



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

KLEYDIANE BRAGA DIAS

**ACÚMULO DE LIPÍDIOS INTRACELULARES E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE
POR *Candida viswanathii*: POTENCIAL PARA HIDRÓLISE DE GORDURA DE
FRANGO**

GURUPI - TO

2016



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

KLEYDIANE BRAGA DIAS

**ACÚMULO DE LIPÍDIOS INTRACELULARES E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE
POR *Candida viswanathii*: POTENCIAL PARA HIDRÓLISE DE GORDURA DE
FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

**GURUPI - TO
2016**

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

D541a Dias, Kleydiane Braga.

Acúmulo de lipídios intracelulares e imobilização de lipase por *Candida viswanathii*: Potencial para hidrólise de gordura de frango. / Kleydiane Braga Dias. – Gurupi, TO, 2016.

141 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2016.

Orientador: Alex Fernando de Almeida

1. Óleo Microbiano. 2. Enzima. 3. Encapsulação. 4. Hidrólise. I. Título

CDD 660.6

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.

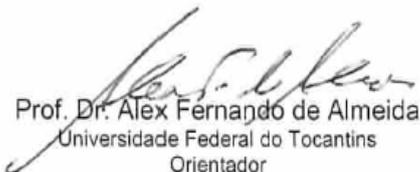
Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



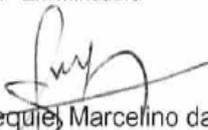
Ata de Defesa nº 18/2016

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KLEYDIANE BRAGA DIAS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

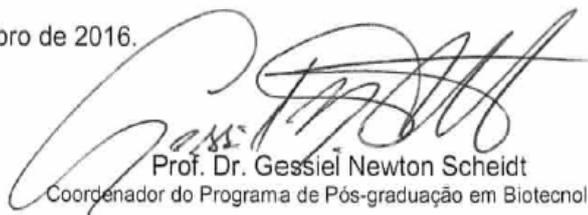
Aos 05 dias do mês de dezembro do ano de 2016, às 14 horas, na sala 15 do edifício BALA II, no campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Orientador Prof. Dr. ALEX FERNANDO DE ALMEIDA, da Universidade Federal do Tocantins, Prof^a. Dr^a. CLÁUDIA CRISTINA AULER DO AMARAL SANTOS, da Universidade Federal do Tocantins e Prof. Dr. EZEQUIEL MARCELINO DA SILVA, da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de Kleydiane Braga Dias, intitulada "**Acúmulo de lipídios intracelulares e imobilização de lipase de *Candida viswanathii*: potencial para hidrólise de gordura de frango.**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Universidade Federal do Tocantins
Orientador


Profª Drª Cláudia Cristina Auler do Amaral Santos
Universidade Federal do Tocantins
1ª Examinadora


Prof. Dr. Ezequiel Marcelino da Silva
Universidade Federal do Tocantins
2ª Examinador

Gurupi, 05 de dezembro de 2016.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

O tempo foi muito curto, mas o caminho foi bem longo! E eu não conseguiria concluir esta dissertação sozinha e por isso gostaria de agradecer especialmente a algumas pessoas.

À Deus, que pela sua grandeza e pelo seu amor incondicional, permitiu que tudo isso acontecesse. Obrigada por me mostrar que sou protegida e iluminada pela sua presença divina, por sempre sustentar-me nos momentos mais difíceis e por dar paz à minha alma.

Aos meus pais, porque sem eles não existiria dissertação, não existiriam objetivos, não existiria minha vida. Vocês me ensinaram a lutar pelos meus objetivos e passar por cima das "pedras no caminho". Mãe, Sueli, minha rainha, meu alicerce, que me deu amor em todo tempo e apoio nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Pai, Orlando, apoio, simplicidade e carinho, por trabalhar duro pra me proporcionar tudo isso e por ser fundamental na construção do meu caráter.

Ao meu irmão Welder e à Samara, aos meus avós, e a toda a família.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, por ser mais que um orientador, por ser professor, conselheiro, amigo, pela orientação, dedicação e pelos ensinamentos valiosos passados generosamente a mim. Obrigada por me ensinar tudo o que sei, e por exigir sempre o máximo de mim, despertando assim o melhor que posso ser.

Ao grande amigo André Felipe. Dizer que é amigo é pouco... Você é meu irmão. Eu te amo e só tenho a agradecer a Deus por te ter comigo. Você é quem me conhece melhor, e ainda assim continua do meu lado. Aconselhamo-nos, repreendemos um ao outro, nos ajudamos, choramos e sorrimos juntos... E muitas vezes a gente não precisa nem falar pra entender o outro... nos entendemos em silêncio... Obrigada por tudo!

Às amigas de mestrado e de vida, Rose e Layse. Conhecemo-nos e convivemos na graduação, mas foi no mestrado que nossos laços se fortaleceram. Agradeço por cada palavra, cada risada, cada conhecimento compartilhado. Agradeço por fazerem os meus dias de disciplinas e matérias mais fáceis. Não que os dias fossem fáceis, mas com vocês eu tive força, com vocês tudo foi mais feliz. Obrigada. Que a nossa amizade dure por todo o sempre. Amo vocês!

À toda a galera do LABAP, o melhor, o mais animado e de mais qualidade laboratório da UFT. Agradeço à Profa Cláudia, à técnica Claudiany e a todos os alunos dessa

família. Não vou citar nomes, porque não quero acabar sendo injusta, caso esqueça alguém. Todos vocês foram muito importantes para mim durante essa trajetória. Agradeço por toda ajuda, todo carinho, toda risada, todo lanche rs. Como foram melhores meus dias de LABAP com vocês... Eu vou sentir muita falta! Mas eu quero que todos se sintam abraçados em nome de uma pessoa em especial: Leyla Karlla... ops, Kah! Minha princesa, eu te agradeço por tudo. Por cada carinho, por cada sorriso que tiraste de mim, por me elogiar o tempo todo, por me amar em silêncio, por encher minha bola sempre, pelas fotos e pelos vídeos feitos de mim (geralmente sem meu consentimento), por entender que às vezes (só às vezes) eu sou meio grossa, mas que no fundo eu sou um amorzinho! Obrigada por achar que eu sou bem melhor do que eu realmente sou. Eu vou levar você e a tua amizade por onde eu for. E se eu conseguir ser metade daquilo que tu espera de mim, eu já estarei realizada.

À Alef Rodrigues. Eu te agradeço por tudo! Nós não precisamos de rótulos... Nós somos um encontro de almas... Já temos uma longa história... E eu louvo a Deus por tua vida. Obrigada pela tua amizade, por cuidar de mim, por despertar em mim o amor pela atividade física, por me ensinar, treinar comigo e me fazer apaixonar pela tua área, e com isso melhorar a minha vida, minha saúde, meu bem estar, minha autoestima. Obrigada pela tua calma e por me ensinar que a gente tem sempre que buscar sempre mais, mas não pode deixar de ser feliz com aquilo que temos. Obrigada pelo teu amor. “Quem nasceu pra ser rei...” rs

À Fundação Universidade Federal do Tocantins.

À Incubadora de Empresas Base Biotecnológica – HABITE.

Ao Laboratório de Biotecnologia, Análise de Alimentos e Purificação de Produtos – LABAP.

À EMBRAPA Agroenergia.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins – PPGBIOTEC.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

E à todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa vitória... o meu **Muito Obrigada!**

Ao meu pai Orlando e a minha
mãe Sueli, que não medem
esforços para que os meus sonhos
se realizem, dedico!

Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes.
Mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar o autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...
Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

(Fernando Pessoa)

Sumário

Lista de tabelas	i
Lista de figuras	ii
Abreviaturas.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	21
2. Objetivos.....	23
Capítulo 1: Revisão da literatura	24
1. Enzimas	25
1.1 Enzimas hidrolíticas	27
2. Lipases.....	28
2.1 Mecanismo de ação	29
2.2 Ativação interfacial de lipases.....	31
3. Produção de lipases microbianas.....	32
3.1 <i>Cultivo em substrato sólido (css)</i>	33
3.2 <i>Cultivo submerso (csm)</i>	34
3.3 <i>Fatores nutricionais</i>	35
3.4 <i>Metabolismo de lipídios em leveduras</i>	37
4. Imobilização enzimática.....	442
4.1 <i>Adsorção</i>	43
4.2 <i>Ligação covalente</i>	44
4.3 <i>Crosslinking</i>	45
4.4 <i>Aprisionamento e encapsulamento</i>	46
4.5 <i>Imobilização de lipases</i>	49
5. Alginato de sódio.....	49
6. Caracterização de lipases.....	51
7. Aplicações biotecnológicas de lipases.....	53
8. Fontes produtoras de lipases.....	55
9. <i>Candida viswanathii</i>	56
10. Referências bibliográficas	58

Capítulo 2: Acúmulo de lipídeo intracelular e produção de lipase por <i>Candida viswanathii</i> usando fontes de carbono renováveis e condições limitantes de nitrogênio.....	72
Resumo	73
Abstract.....	74
1. Introdução.....	745
2. Material e métodos	77
2.1 Microrganismo e condições de cultura.....	77
2.2 Cultivo submerso.....	77
2.3 Fontes de carbono e condições limitadas de nitrogênio	77
2.4 Biomassa e extrato bruto	78
2.5 Efeito de glicose sobre a formação de lipídios e de produção de lipase	78
2.6 Métodos analíticos.....	78
2.6.1 Atividade de lipase.....	78
2.6.2 Determinação de lipídio microbiano.....	79
2.6.3 Quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	79
2.6.4 Determinação do óleo residual após o cultivo	80
2.6.5 Parâmetros da fermentação	80
3. Resultados.....	81
3.1 Efeito de fontes de carbono sobre o crescimento, produção de lipase e acúmulo de lipídio.....	81
3.2 Efeito de fontes de nitrogênio sobre o crescimento, produção de lipase e acúmulo de lipídio	85
3.3 Cinética de acúmulo de lipídio e produção de lipase	87
3.4 Perfil de ácidos graxos.....	93
4. Discussão	95
5. Considerações finais	100
6. Referências	101
Capítulo 3: Encapsulação da lipase de <i>Candida viswanathii</i> em alginato de sódio e hidrólise da gordura de frango em biorreator tipo cesto.....	104
Resumo	105
Abstract.....	106
1. Introdução.....	107
2. Material e métodos	109
2.1 Manutenção da linhagem.....	109
2.2 Condições de cultivo e obtenção do extrato proteico extracelular	109
2.3 Determinação da atividade enzimática	109

