



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

ALLINE ALVES CORREIA DA FONSECA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES EM  
CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO LEVEDURAS DO  
CERRADO TOCANTINENSE**

Palmas  
2015

ALLINE ALVES CORREIA DA FONSECA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES EM  
CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO LEVEDURAS DO  
CERRADO TOCANTINENSE**

Dissertação apresentada Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Carreiro  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Linha de pesquisa do PPGCTA: Controle de Qualidade e Segurança Alimentar.

Palmas  
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

F676o Fonseca, Aline Alves Correia da.  
Otimização da produção de lipases em cultivo submerso utilizando leveduras do cerrado tocantinense. / Aline Alves Correia da Fonseca. – Palmas, TO, 2015.  
50 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2015.

Orientadora : Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Carreiro

Coorientador: Almeida Dr. Alex Fernando de

1. Leveduras. 2. Lipases. 3. Otimização. 4. Cultivo Submerso. I. Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

ALLINE ALVES CORREIA DA FONSECA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES EM  
CULTIVO SUBMERSO UTILIZANDO LEVEDURAS DO  
CERRADO TOCANTINENSE**

Dissertação DEFERIDA e APROVADA em 26 de novembro de 2015, pela Banca  
Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento  
UFT

Prof. Dr. Thiago Lucas de Abreu Lima  
UFT

Prof.ª Dr.ª Solange Cristina Carreiro  
Orientadora –EA/UFT

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus que me proporcionou todas as bênçãos que estão sobre a minha vida, e me abençoou com toda sorte de benção nas regiões celestiais.

## RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. A grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características tem estimulado a procura de novas cepas de micro-organismos lipolíticos. O presente estudo objetiva otimizar a produção de lipases em cultivo submerso por leveduras pouco estudadas. Foi utilizado um delineamento Plackett-Burman para avaliar o efeito de dez variáveis (pH, agitação, sulfato de amônio, peptona, triton X-100, Tween 20, azeite de oliva, extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato monopotássico) na produção de lipases por duas linhagens de leveduras, considerando o nível de significância  $p < 0,1$ . Para a produção de lipase pela linhagem TAQ 616 a variável significativa foi a concentração de azeite de oliva e para biomassa foram as concentrações de azeite de oliva, triton X-100 e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . A atividade enzimática da linhagem ABRT 461 sofreu a influência das variáveis pH, agitação e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e para a produção de biomassa nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa. A linhagem ABRT 461 foi escolhida para realização de um planejamento de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$ . As condições ótimas de atividade enzimática geradas pelo modelo proposto foram de 114 rpm, pH 5,0 e  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A atividade enzimática de  $84,4 \text{ U.mL}^{-1}$  foi obtida após o cultivo da linhagem ABRT 461 durante 72 horas nas condições ótimas estimadas pelo modelo.

Palavras-chave: leveduras, lipases, otimização, cultivo submerso, Plackett & Burman, superfície de resposta.

## **OPTIMIZATION OF LIPASES PRODUCTION IN SUBMERGED CULTURES USING YEASTS OF THE TOCANTINS' CERRADO.**

### **ABSTRACT**

The Cerrado is the second largest biome in South America, housing 11.627 native plant species already cataloged. The great industrial demand for new sources of lipases with different characteristics has stimulated the search for new strains of lipolytic microorganisms. The purpose of this study is to optimize the lipase production in submerged culture for little studied yeast. A Plackett-Burman design was used to evaluate the effect of ten variables (pH, agitation, ammonium sulfate, peptone, Triton X-100, Tween 20, olive oil, yeast extract, magnesium sulfate and potassium dihydrogenphosphate) in the lipase production by two yeast strains, considering a significance level of  $p < 0,1$ . The significant variable for strain TAQ 616 lipases production was the olive oil concentration and for biomass were olive oil, triton X-100 and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The enzymatic activity of lineage ABRT 461 suffered the influence of pH, agitation and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and for biomass production any variable was statistically significant. The ABRT 461 lineage was selected to do a central composite rotational design (CCRD)<sup>23</sup>. The optimum conditions for enzyme activity generated by the proposed model was 114 rpm, pH 5.0 and 25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The enzymatic activity of 84,4  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  was obtained after the cultivation of ABRT 461 lineage for 72 hours in optimal conditions estimated by the model.

Keywords: yeasts, lipases, optimization, submerged culture, Plackett-Burman, response surface.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	9
2.1 ENZIMAS .....	9
2.2 LIPASES .....	10
<b>2.2.1 Produção de lipases por micro-organismos</b> .....	12
<b>2.2.2 Aplicação industrial das lipases</b> .....	13
<b>2.2.3 Reações catalisadas por lipases</b> .....	15
2.3 INDUTORES E CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPASES .....	16
2.4 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS: DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS ...	18
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 OBJETIVO GERAL .....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS .....	21
4.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO .....	21
4.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO .....	21
4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS .....	23
<b>4.4.1 Produção de biomassa</b> .....	23
<b>4.4.2 Determinação da atividade lipolítica pelo Método Titulométrico</b> .....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1 PLACKETT & BURMANN .....	25
5.2 MATRIZ DE DELINEAMENTO COMPOSTO ROTACIONAL (DCCR) .....	28
5.3 APLICAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MEIO OTIMIZADO .....	34
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
<b>APÊNDICES</b> .....	48



## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km<sup>2</sup>, cerca de 22% do território brasileiro, sendo reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2015).

Apesar de o Brasil ser um país com enorme biodiversidade e potencial para produzir biocatalisadores, ainda há uma grande dependência tecnológica nesse setor. Sendo assim, o emprego de enzimas provindas de micro-organismos nativos seria essencial para o desenvolvimento do setor biotecnológico nacional (SILVA, 2014).

A inovação biotecnológica no uso de micro-organismos produtores de enzimas tem sido de grande interesse para as indústrias de alimentos, fármacos, oleoquímica e de detergentes, tanto que, o mercado global de culturas e enzimas gira em torno de 4 bilhão de dólares por ano, sendo que o mercado brasileiro corresponde a 6% (240 milhões de dólares) deste valor (ABIAM, 2015).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (YANG *et al.*, 2005). Em um estudo realizado por Sharma *et al.* (2001), foram listadas 109 diferentes espécies de micro-organismos produtoras de lipases; destas, 47 espécies de bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, 42 espécies de fungos filamentosos e 20 espécies de leveduras. Entretanto, a busca e seleção de micro-organismos com atividade lipolítica pode levar à descoberta de novas lipases, com características únicas e adaptadas ao ambiente de onde eles foram isolados (KUMAR *et al.*, 2005).

Para a obtenção de uma secreção de lipases satisfatória procura-se determinar as condições ótimas de crescimento da levedura, variando-se fontes de carbono e nitrogênio, indutor, pH, temperatura, agitação, dentre outros fatores.

Neste contexto, esse estudo visou otimizar a produção de lipases em cultivo submerso por linhagens de leveduras ainda pouco estudadas, pertencentes à coleção de Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENZIMAS

As enzimas são unidades funcionais do metabolismo celular encontradas em vegetais, animais e micro-organismos. Elas são de natureza protéica e são formadas por subunidades (aminoácidos) ligados entre si por ligações peptídicas (NELSON & COX, 2002).

As enzimas estão presentes em todas as células em pequenas quantidades, acelerando uma reação química sem serem alteradas no processo, não sendo consumidas no final de cada reação (CHAMPE & HARVEY, 1996).

As enzimas são bastante específicas nas transformações moleculares. Elas apresentam alguns tipos de especificidade, como absoluta, em grupo, de ligação e estereoquímica (GONÇALVES, 2007; QUEIROZ, 2002). A especificidade absoluta ocorre quando a enzima catalisa apenas uma reação em particular. Na especificidade em grupo, a enzima dirige a ação catalítica para um grupo funcional específico na molécula do substrato, como por exemplo o grupo hidroxila (OH). E na especificidade estereoquímica a enzima atua sobre um tipo particular de isômero óptico. Na especificidade de ligação, as enzimas atuam sobre um tipo particular de ligação química da estrutura molecular, como é o caso de algumas enzimas que só catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e outras a hidrólise de ligações éster (GONÇALVES, 2007; QUEIROZ, 2002; SANT'ANNA JR., 2001).

Mais de 4000 enzimas são conhecidas, e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e, destas, 90% são produzidas por micro-organismos por meio de processos fermentativos. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo de enzimas, em vendas no mundo (JAEGER *et al.*, 1997, SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

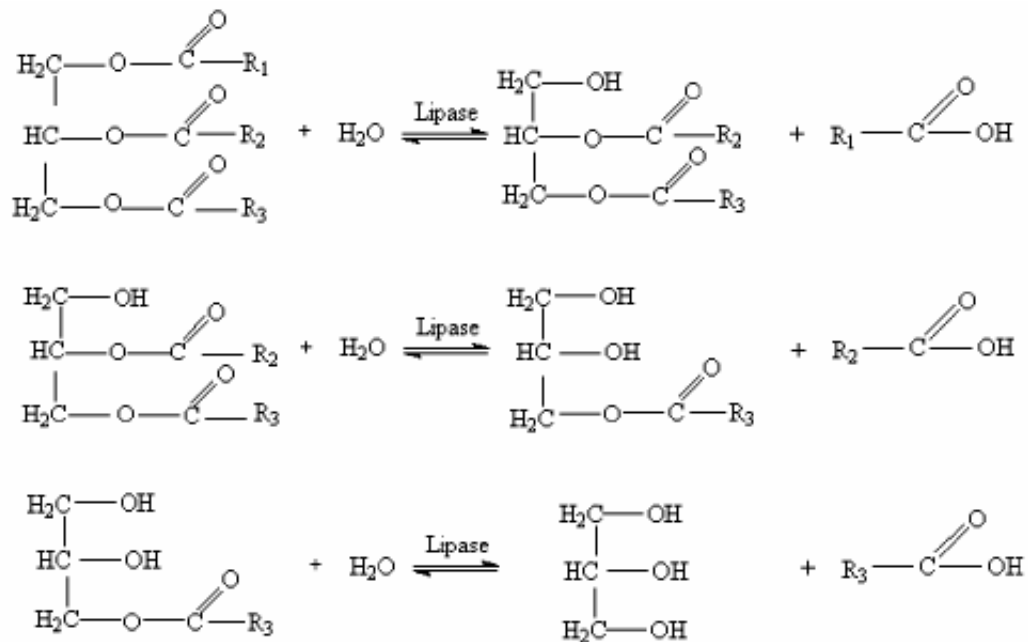
As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção e a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. A diversidade de microrganismos existentes justifica a busca por novos produtores de enzimas (CARVALHO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2001). A identificação de novas fontes microbianas produtoras de lipases, principalmente de micro-organismos não patogênicos, é de interesse estratégico, pois, além de garantir o suprimento de

enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser realizados a partir de enzimas vegetais ou animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

## 2.2 LIPASES

As lipases são triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise de triacilglicerídeos (Figura 01), principais componentes de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, além de exercerem papel fundamental no metabolismo dos lipídeos presentes nos seres vivos, como enzimas digestivas (VITOLLO, 2001; KOBLITZ, 2008).

