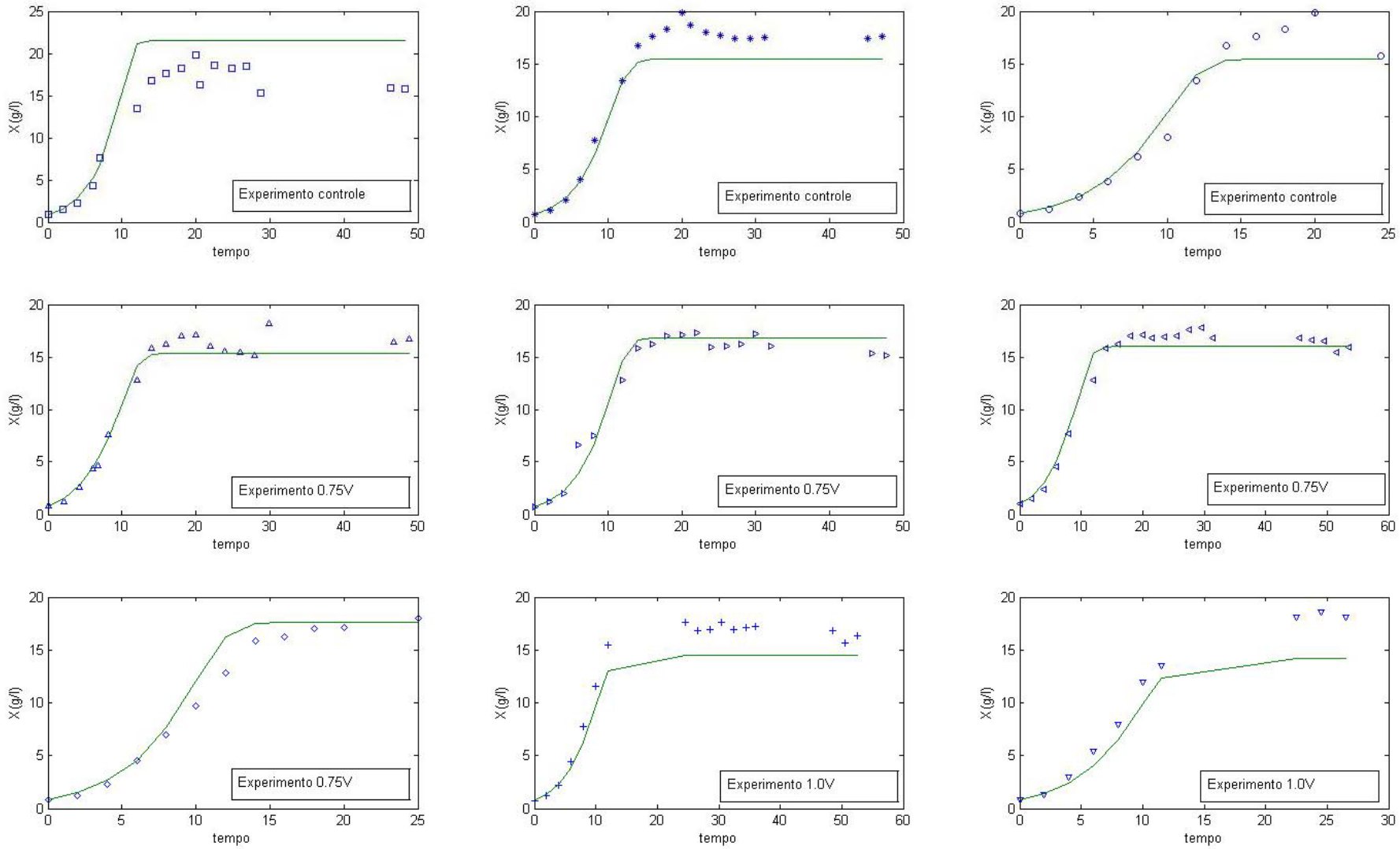

Figura V-9: Perfis de crescimento celular obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

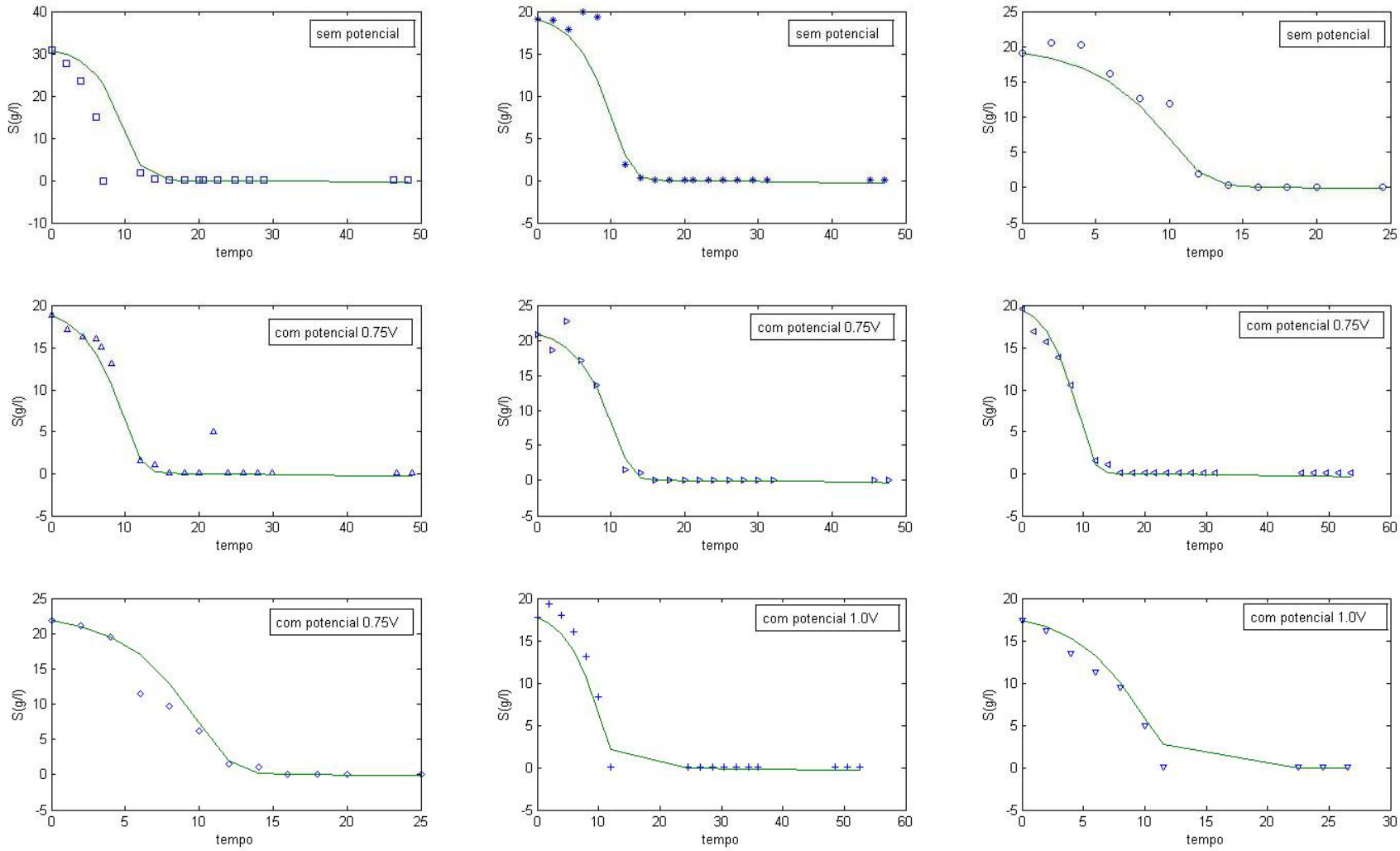

Figura V-10: Perfis de consumo de substrato obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