2.3.1	Atividade enzimática por método espectrofotométrico.....	109
2.3.2	Atividade enzimática por método titulométrico	110
2.4	Determinação de proteínas	110
2.5	Imobilização da lipase de <i>C. viswanathii</i>	111
2.5.1	<i>Alginato e imobilização</i>	111
2.5.2	<i>Influência das variáveis na imobilização de lipase de Candida viswanathii</i>	111
2.5.2.1	Diâmetro da esfera.....	111
2.5.2.2	Concentração de alginato.....	111
2.5.3	<i>Modificação de alginato para imobilização de lipase de Candida viswanathii</i>	112
2.5.3.1	Modificação por glutaraldeído.....	112
2.5.3.2	Modificação por álcool polivinílico (PVA).....	112
2.5.3.3	Modificação por carboximetilcelulose (CMC).....	112
2.5.4	<i>Cálculos dos parâmetros de imobilização</i>	113
2.5.4.1	Atividade específica	113
2.5.4.2	Taxa de imobilização.....	113
2.5.4.3	Rendimento da imobilização	113
2.6	Caracterização da lipase de <i>Candida viswanathii</i> livre e imobilizada	113
2.6.1	<i>Determinação da temperatura ótima de atividade</i>	114
2.6.2	<i>Estabilidade térmica</i>	114
2.6.3	<i>Efeito de íons metálicos</i>	115
2.6.4	<i>Reuso da lipase imobilizada</i>	115
2.7	Hidrólise de gordura de frango por lipase de <i>Candida viswanathii</i> livre e imobilizada em biorreator com agitação mecânica e do tipo cesto	115
3.	Resultados e Discussão.....	117
3.1	Influência de variáveis sobre a imobilização da lipase de <i>Candida viswanathi</i>	117
3.2	Modificação de alginato para encapsulação da lipase de <i>Candida viswanathii</i>	119
3.3	Reuso da lipase encapsulada	121
3.4	Caracterização operacional da lipase de <i>Candida viswanathii</i> livre e encapsulada.....	123
3.4.1	<i>Efeito da temperatura sobre a atividade</i>	123
3.4.2	<i>Estabilidade térmica</i>	125
3.4.3	<i>Efeito de íons metálicos</i>	128
3.5	Hidrólise de gordura de frango por lipase de <i>Candida viswanathii</i> livre e imobilizada em biorreator do tipo cesto com agitação mecânica.....	132
4.	Considerações finais	135

5. Referências bibliográficas	136
Considerações finais	1422

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Classificação das enzimas.	26
--	----

Capítulo 2

Tabela 1: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa <i>C. viswanathii</i> com utilização de triacilgliceróis puros e complexos.	84
Tabela 2: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa <i>C. viswanathii</i> com utilização de diferentes fontes de nitrogênio.	87
Tabela 3: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa <i>C. viswanathii</i> em 96h de cinética de cultivo.	93
Tabela 4: Perfil dos ácidos graxos produzidos por <i>C. viswanathii</i> em diferentes fontes de carbono.	94

Capítulo 3

Tabela 1: Influência do diâmetro da esfera na imobilização de lipase de <i>C. viswanathii</i>	117
Tabela 2: Imobilização da lipase de <i>C. viswanathii</i> em diferentes métodos de modificação.	121
Tabela 3: Valores experimentais da constante de desativação (Kd) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para lipase livre e encapsulada, em função da temperatura.	128
Tabela 4: Efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de <i>C. viswanathii</i>	129
Tabela 5: Parâmetros de hidrólise de gordura de frango utilizando lipase livre e encapsulada de <i>C. viswanathii</i>	133

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (Adaptada de castro et al., 2004).	28
Figura 2: Dobra canônica de α/β hidrolases. A hélices são indicadas por cilindros, e folhas β são indicadas por setas sombreadas (Jaeger; Dijkstra; Reetz, 1999).	29
Figura 3: Decanismo de reação de lipases.	30
Figura 4: (A) Sítio ativo das lipases e <i>lid</i> em conformação aberta e fechada (Adaptado de Hanefeld; Gardossi; Magner, 2009) e (B) Ativação interfacial de lipases (Adaptado de Barbosa et al., 2015)	32
Figura 5: (A) Imagem de microscopia de fluorescência de corpúsculos lipídicos em células de levedura (Kohlwein; Chauhan; Hofbauer, 2015). (B) Características estruturais do corpúsculo lipídico (adaptado de Jakubowski, 2016).	38
Figura 6: Visão geral das principais vias metabólicas da síntese de lipídios em levedura (Adaptado de Valoni, 2014).	40
Figura 7: Métodos de imobilização de enzima (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004).	43
Figura 8: Imobilização de enzima por adsorção (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).	44
Figura 9: Imobilização de enzima por ligação covalente (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).	45
Figura 10: Imobilização de enzima por <i>crosslinking</i> (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).	46
Figura 11: Imobilização de enzima por (A) aprisionamento / (B) encapsulação (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).	48
Figura 12: (a) Estruturas dos ácidos β -d-manurônico e α -l-gulurônico (Adaptado de Iro Alginate Industry Co, 2013) e (B) Sua estrutura secundária em blocos MM e GG.	50
Figura 13: (A) Células de <i>Candida viswanathii</i> e (B) Pseudomicélio (Sandhu e Randawa, 1962).	57

Capítulo 2

- Figura 1:** Efeito de fontes de carbono puras e complexas sobre o crescimento de *C. viswanathii*, produção de lipase e acúmulo de lipídio. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel suplementado com 1% (p/v) de triacilglicerol, pH 6,0, 72 h, 200 rpm, 28 °C. 82
- Figura 2:** Células de levedura *C. viswanathii* após 72h de incubação em meio de cultivo contendo azeite de oliva. Setas indicam as vesículas com lipídios. Aumento 400x. 83
- Figura 3:** Efeito de fontes de nitrogênio sobre o crescimento de *C. viswanathii*, produção de lipase e acúmulo de lipídio, Condições de cultivo: meio líquido de Vogel suplementado com 1% (p/v) de triacilglicerol e 0,2% (p/v) de fonte de nitrogênio, pH 6,0, 72 h..... 86
- Figura 4:** Crescimento de *C. viswanathii* (A), produção de lipase (B) e cinética de acúmulo lipídica (C). Condições de cultura: as culturas foram realizadas em meio Vogel com fonte de carbono a 1% (p / v) e fonte de nitrogênio a 0,2% (p / v), pH 6,0, 72h, 200 rpm a 28 °C. Setas indicam a adição de glicose ao meio de cultivo.. 90
- Figura 5:** Morfologia de células de *C. viswanathii* crescida em azeite de oliva (A), glicose (B) e azeite de oliva+glicose (C) após 72 h de cultivo, a 180 rpm, 28 °C. Aumento 400x. 92

Capítulo 3

- Figura 1:** Efeito da concentração de alginato de sódio sobre a atividade enzimática de lipase produzida por *C. viswanathii*. 118
- Figura 2:** Reutilização da lipase de *C. viswanathii* imobilizada em diferentes métodos de modificação. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C. 122
- Figura 3:** Temperatura ótima de atividade da lipase de *C. viswanathii* sobre a hidrólise de palmitato de p-nitrofenila (A) e gordura de frango (B), utilizando a enzima livre

e encapsulada em alginato de sódio 2%. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine.....	124
Figura 4: Termoestabilidade da lipase livre (A) e imobilizada (B) de <i>C. viswanathii</i> . A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C.....	126
Figura 5: Efeito da concentração de íons metálicos sobre a atividade enzima de lipase livre (A) e imobilizada (B) produzida por <i>C. viswanathii</i>	131
Figura 6: Biorreator do tipo cesto com agitação mecânica.....	132
Figura 7: Perfil de hidrólise da gordura de frango por lipase de <i>C. viswanathii</i> livre e encapsulada.....	133

ABREVIATURAS

E.C: Enzyme Commission

mM: milimolar

pI: ponto isoeletrico

P_L: produtividade de lipase (U/h)

pNP: para-nitrofenol

pNPP: para-nitrofenil palmitato

P_X: produtividade de biomassa (g/h)

q_L: razão específica da produção de lipase (U/g of biomass/h)

S: substrato (g/L)

STR: reator com tanque agitado

U: unidade enzimática

Y_{X/S0}: rendimento biomassa sobre substrato não consumido (g/g);

Y_{L/S0}: rendimento lipase sobre substrato não consumido (U/g);

Y_{X/S}: rendimento biomassa sobre substrato consumido (g/g);

Y_{L/S}: rendimento lipase sobre substrato consumido (U/g);

TAG: triacilglicerol

T_{1/2}: meia vida

X: biomassa (g/L)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio em condições submersas, imobilizar a lipase e avaliar o seu potencial em reação de hidrólise de gordura de frango em biorreator tipo cesto. Os cultivos submersos em condições limitantes de nitrogênio com diferentes fontes de lipídios puros ou complexos mostraram que *C. viswanathii* acumulou 44% de lipídio intracelular em trioleína e 39% em azeite de oliva utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Nestas condições, a produção de lipase foi 26,78 U/ml em azeite de oliva e 23,6 U/ml em trioleína. O nitrato de amônio inibiu a produção de lipase em 48% em trioleína e 69% em azeite de oliva. Além disso, a análise dos ácidos graxos revelou predominância de ácido oleico (C18:1), em proporções de 69,31, 60,69 e 68,84%, para azeite de oliva, glicose e azeite/glicose, respectivamente. Quanto à imobilização, estudou-se a influência do diâmetro da esfera e da concentração de alginato, obtendo-se o melhor diâmetro de 2 mm e concentração de 2% de alginato, com atividade enzimática de 13,42 U/g e 28 U/g, respectivamente. Utilizou-se alginato de sódio em sua forma convencional e modificado com glutaraldeído, álcool polivinílico e carboximetilcelulose, sendo que o alginato na forma convencional foi o que apresentou melhores resultados, obtendo-se 28,6 U/g e mais de 50% de atividade após 15 ciclos de reuso. A caracterização da lipase livre e encapsulada de *C. viswanathii* revelou temperatura ótima de atividade de 35 °C para a enzima encapsulada e na faixa de 40 – 45 °C para a lipase livre sobre a hidrólise do p-NPP. Sobre a hidrólise de gordura de frango, tanto enzima livre quanto encapsulada apresentaram temperatura ótima de atividade à 40 °C. Quanto à estabilidade térmica, a enzima livre apresentou boa estabilidade até 12h de incubação nas temperaturas de 30 e 40 °C. Já a enzima encapsulada mostrou-se estável em até 72 horas de incubação nas mesmas temperaturas. A enzima livre apresentou aumento de atividade na presença de NH₄Cl e CaCl₂ (117,50% e 111,25%, respectivamente). Já a lipase encapsulada apresentou aumento na atividade com todos os íons analisados, sendo CaCl₂ (152,94%), NH₄Cl (145,88%), BaCl₂ (144,12%) e NaCl (138,24%). Em relação à hidrólise, observou-se que tanto a enzima livre como encapsulada apresentaram maior atividade hidrolítica após 96 horas de incubação, em que a enzima encapsulada obteve 34,66% de hidrólise e a enzima livre

obteve 17,91% de hidrólise. Assim, a levedura *Candida viswanathii* mostrou-se eficiente tanto para o acúmulo de lipídio, quanto para a produção de lipase nas condições estabelecidas. Além disso, a enzima encapsulada apresentou boa estabilidade e potencial para aplicação na hidrólise de gordura de frango.