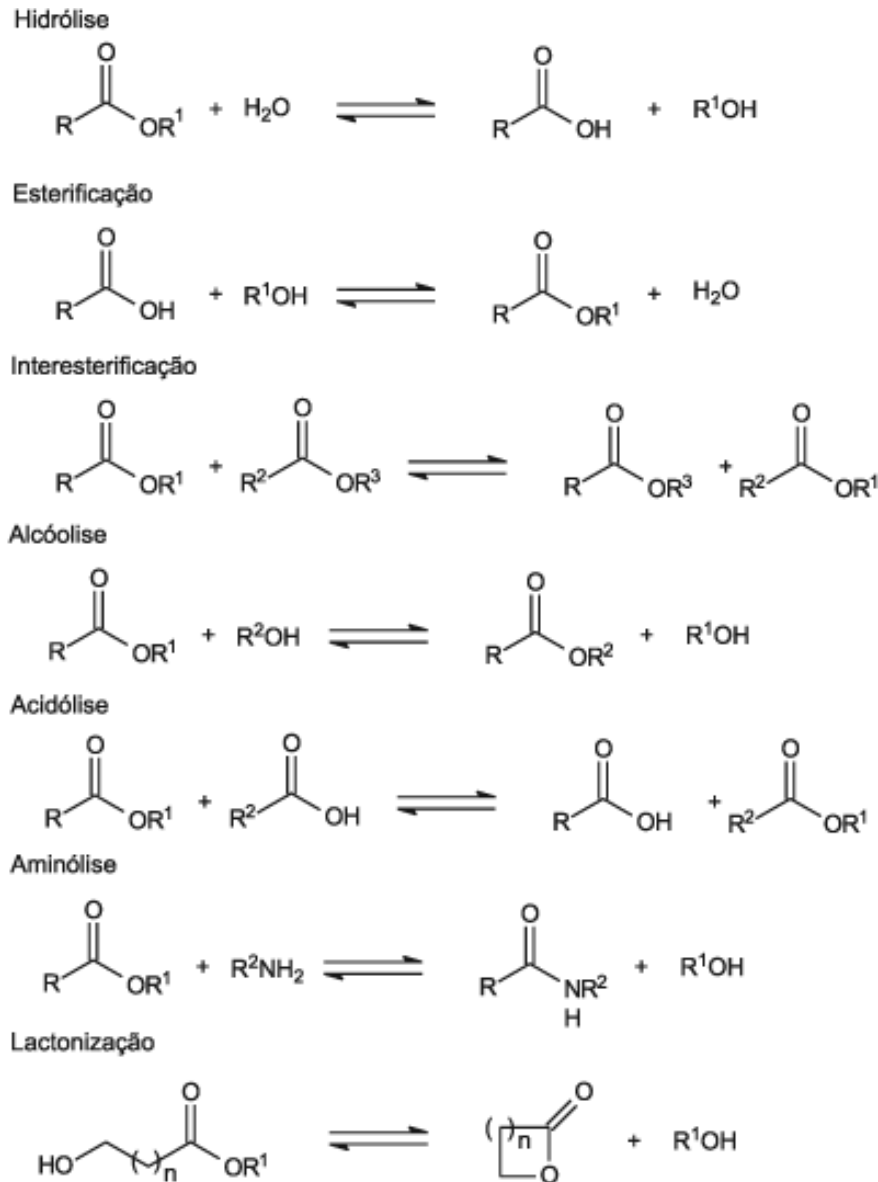
As lipases atuam na interface orgânica-aquosa demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos, ao contrário de outras enzimas (HASAN *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Hidrólise sequencial de um triacilglicerol típico por uma triacilglicerol acil hidrolases (CASTRO *et al.*, 2004).

Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese (Figura 2), como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), sendo que a atividade de

água do meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) (MAHADIK *et al.*, 2002; JAEGER; EGGERT, 2002; SAXENA *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2009).



**Figura 02.** Reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).

Esta capacidade de catalisar várias reações juntamente com a seletividade e a especificidade confere às lipases um diversificado potencial de aplicações (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Segundo Fernandes (2007), as lipases são utilizadas em laticínios para hidrólise de gordura do leite, na indústria química para a hidrólise de óleos e gorduras, na fabricação de detergentes para lavanderias e uso doméstico (remover manchas de óleos), na medicina com a dosagem de triglicerídeos no sangue, na indústria de química fina para a síntese de ésteres, na

indústria de alimentos para esterificação e transesterificação de óleos ou gorduras, flavorizantes e aromatizantes.

### 2.2.1 Produção de lipases por micro-organismos

O microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases, a aproximadamente cem anos atrás (JAEGER E EGGERT, 2002). Claude Bernard (1856) isolou pela primeira vez a lipase de suco pancreático e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Somente a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando-se diversos microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos. Tanto micro-organismos eucariotos (leveduras e fungos filamentosos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases, cujas propriedades variam de acordo com sua procedência (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; SAXENA *et al.*, 2003).

As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens em relação às lipases de origem animal e vegetal. As lipases de micro-organismos são em sua maioria extracelulares, apresentando procedimento mais fácil de extração, isolamento e purificação tendo um custo de produção menor, são mais estáveis e possuem propriedades distintas das lipases de origem animal e vegetal (DALLAVECCHIA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 1975; MARTINS *et al.*, 2008; NAWANI *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases microbianas são classificadas em 3 grupos, de acordo com a relação da sua especificidade ao substrato (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO & ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004):

- *Lipases 1,3 específicas*: liberam ácidos graxos resultantes da catálise, especificamente nas posições sn-1,3 dos acilgliceróis. Entre as espécies produtoras de lipases pertencentes a este grupo com tal especificidade estão *Aspergillus niger*, *Mucor miehei* e *Rhizopus delemar*, assim também como a típica lipase de alguns vegetais como colza, mostarda e tremoço (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO & ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004).

- *Lipases ácido graxos específicas*: são biocatalisadores hidrolíticos de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilglicerol (TAG). Uma espécie que hidrolisa preferencialmente grupos acilas de cadeia longa que contém dupla ligação cis na posição 9 é a levedura *Geotrichum candidum* (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO &

ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004).

- *Lipases não específicas*: catalisam aleatoriamente a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol não mostrando especificidade com relação ao grupo acil ou à posição de esterificação no glicerol. São exemplos lipases produzidas por *Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea* (CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO & ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004).

Lipases são produzidas principalmente por meio de bioprocessos submersos em cultivos em batelada e batelada alimentada (HAACK *et al.*, 2006) usando fungos filamentosos, sendo os gêneros mais citados para a produção de lipases os *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (HAQ; IDREES; RAJOKA, 2002; D'ANIBALLE *et al.*, 2006).

Dartora *et al.* (2003) pesquisaram três grupos distintos de micro-organismos em diversos substratos: bactérias, fungos filamentosos e leveduras, verificando a presença de micro-organismos nos diferentes substratos utilizados, bem como em diferentes valores de pH. Após a identificação utilizando provas bioquímicas e com o auxílio de microscopia, verificaram que o principal grupo isolado e identificado foi o das leveduras, destacando as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Rodotorula rubra*. Já com relação às bactérias foram identificadas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Dentre os fungos filamentosos isolados e caracterizados se destacam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Leveduras são amplamente utilizadas na indústria de alimentos e bebidas, contudo, apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases, como *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomyccopsis* e *Yarrowia* (HADEBALL, 1991).

Dentre as leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, descritas como de grande aplicação industrial por produzir enzima em grande quantidade estão as espécies *Candida rugosa* e *Candida antarctica* (GACESA e HUBBLE, 1990; COLEN, 2006).

As leveduras produtoras de lipases são apropriadas para as utilidades industriais por absorverem uma enorme variedade de substratos de baixo custo e apresentarem facilidade de recuperação do produto final devido à rápida separação da biomassa (SILVA-NEVES, 2006).

### 2.2.2 Aplicação industrial das lipases

Geralmente as lipases industriais são derivadas de fontes fúngicas e bacterianas (TREVISAN, 2004). A escolha da enzima ideal é realizada após cuidadosa investigação sobre os fatores que influenciam sua aplicação em processos industriais tais como métodos de

análise, especificidade, temperatura, pH e agentes capazes de alterar a reação, o produto e seus custos (SAID & PIETRO, 2004).

#### *Lipases na indústria de detergentes*

A aplicação de lipases na indústria de detergentes é bastante difundida, pois estas moléculas, quando aplicadas nas formulações de sabões e detergentes reduzem o tempo e a temperatura da lavagem dos tecidos, resultando em um processo com menores gastos de energia. (GANDHI, 1997).