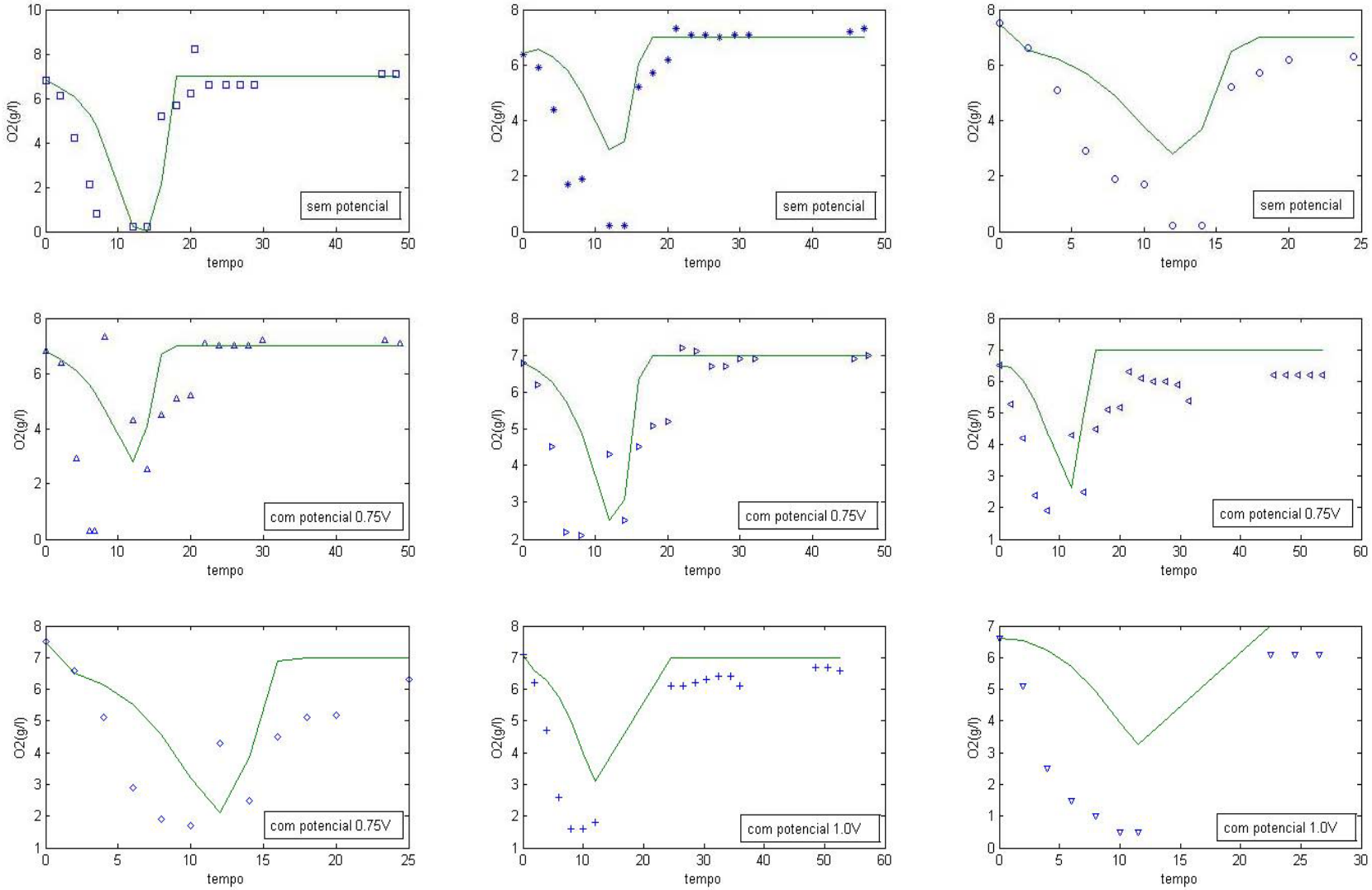

Figura V-11: Perfis de consumo de oxigênio obtidos para o cultivo de *Y. lipolytica* nas condições estudadas com a utilização do modelo matemáticos em todos os pontos obtidos experimentalmente.

V.2.2 Produção de lipase

A atividade lipásica extracelular foi acompanhada durante os cultivos através do método espectrofotométrico. Como foi mencionado na revisão bibliográfica, este método detecta além das lipases, outras esterases, o que pode superestimar os resultados no que se refere à enzima desejada, a lipase. A Figura V-12 apresenta os perfis de atividade obtidos para todas as condições estudadas.

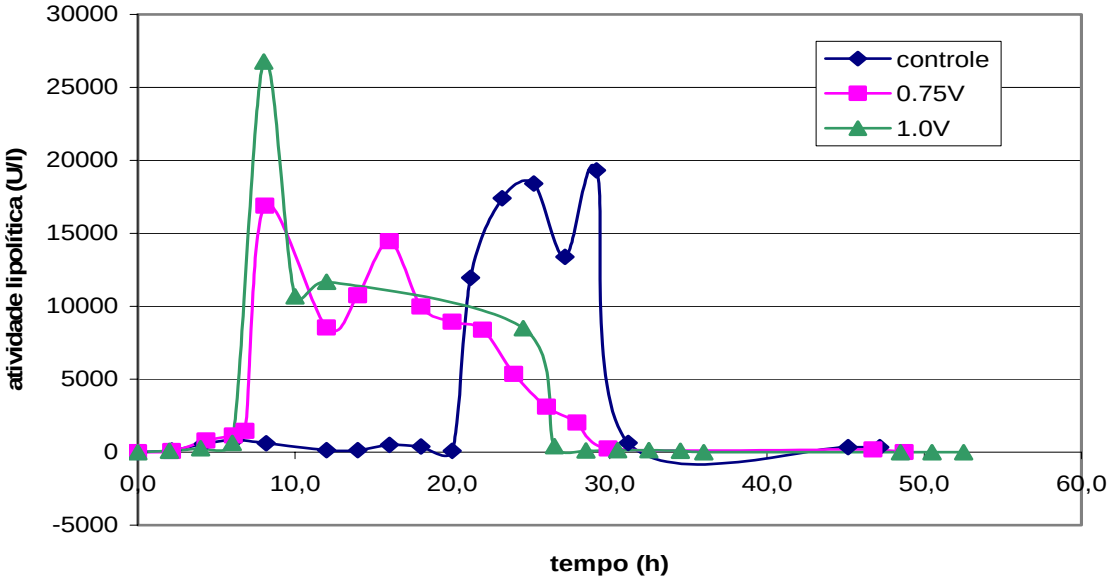

Figura V-12: Atividade da lipase extra-celular de *Y.* lipolytica ao longo do experimento nas 3 condições experimentais estudadas (controle, com estresse de 0.75V e 1V)

Ao se observar a Figura V-12, a presença de atividade lipolítica é visualizada em experimentos controle em aproximadamente 20h, isto é, na fase estacionária do crescimento celular o que está de acordo com o que fora descrito por Amaral (2003). Porém quando o potencial elétrico é aplicado essa enzima parece ser excretada para o meio mais rapidamente fazendo com que o máximo de atividade seja obtido em, aproximadamente, 8 horas. Pereira-Meirelles *et al.* (2000) estudaram a localização da lipase em células de *Y. lipolytica* e não detectaram lipase extracelular durante as primeiras 24 horas de cultivo, sugerindo que nesta fase a lipase intracelular começa a ser liberada lentamente no meio de cultura e atinge seu máximo somente no final da fase estacionária de crescimento. Então a permeabilidade na membrana causada pelo estresse eletroquímico (Fox, 2006) seria uma justificativa plausível para a explicação da

diferença de atividade lipolítica entre os experimentos controle e com estresse; pois facilita a excreção da lípase intracelular.