Palavras-chave: Levedura oleaginosa; Enzima; Óleo Microbiano; Encapsulação; Hidrólise.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the culture conditions for lipase production and lipid accumulation by yeast *Candida viswanathii* using different carbon sources and nitrogen under submerged conditions; and to immobilize the lipase produced in alginate and to evaluate its potential for poultry fat hydrolysis in basket type bioreactor. Submerged cultures under nitrogen-limiting conditions with different sources of pure or complex lipids showed that *C. viswanathii* accumulated 44% intracellular lipid in triolein and 39% in olive oil using yeast extract as a source of nitrogen. Under these conditions, lipase production was 26.78 U/ml using olive oil and 23,6 U/ml with triolein. Ammonium nitrate inhibited lipase production in 48% with triolein and 69% with olive oil. In addition, analysis of fatty acids showed a predominance of oleic acid (C18:1), in proportions of 69.31, 60.69 and 68.84%, for olive oil, glucose and olive oil/glucose, respectively. The influence of drop diameter and alginate concentration was studied, obtaining the best 2 mm diameter and 2% alginate concentration, with enzymatic activity of 13.42 U/g and 28.0 U/g, respectively. Sodium alginate was used in its conventional form and modified with glutaraldehyde, polyvinyl alcohol and carboxymethylcellulose, and the alginate in the conventional form gave the best results, obtaining 28.6 U/g and more than 50% activity after 15 cycles of reuse. The free and encapsulated lipase characterization of *C. viswanathii* revealed an optimal activity temperature of 35 °C for the encapsulated enzyme and in the 40-45 °C range for free lipase on the hydrolysis of p-NPP. On the hydrolysis of poultry fat, both free and encapsulated enzyme presented optimum temperature of activity at 40 °C. As for thermal stability, the free enzyme presented good stability up to 12 h of incubation at temperatures of 30 and 40 °C. The encapsulated enzyme was stable in up to 72 hours of incubation at the same temperatures. The free enzyme showed increased activity in the presence of NH₄Cl and CaCl₂ (117.50% and 111.25%, respectively). In addition, the encapsulated lipase presented increased activity with all the ions analyzed, being CaCl₂ (152.94%), NH₄Cl (145.88%), BaCl₂ (144.12%) and NaCl (138.24%). In relation to the hydrolysis, it was observed that both the free and encapsulated enzyme presented higher hydrolytic activity after 96 hours of incubation, in which the encapsulated enzyme obtained 34.66% hydrolysis and the free enzyme obtained 17.91% hydrolysis. Thus, yeast *Candida viswanathii* proved to be efficient both for lipid accumulation and for

lipase production under the established conditions. In addition, the encapsulated enzyme presented good stability and potential for application in poultry fat hydrolysis.

Keywords: Oleaginous yeast; Enzyme; Microbial Oil; Encapsulation; Hydrolysis.

1. INTRODUÇÃO

Alguns microrganismos apresentam grande potencial em sintetizar e armazenar quantidades relevantes de lipídeos em sua biomassa (CHANG et al., 2015), sendo que dentre estes microrganismos destacam-se as leveduras oleaginosas, que são de rápido crescimento e teor elevado de lipídio em sua biomassa celular (THEVENIEAU; NICAUD, 2013). Desse modo, leveduras oleaginosas apresentam grande potencial na acúmulo de lipídios em função da sua alta taxa de acúmulo (HUGENHOLTZ; SMID, 2002), mas também pelo fato de serem microrganismos potenciais na produção de lipases.

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas caracterizadas por catalisar a hidrólise de ligações éster de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol, sendo consideradas uma das enzimas mais importantes entre as enzimas industriais (BRÍGIDA et al., 2014). Em razão de as enzimas livres encarecerem o processo, por não possibilitarem sua recuperação e reuso, a imobilização enzimática apresenta-se com uma alternativa, por reduzir o volume de reação, além de favorecer a estabilidade da enzima e sua reutilização (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; MATEO et al., 2007).

Muitos são os métodos de imobilização, que se concentram em ligações covalentes da enzima a uma matriz insolúvel; ligação cruzada intermolecular, utilizando reagentes funcionais; adsorção a uma matriz insolúvel em água; aprisionamento dentro de uma estrutura insolúvel em água ou membranas semipermeáveis (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). No caso de lipases, os principais métodos utilizados incluem adsorção, ligação covalente e encapsulação (NIKPOUR; PAZOUKI; DASHT, 2016); sendo que esta última apresenta benefícios à enzima, como favorecer uma maior área de superfície entre o substrato e a enzima por impor uma barreira física, mas não restringir sua mobilidade (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

As aplicações de lipases imobilizadas são variadas; no entanto, vem ganhando espaço no cenário mundial a hidrólise de lipídios, que resulta em ácidos graxos bastante

semelhantes àqueles encontrados em óleos vegetais, tendo potencial para aplicação em indústrias de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (GUPTA, 2016).

Vários tipos de óleos e gorduras podem ser utilizados neste tipo de hidrólise, como óleo de coco, soja, mostarda, girassol e arroz (GHOSH; BHATTACHARYYA, 1995), óleo de palma (AL-ZUHAIR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003), óleo de oliva, sebo (LINFIELD et al., 1984) e óleo de peixe (BYUN et al., 2007). Entretanto, a gordura de frango tem conquistado espaço e interesse, uma vez que apresenta grande proporção de ácidos graxos desejáveis, como os ácidos graxos monoinsaturados, tais como ácido oleico (CENTENARO; FURLAN; DE SOUZA-SOARES, 2008; LEE; FOGLIA, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar o acúmulo de lipídio e a produção de lipase de *Candida viswanathii*, bem como imobilizar e avaliar o potencial para hidrólise de gordura de frango.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o acúmulo de lipídios por *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono em condições limitantes de nitrogênio em cultivo submerso.
- Avaliar a composição dos ácidos graxos produzidos nos lipídios acumulados por *C. viswanathii* em diferentes condições de cultivo.
- Avaliar a produção de lipase por *C. viswanathii* nas mesmas condições utilizadas para avaliação de acúmulo de lipídio.
- Imobilizar a lipase produzida por *C. viswanathii* nas condições estabelecidas em cultivo submerso e determinar suas principais propriedades bioquímicas, comparando-as com as da enzima livre.
- Avaliar o potencial para hidrólise de gordura de frango pela enzima encapsulada, comparando com a enzima livre.

CAPÍTULO 1
Revisão da Literatura

1. Enzimas

Enzimas são fundamentais para as células vivas, uma vez que catalisam todas as reações metabólicas necessárias para a produção de macromoléculas indispensáveis para a manutenção dos seres vivos. Os primeiros relatos sobre catálise biológica são datados de 1700 em investigações sobre digestão de carne por secreções do estômago (NELSON; COX; 2014). Em 1833, A. Payen e J. F. Persoz fizeram a primeira constatação notável sobre a enzima diastase (amilase), e a partir disso muitos outros estudos foram realizados devido a grande importância que as enzimas apresentam (SHODA et al., 2016). Com exceção de RNAses, as enzimas são proteínas que catalisam reações bioquímicas com a capacidade de converter um substrato específico em produtos com elevadas taxas de reação. Dessa forma, as enzimas reduzem a energia de ativação (E_a) e os produtos são formados mais rapidamente e as reações alcançam seu estado de equilíbrio mais rapidamente (PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2017).

As enzimas são classificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) em seis grandes classes de acordo com o tipo de reação química que catalisam (Tabela 1), sendo atribuído um número de classificação denominado E.C. (*Enzyme Commission of the IUBMB*), de quatro dígitos, onde o primeiro número designa a qual classe a enzima pertence; o segundo número, a subclasse dentro da classe; o terceiro número, grupos químicos específicos que participam da reação, e o quarto número, a enzima, propriamente dita (NELSON; COX; 2014).

Tabela 1: Classificação das enzimas.

Classe	Enzimas	Tipo de Reação	Exemplo de Enzimas
1	Oxidoreductases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C e C=C	Peroxidase, Lacase, Tirosinase, Glicose Oxidase
2	Transferases	Transferências de grupo aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Fosforilase, Glicosiltransferase, Aciltransferase
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, nitrídios e glicosídeos	Glicosidase (Celulase, Amilase, Xilanase, Quitinase, Hialuronidase), Lipase, Protease, Peptidase
4	Liasas	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Decarboxilase, Aldolase, Desidratase
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemase, Epimerase, Isomerase
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e CN e ésteres de fosfato	Ligase, Sintetase, Acil Coa Sintetase

Adaptado de (SHODA et al., 2016).

1.1 Enzimas Hidrolíticas

Hidrolases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise de uma ligação química na presença de molécula de água (H_2O), sendo utilizadas como catalisadores para a produção de materiais orgânicos macromoleculares em indústrias que contribuem do ponto de vista ecológico e sustentável (SHODA et al., 2016). As hidrolases são caracterizadas pelo número de classe 3 da *Enzyme Commission* (E.C.) e são classificadas em 13 subclasses de acordo com as ligações específicas clivadas. Estas 13 subclasses compreendem esterases (E.C. 3.1), incluindo nucleases, fosfodiesterases, lipases e fosfatases, que catalisam a hidrólise de ligações éster; glicosilases (E.C. 3.2) que hidrolisam açúcares; éter, tioéter e trialquilsulfônio hidrolases (E.C. 3.3) que rompem ligações éter; proteases/peptidases (E.C. 3.4) tais como aminopeptidases, carboxipeptidases e endopeptidases, que hidrolisam ligações C-N peptídicas; hidrolases que hidrolisam ligações C-N não peptídicas em amidas, amidinas e nitrilos (E.C. 3.5); hidrolases que atuam sobre ácidos anidridos incluindo nucleosídeos di e trifosfatos, e anidridos contendo sulfonilo (E.C. 3.6); hidrolases atuando em ligações C-C (E.C. 3.7), ligações C-haleto (E.C. 3.8), ligações P-N (E.C. 3.9), ligações S-N (E.C. 3.10), ligações C-P (E.C. 3.11), ligações S-S (E.C. 3.12) e ligações C-S (E.C. 3.13) (SOUSA et al., 2015).

O mecanismo de atuação destas enzimas é o mesmo para todas as subclasses; no entanto, os sítios ativos das hidrolases são diferentes. Existem quatro tipos principais de sítios ativos que são baseados nos aminoácidos presentes e no mecanismo de ação. O primeiro tipo contém resíduos de ácido aspártico ou glutâmico, que é encontrado em lisozima e pepsina como enzimas. O sítio ativo baseia-se na presença de dois ou mais grupos carboxílico. Um dos grupos carboxílico torna-se protonado e atua como ácido geral. O outro grupo carboxílico está desprotonado e atua como uma base. O ácido (eletrófilo) ativa o substrato, onde a base (nucleófilo) ativa água. Enzimas que utilizam este tipo de sítio ativo são aquelas que catalisam a hidrólise de éster, amida e as ligações glicosídicas. O segundo tipo é composto por serino-proteases, e possui um grupo imidazol no sítio ativo para ativação da água como um nucleófilo. O mecanismo catalítico inclui a acilação do grupo hidroxilo de um tiol, normalmente em uma serina no sítio ativo, seguida pela formação de intermediários acil-enzima. A terceira versão de sítios ativos incluem íons metálicos zinco (Zn), cobalto (Co) ou níquel (Ni) para a

ativação de água e de substrato. Estes íons metálicos geralmente contêm grupos carbóximo de histidina (imidazol) e ácido aspártico (glutâmico) como seus ligantes. Os íons metálicos podem atuar como agentes eletrofílicos que ativam o centro de reação atacado ou como ativadores eletrofílicos de moléculas de água que geram cátions hidroxilo. A fosfatase alcalina é um exemplo primário deste mecanismo de sítio ativo. A última categoria de sítio ativo também inclui íons metálicos, que são íons de manganês (Mn) ou de magnésio (Mg). Eles também servem como agentes eletrofílicos que ativam o substrato. No entanto, induzem um déficit de eletrodensidade no centro de reação devido à sua potência (BETTIN e FRANCO, 2005).

2. Lipases

Lipases são formalmente chamadas de triacilglicerol hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol sob condições aquosas (Figura 1). No entanto, também podem agir em reações de síntese, como esterificação e transesterificação, amidação, síntese de peptídeos e formação de lactonas macrocíclicas, em condições reduzidas de água, onde há a transferência de grupos acila de solventes orgânicos (BARRIUSO et al., 2016; BRÍGIDA et al., 2014; FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011).