O uso de enzimas em formulações de detergentes é muito comum em países desenvolvidos onde aproximadamente metade de todos os detergentes comercializados contém enzimas. Além das lipases utilizam-se também proteases, amilases e celulases (HASAN *et al.*, 2006; JAEGER & REETZ, 1998; SHARMA *et al.*, 2001).

#### *Lipases na indústria de alimentos*

Na indústria de laticínios, as lipases são empregadas para a hidrólise da gordura do leite. As aplicações incluem a melhoria do sabor e a aceleração do processo de cura de queijos, manufatura de produtos similares ao queijo e lipólise da manteiga e creme de leite. As fontes tradicionais de lipases para a indústria de queijos são os tecidos animais, principalmente glândulas (pâncreas e fígado) e tecidos pré-gástricos de ruminantes jovens. Atualmente são utilizados vários preparados microbianos de lipases, desenvolvidos especialmente para a manufatura de queijos, como por exemplo de *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Mucor miehei* (SAID & PIETRO, 2004; WOOLLEY & PETERSEN, 1994).

As lipases atuam ainda na maturação de queijos liberando ácidos graxos que garantem as características organolépticas do produto final, reduzindo o tempo necessário para maturação do queijo e conseqüentemente reduzem o tempo e custos com o processo, fatores que se refletem no produto final (WHITAKER, 1994; ANDRADE, *et al.*, 2002).

As lipases por meio da interesterificação e da hidrogenação têm sido utilizadas para a preparação de glicerídios na fabricação de manteigas e margarinas. A reação de interesterificação convencional é conduzida na presença de catalisadores como o sódio. A reação conduzida com lipases como catalisadores é muito mais específica, no entanto requer meio aquoso, o que diminui o rendimento da reação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases têm sido utilizadas para a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e

álcoois, os quais são compostos voláteis responsáveis por características de odor em alimentos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Por exemplo, a produção de butil acetato, o qual possui aroma de abacaxi, pode ser realizada pela reação de esterificação entre butanol e ácido acético catalisada por lipases extraídas de *Rhizopus oryzae* (SALAH *et al.*, 2007).

No processo de fermentação de salsichas, utiliza-se *Rhizomucor miehei* como cultura produtora de lipase, acelerando o processo de maturação, representando um baixo custo como aspecto positivo (CASTRO *et al.*, 2004).

Um campo promissor de aplicação de lipases é na indústria de panificação, dando ao pão maior volume, conferindo ao miolo uma cor mais clara, melhorando sua textura, com a degradação dos lipídeos do trigo, mudando sua interação com o glúten permitindo ao mesmo uma rede mais elástica e resistente (CASTRO *et al.*, 2004; GOMEZ *et al.*, 2004).

As lipases são usadas na fabricação de pães, pois a ação das delas é capaz de modificar os próprios lipídeos da massa, sem a complementação da produção com gorduras adicionais. A hidrólise de triglicerídeos da massa favorece a capacidade de retenção de ar por esta, o que produz um pão com textura mais macia e fornece uma capacidade de retenção de água à massa, prolongando a vida de prateleira do produto. (GACESA e HUBBLE, 1990).

#### *Lipases no tratamento de efluentes*

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), já que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Sendo assim, processos alternativos que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria.

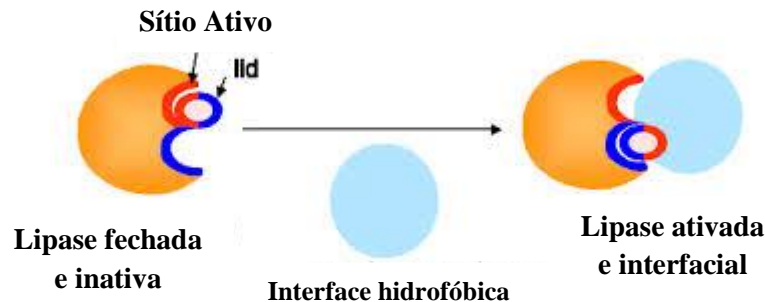
As lipases são usadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas, na etapa de tratamento preliminar de efluentes, antes da digestão anaeróbia, diminuindo assim o diâmetro das partículas de gorduras em até 60%, reduzindo o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (CASTRO *et al.*, 2004).

### **2.2.3 Reações catalisadas por lipases**

As enzimas lipolíticas microbianas são as que mais têm potencial para aplicação em biocatálise por algumas razões, como a capacidade de adaptação em sistemas orgânicos, e não necessitar de cofatores (HASAN *et al.*, 2006).



Porém, quando se utiliza lipases como biocatalisadores é preciso levar em consideração algumas peculiaridades do seu mecanismo de ação (DEREWENDA *et al.*, 1993; UPPENBERG *et al.*, 1994; SCHRAG *et al.*, 1997; ERICSSON *et al.*, 2008). Primeiro, o sítio ativo da enzima está fechado através de um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou *lid*, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa). A segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface hidrofóbica (nesta conformação a lipase é considerada ativa) (Figura 3). Este fenômeno é referido como “ativação interfacial” (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Ativação interfacial de lipases com interfases hidrofóbicas (VOLPATO, 2009).

As lipases que são enzimas solúveis em água atuam na interface água-lipídeo, contrariando as equações de Michaelis Menten para a cinética enzimática que são válidas somente para reações catalisadas em fase homogênea. Geralmente o substrato lipídico é utilizado sob forma de emulsão em análises da lipase e à medida que vão se formando os produtos e degradando o substrato ocorre variação na composição da interface água-lipídeo. Portanto a velocidade da reação é determinada pela área superficial da emulsão das partículas por unidade de volume e não pela concentração de lipídeos na emulsão (GONÇALVES, 2007).

### 2.3 INDUTORES E CULTIVO NA PRODUÇÃO DE LIPASES

As enzimas podem ser indutivas, ou seja, produzidas pelos micro-organismos na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo a fim de estimular a produção (ROVEDA, *et al.*, 2010).

Como as lipases são enzimas de caráter indutivo, a escolha de um indutor ideal determina a produtividade do biocatalisador (CONTESINI *et al.*, 2010).

As matérias primas utilizadas como indutores para a produção de lipases são geralmente óleos, sendo o principal deles o óleo de oliva, devido a sua grande proporção de trioleína, substrato ideal para muitas lipases. Para a produção em larga escala o uso de um substrato de alto custo pode ocasionar um grande aumento do valor do produto final, portanto a redução de custo deste componente do meio se faz importante (FERNANDES, 2005; DAMASO *et al.*, 2008).

Os principais indutores utilizados na produção de enzimas lipolíticas através de fermentação em estado sólido (FES) são os óleos vegetais (babaçu, girassol, oliva, soja, palma, canola, milho), gorduras animais (SILVA *et al.*, 2005).

A estratégia de cultivo melhor definida para produção de lipases é a de cultivo submerso (YANG *et al.*, 2005). Os cultivos submersos podem ser realizados em frascos dispostos em incubadora rotatória, biorreatores de bancada ou biorreatores de escala industrial. Estes sistemas podem ser operados de forma contínua, semicontínua ou descontínua. Nos processos descontínuos uma suspensão celular é adicionada ao meio de cultivo e o procedimento transcorre sem adição ou retirada do meio de cultivo reacional. Outra forma é o cultivo em batelada alimentada, que consiste em alimentar o processo durante sua execução de forma intermitente ou contínua, sem que ocorra a retirada de material durante a operação (ALONSO *et al.*, 2005).

A escolha do meio fermentativo para a produção de lipases deve levar em conta alguns fatores que visem propiciar ao micro-organismo o ambiente mais favorável possível para a realização do processo, e um deles é o ambiente físico do meio (sólido ou líquido) que varia para cada tipo de micro-organismo (SHARMA *et al.*, 2001; LI & ZONG, 2010).

Outro ponto importante do desenvolvimento do meio fermentativo é a sua composição química. Para uma satisfatória secreção de lipases é necessário uma fonte de carbono e outra de nitrogênio facilmente metabolizáveis pelos micro-organismos, para que estes apresentem crescimento ideal, mas em produção de lipases o indutor é um ponto crucial para o sucesso da fermentação (IFTIKHAR *et al.*, 2010; LI & ZONG, 2010).

A produção de enzimas em escala industrial é realizada por processo submerso por ser de relativa facilidade de cultivo, garantir homogeneidade do meio e pela facilidade de controle dos parâmetros do processo, entretanto a maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água (WANDERLEY, 2011).

Por definição, fermentação submersa (FS) é aquela na qual o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio líquido de fermentação, geralmente agitado. No caso de fermentações aeróbias, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, por meio de um compressor, por borbulhamento de ar (WANDERLEY, 2011).

Segundo Wanderley (2011) a FS oferece vantagens em relação a fermentação em estado sólido (FES) tais como:

- Facilidade no controle de grandes volumes;
- Os micro-organismos são submetidos as mesmas condições (homogeneidade) físico-químicas, e principalmente o acesso aos nutrientes, facilitando a identificação dos parâmetros ideais de produção;
- A absorção de nutrientes e excreção de metabólitos é executada com maior eficiência e, conseqüentemente, maior produtividade;

A escolha da linhagem e o preparo do inóculo são parâmetros significativos em todos os processos fermentativos. A elaboração de inóculo de maneira adequada proporciona uma igualdade metabólica entre as células, além do controle do número de células adicionados em um determinado volume de meio de cultura. A escolha da linhagem por sua vez implicará em produção de compostos específicos. Além disso, a presença de compostos específicos no meio de cultura, pode influenciar nos rendimentos da enzima-alvo (WANDERLEY, 2011).