V.2.3 *Morfologia Celular*

a) Análise de Imagem:

No estudo com *Y. lipolytica* procurou-se investigar a formação de hifas deste microrganismo dado que esta é uma levedura modelo no estudo de dimorfismo celular, ou seja a habilidade de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas: células ovóides e hifas bastante alongadas. *Yarrowia lipolytica* é um fungo que apresenta dimorfismo naturalmente, formando células de leveduras, pseudo-hifas e hifas septadas.

Para se analisar a formação de hifas ao longo do processo (sem e com a aplicação de estresse), foi utilizado um programa de análise de imagens desenvolvido por Freire *et al.* (2005), onde o mesmo analisa a circularidade da cepa através da relação Fmáx/Fmín (Kawasse *et al* (2003)). Durante o cultivo e produção de lipase de *Y lipolytica*, foram retiradas amostras no início (0 horas de experimento) e ao final do experimento (48 horas de experimento).

Os resultados sem aplicação de potencial elétrico e com potencial elétrico são apresentados na Figura V-13 para o início do experimento e na Figura V-14 para o final do experimento.

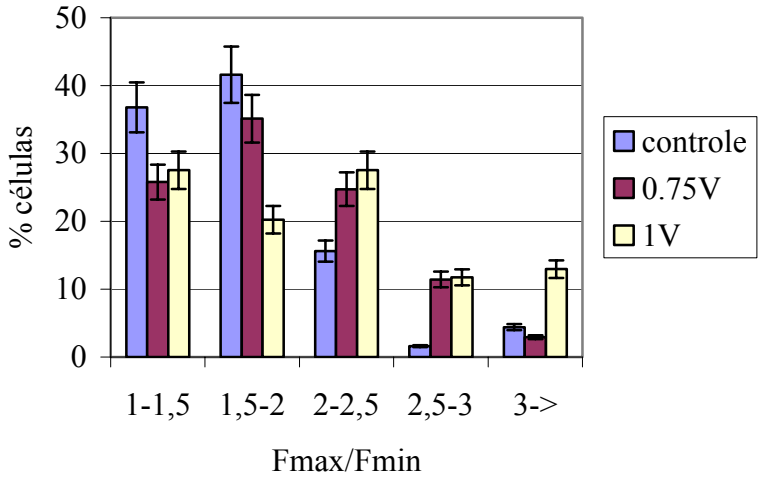

Figura V-13: Perfil de Imagem para *Yarrowia lipolytica* no início dos experimentos (controle, 0,75V e 1V)

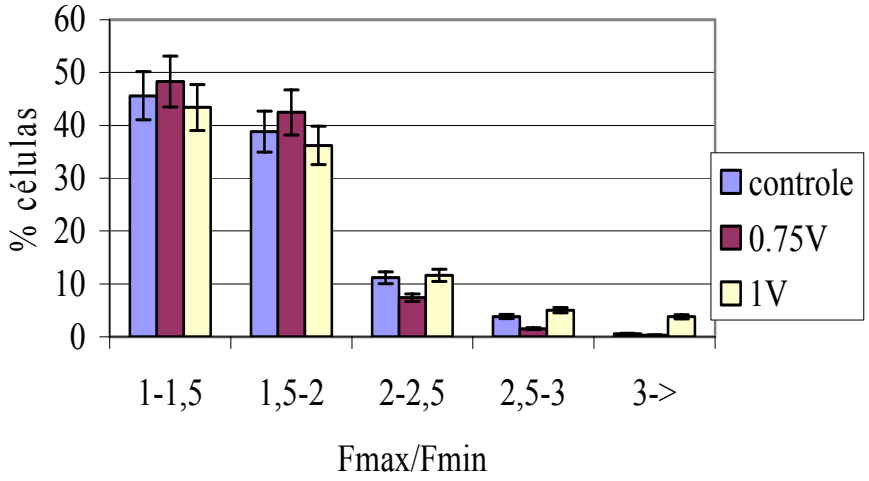

Figura V-14: Perfil de Imagem para *Yarrowia lipolytica* ao final dos experimentos (controle, 0,75V e 1V)

Através dos perfis obtidos na Figura V-13, pode se observar uma variação nos valores obtidos para a morfologia no ponto inicial, isso ocorre, pois a levedura foi transferida para o inoculo a partir de um meio de cultivo sólido, sendo necessário algum tempo ou algumas transferências para meios líquidos para sua adaptação a este meio. Como foi feita apenas uma transferência para o meio líquido, é possível que isso aliado ao pouco tempo de incubação neste meio (48 horas) não tenha sido suficiente para a adaptação das células.

Contudo na Figura V-14 há uma tendência ao sincronismo celular, ou seja, decorrido o tempo de cultivo em reator e com essa segunda transferência de meio, as células tendem a se adaptarem ao meio de cultura, o que eliminaria a influência do potencial elétrico sobre a formação de hifas.

Para remover o efeito da aleatoriedade inicial da cultura,, e analisar assim apenas a influência do potencial elétrico, foiempregada para análise a relação percentual descrita na Equação V-6)

$$\text{relação percentual} = \frac{\%\text{células}_{3^{o}\,\text{dia}} - \%\text{células}_{1^{o}\,\text{dia}}}{\%\text{células}_{1^{o}\,\text{dia}}} \qquad \textbf{(V-6)}$$

Onde:

% células $_{3^{o}\text{dia}}$ – é o percentual de células com cada elongação ao final do 3ºdia.

% células $_{1^{o}dia}$ - é o percentual de células com cada elongação ao final do 1ºdia.

Observando a Figura V-15, nota-se que a aplicação de estresse eletroquímico aumenta o número de células com elongação em torno de 1, ou seja, as células ficam mais circulares. Isto indica que a aplicação de potencial elétrico inibe a formação de hifas.

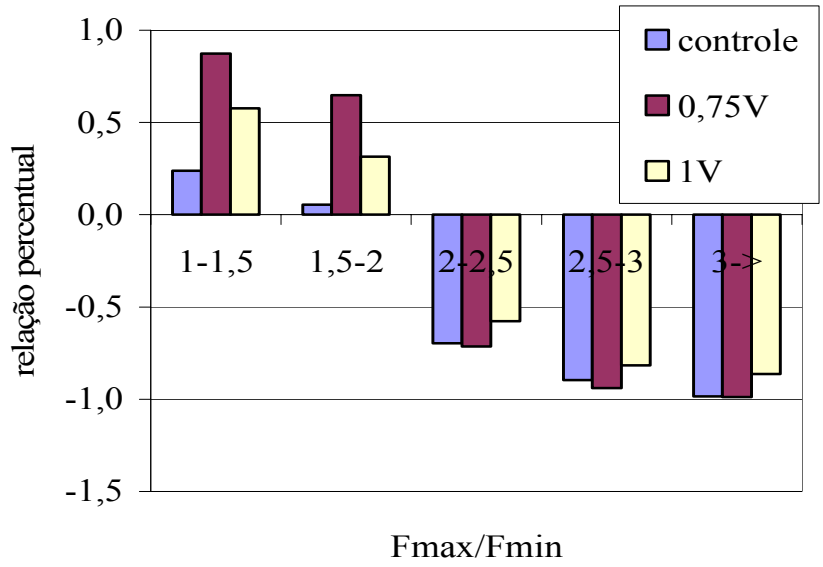

Figura V-15: Relação percentual (entre o 3º e o 1º dia) contra circularidade em *Yarrowia lipolytica* ao final dos experimentos (controle, 0,75V e 1V)

Ainda pode se constatar que o potencial de 0,75 V induz ainda mais esse efeito até a circularidade em tono de 1,5-2, já o potencial de 1,0 V reduz drasticamente a formação de hifas ao longo de todo o processo; quando comparadas com as células controle.

b) Epifluorescência com alaranjado de acridina

Com o objetivo de analisar as células viáveis e não viáveis ao longo do processo foi utilizada a técnica de epiflorescência com o alaranjado de acridina. Para a realização da análise foram recolhidos pontos no início do 1º, 2º e 3º dias de experimento.