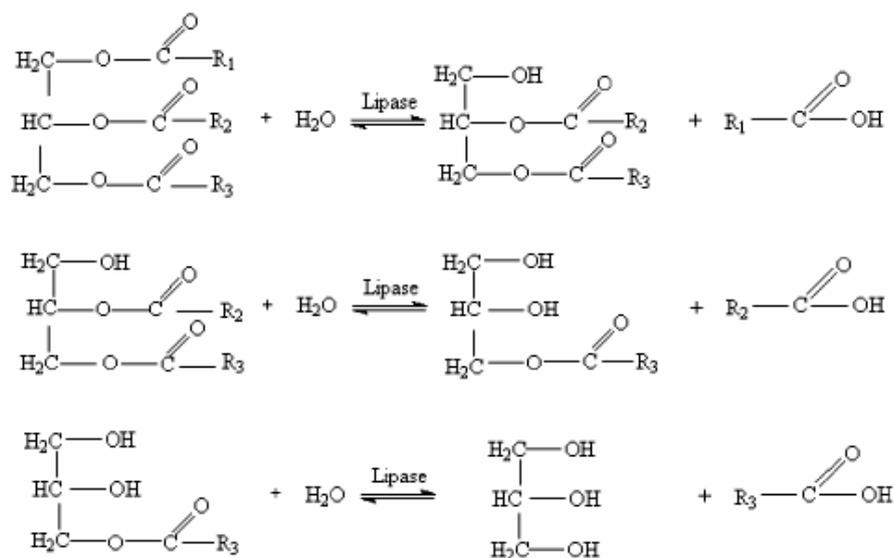


Figura 1: Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases (Adaptada de Castro et al., 2004).

As lipases pertencem à família das α/β hidrolases, ou seja, definidas por estrutura contendo α -hélices e folhas- β (Figura 2). A atividade destas enzimas decorre da tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina e geralmente uma sequência consenso (Gly-X-Ser-X-Gly; onde X é uma aminoácido ácido) é encontrada ao redor da serina do sítio ativo. O sítio ativo é protegido do meio por uma estrutura móvel, denominada tampa hidrofóbica ou *lid*, que ao estar em uma interface água/lipídio sofre uma alteração conformacional para que o sítio ativo seja exposto (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016; BARRIUSO et al., 2016; BORNSCHEUER, 2002).

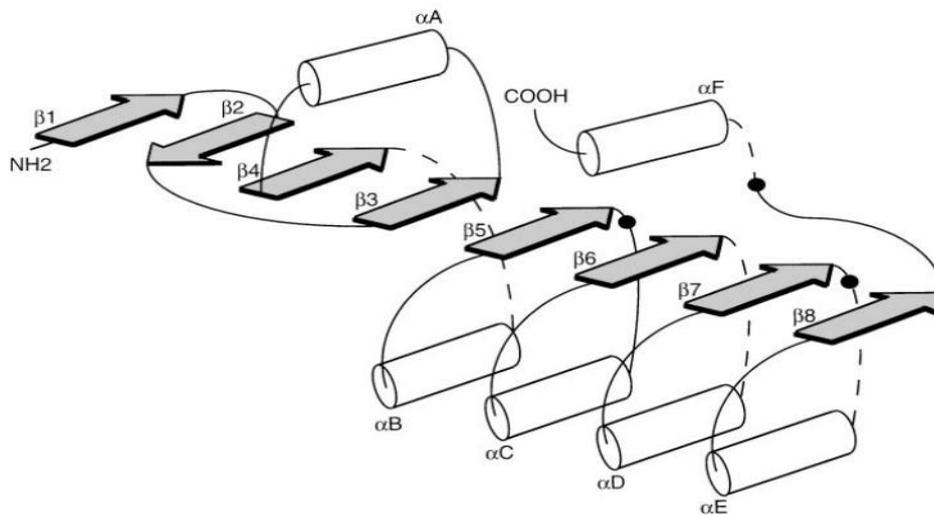


Figura 2: Dobra canônica de α/β hidrolases. Alfa hélices são indicadas por cilindros, e folhas β são indicadas por setas sombreadas (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.1 Mecanismo de ação

A ação das lipases acontece quando um átomo de oxigênio do grupo $-OH$ do resíduo de serina nucleofílico ataca o carbono carbonílico ativado do éster lipídico, o qual está ligado ao sítio ativo da enzima. Esta reação forma um intermediário tetraédrico transitório, que se caracteriza pela carga negativa do oxigênio da ligação éster e pelos quatro átomos ligados ao C carbonílico (Figura 3). O intermediário tetraédrico formado é estabilizado por pontes de hidrogênio que ligam o átomo de oxigênio carbonílico negativamente carregado denominado oxiânion, e pelo menos dois grupos $-NH$ peptídicos da cavidade do oxiânion. A histidina do sítio catalítico aumenta a capacidade

nucleofílica da serina, a partir da transferência de um próton do grupo -OH da serina, que é favorecida pela presença do ácido catalítico, que orienta o anel imidazol da histidina, neutralizando em parte a sua carga. Em seguida, a ligação éster é então clivada pela doação de um próton ao oxigênio. Assim, um intermediário covalente é formado quando o componente ácido do substrato é esterificado à serina nucleofílica, enquanto que, no meio o componente álcool é difundido. O próximo passo é a etapa de desacilação, em que uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. Um dos prótons da histidina ativa a molécula de água e o íon OH resultante ataca o carbono carbonílico do grupo acila à serina por ligação covalente. Outro intermediário tetraédrico transitório é formado, estando negativamente carregado e sendo estabilizado por interações com a cavidade oxiânion. Um próton é doado da histidina para o oxigênio da serina ativa, o qual libera o componente acil como ácido carboxílico, e a enzima pode iniciar a catálise de outra molécula de substrato (BORNSCHEUER, 2002; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

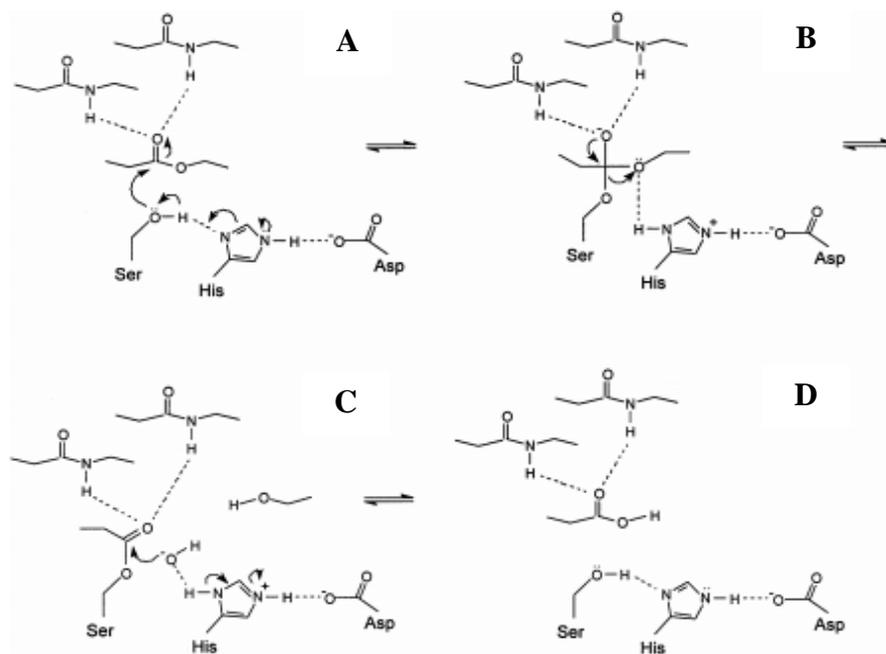
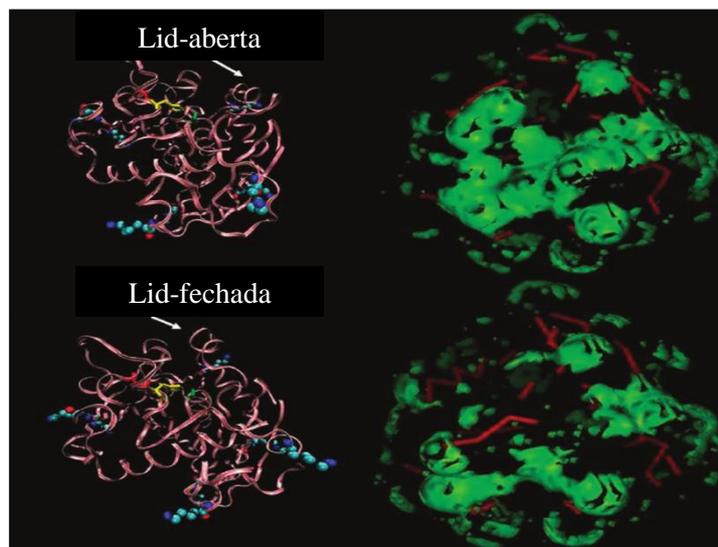


Figura 3: Mecanismo de reação de lipases: (A) Ligação do lipídio, ativação do resíduo de serina pela histidina vizinha e ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico do substrato pelo O⁻ da Ser. (B) Intermediário tetraédrico transitório, com O⁻ estabilizado por ligações de hidrogênio com dois grupos -NH peptídicos. (C) O intermediário covalente (acil enzima). A entrada da molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina vizinho. (D) O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acila é quebrada, e o produto acila é liberado como ácido carboxílico (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.2 Ativação Interfacial de lipases

Lipases possuem um mecanismo denominado ativação interfacial, descrito inicialmente por Sarda e Desnuelle (1958). O sítio ativo das lipases é protegido por uma tampa, também denominada *lid*, que nada mais é que uma cadeia peptídica de natureza hidrofóbica (Figura 4A). Quando em meio aquoso, as lipases apresentam conformação fechada e inativa, e conformação aberta e ativa. Na conformação fechada, o sítio ativo está isolado do meio reacional em virtude da proteção que a tampa oferece. Já a conformação aberta ocorre quando a tampa está na presença de uma interface lipídio-água, havendo uma interação entre ambas. Então, a tampa se move e altera a forma da enzima de fechada para aberta. Isso faz com que o sítio ativo seja exposto e favoreça a catálise, uma vez que o sítio ativo fica acessível ao substrato e expõe uma superfície hidrofóbica ampla (Figura 4B) (MATHESH et al., 2016; RUEDA et al., 2016; SARDA; DESNUELLE, 1958). Assim, a ativação interfacial faz relação entre o aumento da atividade de lipase e os substratos insolúveis, de forma que lipases apresentam preferência por interfaces água-óleo e água-solvente orgânico, ou seja, substratos emulsionados (JAEGER; REETZ, 1998).



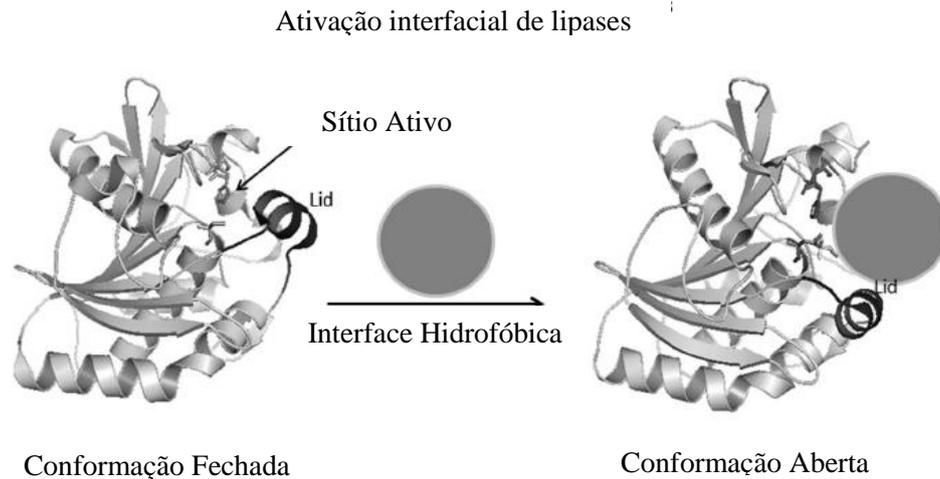


Figura 4: (A) Sítio ativo das lipases e lid em conformação aberta e fechada (Adaptado de HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009) e (B) Ativação interfacial de lipases (Adaptado de BARBOSA et al., 2015).