## 2.4 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS: DELINEAMENTO DE EXPERIMENTOS

Delineamento de experimentos, ou DOE (do inglês, *Design of experiments*), é uma ferramenta usada para avaliar a relação de causa e efeito de um determinado processo ou sistema por meio de uma série de testes nos quais mudanças intencionais são realizadas nas variáveis de entrada, refletindo em alterações identificáveis na variável de resposta deste mesmo processo ou sistema (MONTGOMERY & RUNGER, 2009, BELL *et al.*, 2003)

O uso de ferramentas estatísticas, como delineamentos de Plackett-Burman (P-B) para identificar as variáveis independentes com influência significativa na variável dependente do

planejamento experimental pela metodologia superfície de resposta para a otimização das condições de cultivo, têm sido amplamente utilizados (KALIL *et al.*, 2000).

O planejamento experimental é utilizado em diferentes áreas, como a engenharia química, biotecnologia, pesquisas na área agrícola, melhoria de processos industriais novos e antigos, bem como em processos que utilizam simulação computacional (BOX *et al.*, 1978; KHURI e CORNELL, 1987; RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Por meio do planejamento experimental, a análise de um determinado processo é realizada utilizando-se um número menor de experimentos quando comparado às metodologias convencionais, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação, com redução de tempo e custos (NETO *et al.*, 1996).

Um dos métodos de avaliação do planejamento experimental é a análise e otimização de superfícies de resposta. Obtêm-se, assim, relações empíricas entre uma ou mais respostas de interesse, que são medidas analíticas, e um determinado número de fatores, que são controlados e influenciam a resposta do processo. Desta forma, este estudo permite que se verifique, quantifique e otimize esta influência, sendo possível a obtenção das melhores condições para realização de determinado processo e/ou para a obtenção de um produto com as características desejadas (NETO *et al.*, 1996; RODRIGUES & IEMMA, 2005). Com os resultados obtidos no planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, especificar os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear, de primeira ordem, ou um modelo quadrático, de segunda ordem, correlacionando as variáveis de entrada e as respostas (XU *et al.*, 2003).

As estratégias mais eficientes empregadas para aumentar a produção de enzimas pelos micro-organismos são: a seleção dos fatores que influenciam nas condições de cultivo e a otimização destes fatores para produção de enzimas (GUPTA *et al.*, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve por objetivo verificar o potencial enzimático de linhagens de leveduras isoladas de bromélias e de folhas em decomposição, pertencentes à Coleção de Culturas Carlos Augusto Rosa da UFT, na produção de lipases.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar as variáveis independentes com influência significativa na produção de lipase por duas linhagens de leveduras;
- Otimizar a produção de lipase por uma das linhagem de leveduras por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR);
- Comparar a produção de lipase, no cultivo de levedura, nas condições ótimas com o previsto pelo modelo proposto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS

Foram selecionadas duas linhagens de leveduras por apresentarem expressiva atividade lipolítica em ensaios previamente realizados em meio sólido (PALUDO, 2015).

As linhagens de leveduras utilizadas no presente trabalho foram isoladas pelo Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMBIO) da UFT, a partir de folhas em decomposição coletadas do Ribeirão Taquaruçu (TAQ) e Bromélias terrestres (ABRT). As linhagens estão depositadas na Coleção de Culturas Carlos Augusto Rosa da UFT, matidas a -80 °C.

As linhagens foram reativadas em Ágar Sabouroud (20 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona; 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 18 g.L<sup>-1</sup> de ágar; 0,2 g.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol), para obtenção de colônias isoladas pela técnica de estriamento, e as placas incubadas a 28° C (± 1°C) por 24 horas.

### 4.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Após a reativação das linhagens em placa contendo Ágar Sabouroud, coletou-se uma alçada a qual foi transferida para em 250 ml de meio líquido GYMP (YARROW, 1998) contendo glicose (20 g.L<sup>-1</sup>), extrato de malte (10 g.L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5 g.L<sup>-1</sup>) e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g.L<sup>-1</sup>) e submetida à incubação em shaker a 30°C por 16 horas com agitação de 200 rpm.

### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO

Para a avaliação da atividade enzimática das linhagens ABRT 461 e TAQ 616, foi realizado um planejamento Placket-Burmann com 16 ensaios, segundo Rodrigues & Iemma (2005). Utilizou-se o cultivo submerso variando as concentrações dos componentes do meio: azeite de oliva, tween 20, triton X-100, extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio,

sulfato de magnésio e fosfato de potássio monobásico, além do pH e a agitação, conforme planejamento experimental proposto (Tabela 1).

Todos os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio estéril, sob agitação a 30 °C por 72 horas.

O pH dos meios foi ajustado usando ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de potássio (KOH) e, os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 min.

Alíquotas de 10 mL de pré-inóculo foram adicionadas nos meios de cultivo correspondendo a uma concentração inicial de  $6,00 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>, calculadas a partir da contagem de células em câmara de Neubauer.

Após o período de incubação a biomassa foi separada por centrifugação a 5000 rpm por 1 hora a 19°C, sendo o sobrenadante (extrato enzimático bruto) separado e armazenado congelado para a posterior análise da atividade enzimática.

A análise dos resultados foi realizada através de análise variância (ANOVA) com uso do programa Statistica 7.0, assumindo  $p < 0,1$ , utilizando como resposta a atividade enzimática.

**Tabela 1.** Níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental Plackett&Burman (PB-16).

Variáveis	Níveis	
	- 1	+ 1
<b>pH</b>	5	6
<b>Agitação (rpm)</b>	150	200
<b>Oliva (mL.L<sup>-1</sup>)</b>	10	30
<b>Tween 20 (mL.L<sup>-1</sup>)</b>	1	5
<b>Triton (mL.L<sup>-1</sup>)</b>	0	2
<b>Extrato de levedura (g.L<sup>-1</sup>)</b>	10	20
<b>Peptona (g.L<sup>-1</sup>)</b>	10	20
<b>Sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0	15
<b>Sulfato de Magnésio MgSO<sub>4</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	1,5	4
<b>Fosfato monopotássico - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g.L<sup>-1</sup>)</b>	0,7	3,5

As variáveis consideradas significativas foram selecionadas para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As demais variáveis foram fixadas nos menores níveis utilizados no PB-16.

Com base nas análises estatísticas dos resultados do DCCR e no modelo matemático obtido, foram calculadas as condições consideradas ideais para a produção da lipase, e linhagem ABRT 416 foi cultivada sob essas condições. Esses ensaios foram realizados em 10 repetições, analisados nas médias de desvio padrão e variância.

#### 4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

##### 4.4.1 Produção de biomassa

A biomassa obtida conforme descrita no item 4.3 e foi ressuspensa em 6 mL de água destilada, vertida em placas de Petri taradas e submetidas a secagem em estufa a 80°C até peso constante.

##### 4.4.2 Determinação da atividade lipolítica pelo Método Titulométrico

A atividade lipolítica foi determinada pelo método descrito por Maldonado (2006), que se baseia na titulação da amostra com NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> após a enzima lipase presente no extrato bruto enzimático agir sobre os triacilglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em Triton X-100, liberando ácidos graxos.

O meio fermentativo foi centrifugado e o extrato bruto enzimático obtido foi utilizado para a determinação da atividade enzimática. Em frascos de 125 mL, foram adicionados 19 mL de emulsão (1% de Triton X-100 e 5% de óleo de oliva) em tampão McIlvaine pH 7,0. A esta mistura foi adicionado 1 mL do extrato enzimático, incubando-se sob agitação de 200 rpm 30 minutos a 37°C. A reação foi paralisada com adição de 20 mL de solução acetona:etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,1 M até pH final 11 por titulação potenciométrica.

Os cálculos de atividade lipolítica foram determinados de acordo com a Equação:

$$\text{Atividade lipolítica (U/mL)} = \frac{(V_{tf} - V_{ti}) \times 1000 \times F_d \times N}{t}$$



Onde:

U =  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo liberado pela ação da enzima. $\text{min}^{-1}$

V<sub>tf</sub> = Volume de NaOH após 30 min de reação;

V<sub>ti</sub> = Volume de NaOH usado para titular o branco (com adição água destilada ao invés do extrato bruto enzimático);

N = Normalidade do NaOH;

t = Tempo total de reação;

F<sub>d</sub> = Fator de diluição do extrato bruto enzimático;

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PLACKETT E BURMAN

Nas condições estudadas, os valores de atividade enzimática para a linhagem ABRT 461, variaram de 10 U.mL<sup>-1</sup> a 93,3 U.mL<sup>-1</sup> e a biomassa de 3,6 g.L<sup>-1</sup> a 11,5 g.L<sup>-1</sup>. Já para a linhagem TAQ 616, a atividade enzimática variou de 20 U.mL<sup>-1</sup> a 90 U.mL<sup>-1</sup> e a biomassa de 2,9 g.L<sup>-1</sup> a 15,8 g.L<sup>-1</sup> (tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de atividade enzimática e biomassa do planejamento experimental PB-16 para as linhagens estudadas.

pH	Ag	Az.	Tween	Triton	E.L.	Pep.	S	Mg	K	ABRT 416	ABRT 461	TAQ 616	TAQ 616	
		Oliva	20	X-100	**	**	**	**	**	A.E.	B	A.E.	B	
		*	*	*							(U.mL <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(U.mL <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )
1	6	150	10	1	2	10	10	15	4	0,7	70	5	90	2,9
2	6	200	10	1	0	20	10	0	4	3,5	10	7,2	90	10,1
3	6	200	30	1	0	10	20	0	1,5	3,5	10	10,1	73,3	11,7
4	6	200	30	5	0	10	10	15	1,5	0,7	11,7	8,7	23,3	6,6
5	5	200	30	5	2	10	10	0	4	0,7	40	3,6	46,7	6,8
6	6	150	30	5	2	20	10	0	1,5	3,5	10	8,6	23,3	7,7
7	5	200	10	5	2	20	20	0	1,5	0,7	13,3	6,7	60	5,4
8	6	150	30	1	2	20	20	15	1,5	0,7	16,7	11	20	9,4
9	6	200	10	5	0	20	20	15	4	0,7	43,3	8,3	73,3	8,1
10	5	200	30	1	2	10	20	15	4	3,5	36,7	8,9	30	7,5
11	5	150	30	1	0	20	10	15	4	3,5	80	11,5	70	15,8
12	6	150	10	1	2	10	20	0	4	3,5	43,3	9,9	53,3	5,1
13	5	200	10	1	2	20	10	15	1,5	0,4	86,7	6,2	83,3	5,6
14	5	150	30	1	0	20	20	0	4	0,4	60	8,2	56,7	8,6
15	5	150	10	5	0	10	20	15	4	3,5	93,3	7	83,3	9,5
16	5	150	10	1	2	10	10	0	1,5	0,4	50	5,6	46,7	5,1

Ag=agitação; E.L.=extrato de levedura; pep.=peptona; S=(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Mg=MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; K=KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
A.E=atividade enzimática; B=biomassa

\* mL.L<sup>-1</sup>

\*\* g.L<sup>-1</sup>

Segundo os resultados obtidos pela Análise Variância (ANOVA) para  $p < 0,1$ , observa-se que:

- **Linhagem ABRT 461:** as variáveis que foram significativas para a atividade enzimática foram pH, agitação e concentração de sulfato de amônio (tabela 3). Enquanto que para a produção de biomassa, desta linhagem, nenhuma variável foi significativa (tabela 4).