Os resultados da análise da viabilidade celular com a aplicação de potencial elétrico em relação ao controle estão apresentados nas Figuras V-16 e V-17 para células ativas e inativas, respectivamente.

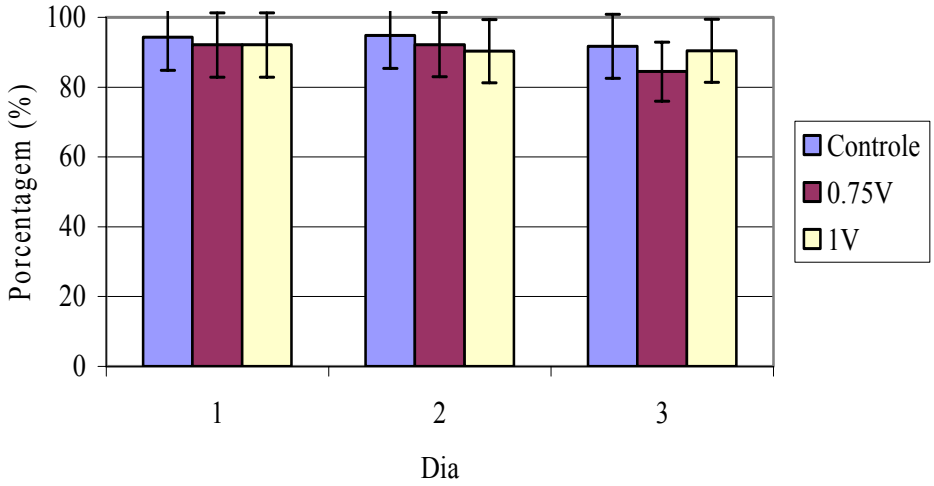

Figura V-16: Histograma de distribuição de percentual de células vivas ao longo dos dias de experimento.

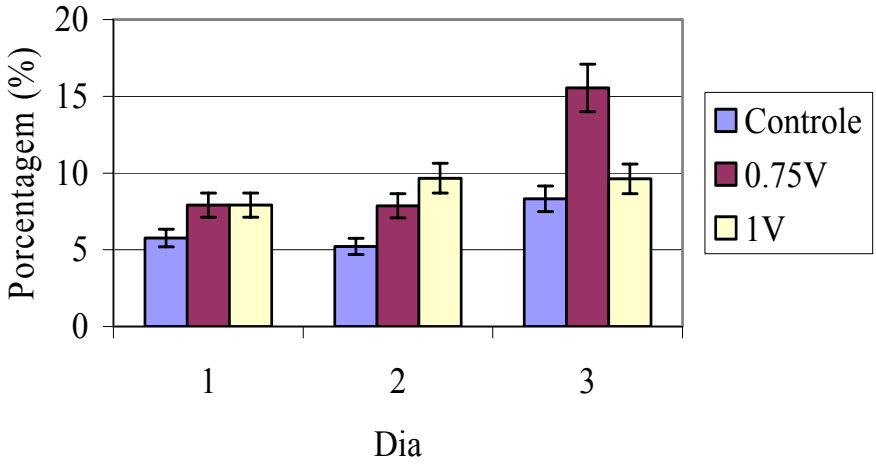

Figura V-17: Histograma de distribuição de percentual de células mortas ao longo dos dias de experimento.

Pode-se notar na Figura V-16 uma similaridade no percentual de células viáveis em todas as condições experimentais. Portanto, o resultado indica que o potencial elétrico não afeta a viabilidade celular nas condições estudadas. Na Figura V-17 é possível observar que o potencial também não exerce uma influência significativa nas células não viáveis, existindo apenas uma ligeira elevação do percentual de células mortas em experimentos com aplicação de potencial de 0,75 V.

Capítulo VI - Conclusões

Conclusões para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

De acordo com a modelagem do processo:

- ✓ O estresse eletroquímico influencia nos seguintes parâmetros: K_S, Y'_{XS}, Y'_{PS}, Y'_{PX}.
- ✓ Os valores obtidos para K_S denotam que quando o potencial elétrico é aplicado o substrato permea mais facilmente para o interior da célula.
- ✓ O potencial elétrico melhora a produção de células, ou seja, o consumo de substrato está sendo direcionado para a produção de células; os valores de Y'_{PS} corroboram tal conclusão, visto que a aplicação de potencial elétrico diminui tal fator de rendimento.
- ✓ Os valores de K_La estão condizendo para as agitações estudadas

De acordo com a morfologia

- ✓ Antes da aplicação do estresse (no início da segunda batelada) em ambas as rotações as células encontram-se em sincronia celular
- ✓ O aumento da agitação inibe o processo de gemulação celular.
- ✓ Ao final do experimento, a agitação exerceu forte influencia no número de células com menos que duas cicatrizes. Quanto menor a agitação aplicada maior será o número de células que possuem mais de duas cicatrizes. A aplicação do potencial, independente da agitação, favorece o aumento de células no processo de divisão indicando uma possível aceleração do relógio biológico ou diminuição do tamanho crítico para a divisão.

Conclusões para o cultivo de *Yarrowia lipolytica*

De acordo com a modelagem do processo:

- ✓ O estresse eletroquímico influencia nos seguintes parâmetros: K_S, Y_{XS}.
- ✓ Os valores obtidos para KS denotam que quando o potencial elétrico é aplicado o substrato permea mais facilmente para o interior da célula, o que também foi observado nos resultados para a outra levedura..
- ✓ O potencial elétrico melhora a produção de células, ou seja, o consumo de substrato está sendo direcionado para a produção de células.

- ✓ O valor de K_La condiz com a agitação estudada
- ✓ A permeabilidade celular causada pelo potencial elétrico facilita a excreção da lipase intracelular para o meio extra celular..

Morfologia

- ✓ No ponto inicial dos experimentos foi constatada uma aleatoriedade no que diz respeito a morfologia, porém ao longo do experimento (no último dia) nota-se um uniformidade entre as formas de condução do processo. A aplicação do potencial elétrico não influenciou na formação de hifas.
- ✓ No início do experimento há uma aleatoriedade com relação ao alongamento das células, porém ao final do mesmo é observada uma uniformidade das células nas condições estudadas.
- ✓ O potencial elétrico não exerce influencia na viabilidade celular.

Capítulo VII - Bibliografia

ADELHORST, K.; BJÖRKLING, F.; GODTFREDSEN, S.E.; KIRK, O. (1990). "Enzyme Catalysed Preparation of 6-O-Acylglucopyranosides". Synthesis. V.2 p.112-115.

AIDOO, K.E., ROB, N.M.J. ; SARKAR, P.K. (2006). "Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods". FEMS Yeast Research , Amsterdam, v. 6, p. 30-39.

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.

ALONSO, F.O.M., OLIVEIRA, E.B.L, DELLAMORA-ORTIZ, G.M. e PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (2005). "Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels". Brazilian J. Chem. Eng., v. 22, n.1, p. 9-18.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO; GUZZO, J.; BARATTI, J. (1999). "Molecular characterization of gene encoding in esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases". Biotechnology Letters, v. 21, p. 313-319,.

ALVES, M.H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A.L.F.; MILANEZ, A.I. (2002). "Screenig of Mucor spp . for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease". Brazilian Journal of Microbiology , v. 33.