Desse modo, o lid tem papel importante em favorecer a atividade hidrolítica de algumas lipases (JOHNSON et al., 2016; LINDSAY et al., 2013). Por outro lado, outras lipases não sofrem ativação interfacial apesar de apresentarem o lid, mas, como exemplos pode-se citar lipases de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae* (MANOEL, 2011). Outro caso é o das cutinases, consideradas como as menores lipases descritas e produzidas por microrganismos como *Fusarium solani* e *Alternaria solani*, que não apresentam esse mecanismo, não sendo dependentes dessa interface hidrofóbica para realização da catálise (MESSIAS et al., 2011).

3. Produção de lipases microbianas

Lipases podem ser obtidas a partir de diversas fontes, mas as principais fontes são microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Estes microrganismos podem produzir lipases em um custo mais baixo e menor tempo. Lipases microbianas são enzimas biotecnologicamente valiosas, em virtude da versatilidade de suas propriedades aplicadas e facilidade de produção em grande escala (SHUKLA; DESAI, 2016).

As enzimas industriais são comumente produzidas a partir de cultivos submersos (CSm), do tipo cultivo em batelada e batelada alimentada. No entanto, a

produção de enzimas também pode ocorrer por meio de cultivos em substrato sólido (CSS) (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; SHARMA et al., 2016).

3.1 Cultivo em substrato sólido (CSS)

Cultivo em estado sólido é um processo em que os microrganismos crescem sobre um material sólido, seja ele natural ou sintético, na ausência ou em quantidade limitada de água livre, o que previne contaminações bacterianas que necessitam de uma elevada atividade de água para se desenvolver. Apresenta-se como uma alternativa interessante para a produção industrial de enzimas com custos mais baixos, isso porque apresenta vantagens como rendimentos de produção e produtividades superiores, custos operacionais mais baixos, menos exigências de controle de assepsia, meios de cultivos de menor custo, boa distribuição de oxigênio, em razão de células e especialmente hifas aéreas serem expostas diretamente à fase gasosa; menos problemas operacionais, equipamentos e sistemas de controle mais simples e menor consumo de energia (RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015).

As lipases são consideradas enzimas indutíveis, ou seja, sua produção é estimulada pela presença de algum indutor no meio de cultivo (MUTHUMARI; THILAGAVATHI; HARIRAM, 2016; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016). Dessa forma, diferentes resíduos agroindustriais, como farelos de trigo e arroz (LOPES et al., 2016; MOHSENI et al., 2012), bagaço de cana-de-açúcar (KAM et al., 2016), entre outros, podem ser efetivamente utilizados como substratos para a produção de lipases em CSS (FAISAL et al., 2014). No entanto, é importante ressaltar que é difícil obter todas as características necessárias para a produção de lipase a partir de um único substrato, sendo necessária a combinação de diferentes substratos e/ou a suplementação do meio de cultivo, de modo que o composto tenha fonte de carbono e nitrogênio, além de sais orgânicos e inorgânicos e vitaminas, entre outros (ALMEIDA et al., 2016).

Quando se fala em biorreatores para CSS, estes devem favorecer o crescimento e metabolismo dos microrganismos. Assim, os reatores utilizados mais frequentemente são do tipo de bandeja, de leito fixo ou de coluna e de tambor rotativo, pois eles variam as condições de agitação e aeração, de modo que o CSS oferece um ambiente completamente diferente do CSm para o crescimento celular e metabolismo, gerando

maior rendimento do produto com reduzido gasto energético, visto que há maior transferência de massa do suporte sólido em razão de uma área superficial maior (HEGDE; RAMESH, 2016; RAMOS-SÁNCHEZ et al., 2015).

3.2 *Cultivo submerso (CSm)*

As enzimas industriais são produzidas majoritariamente por meio de CSm, em razão de vantagens no controle mais eficiente de parâmetros do processo, como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido no meio e concentração do substrato e produto; facilidade de cultivo e no controle de grandes volumes; e maior homogeneidade do meio de cultura, que facilita o acesso aos nutrientes (PAULOVÁ; PATÁKOVÁ; BRÁNYIK, 2013).

Lipases têm sido produzidas preferencialmente por CSm por facilitar a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa por filtração simples ou centrifugação. O controle dos tipos e concentrações de nutrientes, o pH, a agitação e a presença e concentração de indutores podem afetar a produtividade destes processos biológicos (COLLA et al., 2016; DAS et al., 2016). Para uma melhor produção de lipases deve-se promover a otimização das condições de fermentação, uma vez que os parâmetros de cultivo influenciam diretamente nas características e eficiência do microrganismo (CELSON et al., 2016; JUDE; OGONNA, 2016).

A produtividade é pretendida em larga escala, sendo iniciada em escala reduzida e os resultados obtidos nos frascos de agitação tomados como indicadores preliminares para as condições necessárias para a produção industrial através de estudos de escalonamento. O método para escalonamento de um sistema de fermentação é geralmente baseado em critérios empíricos, tais como pH, temperatura, entrada de energia constante por unidade de volume, coeficiente de transferência de massa constante, tempo de mistura constante e velocidade (EL-SEDAWY et al., 2013).

3.3 Fatores nutricionais

Muitos estudos dedicam-se a identificar quais as melhores condições de cultivo que satisfaçam as necessidades nutricionais do microrganismo a fim de produzir lipase de maneira eficiente. A produção de lipase microbiana é fortemente influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio de cultivo, temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido (OYEDEJI; IJIGBADE, 2016; SUNDAR; KUMARESAPILLAI, 2013).

A fonte de carbono é um dos fatores nutricionais de maior relevância quando se trata de produção de lipase. Isso porque essas enzimas são indutíveis, produzidas principalmente na presença de óleos, ácidos graxos e glicerol, entre outros. A literatura mostra que substratos lipídicos e seus metabólitos, principalmente ácidos graxos de cadeia longa, atuam na síntese de lipase (DALMAU et al., 2000). Entre os substratos para produção de lipase pode-se citar fontes de triacilgliceróis, como óleo de milho, soja, canola, sementes de linhaça, girassol, entre outros; ressaltando-se que estas fontes favorecem a produção de lipase, mas não em níveis tão elevados, isto pelo fato de que a lipase de *C. viswanathii* ser induzida preferencialmente com ésteres de ácidos graxos monoinsaturados (18:1 Δ^9) (ALMEIDA; TAULK-TORNISIELO; CARMONA, 2013). Dessa forma, é necessário dar a devida atenção ao azeite de oliva, que possui uma elevada quantidade de ácido oleico em sua composição e sendo considerado o melhor indutor para produção de lipase de *Candida* (AB ENZYMES, 2016; SHARMA et al., 2016).

Gordillo et al. (1998) em estudo de produção de lipase por *Candida rugosa*, relataram que a produção de lipase aumentou com o comprimento da cadeia de ácido graxo, sugerindo que ácidos graxos de cadeia longa participam na expressão de genes de lipase, como é o caso do ácido oleico, que possui cadeia de 18 átomos de carbono. Já a utilização de outros ácidos graxos, como ácido láurico, mirístico, palmítico e esteárico apresentam baixa produção de lipases, o que pode ser explicado pelo fato de que estes ácidos graxos são sólidos, dificultando a completa homogeneização no meio (ALMEIDA; TAULK-TORNISIELO; CARMONA, 2013).

Outras fontes não relacionadas a óleos e gorduras podem ser utilizadas, como é o caso de carboidratos. No entanto, não apresentam bons resultados para síntese de

lipase, apesar de propiciarem bom crescimento celular (DALMAU et al., 2000). Isso é confirmado pelo estudo de Almeida; Taulk-Tornisielo; Carmona (2013), em que observaram que em meio suplementado com glicose, galactose, manitol, sorbitol ou glicerol, o crescimento de *C. viswanathii* é verificado, mas não se observa produção de lipase.

Além das fontes de carbono, as fontes de nitrogênio são indispensáveis para produção de lipase, uma vez que são importantes para síntese de fatores de crescimento celular e aminoácidos necessários para replicação celular das células microbianas, manutenção, metabolismo celular e produção de enzimas (ALMEIDA; TAULK-TORNISIELO; CARMONA, 2013; GONÇALVES; COLEN; TAKAHASHI, 2013; TAN et al., 2004). É necessário ressaltar que o nitrogênio, assim como carbono, enxofre, fósforo, oligoelementos e oxigênio, compõem os fatores químicos de crescimento microbiano. Desse modo, a presença do nitrogênio é indispensável para a síntese de material celular dos microrganismos, uma vez que utilizam nitrogênio principalmente para sintetizar os grupos amino que estão presentes nos aminoácidos para síntese de proteínas. Além disso, para síntese de DNA e RNA se faz necessária a presença de nitrogênio, assim como para a síntese de ATP, que é responsável pela transferência de energia química dentro da célula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Algumas das fontes de nitrogênio mais utilizadas são extrato de levedura, peptona e caseína, ressaltando-se que fontes orgânicas favorecem maior crescimento e densidade celular que fontes inorgânicas (SUNDAR; KUMARESAPILLAI, 2013). O estudo de Almeida; Taulk-Tornisielo; Carmona (2013) aponta a utilização de fontes orgânicas e inorgânicas para produção de lipase por *C. viswanathii*, em que se observou que fontes inorgânicas como cloreto de amônio e sulfato de amônio favoreceram o crescimento celular, mas não apresentaram boa produção de lipase, enquanto que nitrato de amônio apresentou resultados satisfatórios tanto para crescimento celular como para produção de lipase. Já as fontes orgânicas de nitrogênio (peptona, triptona e extrato de levedura) apresentaram bons resultados de produção de lipase e crescimento celular, ressaltando que fontes orgânicas de nitrogênio são normalmente usadas, pois fornecem fatores nutricionais adicionais, como aminoácidos, vitaminas e cofatores às células (DARVISHI et al., 2009; TAN et al., 2004).

3.4 Metabolismo de lipídios em leveduras

Os lipídios são os principais depósitos de energia, sendo considerados como as moléculas mais eficientes como reserva energética. Dessa forma, desempenham importantes funções no organismo dos seres vivos, e são armazenados como uma grande gotícula única central (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2016). À vista disso, os microrganismos possuem grande capacidade de síntese e armazenamento de ácidos graxos em sua biomassa. Alguns microrganismos possuem capacidade de produzir e armazenar altos teores de lipídios microbianos em aproximadamente 20% de sua biomassa seca. Esses microrganismos são denominados microrganismos oleaginosos (BACCIOTTI, 2015; CHANG et al., 2015; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; VALONI, 2014).

As leveduras oleaginosas são consideradas eficientes no acúmulo de lipídios em razão de possuírem capacidade de armazenar elevado teor lipídico em sua biomassa celular, na ordem de cerca de 40% de seu peso seco em lipídios em condições normais de crescimento e até 70% em condições limitantes de nutrientes (BEOPOULOS et al., 2009; THEVENIEAU; NICAUD, 2013). Além disso, possuem crescimento rápido, maior tamanho celular, não são influenciadas pelo clima, e são mais tolerantes à baixa disponibilidade de oxigênio, íons metálicos e co-produtos inibitórios (SITEPU et al., 2014).