- **Linhagem TAQ 616:** somente a variável azeite de oliva foi significativa para atividade enzimática (tabela 5), e para produção de biomassa foram concentrações de Triton X-100, azeite de oliva e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (tabela 6).

**Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-16 para a linhagem ABRT 461.

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>
Média	42,1875	5,24745	8,03963	0,000482
pH*	-30,6250	10,49489	-2,91809	<b>0,033087</b>
Agitação*	-21,4500	10,49489	-2,04385	<b>0,096395</b>
Az. de Oliva	-18,1000	10,49489	-1,72465	0,145189
Tween 20	-0,6500	10,49489	-0,06193	0,953014
Tritons X-100	-5,2000	10,49489	-0,49548	0,641268
Ext. de levedura	-4,3750	10,49489	-0,41687	0,694067
Peptona	-5,2250	10,49489	-,49786	0,639702
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ *	25,2250	10,49489	2,40355	<b>0,061351</b>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11,4500	10,49489	1,09101	0,325032
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,1250	10,49489	0,77419	0,473819

\* Parâmetros estatisticamente significativos,  $R^2=0,82$ .

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para as produções de biomassas obtidas no PB-16 para a linhagem ABRT 461.

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>
Média	0,224313	0,125291	1,79034	0,133407
pH	0,223375	0,250581	0,89143	0,413536
Agitação	-0,218375	0,250581	-0,87147	0,423358
Az. de Oliva	-0,191125	0,250581	-0,76273	0,480043
Tween 20	0,293125	0,250581	1,16978	0,294811
Tritons X-100	0,282125	0,250581	1,12588	0,311334
Ext. de levedura	-0,279375	0,250581	-1,11491	0,315590
Peptona	0,226625	0,250581	0,90440	0,407247
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-0,282125	0,250581	-1,12588	0,311334
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,288875	0,250581	1,15282	0,301101
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,224875	0,250581	0,89741	0,410624

\* Parâmetros estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ),  $R^2=0,82$ .

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-16 para a linhagem TAQ 616.

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>
Média	57,7000	6,17168	9,34916	0,000236
pH	-3,7750	12,34335	-0,30583	0,772056
Agitação	4,5750	12,34335	0,37064	0,726086
Az. de Oliva*	-29,5750	12,34335	-2,39603	<b>0,061924</b>
Tween 20	-7,1000	12,34335	-0,57521	0,590065
Tritons X-100	-13,7500	12,34335	-1,11396	0,315960
Ext. de levedura	3,7500	12,34335	0,30381	0,773511
Peptona	-2,9250	12,34335	-0,23697	0,822083
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,9000	12,34335	0,23494	0,823571
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12,1000	12,34335	0,98028	0,371965
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	11,2250	12,34335	0,90940	0,404844

\* Parâmetros estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ),  $R^2=0,656$ .

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) para as produções de biomassas obtidas no PB-16 para a linhagem TAQ 616.

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(5)</b>	<b>p</b>
Média	0,078688	0,005695	13,81782	0,000036
pH	-0,003375	0,011389	-0,29633	0,778891
Agitação	-0,002875	0,011389	-0,25243	0,810757
Az. de Oliva*	0,027875	0,011389	2,44748	<b>0,058116</b>
Tween 20	0,005125	0,011389	0,44998	0,671559
Tritons X-100*	-0,031375	0,011389	-2,75478	<b>0,040082</b>
Ext. de levedura	0,019375	0,011389	1,70116	0,149653
Peptona	0,005875	0,011389	0,51584	0,627960
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,006126	0,011389	0,53779	0,613789
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,004875	0,011389	0,42803	0,686437
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	0,025125	0,011389	2,20602	<b>0,078496</b>

\* Parâmetros estatisticamente significativos ( $p < 0,1$ ),  $R^2=0,82$ .

A produção de lipase é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e de nitrogênio, pelo pH do meio de cultivo, pela temperatura de incubação e pela concentração de oxigênio dissolvido (ELIBOL & OZER, 2000). Além de ser 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).

Oliveira *et.al.* (2013) estudaram a linhagem *Candida guilliermondi* de sob as condições de pH 6,5 a 30°C e 180 rpm após 72 horas de cultivo, verificando o sulfato de amônio foi a variável que apresentou o maior influência sobre a produção de lipases pela linhagem estudada. Sharma *et.al.* (2001) verificaram que produção de lipases foi incrementada quando o sulfato de amônio foi associado a fontes de nitrogênio orgânicas.

Tumang & Costa *et al.* (2006) empregaram fermentação submersa para a produção de lipases pelo *Yarrowia lipolytica* com uma agitação de 160 rpm, a 30° C e pH 6,0 obtendo atividade lipolítica de 1,2 U.mL<sup>-1</sup>.

Dartora *et al* (2003) obtiveram uma variação no índice enzimático de 29,14 U.mL<sup>-1</sup> a 16,65 U.mL<sup>-1</sup>, para as espécies *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Alonso *et al* (2005) verificaram que o aumento da agitação de 300 para 400 rpm prejudicou o crescimento celular de *Y. lipolytica*, mesmo utilizando óleo de oliva como fonte de carbono. Estes mesmos autores obtiveram 5,3 U.mL<sup>-1</sup> de atividade lipolítica máxima sob agitação de 200 rpm, em um meio contendo azeite de oliva como fonte de carbono. Já quando a fonte de carbono foi alterada para glicose, a melhor produção de lipase foi de 1,259 U.mL<sup>-1</sup> a 350 rpm.

## 5.2 MATRIZ DE DELINEAMENTO COMPOSTO ROTACIONAL (DCCR)

Baseando-se nos resultados obtidos no PB-16, para as duas linhagens estudadas, o DCCR 2<sup>3</sup> foi realizado apenas para a linhagem ABRT 461, por esta apresentar um maior número de variáveis significativas para a atividade enzimática. Fez-se um DCCR (2<sup>3</sup>) com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, objetivando otimizar as condições de cultivo para a produção de lipase. As variáveis independentes foram pH, agitação e concentração de sulfato de amônio. As demais variáveis foram fixadas nos menores níveis propostos do planejamento PB-16.

A tabela 7 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis usadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) e biomassa (g.L<sup>-1</sup>). Neste estudo a atividade enzimática variou de 26,7 U.mL<sup>-1</sup> a 173,3 U.mL<sup>-1</sup>. Quanto a produção de biomassa, variou de 0,16 g.L<sup>-1</sup> a 4,24 g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 7.** Matriz do planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup>, com os resultados obtidos para atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) e biomassa (g.L<sup>-1</sup>) da linhagem ABRT 461.

	<b>pH</b>	<b>Agitação</b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Atividade Enzimática</b>	<b>Biomassa</b>
<b>1</b>	4,5	40	14,5	26,7	1,4
<b>2</b>	5,5	40	14,5	46,7	1,4
<b>3</b>	4,5	160	14,5	70	3,16
<b>4</b>	5,5	160	14,5	76,7	3,44
<b>5</b>	4,5	40	26	96,7	1,16
<b>6</b>	5,5	40	26	96,7	1,4
<b>7</b>	4,5	160	26	113,3	3,64
<b>8</b>	5,5	160	26	80	4,18
<b>9</b>	4	100	20	63,3	3,88
<b>10</b>	6	100	20	56,7	2,16
<b>11</b>	5	0	20	60	2,9
<b>12</b>	5	200	20	113,3	0,16
<b>13</b>	5	100	10	43,3	3,88
<b>14</b>	5	100	30	173,3	4,24
<b>15</b>	5	100	20	156,7	2,48
<b>16</b>	5	100	20	130	2,48
<b>17</b>	5	100	20	160	3,36

Por meio dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na tabela 8 e os resultados da análise de variância (ANOVA) na tabela 9.

Os resultados mostraram que os coeficientes quadráticos e lineares do pH, agitação e concentração de sulfato de amônio foram significativos ( $p < 0,1$ ), indicando que as variáveis atuam de forma independente, não havendo interação estatisticamente significativa entre os efeitos.