AMARAL, P.F.F. (2003). "Emprego de carreador de oxigênio na Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*", Dissertação de mestrado, Escola de Química – UFRJ

AMARAL, P.F.F. (2007). "Produção de lípase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico", Tese de doutorado, Escola de Química – UFRJ

AMAT A., RIGAU J.,.WAYNANT R. W., ILEV I. K., ANDERS J. J. (2006), "The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism". Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology v. 82 p.152–160.

ANDREISHCHEVA, E.N., SOARES, M.I.M. e ZVYAGIL'SKAYA, R.A. (1997). "Energy metabolism of *Candida (Yarrowia) lipolytica* yeast under nonstress and salinity stress conditions", *Russian J. of Plant Physiol.*, v.44, n.5, p.568-574.

ARAÚJO, O.Q.F., COELHO, M.A.Z., MARGARIT, I.P., VAZ-JUNIOR, C.A., ROCHA-LEÃO, M.H.M. (2004) "Electrical Stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* Cultures", *Braz. J. Microbiol*., v. 35, p. 97-103.

ARPIGNY, J.L. AND JAEGER, K.-E. (1999) "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties". Biochem. J., v.343, p.177–183.

ASHRAFI, K., SINCLAIR, D., GORDON, J.I., GUARENTE, L.(1999). "Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology, v. 96, p.9100–9105.

BANDMANN, N.; COLLET, E.; LEIJEN, J.; UHLÉN, M.; VEIDE, A.; NYGREN, P.A. (2000). "Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems". Journal of Biotechnology, v. 79, p. 161-172.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. (1997). "Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica", FEMS Microbiol. Rev., v.19, pp.219-237.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A.(2002). "Isolation and characterization of three distinct forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation". Braz. arch. biol. technol., v.44, n.2 Curitiba/BRA.

BERMAN, J. E SUDBERY, P.E. (2002) "*Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast". *Nat. Rev. Genet*. v.3, p.918–930.

BIER, M. (1955) "Lipases". Methods Enzymology, v. 1, p. 627-651.

BJÖRKLING, F.; GODTFREDSEN, S.E.; KIRK, O. (1989). "A Highly Selective Enzyme-Catalysed Esterification of Simple Glucosides". Journal of the Chemical Society - Chemical Communications. v.14, p.934-935.

BORNSCHEUER, T.U.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, H.S. (2002) "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application". Trends in Biotechnology, v. 20, n. 10, p. 433-437.

BORNSCHEUER, U.T. 1995. "Lipase Catalysed Synthesis of Monoacylglycerols." Enzyme and Microbial Technology. v.17, p.578-586.

BORNSCHEUER, U.T.; KAZLAUSKAS, R.J. (1999) "Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations". Wiley –VCH, Weinheim.

BROCKMAN, H.L (1984) "General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches". In: Borgstrom, B. e Brockman, H.L. (Eds.). Lipases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p. 1-46.

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

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATKAR, S.A.; ALSINA, M.A. (2000.b). "Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase". Biochimie, v. 82, p. 1053-1061.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S.A., ALSINA, M.A. (2000.a) "Interfaciall control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase." Biochemistry**,** v. 39, p.413-423.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U.T.; SCHMID, R.D.(1996). "Lipase-Catalysed Solid Phase Synthesis of Sugar Esters. Fett/lipid". v..10, p.332-335.

CARLILE, M.; WATKINSON, S.C. (1997) "The fungi"., London: Academic Press, p.460

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C. (2006) "Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter sp.* Lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate." Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic, v. 42, p. 39-44.

CHEN, W., HAN, Y., CHEN, Y., XIE, J.T. (1998) "Field-induced electroconformational damages in cell membrane proteins: a new mechanism involved in electrical injury", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, v.47, p.237-245.

CHEN, J., WEN, C. e CHEN, T. (1999). "Effect of oxygen transfer on lipase production by Acinetobacter radioresistens" Biotechnol. Bioeng., v.62, n.3, p.311-315.

CHERNYAVSKAYA, O.G., SHISHKANOVA, N.V., IL'CHENKO, A.P., FINOGENOVA, T.V. (2000) "Synthesis of α-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.53, p.152-158.

CHO, A. R.;YOO, S.K.;KIM, E. J. (2000). "Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1". FEMS Microbiology Letters, v. 186, p. 235-238.

CI, Y., FENG, J., JIANG, Z., LUO, D. (1997). "The voltammetric behavior of *Saccharomyces cerevisiae*," *Bioelectrochem.Bioenerg*., v.43, p.293-296.

CIAFARDINI, G., ZULLO, B.A. e IRIDE, A. (2006). "Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil", Food Microbiology, v. 23, p. 60–67.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. (2005) "Isolation and screening of alkaline lipase-production fungi from Brazil savanna soil.", World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 22, p. 881-885.

CORZO, G. e REVAH, S. (1999). "Production and characteristics of the lipase from Yarrowia lipolytica 681", Bioresource Technol., v.70, pp.173-180.

CREATOR, J., JOYNE, J. (1993) "*in The cell cycle – a practical approach"* (ed. Fantes, P. and Brooks R.), p.69-92, IRL Press, USA.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. (2000). "Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme and Microbial Technolgy, v. 26, p. 657-663.

De Souza Pereira, R. (1998). “The Use of Baker’s Yeast in the Generation of Asymmetric Centers to Produce Chiral Drugs and Other Compounds”. Critical Reviews in Biotechnology. v.18, p.25-83.

DEIVE, F.J.; COSTAS, M.; LONGO, M.A. (2003) “Production of a thermostable extracellular lipase by Kluyveromyces marxianus”. Biotechnology letters , v. 25, p. 1403-1406.

DEIVE, F.J.; COSTAS, M.; LONGO, M.A. (2003) “Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*.” Biotechnology letters , v. 25, p. 1403-1406.

DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. (1999) “Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027.” FEMS Microbiology Letters, v. 179, n. 2, p. 241-246

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. (2003). “A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*”, Biotechnology Letters , v. 25, p. 1225-1229

DUARTE, M.V.E. (2006). “Simulação de dinâmica populacional microbiana: Modelagem estruturada em idade e influência do ciclo celular”, tese de doutorado , Escola de Química, UFRJ

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., DE MONTIGNY, J., MARCK, C., NEUVE´GLISE, C., TALLA, E., GOFFARD, N., FRANGEUL, L., AIGLE, M., ANTHOUARD, V., BABOUR, A., BARBE, V., BARNAY, S., BLANCHIN, S., BECKERICH, J.M., BEYNE, E., BLEYKASTEN, C., BOISRAME, A., BOYER, J., CATTOLICO, L., CONFANIOLERI, F., DE DARUVAR, A., DESPONS, L., FABRE, E., FAIRHEAD, C., FERRY-DUMAZET, H., GROPPI, A., HANTRAYE, F., HENNEQUIN, R., JAUNIAUX, N., JOYET, P., KACHOURI, R., KERREST, A., KOSZUL, R., LEMAIRE, M., LESUR, I., MA, L., MULLER, H., NICAUD, J.M., NIKOLSKI, M., OZTAS, S., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., PELLENZ, S., POTIER, S., RICHARD, G.F., STRAUB, M.L., SULEAU, A., SWENNEN, D., TEKAIA, F., WESOLOWSKI-LOUVEL, M., WESTHOF, E., WIRTH, B., ZENIOU-MEYER, M., ZIVANOVIC, I., BOLOTIN-FUKUHARA, M., THIERRY, A., BOUCHIER, C., CAUDRON, B., SCARPELLI, C., GAILLARDIN, C., WEISSENBACH, J., WINCKER, P. e SOUCIET, J.L. (2004). “Genome evolution in yeasts”, Nature, v. 430, p. 35–44.