As leveduras oleaginosas possuem lipídios do tipo triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres de esterol (EE), esteróis livres e outros. No entanto, 80-90% destes consistem em triacilgliceróis (TAG) e ésteres de esteróis (EE), coletivamente chamados de lipídios neutros, sendo que a quantidade varia de acordo com a espécie de levedura, seu crescimento e condições de cultivo (BEOPOULOS; NICAUD; GAILLARDIN, 2011). As moléculas lipídicas são armazenadas em compartimentos da célula denominados partícula lipídica ou corpúsculo lipídico (Figura 5), sendo um núcleo hidrofóbico recoberto por uma membrana de fosfolipídios com proteínas incorporadas (BEOPOLUS et al., 2008; NIELSEN, 2009; NILSSON; NIELSEN, 2016; SCHÜTZHOLD et al., 2015).

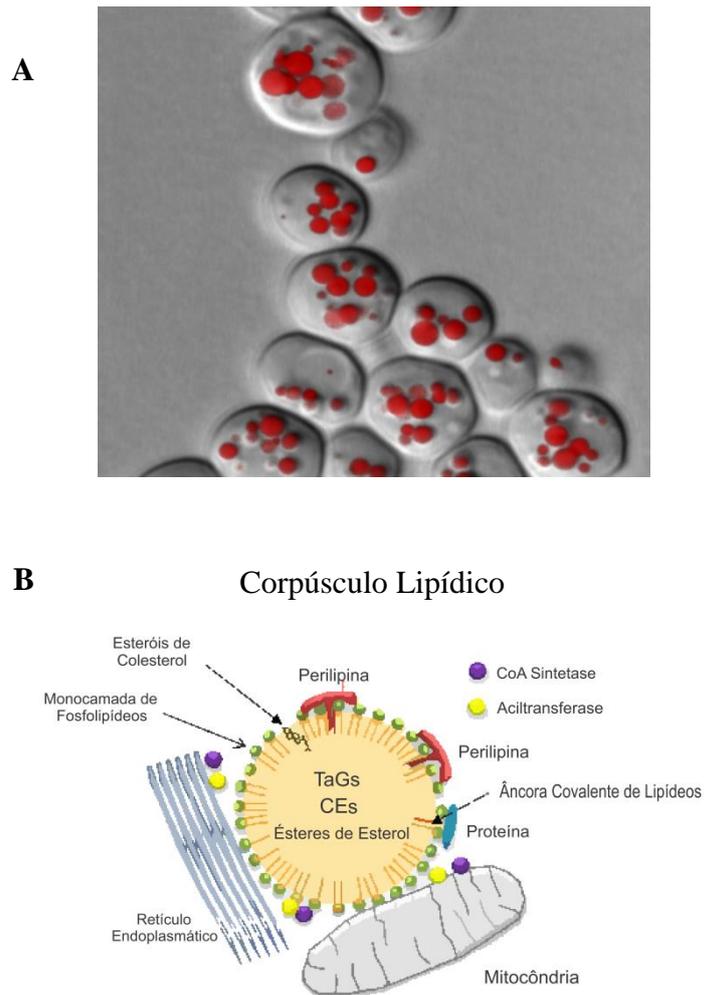


Figura 5: (A) Imagem de microscopia de fluorescência de corpúsculos lipídicos em células de levedura (KOHLWEIN, 2008) (B) Características estruturais do corpúsculo lipídico (Adaptado de JAKUBOWSKI, 2016).

Os lipídios são biomoléculas orgânicas compostas, principalmente, por ácidos graxos e álcool. Os ácidos graxos são compostos de suma importância para as leveduras e podem ser obtidos de três modos distintos, que são: fontes externas absorvidas do meio, lipídios endógenos reciclados de proteínas degradadas, e síntese a partir da via de Kennedy (BACCIOTTI, 2015; BEOPOULOS et al., 2009). Se a levedura não obtiver esses compostos a partir do meio de cultivo para realizar suas funções primordiais, torna-se preciso a realização de uma síntese endógena (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011). Para formar novas membranas lipídicas na fase de crescimento, a levedura precisa produzir fosfolipídios; no entanto, na fase estacionária de crescimento celular os

lipídios são acumulados na forma de lipídios neutros, que são os triacilgliceróis (TAG) e ésteres de esteroide (EE), sendo requerida energia na forma de ATP e NADPH e precursores como acetil-CoA, malonil-CoA e glicerol (BACCIOTTI, 2015; THEVENIEAU; NICAUD, 2013; ZHANG et al., 2011). O ponto em que a levedura passa da fase de crescimento para a fase de acúmulo é quando há limitação de nutrientes, o que acaba por comprometer a produção de biomassa (ANGERBAUER et al., 2008; BACCIOTTI, 2015; CHANG et al., 2015; THEVENIEAU; NICAUD, 2013; VALONI, 2014).

Fatores como fisiologia da levedura, limitação de nutrientes, pH e temperatura do meio e produção de metabólitos (como etanol e citrato), interferem diretamente no acúmulo lipídios que, por sua vez, interfere na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (NELSON; COX, 2014). Esse acúmulo pode acontecer de dois modos: via de síntese *de novo* e via de acúmulo *ex novo*. A via de síntese *de novo* acontece quando o crescimento do microrganismo é induzido por glicose ou glicerol como substrato em condição de limitação de nitrogênio e utiliza acetil-CoA e malonil-CoA como precursores de ácidos graxos (BACCIOTTI, 2015; BEOPOULOS; NICAUD, 2012; NELSON; COX, 2014; VALONI, 2014).

A síntese de lipídios necessita de um suprimento de ácidos graxos ativados para a síntese de TAGs ou EE, sendo que para a síntese de TAGs, necessita-se de glicerol 3-fosfato obtido pela redução de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), um intermediário glicolítico, que pode ser gerado a partir da glicose ou do glicerol, e está intimamente ligado a produção de ácido cítrico e a atividade da enzima isocitrato desidrogenase, pertencente ao conjunto de enzimas presentes no Ciclo de Krebs (CK). Para início da síntese, átomos de carbono obtidos pela clivagem do citrato (fornecido pelo ciclo do TCA) pela ATP-citrato-liase (ACL) são utilizados (BEOPOULOS et al., 2008).

Na ausência de nitrogênio, a enzima adenosina monofosfato desaminase (AMP desaminase) quebra adenosina monofosfato em inosina monofosfato (IMP), fazendo com que diminuam as concentrações de AMP intracelular e se alterem as funções do CK, que por sua vez faz a enzima isocitrato desidrogenase perder sua atividade. A isocitrato desidrogenase tem a função de transformar o ácido isocítrico em ácido α -cetoglutárico; desse modo, quando o ácido isocítrico se acumula dentro da mitocôndria

fica em equilíbrio com o ácido cítrico, que alcança um ponto crítico e é levado para o citosol e clivado pela enzima ATP citrato liase (ACL) gerando oxaloacetato e acetil-CoA. Em seguida, acetil-CoA é convertido em malonil-CoA através da acil carboxilase (ACC). Com a adição de acetil-CoA a uma unidade de malonil-CoA há a formação de acetoacetil-CoA e aumento da cadeia de ácidos graxos. Outras reações envolvendo NADPH, ATP e a incorporação de mais moléculas de malonil-CoA (Ciclo de alongamento) ocorrem favorecendo a formação de palmitato, que é o precursor de todos os outros ácidos graxos, que são os precursores para a síntese de lipídios (BACCIOTTI, 2015).

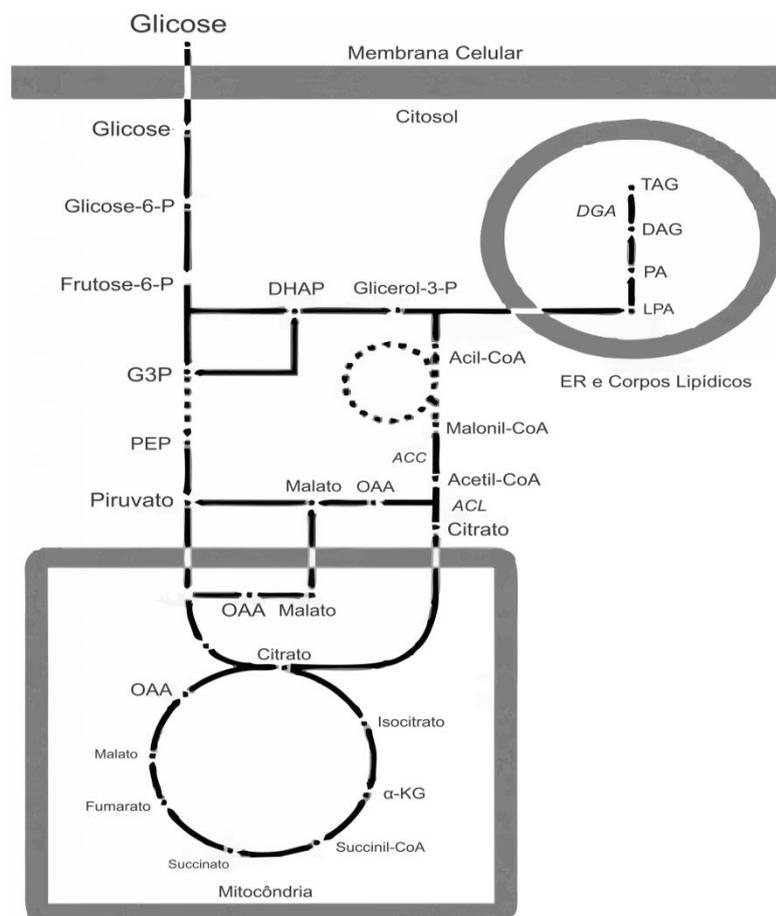


Figura 6: Visão geral das principais vias metabólicas da síntese de lipídios em levedura (Adaptado de VALONI, 2014).

Os TAG são sintetizados no retículo endoplasmático (RE) ou na membrana do corpúsculo lipídico através da via de Kennedy, em que ácidos graxos livres são ativados para coenzima A (CoA) e utilizados para a acilação do esqueleto de glicerol para

sintetizar TAG. No primeiro passo da montagem do TAG, glicerol-3-fosfato (G3P) é acilado por G3P aciltransferase (SCT1) a ácido lisofosfatídico (LPA), que é então adicionalmente acilado por LPA aciltransferase (SLC1) a ácido fosfatídico (PA). Isto é seguido por desfosforilação de PA por PA fosfohidrolase (PAP) liberando diacilglicerol (DAG). No passo final, o DAG é acilado pela DAG aciltransferase (DGA1 com acil-CoA como doador acila) ou pela fosfolípido DAG aciltransferase (LRO1 com glicerofosfolípidos como doador acila) para produzir TAG (BEOPOULOS et al., 2008). Para a síntese de ésteres de esterol (EE), há a reação entre uma molécula de ácido graxo com um grupo hidroxila de esteróis catalisada por uma EE sintase denominada acil-CoA-colesterol aciltransferase (ACAT); além disso, a mobilização do EE é catalisada por EE hidrolases que tem a função de liberar tanto esteróis como ácidos graxos livres (BACCIOTTI, 2015).

Já na via de acúmulo ex novo, a levedura acumula ácidos graxos, óleos e TAGs a partir do meio de cultura. É necessário que haja o auxílio do transporte ativo para condução dos ácidos graxos livres para dentro da célula. Os ácidos graxos são então utilizados tanto para as necessidades de crescimento como para servirem de substratos para transformações endocelulares, onde dentro do corpúsculo lipídico são reorganizados em TAGs e EE e armazenados, sem modificações dentro da célula. Ácidos graxos livres sofrem degradação pelo processo da β -oxidação em reações catalisadas por acil-CoA oxidases (Aox), resultando em cadeias de acil-CoA e acetil-CoA (BACCIOTTI, 2015).