**Tabela 8.** Coeficientes de regressão para a atividade enzimática DCCR 2<sup>3</sup>.

<b>Parâmetros</b>	<b>Coef. de Regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(7)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Limite de confiança (-90%)</b>	<b>Limite de confiança (+90%)</b>
Média/interação	-3032,23	517,7195	-5,85727	0,000626	-4013,29	-2051,56
pH (L)*	1024,15	175,2177	5,84411	0,000634	692,20	1356,13
pH (Q)*	-95,48	16,7230	-5,70926	0,000728	-127,16	-63,79
Agitação (L)*	3,16	1,2191	2,58853	0,036022	0,85	5,47
Agitação (Q)*	-0,01	0,0016	-4,45612	0,002950	-0,01	-0,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)*	40,79	13,4511	3,03259	0,019045	15,31	66,28
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)*	-0,50	0,1632	-3,07921	0,017835	-0,81	-0,19
pH x agitação	-0,19	0,2213	-0,87931	0,408402	-0,61	0,22
pH x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-2,60	2,3080	-1,12834	0,296358	-6,98	1,77
agitação x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-0,03	0,0192	-1,40171	0,204375	-0,06	0,01

\* Parâmetros estatisticamente significativos para o coeficiente de determinação: R<sup>2</sup>=0,92.

**Tabela 9.** Análise da variância obtida para o DCCR 2<sup>3</sup>. R<sup>2</sup> = 0,92.

<b>Parâmetros</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>p-valor</b>
pH (L)	31,06	1	31,06	0,00810	0,775218
pH (Q)	11492,63	1	11492,63	32,59567	0,000728
Agitação (L)	1884,83	1	1884,83	5,34581	0,054019
Agitação (Q)	7001,22	1	7001,22	19,85702	0,002950
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	10355,46	1	10355,46	29,37041	0,000988
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	3343,02	1	272,61	9,48156	0,017835
pH x agitação	272,61	1	448,89	0,77319	0,408402
pH x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	448,89	1	692,75	1,27316	0,296358
agitação x (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	692,75	1	352,58	1,96479	0,203752
Resíduo	2468,07	7			
Total	30472,12	16			

Ignorando as interações, as quais, não foram estatisticamente significativas, foi possível determinar os coeficientes de regressão (tabela 10) e os resultados da análise de variância - ANOVA (tabela 11).

**Tabela 10.** Coeficientes de regressão para a atividade enzimática DCCR 2<sup>3</sup>.

<b>Parâmetros</b>	<b>Coef. de Regressão</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t(10)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Limite de confiança (-90%)</b>	<b>Limite de confiança (+90%)</b>
Média/interação	-2618,76	469,6905	-5,57550	0,000236	-3470,05	-1767,46
pH (L)*	952,30	175,7573	5,41825	0,000294	633,74	1270,85
pH (Q)*	-95,48	17,5481	-5,44082	0,000285	-127,28	-63,67
Agitação (L)*	1,64	0,3506	4,76542	0,000874	1,00	2,27
Agitação (Q)*	-0,01	0,0017	-4,24660	0,001699	-0,01	-0,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)*	25,07	6,9651	3,59999	0,004848	12,45	37,70
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)*	-0,50	0,1712	-2,93443	0,014927	-0,81	-0,19

\* Parâmetros estatisticamente significativos para o coeficiente de determinação: R<sup>2</sup>=0,87.

**Tabela 11.** Análise da variância obtida para o DCCR 2<sup>3</sup>. R<sup>2</sup> = 0,87.

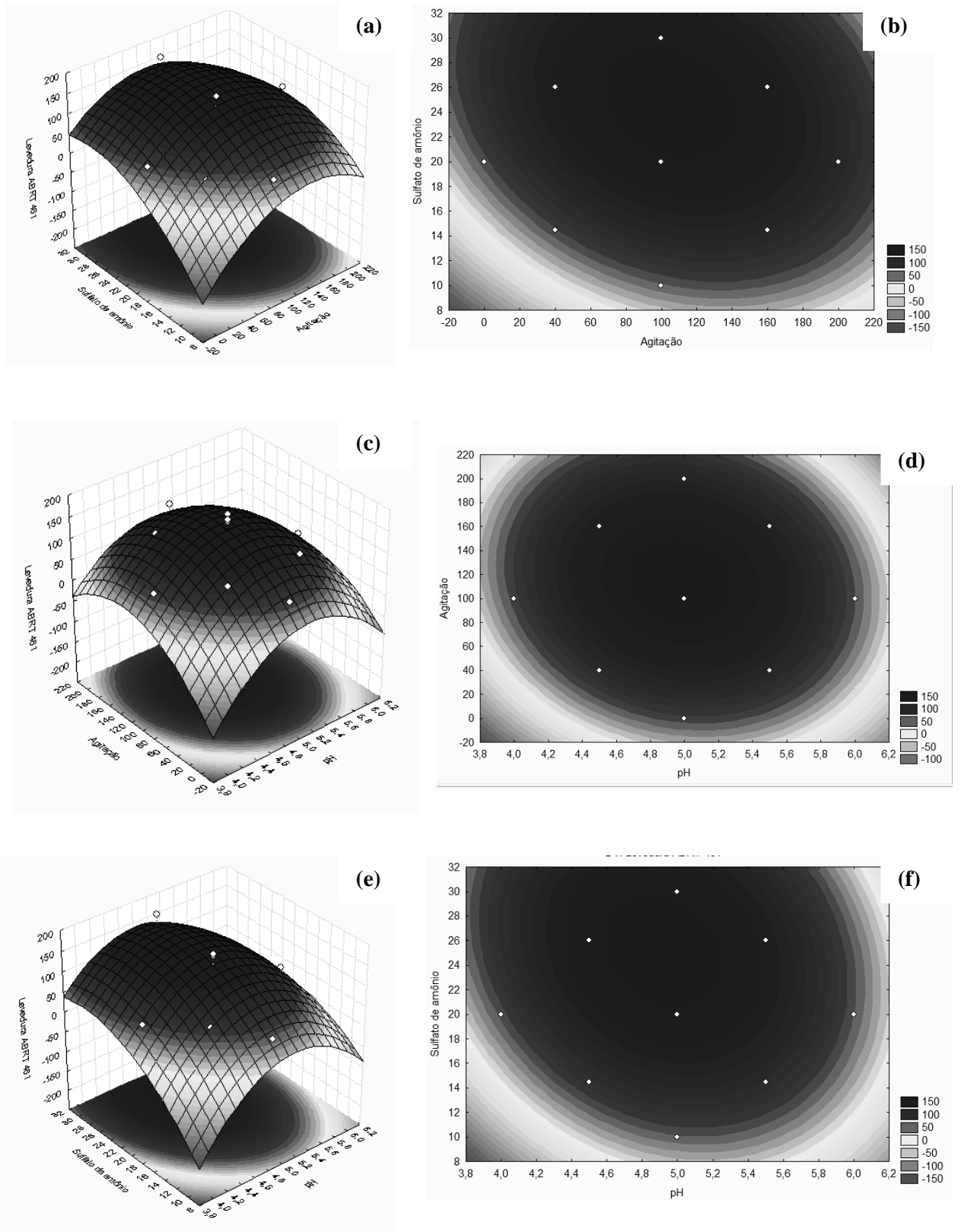
<b>Parâmetros</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Grau de liberdade</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcal</b>	<b>p-valor</b>
pH (L)	24,26	1	24,26	0,06248	0,807683
pH (Q)	11492,63	1	11492,6	29,60248	0,000285
Agitação (L)	1939,22	1	1939,22	4,99501	0,049426
Agitação (Q)	7001,22	1	7001,22	18,03359	0,001699
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	10355,46	1	10355,4	26,67339	0,000422
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	3343,02	1	3343,02	8,61089	0,014927
Resíduo	3882,32	10	3882,32		
Total	30472,12	16			

Como, com exceção das interações, todos os parâmetros foram significativos, foi possível um modelo com as variáveis (Equação 1):

$$\text{Atividade enzimática} = -2618,76 + 952,30 \text{ pH(L)} - 95,48 \text{ pH(Q)} + 1,64 \text{ agitação (L)} - 0,01 \text{ agitação (Q)} + 25,07 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ (L)} - 0,50 \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 \text{ (Q)} \quad \text{Equação (1)}$$

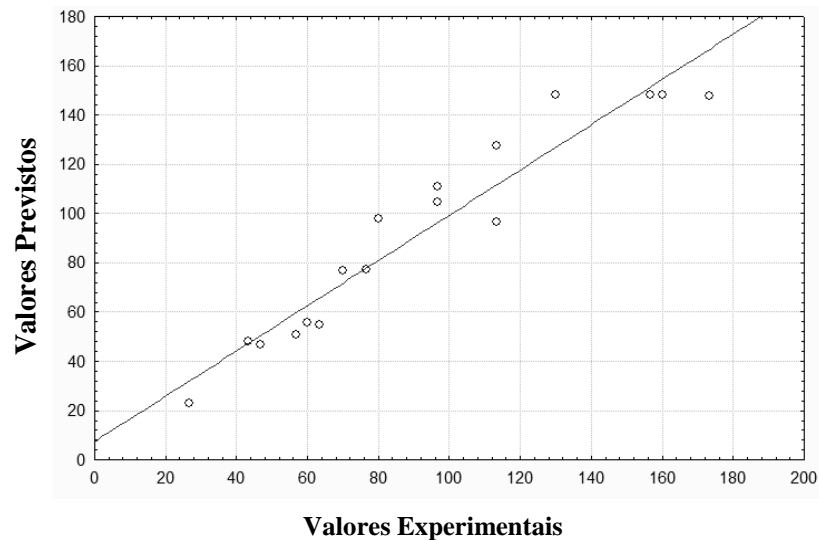
Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de respostas (figura 4).





**Figura 4.** Superfícies de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) em função da agitação e concentração de sulfato de amônio (a) e (b), da agitação e pH (c) e (d), e da concentração de sulfato de amônio e pH (e) e (f).

A porcentagem de variação explicada foi de 87%. Os resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo expressos (figura 5).