EGGERT, T.; VAN POUDEROYES, G.; PENCREAC’H, G.; DOUCHET, I.; VERGER, R.; DIJKSTRA, B.W.; JAEGER, K.-E. (2002) “Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*.” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.26, p.37–46.

EGLOFF, M. P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CAMBILLAU, C.; VERGER, R. (1995) “Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux.” In: Malcata, F.X. (Ed.). Engineering of/with lipases**.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

ELIBOL, M. E OZER, D. (2000). “Influence of oxygen transfer on lipase production by Rhizopus arrhizus”, Proc. Biochem. v.36, p.325-329.

ELLAIAH, P., PRABHAKAR, T., RAMAKRISHNA, B.,THAER TALEB, A. eADINARAYANA, K. (2004). “Production of lipase by immobilized cells of Aspergillus niger”, Proc. Biochem., v.39, pp. 525–528.

FERNANDES, M.L.M (2002). Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistemas de micelas reversas. Dissertação Mestrado em Química Orgânica – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FERNANDES, M.L.M.; KRIEGER, N.; BARON, A.O; ZAMORA, P.P.; RAMOS, L.P.; MITCHELL, D.A. (2004). “Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system.” Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 43-49.

FERNANDEZ, G. V.; BRIEVA, R.; GOTAU, V. (2006)“Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals”. Journal of Molecular Catalysts B: Enzymatic, v.40, p. 111-120.

FICKERS, P., NICAUD, J.M., GAILLARDIN, C., DESTAIN, J. e THONART, P. (2004). “Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast Yarrowia lipolytica”, Journal of Applied Microbiology, v. 96, pp. 742–749.

FINOGENOVA, T.V., KAMZOLOVA, S.V., DEDYUKHINA, E.G., SHISHKANOVA, N.V., ILCHENKO, A.P., MORGUNOV, I.G., CHERNYAVSKAYA, O.G. E SOKOLOV, A.P. (2002). “Biosynthesis of Citric and Isocitric Acids from Ethanol by Mutant *Yarrowia lipolytica* N1 Under Continuous Cultivation”, Appl. Microbiol. Biotechnol., v.59, p.493-500.

FLORES, C-L., RODRÍGUEZ, C., PETIT, T. e GANCEDO, C. (2000). “Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts”, *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 24, n.4, p.507-529.

FOX, M. B. (2006).“ Pulsed electric field inactivation in a microreactor“, PhD Thesis Wageningen University, The Netherlands.

FREIRE, M.G., DIAS, A.M.A., COELHO, M.A.Z., COUTINHO, J.A.P. e MARRUCHO, I.M. (2005) “Aging mechanisms of perfluorocarbon emulsions using image analysis”, J. Colloid Interface Sci., v. 286, p. 224-232.

FRIEDENTHAL, M., EPSTEIN, A. e PASSERON, S. *et al*., (1974). “Effect of potassium cyanide, glucose and anaerobiosis on morphogenesis of *Mucor rouxii*”, J. Gen. Microbiol., v.82, p.15-24 *apud* SZABO, R. (1999). “Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration”, Folia Microbiol. v.44, n.1, p.19-24.

FROST, G,M.; MOSS, D.A. (1987) “Production of enzymes by fermentation”. Enzyme Technology, v. 7, p. 112-121.

GAO, Y.; BREUIL, C. (1998) "Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*". World Journal Microbiology and Biotechnology, v.14, n. 3, 1998.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. (1999) "Enzymatic synthesis of fatty esters; Part I. kinetic approach." Enzyme and Microbial Technology, v. 25, n. 7, p. 584-590.

GEHARTZ, W. 1990. Industrial Uses of Enzymes. In: Enzymes in Industry – Production and Application. VCH, Weinheim. 77-148.

GHEORGHIU, E., ASAMI, K. (1998) "Monitoring cell cycle by impedance spectroscopy: experimental and theoretical aspects", Bioelectrochem. Bioenerg., v.45, p.139-143.

GILL, J. AND PARISH, J.H. (1997) "Minireview: lipases – enzymes at an interface." Biochemical Education, v.25, n.1, p.2-5.

GIMENO, C.J., LJUNGDAHL, P.O., STYLES, C.A. e FINK, G.R. (1992). "Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS", Cell, v. 68, p.1077-1090.

GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KORNILLOWICZ-KOWASLKA, T. (2004) "A thermostable lipase produced by a newly isolated Geotrichum -like strain, R59." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 31, p. 177-182.

GIRAFFA,G. (2004) "Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation." FEMS Microbiology Reviews, v. 28, p. 251-260.

GULTEKIN, M. S.; ÇELIK, M.; TURKUT, E.; TANYELY, C.; BALCI, M. (2004) "Resolution of (±)-anti-2,3-dioxabicyclo(2.2.2)oct-7-en-5-ol via *Candida cylindracea* lipase: synthesis of (-)-and (+)-proto-quercitol." Tetrahedron:Asymmetry, v. 15, n. 3, p. 453-456.

HADEBALL, W. (1991) "Production of lipase by *Yarrowia lipolítica*." Acta Biotechnology , v. 11, p. 159-167.

HARTWELL, L.H., UNGER, M.W. (1977), "Unequal division in *Saccharomyces cerevisiae* and its implications for the control of cell division", J.Cell. Biol., v.75, p.422-425

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; (2006), "Industrial application of microbial lipase." Enzyme and Microbial technology, v. 39, n. 2, p. 235-251.

HEERKLOTZ, H. (2001), "Membrane Stress and Permeabilization Induced by Asymmetric Incorporation of Compounds", Biophysical Journal, v.85, p.184-195.

HEO, J.H.; KIM, H.S.; YOO, K.P. (2000). “Enzymatic Preparation of Carbohidrate Ester of Medium Chain Fatty Acid in Supercritical Carbon Dioxide.” Biotechnology Letters. v.22, p.995-998.

HOLMQUIST, M.; TESSIER, D.C.; CYGLER, M. (1997) “Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II.” Biochemistry, v.36, p.15019-15025.

IMAMURA, S., KITAURA, S. (2000). “Purification and Characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257.” Journal of Biochemistry, v. 127, p. 419-425.

ISAKSSON, D.; SJODIN, K.; HOGBERG, H. E. (2006). “Enantiomerically enriched cryptone by lipase catalysed kinetic resolution.” Tetrahedron:Asymmetry, v. 17, n. 2, p. 275-280.

IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. (1984). “Fungal lipase.” In: Howard L. Brockman (Eds.). Lipases. Amsterdam: Elsevier, p.443-469.

JAEGER, K .E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T.(1999) “Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications lipases.” Annual Review Microbiology, v. 53, p. 315-351.

JAEGER, K.E. AND EGGERT, T., (2002) “Lipases for biotechnology.” Current Opinion in Biotechnology, v. 13, n. 4, p. 390-397.

JAEGER, K.E.; RANSAK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. (1994). “Bacterial lipases.”. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, n. 1, 29-63.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. (1998) “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.” Trends in Biotechnology, v. 16, p. 396-403.

JESUS, M.F.C.P.; BRANCO, R.N.; SANT’ANA JR., G.L.; FREIRE, D.M.G.; SILVA JR., J.G. (1999) “Penicillium restrictum lipases: a comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity.” Brazilian Journal of Chemical Engineering , v. 16.

JIMÉNEZ-BREMONT, J.F., RUIZ-HERRERA, J., DOMINGUEZ, A. (2001). “Disruption of gene YlODC reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*”, FEMS Yeast Research, v.1, p.195-204.

JOHNSON-GREEN, Perry.” Introduction to food biotechnology.” 1ª ed. New York: CRC

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N., MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. (2003) “Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7.” Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 22, p. 307–313.

KANG, H.; KIM, J.; KIM, H.; PARK, S.; OH, T.; HUR, C. MELDB: (2006). "A database for microbial estearases and lipases." Febs Letters, v. 580, p. 2736-2740.