No processo de degradação, os ácidos graxos livres geram energia para o crescimento e manutenção das células e formação de metabólitos intermediários, que formam os precursores para síntese de materiais celulares. Na via de acúmulo ex novo, os processos de acúmulo de lipídios e crescimento celular acontecem de maneira simultânea e independem da limitação de nitrogênio no meio de cultivo, o que diferencia esta via da via de síntese de novo (BEOPOULOS et al., 2008; VALONI, 2014).

4. Imobilização Enzimática

Enzimas são biocatalisadores que desempenham importantes funções biotecnológicas devido à sua versatilidade com respeito à especificidade por substrato e estereoseletividade, apresentando várias vantagens quando comparadas com as catálises químicas convencionais (BUSSAMARA et al., 2012). Portanto, a utilização de enzimas como catalisadores requer, em muitos casos, sua recuperação para o reuso e, assim, tornar o processo economicamente viável (MATEO et al., 2007). A primeira notificação do uso de enzimas imobilizadas foi constatada por Nelson e Griffin, em 1916, quando observaram que a enzima invertase adsorvida em carvão apresentava capacidade de hidrolisar sacarose (NISHA; ARUM; GOBI, 2012).

A imobilização de enzimas apresenta algumas vantagens em processos industriais como: redução do volume de reação, melhoria da estabilidade da enzima e sua reutilização, facilidade de controle do processo, purificação do produto e redução de inibidores (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; ÖZTÜRK, 2001). No entanto, apesar das vantagens incontestáveis da imobilização enzimática, algumas desvantagens são observadas como mudanças conformacionais na estrutura da enzima devido à sua interação com o suporte e limitações disfuncionais entre enzima e suporte, o que pode causar diminuição da eficiência e elevação dos custos (JAFARY et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Para se escolher de maneira correta o método de imobilização, deve-se observar atentamente o tipo de suporte a ser utilizado e sua ativação, as características da enzima e o método de imobilização. Os métodos de imobilização de enzima são classificados em ligações covalentes da enzima a uma matriz insolúvel; ligação cruzada intermolecular, utilizando reagentes funcionais; adsorção a uma matriz insolúvel em água; aprisionamento dentro de uma estrutura insolúvel em água ou membranas semipermeáveis (Figura 7) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

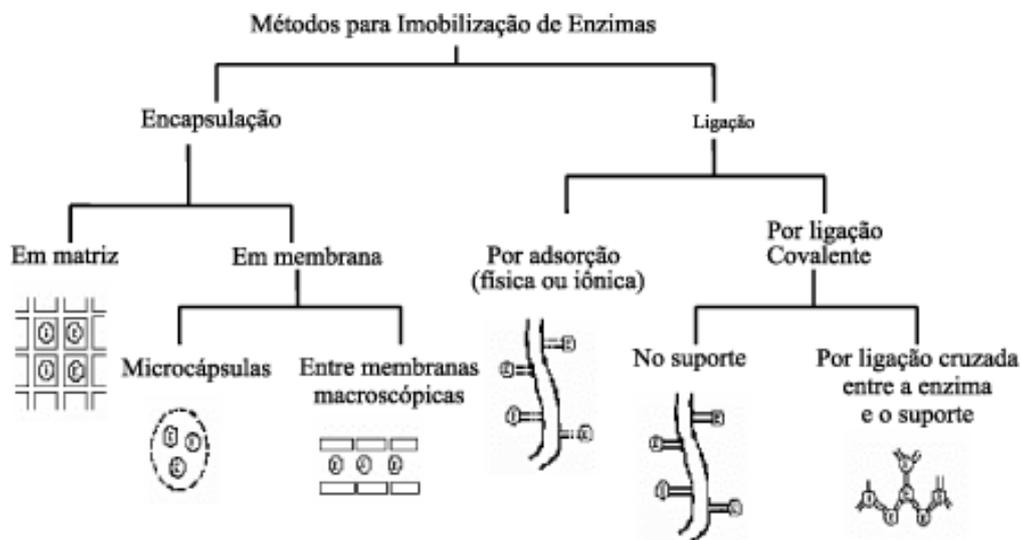


Figura 7: Métodos de imobilização de enzima (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

4.1 Adsorção

A adsorção é considerada a mais fácil e mais antiga das técnicas de imobilização (Figura 8). É um método simples e a enzima não necessita ser pré-tratada ou quimicamente modificada. No entanto, possui a desvantagem de estabelecer ligação fraca entre a enzima e o suporte, possibilitando a dessorção devido a alterações de pH, temperatura e força iônica (COSTA; AZEVEDO; REIS, 2005). É um método que depende intimamente de fatores como a área superficial da matriz, porosidade e tamanho do poro, e tamanho da enzima. Trata-se de um processo reversível em que a interação entre a enzima e a superfície da matriz acontece em um meio fraco de ligações de hidrogênio, forças hidrofóbicas, iônicas e de van der Waals (MOHAMAD et al., 2015; NISHA; ARUN; GOBI, 2012). Os principais materiais utilizados para a adsorção são carvão ativado, polietileno, alumina, polipropileno, resina de troca iônica e resina sintética (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; MOHAMAD et al., 2015; NISHA; ARUN; GOBI, 2012).

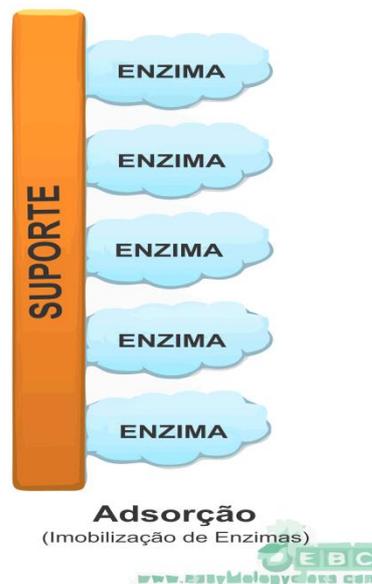


Figura 8: Imobilização de enzima por adsorção (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).

4.2 Ligação covalente

A ligação covalente é um método convencional de imobilização e é realizada de maneira mais complexa, em que há ligação direta entre a enzima e o suporte (Figura 9). A ligação covalente é um tipo de ligação forte e estável. Alguns materiais de suporte de enzimas incluem poliacrilamida, vidro poroso, agarose e sílica porosa, e geralmente o suporte exige ativação prévia (NISHA; ARUN; GOBI, 2012). A utilização do método de ligação covalente é vantajosa porque a enzima é firmemente fixada, evitando contaminação do produto; mas apresenta a desvantagem de possibilitar perda de atividade da enzima em decorrência da sua modificação (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; JAFARY et al., 2016; MOHAMAD et al., 2015).

A imobilização covalente envolve duas etapas principais: a ativação do material de suporte pela adição de um agente ativador em suportes contendo grupamentos amino primários, como glutaraldeído e, em seguida, modificação da estrutura do polímero para ativação da matriz. A etapa de ativação produz o grupo electrofílico no material de suporte, de modo que os materiais de suporte reagem com os

nucleófilos fortes sobre as enzimas (BEZERRA et al., 2015). A ligação covalente é normalmente formada entre o grupo funcional na matriz de suporte e a superfície da enzima que contém o resíduo de aminoácido. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação covalente são o grupo sulfidrilo de cisteína, grupo hidroxilo de serina e treonina (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; REHM; CHEN; REHM, 2016). A ligação entre a enzima e o material de suporte pode ser conseguida quer através de ligação direta ou por meio de um braço espaçador. A potencialidade de usar o braço espaçador é que ele proporciona o maior grau de mobilidade para as enzimas que, podem apresentar atividade mais elevada quando em comparação com a ligação direta (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; ZHANG et al., 2016).

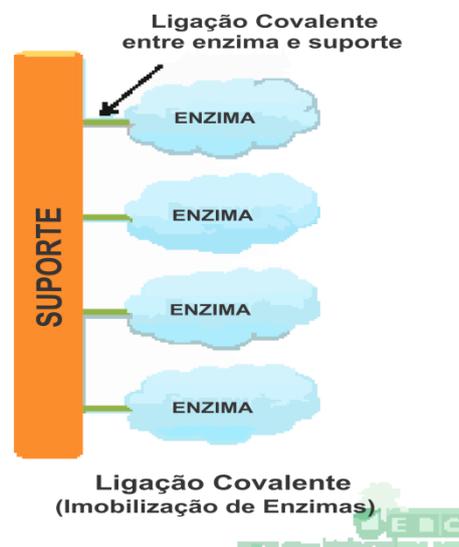


Figura 9: Imobilização de enzima por ligação covalente (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).

4.3 Crosslinking

Método irreversível de imobilização enzimática, que não requer um suporte para evitar perda de enzima na solução de substrato (Figura 10). O método *crosslinking* (do inglês, ligação cruzada) também é chamado de imobilização isenta de transportador, onde a enzima atua como o seu próprio transportador, ou seja, uma enzima praticamente pura é obtida eliminando as desvantagens associadas aos transportadores (HANEFELD;

GARDOSSI; MAGNER, 2009; MOHAMAD et al., 2015), como perda de mais de 50% de atividade nativa (SHELDON, 2007). A técnica de *crosslinking* se dá pela formação de ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas de enzima por meio de reagentes bi ou multifuncionais. O reagente mais comumente utilizado é o glutaraldeído, que é vantajoso por ser econômico e de fácil obtenção (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012).

Agregados de enzimas reticulados (CLEAs) são primeiramente preparados por agregação das enzimas com agentes precipitantes tais como a acetona, etanol e sulfato de amônio, para em seguida realizar-se a imobilização do tipo *crosslinking*. As reações para a imobilização de enzimas podem ser executadas em três maneiras diferentes: pela mistura dos pré-polímeros com um fotossensibilizador, como éter etílico de benzoína; fusão, mistura com a solução enzimática, e gelificação por exposição à radiação ultravioleta (UV); ou congelamento do monômero contendo a solução enzimática sob a forma de pequenas esferas (HOMAEI, 2015; MOHAMAD et al., 2015).

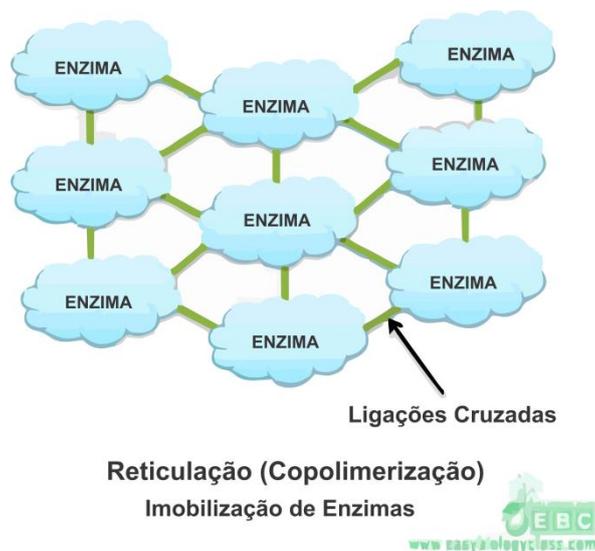


Figura 10: Imobilização de enzima por *crosslinking* (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).

4.4 Aprisionamento e Encapsulamento

O aprisionamento é definido como um método de imobilização irreversível em que as enzimas são aprisionadas num suporte ou no interior das fibras, com estrutura de

rede de materiais ou em membranas de polímero, que permite a passagem de substrato e produto através dos poros, mas a enzima fica retida (Figura 11A) (MOHAMAD et al., 2015). De maneira geral, a matriz de suporte protege as enzimas da contaminação microbiana, proteínas e enzimas no micro ambiente. E as principais matrizes utilizadas são constituídas por géis de poli(acrilamida), triacetato de celulose, agar, gelatina, carragenina e alginato (EBC – EASY BIOLOGY CLASS, 2016; NISHA; ARUN; GOBI, 2012).