**Figura 5.** Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a atividade enzimática.

O processo de otimização para a produção de lipase da levedura ABRT 461 foi eficaz para os parâmetros de pH, agitação e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , com valores ótimos de 5, 114 rpm e  $25 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Liu & Zhang (2011) estudaram a otimização da produção de lipases por um mutante de *Candida antarctica* utilizando a metodologia de superfície de resposta, pH entre 5,1 e 6,5, incubado as temperaturas entre  $15^\circ\text{C}$  e  $31^\circ\text{C}$ , a 250 rpm por 58 horas, tendo como maior atividade enzimática o valor de  $27,34 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Muitos outros trabalhos têm demonstrado que a agitação e a aeração são parâmetros que influenciam diretamente a produção de lipases (CHEN *et al.*, 1999; ELIBOL e OZER, 2000; TAN *et al.*, 2003).

As fontes de nitrogênio mais comumente usadas para o crescimento microbiano são: farinha de soja, peptona, uréia, nitrato e sais de amônio. A literatura reporta diferentes efeitos com relação à produção de lipases, dependendo da fonte de nitrogênio utilizada (HADEBALL, 1991).

Estudos realizados por Braga (2009) mostraram que a produção de lipases pela *C.rugosa* é superior as outras linhagens de  $5,873 \text{ U.mL}^{-1}$ . Este mesmo autor avaliou a atividade lipolítica de três linhagens da *Y. lipolytica*, obtendo valores máximos de  $448,6 \text{ U.L}^{-1}$ ,  $117,6 \text{ U.L}^{-1}$  e  $415,2 \text{ U.L}^{-1}$ , respectivamente.

Tan *et.al.* (2003) encontraram alta atividade enzimática usando uma fonte inorgânica de nitrogênio o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . He e Tan (2006) encontraram atividade lipolítica de 6,230 e 9,600  $\text{U.mL}^{-1}$  em frascos agitados e biorreatores de 5L, enquanto usaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar o meio de cultivo para a produção de lipase por *Candida sp.*

### 5.3 APLICAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MEIO OTIMIZADO

Para se verificar o ponto de atividade enzimática máxima prevista a partir do modelo proposto, a linhagem ABRT 461 foi cultivada nas condições otimizadas obtidas no DCCR 2<sup>3</sup> (agitação de 114 rpm, pH 5,0 e concentração de sulfato de amônio 25  $\text{g.L}^{-1}$ ) em dez repetições. Os demais parâmetros foram mantidos conforme o DCCR 2<sup>3</sup>.

A atividade enzimática da linhagem ABRT 461 variou entre 34,4 e 105,6  $\text{U.mL}^{-1}$  e a produção de biomassa entre 0,03 e 0,08  $\text{g.L}^{-1}$  (tabela 12).

**Tabela 12.** Resultados obtidos, para atividade enzimática ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) e biomassa ( $\text{g.mL}^{-1}$ ) a linhagem de ABRT 461. Médias das triplicatas com 10 repetições.

	<b>Atividade Enzimática*</b>	<b>Biomassa*</b>
<b>1</b>	105,6	0,06
<b>2</b>	67,8	0,08
<b>3</b>	98,9	0,07
<b>4</b>	103,3	0,08
<b>5</b>	34,4	0,06
<b>6</b>	94,4	0,08
<b>7</b>	84,4	0,06
<b>8</b>	102,2	0,04
<b>9</b>	72,2	0,03
<b>10</b>	81,1	0,04
<b>Médias</b>	<b>84,4</b>	<b>0,06</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b><math>\pm 22,024</math></b>	<b><math>\pm 0,019</math></b>

\* médias de valores de análises em triplicata.

A partir do modelo proposto tem-se um valor previsto de 161,94  $\text{U.mL}^{-1}$  de atividade enzimática nas condições do cultivo realizado. A atividade enzimática média dos cultivos realizados foi de 84,4  $\text{U.mL}^{-1} \pm 22,024 \text{ U.mL}^{-1}$ . A produção de lipases encontrada foi superior

aos valores encontrados por Dominguez *et al* (2003), quando estudaram a produção de lipases pela *Y. lipolytica*, em cultivo submerso, encontrando valores de 58 U.mL<sup>-1</sup>, 49 U.mL<sup>-1</sup> e 33 U.mL<sup>-1</sup>. Fickers *et al.*, (2006) encontraram valores de 1,118 U.mL<sup>-1</sup> com 53 horas de incubação, enquanto estudavam a produção de lipases pela linhagem de *Y. lipolytica*.

Lakshmi *et.al.*,(1999) obtiveram para a *Candida rugosa* 4,5 U.mL<sup>-1</sup> de atividade lipóitica.

Lock (2007) relatou atividade enzimática de 119,79 U.mL<sup>-1</sup>após 24 h de incubação pela levedura *Y. lipolytica*. O mesmo autor estudou ainda uma linhagem de *Debaromyces melissophilus*, tendo obtido uma atividade enzimática máxima de 133,7 U.mL<sup>-1</sup>, em 36 horas.

## 6. CONCLUSÃO

- A otimização da produção de lipases pela linhagem ABRT 461 pelo planejamento experimental foi alcançada, sendo encontrados valores ótimos de agitação, pH e concentração de sulfato de amônio a partir do modelo proposto.

- Os delineamentos de PB e DCCR se mostraram adequados para a otimização das condições de produção de lipases por leveduras em cultivo submerso.

- A linhagem de levedura ABRT 461 apresenta potencial para a produção industrial de lipases.

## REFERÊNCIAS

ABIAM, **Uso das enzimas na industria de alimentos**, 2015. Disponível no sítio: [www.abiam.com.br](http://www.abiam.com.br).

ALONSO, F.O.M.; OLIVEIRA, E.B.L.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M.; PEREIRA-MEIRELLES, F.V., Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Brazilian Journal Chemical Engineer** v. 2,. p.9–18, 2005.

ANDRADE, V.S.; SARUBBO, L.A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.106-110, 2002.

BRAGA, A.C. **Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica***. Dissertação Programa de Pós-graduação em Engenharia Biológica da Universidade do Minho, p.107, 2009.

BELL, S.; MORSE, S. **Measuring sustainability: learning from doing**. London: Earthscan, 189 p., 2003.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 448 p., 2005.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

BOX, G. E. P. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley. p. 653, 1978.

BRZOWSKI, A. M.; *et.al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature** **351**, p.491–494, 1991.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; D'ADDIO NOFFS, M.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26(1), p.75- 80, 2003.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.Ap.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v.28(4), p. 614-621, 2005.

CASTRO, H.F. AND ANDERSON, W.A. Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases. **Química Nova**, São Paulo, V. 18, n.5, p.544-554 ,1995.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHAMPE, P.C.; & HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**. Ed. Artmed, 2ª ed. Porto Alegre, 1996.

CHEN, J.Y.; WEN, C.M.; CHEN, T.L.. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens* **Biotechnology and Bioengineering**, v.62, p. 311-316, 1999.

COLLA, L.M.; REINCHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**. Vol. 4(2), p. 1-14, 2012

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia da UFMG, 206 p. 2006.

CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipases: potencial biocatalyst for industrial use. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, p. 163, 2010.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAMASO, M.C.T.; PASSIONOTO, M.A.; FREITAS, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LAGO, R.C.A.; Couri, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 39, p. 676, 2008.

DARTORA, D. F. Isolamento e Seleção de Micro-organismos Produtores de Lipases a partir do Soro de Queijo. In: SINAFERM, 14., 2003, Florianópolis. **Anais Sinaferm 2003**. Florianópolis: UFSC, 2003. p. 1 - 6. Disponível em: <[www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t165.doc](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t165.doc)>.

DOMINGUEZ, A; DEIVE, F.J.; SANROMAN, M.A.; LONGO, M.A. Effect of lipids and surfactantes on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, p. 0268-2575, 2003.

DEREWENDA ZS, SHARP AM. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. **Trends Biochem Science**. v. 18, p.20-25, 1993.

ELIBOL, M., OZER, D. Influence of oxygen on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process. Biochem**. v.36, p.325–329, 2000.

ERICSSON DJ, KASRAYAN A, JOHANSSON P, BERGFORS T, SANDSTROM AG, BACKVALL JE, MOWBRAY SL. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase: a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biotechnology**. v.376, p.109-119, 2008.

FAGUNDES, F.P; BEZERRA; J.P.; GARCIA, M.A.; MEDEIROS, A.C.R.; BORGES, M.R.; GARCIA, R.B; Costa, M. Avaliação das Propriedades do óleo de mamona. In: Produção de bicomcombustível. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Produção e Desenvolvimento em Petróleo e Gás, Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás – IBP **Revisão**, 2005.

FALCONE, C.O. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento**. Programa de Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito. Espírito Santo, p.71, 2009.



FERNANDES, M. L. M. et al. 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, 2004.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Programa de Pós-graduação em Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, p.131, 2007.

FICKERS, P. et.al. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 756-759, 2006.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnología de las Enzimas**. Acribia, Zaragoza. 1990.

GANDHI, N.N. Applications of Lipase. **Journal American Oil Chemists Society**. v. 74, p. 621-634. 1997.

GONÇALVES, G. A. F. **Produção de lipases extracelular por levedura em cultivo submerso**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GOMES, N., **Efeito do oxigênio na biotransformação de lípidos em aromas pela levedura *Yarrowia lipolytica***. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Braga, Portugal, 2004.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v.11, p.159-167, 1991.

HAQ, U. I., IDREES, S.; RAJOKA, M.I., Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.37(6), p. 637-641, 2002.

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

HE, Y-Q.; TAN, T-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 43, p. 9–14, 2006.

IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124, 2010.

JAEGER, K. E. *et.al.*, Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 3-12, 1997.

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

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

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochem.**, v.35, p.539-550, 2000.

KOBLITZ, M.G. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p., 2008.

KUMAR, S.; SHARMA, N.S.; SAHARAM, M.R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization.. **Process Biochemistry**, p. 5-15, 2005.

KHURI, A.I. & CORNELL, J.A. **Response Surfaces**. Dekker, New York, p.405, 1987.

LAKSHMI, B.S. et.al. Effect of vegetable oils in the secretions of lipase from *Candida rugosa* (DMS 2031). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 66-70, 1999.

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43, 2010.