KAWASSE, F.M, AMARAL, P.F., ROCHA-LEÃO, M.H.M., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. e COELHO, M.A.Z. (2003). "Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing", Bioprocess Biosyst. Eng., v.25, p. 371-375.

KISHORE N.K. EMANI S.S., MAITI T.K., BISHT G.S. (2007) "Studies on Pulsed Electric Field Applications for Food Sterilization." Second International Conference on Industrial and Information Systems, ICIIS 2007, 8 – 11 August 2007, Sri Lanka.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. (2004) "Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems." Food Technology Biotechnology, v. 42, n.4, p. 279–286
.

KRIEGER, N.; TAIPA, M.; AIRES-BARROS, M.R.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; CABRAL, J.M.S. (1997). "Purification of *Penicillium citrinum* lipase using AOT-Isooctane reversed micelles." Journal Chemical Biotecnology, v. 69, p. 77-85.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. (1998). "The Yeasts, A Taxonomic Study", 4ª edição, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.1055.

KWON, S.J.; HAN, J.J.; RHEE, J.S. (1995). "Production and in Situ Separation of Mono- or Diacylglycerol Catalysed by Lipases in n-Hexane." Enzyme and Microbial Technology. v.17, p.700-704.

LEE, D.W.; KIM, H.W.; LEE, K.W.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; LEE, H.S.; KIM, D.S.; PYUN, Y.R. (2001). "Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1." Enzimology Microbial Technology, v. 29, p.363-371.

LI, C.-Y., CHENG, C.-Y. e CHEN, T.-L. (2004). "Fed-batch production of lipase by Acinetobacter radioresistens using Tween 80 as the carbon source", Biochemical Engineering Journal, v.19, p. 25–31.

LIMA, A.W.O.; ANGNES L. (1999) "Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos a Aplicações em Química Analítica". Química Nova, v. 22, n. 2, p. 229-245.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.;FONTANA, J.D. (2004-b) "Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*." Biochemical Engineering Journal, v. 18, p. 65-71.

LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. (2006) "Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete Antrodia cinnemamomea in submerged culture. Enzyme and Microbial Technology", v. 39, p. 98-102.

LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J.L.; BROCCA, S.; VALERO, F.;

Lötzbeyer, T., Schuhmann, W., Schmidt, H. Minizymes. (1996) "A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes." Bioelectrochem. Bioenerg., v.42, p.1-6.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, (2000). J. Biology of microorganisms. 8 ed.

MADZAK, C., GAILLARDIN, C. E BECKERICH, J.-M. (2007). "Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review", Journal of Biotechnology, v.109, n. 1-2, p. 63-81.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. (2002). "Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation." Process Biochemistry, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. (1999). "Production of extracellular lipase by phytopathogenic *fungus Fusarium solani* FS1." Revista de Microbiologia , v. 30, p. 304-309.

MANCO, G.;DI GENNARO, S.; DE SOUZA, M.; ROSSI, M. (1994). "Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius."* European Journal of Biochemical, v. 221, p.965-972.

MARGOLIN, A.L. (1996). "Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. Enzyme and Microbial Technology." v.7, p.113-119.

MARQUES, T.; SERRA, G. (2004) "Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol." Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas. v. 24, p. 532-535.

MAZID, M. A. (1993) "Biocatalysts and immobilized enzyme/cell bioreactors. Biotechnology." v.11, p. 690-695.

MCNEIL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. (1990). "Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride. Journal of the American Oil Chemists Society." v.67, n.11, p.779-783.

MCNEIL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. (1991). "High-Yield Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils. Journal of the American Oil Chemists Society." v.68, n.1, p.1-5.

MELO, WALBER C.; SANTOS, ALEXANDRE S. DOS; SANTA ANNA, LÍDIA MARIA M. ; PEREIRA JR, N. (2008) "Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from Castor Bean (Ricinus communis L.) oil extraction for ethanol production: detoxification and biodiesel process integration." Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 19, p. 418-425.

MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. (1996). "Effect of nitrogen sources in batch and continuous

cultures to lipase production by *Candida rugosa"*. Applied Biochemistry and Biotechnology , v. 59, p. 25-37.

MORENO-ARRIBAS M.V. & POLO M.C. (2005) "Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends." Critical Reviews in Food Science and Nutrition , Amsterdam, v. 45, p. 265-286.

MÜNCH, T., SONNLEITNER, B., FIECHTER, A. (1992) "New insights into the synchronization mechanism with forced synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae"*, J. Biotechn., v.24, p. 299-314.

MULLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P. e DALBOGE, H. (1998). "Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorph*a, *Kluyveromyces lacti*s, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytic*a. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytic*a", Yeast, v.14, p. 1267-1283.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. (1996). "Expression of Lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-Level Production and Purification." Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 81, n. 6, p. 488-492.

NAMBOODIRI, V.M.H; CHATTOPADHYAYA, R. (2000) "Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*." Lipids, v. 35, p. 495-502.

NICAUD, J-M., FABRE, E. e GAILLARDIN, C. (2002). "Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker", Curr. Genet., v.16, p.253-260.

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE,C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. (2001) "Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study." Biochemical Biophysics Acta, v. 1534, p. 34-44.

NOVOTNY, C., DOLEZALOVA, L., MUSIL, P., e NOVAK, M. (1988). "The production of lipases by some Candida and Yarrowia yeasts", J. Basic Microbiol., v.28, p.221-227.

OBRADORS N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLÀ, C. (1993) "Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*." Biotechnology letters . v. 15, p. 357-360.

OLIVEIRA, A.A.C., VAZ-JUNIOR,C.A., ARAÚJO, O.Q.F., COELHO, M.A.Z (2005) "Uso de Processamento Digital de Imagens na Caracterização de Parâmetros Morfológicos de *Saccharomyces cerevisiae"*, In: XV Sinaferm 2005, Recife, Pernambuco.

OLIVEIRA, A.A.C., COSTA, C.T.O.G.., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z, ARAÚJO, O.Q.F., (2009). "Estudo da influencia da agitação no cultivo de

Saccharomyces cerevisiae conduzido sobre estresse eletroquímico", In: XVII Sinaferm 2009, Natal, Rio Grande do Norte.

OLIVEIRA, A.A.C., COSTA, C.T.O.G.., ROCHA-LEÃO, M;H., MARGARIT, I.C.P., COELHO, M.A.Z, ARAÚJO, O.Q.F., (2007). "Respostas Fisiológicas e Morfológicas de Culturas de *Sacch. cerevisiae* à Aplicação de Potencial Elétrico". In: XVI Sinaferm 2007, Curitiba, Paraná.

OLIVEIRA, A.A.C., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z, ARAÚJO, O.Q.F., (2008). "Efeito da aplicação de potencial elétrico no cultivo e na produção de lipase de Y*arrowia lipolytica*", In: XVII COBEQ, Recife, Pernambuco.

OLIVEIRA, A.A.C., MAZOLLI, A., COELHO, M.A.Z, ARAÚJO, O.Q.F., (2008). "Modelagem cibernética de cultura de *Saccharomyces cerevisiae* com base no ciclo celular", In: XVII COBEQ, Recife, Pernambuco

OLIVEIRA, A.A.C., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.Z, ARAÚJO, O.Q.F., (2009). "A influência do estresse eletroquímico em culturas de *Yarrowia lipolytica*", In: XVII Sinaferm 2009, Natal, Rio Grande do Norte.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. (2000) "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*". Microbiology and Molecular Biology Rewiews, v. 64, p. 34-50.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. (1999) "The realm of microbial lipases in biotechnology." Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 29, p. 119-131, 1999.

PANKE, S. AND WUBBOLTS, M.G. (2002) "Enzyme Technology and bioprocess engineering." Current Opinion in Biotechnology**.** v. 13, n. 2, p.111-116.