LIU, j. & ZHANG, Y. Optimisation of lipase production by a mutant of *Candida antarctica* DSM-3855 using response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, p. 695-701, 2011.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia – Tecnologia das fermentações**. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1975.

LIMA, U. A. e AQUARONE, E. e BORZANI, W. e SHIMIDELL, W. **Produção de Enzimas Microbianas. Biotecnologia Industrial**: volume 2 e 4; 1ª edição. São Paulo, 2001.

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **JAACS**, v. 79, p. 191-195, 2002.

LOCK, L.L., **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.125, 2007.

MALDONADO, R.F. **Produção, Purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Programa de Pós-graduação da Unicamp, 2006.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31(8), p. 1942-1947, 2008.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **O bioma do cerrado**. Sítio: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>, 2015.

MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2a ed., LTC. Rio de Janeiro, 2003.

NAWANI, N.; DOSANJH, N.S.; KAUR, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. Characterization and esterification studies. **Chapman and Hall.**, v.20(10), p. 997-100, 1998.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**, 3ª ed, p. 189-224, Sarvier, 2002.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora da Unicamp, p. 102-106, São Paulo, 1995.

OLIVEIRA, A. N. *et al.* Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA B. H., Imobilização e Caracterização parcial de lipase produzida por *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa. **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista**, p.133, 2012.

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J.V.C; FERNANDES, M.L.; MARIANO, A.B., Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n.1, p 19-26, 2013.

PALUDO, G.B. Potencial enzimático de leveduras isoladas do cerrado tocantinense. **Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Universidade Federal do Tocantins, p. 101, 2015.

PATEL, R.N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enz. Microbial Technology**, v. 31, p. 804-826, 2002.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; SANT'ANNA JR., G. L. A stable lipase from *Candida lipolytica*, cultivation conditions and crude enzyme characteristics. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 63-65, p.73-85. 1997.

PINHEIRO, T. L. F.; *et.al.*. Response surfacemethod to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 2, p. 119-125, 2008a.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444-450, 2008b.

PLACKETT, R.L.; BURMANN, J.P., The design of optimum multifactorial experiments, **Biometrika**. v.33, p. 305–325, 1946.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 325 p, 2005.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, M.L. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.30 n.1, 2010.

QUEIROZ, N. **Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisadas por lipases.** Programa de Pós-graduação em Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: **A review.** *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

SCHRAG J.D., *et al.* The open conformation of a Pseudomonas lipase. **Structure**, v. 5(2), p.187-202, 1997.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas.** In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes biotecnológicos.* Cap. 1, p. 1 – 7, Ed. Legis Summa, 2004.

SALAH, R.B; GHAMGHUI, N H. MILED, H. MEJDOUB AND Y. GARGOURI,. Production of butyl acetate ester by ipase from novel strain of Rhizopus oryzae. **Journal Bioscience. Bioengineer**, v.103, p.368-373, 2007.

SANT'ANNA Jr, G. L. Produção de Enzimas Micorbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial.** 1a ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 3, p. 351 – 354, 2001.

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

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239-247, 2003.

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

SILVA -NEVES, K.C., PORTO, A. L.F., TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**. v.36, p.299 – 306. 2006.

SILVA, E.B. Fungos e leveduras extraídos de folhas e frutos podem ser convertidos em enzimas. **Jornal da Unicamp**. 20 de outubro a 2 de novembro de 2014.

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

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

TREVISAN, H.C. Lipases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R., **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ed. Legis Summa, Cap.7, p. 115-135, 2004.

TUMANG, T.R.; COSTA, E.S., Maldi-tofms aplicada à produção, purificação e caracterização de lipase de interesse biotecnológico. **XIV Seminário de Iniciação Científica**. PIBIC-PUC-RIO, 2006.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T,A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**. v. 2, p. 293-308, 1994.

VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 47-54,2007.

VITOLO, M. Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos. In: Biotecnologia Industrial: **Biotecnologia na Produção de Alimentos**. 1 Ed. v 4. Ed. Edgard Blucher Ltd. p. 387-420, 2001.

VOLPATO, G., **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol.** Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 158 p., 2009.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2095-2103, 2005.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, v. 4, p. 77–100, **Elsevier**, 1998.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnol.** v. 25, p. 1239, 2003.

WANDERLEY, M.P.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J.. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**. v.01, n°1, p.44-50, 2011.

WOOLEY, P. e PETERSON, S. B. **Lipases their structure production Biochemistry and application.** Cap 12. Cambridge University Press, 1994.

WHITAKER, J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences.** Marcel Dekker, Nova York. 234 p. 1994.



## APENDICES

**Tabela 1.** Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-16 com 72 h de incubação para a linhagem ABRT 461.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
pH*	3751,56	1	3751,563	8,515228	<b>0,033087</b>
Agitação*	1840,41	1	1840,410	4,177329	<b>0,096395</b>
Az. de Oliva	1310,44	1	1310,440	2,974413	0,145189
Tween 20	1,69	1	1,690	0,003836	0,953014
Tritons X-100	108,16	1	108,160	0,245500	0,641268
Ext. de levedura	76,56	1	76,562	0,173780	0,694067
Peptona	109,20	1	109,203	0,247866	0,639702
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	2545,20	1	2545,203	5,777054	<b>0,061351</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	524,41	1	524,410	1,190296	0,325032
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	264,06	1	264,063	0,599364	0,473819
Erro	2202,85	5	440,571		
Total	12734,56	15			

\* Parâmetros estatisticamente significativos, R<sup>2</sup>=0,82.

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-16 com 72 h de incubação para a linhagem ABRT 461. R<sup>2</sup>=0,6718.

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
pH	0,199586	1	0,199586	0,794644	0,413536
Agitação	0,190751	1	0,190751	0,759467	0,423358
Az. de Oliva	0,146115	1	0,146115	0,581753	0,480043
Tween 20	0,343689	1	0,343689	1,368387	0,294811
Tritons X-100	0,318378	1	0,318378	1,267612	0,311334
Ext. de levedura	0,312202	1	0,312202	1,243021	0,315590
Peptona	0,205436	1	0,205436	0,817912	0,407247
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,318378	1	0,318378	1,267612	0,311334
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,333795	1	0,333795	1,328995	0,301101
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,202275	1	0,202275	0,805352	0,410624
Erro	1,255818	5	0,251164		
Total	3,826421	15			

**Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-16 com 72 h de incubação para a linhagem TAQ 616.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
pH	57,002	1	57,002	0,093534	0,033087
Agitação	83,723	1	83,723	0,137378	0,726086
Az. de Oliva*	3498,723	1	3498,723	5,740942	<b>0,061924</b>
Tween 20	201,640	1	201,640	0,330865	0,590065
Tritons X-100	756,250	1	756,250	1,240907	0,315960
Ext. de levedura	56,250	1	56,250	0,092299	0,773511
Peptona	34,223	1	34,223	0,056155	0,822083
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	33,640	1	33,640	0,055199	0,823571
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	585,640	1	585,640	0,960958	0,371965
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	504,002	1	504,002	0,827002	0,404844
Erro	3047,168	5	690,434		
Total	8858,260	15			

\* Parâmetros estatisticamente significativos, R<sup>2</sup>=0,81773.

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-16 com 72 h de incubação para a linhagem TAQ 616.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
pH	0,000046	1	0,000046	0,087812	0,778891
Agitação	0,000033	1	0,000033	0,063721	0,810757
Az. de Oliva*	0,003108	1	0,003108	5,990147	<b>0,058116</b>
Tween 20	0,000105	1	0,000105	0,202486	0,671559
Tritons X-100*	0,003938	1	0,003938	7,588836	<b>0,010082</b>
Ext. de levedura	0,001502	1	0,001502	2,893951	0,149653
Peptona	0,000138	1	0,000138	0,266087	0,627960
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,000150	1	0,000150	0,289214	0,613789
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,000095	1	0,000095	0,183213	0,686437
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,002525	1	0,002525	4,866535	<b>0,078496</b>
Erro	0,002594	5	0,000519		
Total	0,014233	15			

\* Parâmetros estatisticamente significativos, R<sup>2</sup>=0,81773.

**Tabela 5.** Resultados obtidos das triplicatas, para atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>) para a linhagem ABRT 461, nas 10 repetições.

<b>Ensaio</b>	<b>Leitura 1</b>	<b>Leitura 2</b>	<b>Leitura 3</b>	<b>Média das triplicatas</b>
<b>01</b>	100,0	116,7	100,0	105,6
<b>02</b>	73,3	63,3	66,7	67,8
<b>03</b>	83,3	96,7	116,7	98,9
<b>04</b>	110,0	83,3	116,7	103,3
<b>05</b>	43,3	33,3	26,7	34,4
<b>06</b>	110,0	80,0	93,3	94,4
<b>07</b>	83,3	76,7	93,3	84,4
<b>08</b>	83,3	123,3	100,0	102,2
<b>09</b>	66,7	66,7	83,3	72,2
<b>10</b>	93,3	66,7	83,3	81,1

**Tabela 6.** Resultados obtidos das triplicatas, para biomassa (g.mL<sup>-1</sup>) para a linhagem ABRT 461, nas 10 repetições.

<b>Ensaio</b>	<b>Leitura 1</b>	<b>Leitura 2</b>	<b>Leitura 3</b>	<b>Média das triplicatas</b>
<b>01</b>	0,06	0,055	0,054	0,06
<b>02</b>	0,085	0,086	0,081	0,08
<b>03</b>	0,082	0,07	0,069	0,07
<b>04</b>	0,08	0,078	0,086	0,08
<b>05</b>	0,058	0,061	0,069	0,06
<b>06</b>	0,073	0,066	0,098	0,08
<b>07</b>	0,064	0,057	0,056	0,06
<b>08</b>	0,041	0,035	0,033	0,04
<b>09</b>	0,034	0,031	0,035	0,03
<b>10</b>	0,041	0,036	0,044	0,04