PASTORE, G.M.; COSTA, V. S.; KOBLITZ, M.G.B. (2003) "Purificação parcial da lipase extracelular produzida por nova cepa de *Rhizopus sp"*. Ciência e Tecnologia de Alimentos , v. 23, p. 135-140.

PATEL, M.T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. (1996) "Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review." Chemical Engineering Communications**,** v. 153, p. 365-404.

PEREIRA R.S., GEIBEL J. (1999), "Direct observation of oxidative stress on the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* strains with atomic force microscopy", Molecular and Cellular Biochemistry, v.201, p.17-24.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. (1997). "Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*", Tese Doutorado em Ciências, IQ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

PINHEIRO, R.I.C. (2004). "Estudo do efeito da pressão na fisiologia de leveduras", Dissertação para Doutoramento, Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal

POROSKE, L.H. (1984). “Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry.” Journal of the American Oil Chemists Society. 61(11): 1758-1765.

PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. van.(2003) “Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century.” Food Technol. Biotechnol. v. 41, n. 1, p. 3-10.

QUEIROS, L. (2003) “Levedura inteligente acelera a produção de álcool.” Jornal da Universidade de Campinas, julho de 2003.

REETZ, M.T.; JAEGER, K.E. (1998) “Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases.” Chemistry and Physics of Lipids, v. 93, n. 1-2, p. 3-14, 1998.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L.R. (2001). “The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor”. Process Biochemstry, v. 36, p. 947-953.

SANTOS, A.; VALLE, M.; GIANNINI, R. (2002) “Adição de compostos nitrogenados a gasolina e a experiencia do PROALCOOL”. Economia e Energia. v. 34, 2002.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. (2003) “Purification strategies for microbial lipases.” Journal Microbiology Methodology, v. 52, p.1-18.

SHARMA, R., CHISTI, Y. e BANERJEE, U.C., (2001). “Research review paper production, purification, characterization, and applications of lipases”, Biotechnology Advances, v.19, pp.627–662.

SHELDON, R.A. (1996). “Chirotechnology: Designing Economic Chiral Syntheses.” Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v.67, p.1-14.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. (1993) “Purification and characaterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*.” Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 75, p. 349-352.

SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. (1998) “Short communication: production of extracellular lipases by *Saccaromyces cerevisiae*.” World Journal of Microbiology & Biotechnology , v. 14, p. 595-597.

SINCLAIR, D., MILLS, K., GUARENTE, L. (1998) “Aging in *Saccharomyces cerevisiae”*, Annu. Rev. Microbiol., v.52, p.533–600.

Soares, D.G., Andreazza, A.C., Salvador M. (2005) “Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*” *Braz. J. Pharm. Sciences*, v.41, n.1, p.95-100.

Sudbery, P.E., Gow, N.A.R. e Berman, J. (2004). “The distinct morphogenic states of *Candida albicans”*. Trends Microbiol. v.12, p.317-324.

SZABO, R. (1999). “Dimorphism in *Yarrowia lipolytica:* filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration*”, Folia Microbiol.* v.44, n.1, pp.19-24.
SZABO, R. e ŠTOFANÍKOVÁ, V. (2002). “Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formaton and pH-dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*”, FEMS Microbiol. Letters, v.206, pp.45-50.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. (2003) “Screening of high lipase producing Candida sp. and production of lipase by fermentation.” Process Biochemistry , v. 39, p. 459-465.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. (1996) “Control of packed collum fouling in the continuous fermentation and stripping of ethanol.” Biotechnology and Bioengineering. v. 51, p. 33-39.

TOMIC, S.; RAMEK, M. (2006) “Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity.” Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**,** v. 38, n. 3-6, p. 139-147.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. (2002) “Microbiology”. 6 ed. Califórnia: Art Méd,.

TOYAMA, K.; TAUCHI, T.; MASE, N.; YODA, H.; TAKABE, K. (2006) “Lipase-catalyzed kinetic resolution of thiotetronic acid derivatives bearing a chiral quaternary carbon: total synthesis of (R)-thiolactomycin and its O-analogue.” Tetrahedron Letters, v. 47, n.40, p. 7163-7166.

TREIMANIS, A; LEITE, M.; EISIMONTE, M.; VIESTURS U. (1999). “Enzymatic Deinking of Laser-Printed White Office Wastepaper.” Chemical and Biochemical Engineering Quarterly. v.13, n.2, p.53-57.

TSAI, S.W.; HUANG, C.M. (1999). “Enantioselective Synthesis of (s)-Suprofen Ester Prodrugs by Lipase in Cyclohexane.” Enzyme and Microbial Technology. v.25, n.8-9, p.682-688.

TSUGAWA, R., NAKASE, T., KOYABASHI, T., YAMASHITA, K. e OKUMURA, S. (1969). “Fermentation of *n*-paraffins by yeast. Part III. A-Ketoglutarate productivity of various yeasts”, *Agr. Biol. Chem.*, v.33, p.929-938.

UVARANI, G.; JAGANATHAN, L.; SHRIDAS, P.; BOOPATHY. (1998) "Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*". Journal of Science Industrial Research, v. 57, 607-610.

VAN HEERDEN, E., LITTHAUER, D., VERGER, R. (2002). “Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films.” Enzyme Microbiology and Technology, v. 30, n. 7, p.902-909.

VASSILEV, P.M., PENG, J.B., HEDIGER, M.A. E BROWN, E.M. (2001) "Single-channel activities of the human epithelial Ca2+ transport proteins CaT1 and CaT2". J. Membr. Biol. v.184, p.113-120.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. (1993) "A taxonomic key the genus *Saccharomyces*." Systematic and Applied Microbiology, v. 16, p. 113-119.

VEIGA, V.F., NIMRICHTER, L., TEIXEIRA, C.A., MORALES, M.M., ALVIANO, C.S., RODRIGUES, M.L., HOLANDINO, C. (2005) "Exposure of human leukemic cells to direct electric current", Cell Biochem. Biophys., v.42, p.61-74

VERGER, R. (1997) "Interfacial activation of lipases: facts and artifacts**."** Trends in Biotechnology, v. 15, n. 1, p. 32-38.

WALT, J. P. Vander.; YARROW, D. (1984) "Methods for isolation maintenance, classification and identification of yeast." In: KREGER-VAN RIJ, N. S. W. (Ed). The yeasts: a toxonomy study. Amsterdam: Elsevier Science, p.45-104.

WATANABE, T.; MATSUE, R.; HONDA, Y.; KUWAHARA, M. (1995) "Differential activities of a lipase and a protease toward straight- and branched-chain acyl donors in transesterification to carbohydrates in an organic medium." Carbohydrate Research, v. v.275, n. 1, p. 215-220.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; LORENTE, G. F.; ILLANES, A.; GUISAN, J. M.; LAFUENT, R. F. (2006) "Effect of lipase – lipase interactions in the activity stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes sp.*" Enzymes and Microbial Technology. v. 39, n. 2, p. 259-264.

YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. (1968) "Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*". Applied Microbiology . v. 16, p. 845-847.

ZAFAR, S.; MOHAMMAD, O.; MOHAMMED, S.; HUSAIN, S. (2005) "Batch Kinetics and modeling of ethanolic fermentation of whey. International Journal of Food Science and Technology." v.40, p. 597-604.

ZAKHEM H. EL , LANOISELLÉ J.-L., LEBOVKAA N.I.,. NONUS M., VOROBIEV E. (2006), "Behavior of yeast cells in aqueous suspension affected by pulsed electric Field", *Journal of Colloid and Interface Science*, v.300 p.553–563.

ZAREVÚCKA, M.; KEJIK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEVORÁ. (2005) „Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*". Enzyme and Microbial Technology, v.37, p. 481-486.