Algumas vantagens da imobilização enzimática por aprisionamento são as condições rápidas, baratas e suaves requeridas para o processo de reação, além de que o aprisionamento pode melhorar a estabilidade mecânica e minimizar a lixiviação da enzima, sem que a enzima interaja quimicamente com o polímero, evitando a desnaturação. No entanto, alguns entraves são observados neste método em decorrência de limitações de transferência de massa do substrato ao sítio ativo da enzima, possibilidade de fuga de enzima, que pode ocorrer quando os poros da matriz de suporte são demasiadamente grandes, desativação durante a imobilização (BRÍGIDA et al., 2008; PAULOVÁ; PATÁKOVÁ; BRÁNYIK, 2013; ZHANG et al., 2016).

O método de imobilização por encapsulamento se refere à imobilização da enzima em uma membrana semipermeável, que impõe uma barreira física às enzimas, mas não restringe sua mobilidade (Figura 11B) (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). As vantagens deste método de imobilização são a área de superfície extremamente grande entre o substrato e a enzima, dentro de um volume relativamente pequeno, e a possibilidade real de imobilização simultânea. As principais desvantagens deste método incluem a inativação ocasional da enzima durante a encapsulação e a concentração enzimática elevada requerida. Além disso, para reter a enzima, o tamanho do poro precisa ser muito baixo e estes sistemas tendem a ter difusão limitada (COSTA; AZEVEDO; REIS, 2005; EBC – EASY BIOLOGY CLASS, 2016).

Os materiais utilizados para esse tipo de imobilização são polímeros, sol-gel, compostos polímeros/sol-gel e outros materiais inorgânicos. É necessário ressaltar que um sol-gel é um processo químico em que há formação de uma rede de óxidos através de reações de policondensação de precursor molecular em um líquido. É uma dispersão coloidal formada por um sol, que é uma dispersão estável de partículas sólidas (amorfas ou cristalinas) ou polímeros coloidais num solvente, e um gel que consiste em uma rede

tridimensional contínua, em que tanto o líquido como o sólido estão dispersos um no outro, o que apresenta uma rede sólida contendo componentes líquidos (BRINKER; SCHERER, 1990).

O método mais simples e comum de aprisionamento enzimático é a gelificação de polímeros polianiônicos e policatiônicos por adição de contra-íons multivalentes (CHEN et al., 2016; TAQIEDDIN; AMIJI, 2004). Os principais polímeros utilizados como matriz são alginato, carragenina, colágeno, poliacrilamida, gelatina, borracha de silicone, poliuretano e álcool polivinílico, sendo o alginato um dos polímeros mais utilizados em razão de suas propriedades de gelificação suaves e não-toxicidade (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; HOMA EI, 2015).

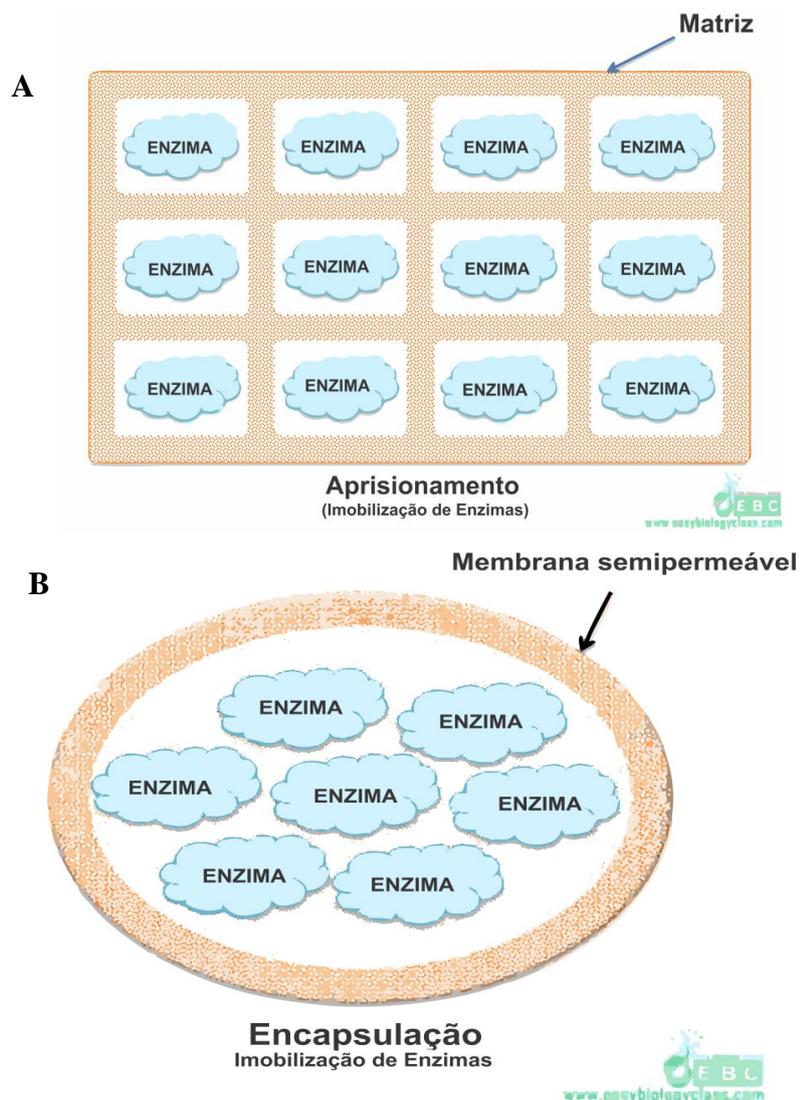


Figura 11: Imobilização de enzima por (A) aprisionamento / (B) encapsulação (Adaptado de EBC – Easy Biology Class, 2016).

4.5 Imobilização de lipases

Por razões práticas e econômicas é vantajoso utilizar lipase em sua forma imobilizada. A lipase pode ser imobilizada por vários métodos que incluem adsorção, ligação covalente e aprisionamento em matrizes poliméricas (ABDULLA; RAVINDRA, 2013; ELAKKIYA; PRABHAKARAN; THIRUMARIMURUGAN, 2016; NIKPOUR; PAZOUKI; DASHT, 2016). No entanto, a seleção de uma estratégia de imobilização deve levar em consideração as características do catalisador, incluindo parâmetros como atividade enzimática global, inativação e características de regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade de reagentes na imobilização e as propriedades finais desejadas do derivado de imobilização (ANDRADE et al., 2016; CAO et al., 2016; MENDES et al., 2011; THANGARAJ et al., 2016; ULKER; GOKALP; GUVENILIR, 2016).

As lipases podem apresentar propriedades catalíticas diferentes de acordo com a técnica de imobilização e o suporte empregado, e por isso torna-se tão importante um estudo minucioso das condições de imobilização. O encapsulamento possui um ambiente restrito e a taxa de transferência de massa é relativamente baixa. Refere-se à captura de enzima dentro de uma matriz de polímero (BARBOSA et al., 2014). Neste método, a carga de enzima é alta (80-100%), mas a difusão do substrato é restrita, sendo a principal vantagem do aprisionamento a interação física do polímero com a lipase e, conseqüentemente, baixa desnaturação da enzima (NIKPOUR; PAZOUKI; DASHT, 2016; ZHAO et al., 2016).

5. Alginato de Sódio

O alginato é um polissacarídeo natural que desempenha papel estrutural nas células e espaço intercelular nas algas marrons como *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystispyrifera*, nas quais compreende cerca de 40% de seu peso seco, sendo componente estrutural da parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e, ao mesmo tempo, flexibilidade à parede celular (DA SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010). No entanto, pode ser obtido de fontes bacterianas, como os gêneros *Pseudomonas* e *Azobacter*, que podem produzir esse

polímero extracelularmente durante sua fase vegetativa (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; FERREIRA, 2016; MARQUES, 2011; NOREEN et al., 2016).

O alginato tem forma linear, randômica e aniônica, e é formado por ácido β -D-manurônico e α -L-gulurônico, denominados blocos M e G, respectivamente, e ligados por ligações glicosídicas tipo 1,4 (Figura 12). Na molécula, os monômeros são dispostos da maneira mais energética possível. Blocos G-G são unidos por ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow4)$, e blocos M-M são unidos por ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, sendo uma ligação glicosídica equatorial/equatorial em M-M, uma ligação glicosídica axial/axial em G-G e uma ligação glicosídica equatorial/axial para M-G (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; DA SILVA, 2008).

Cada espécie ou parte da alga analisada apresenta proporções de blocos M e G distintas, de modo que a partir disso o polímero apresente viscosidade distinta, até uma estrutura gelificada, na presença de cátions divalentes, como cálcio, bário e cobre, que têm a função de ligar os blocos secundários M-M, M-G ou G-G, sendo que estruturas de blocos M-G são mais flexíveis e estruturas G-G são mais rígidas (FERREIRA, 2016; MARQUES, 2011; MÖRSCHBÄCHER; VOLPATO; SOUZA, 2016; NOREEN et al., 2016).

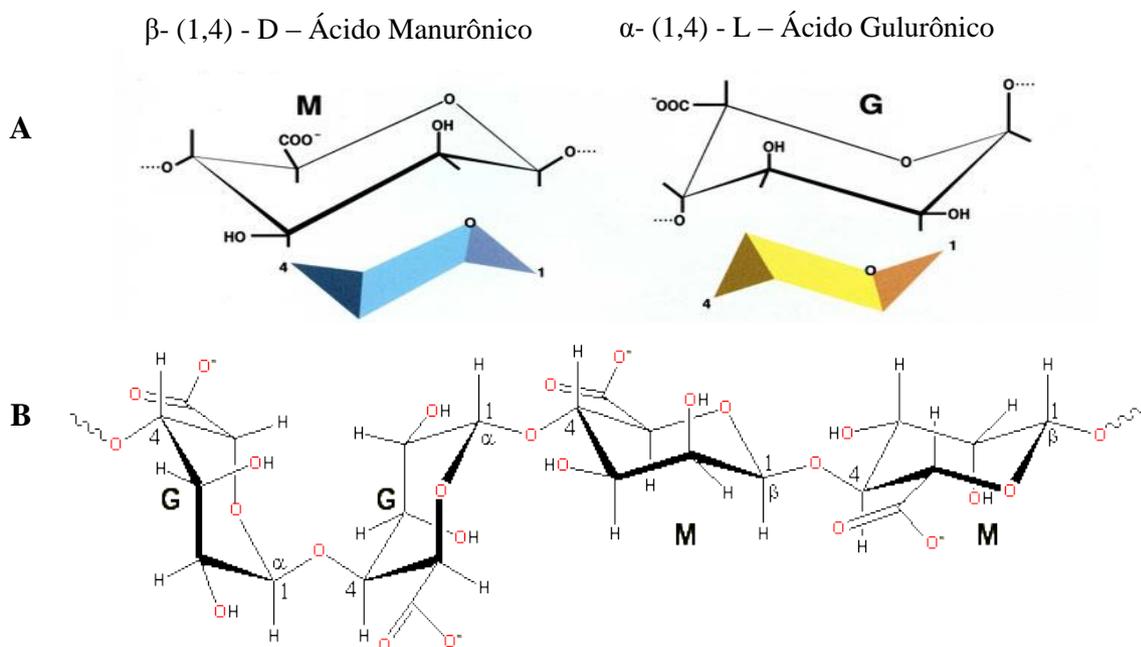


Figura 12: (A) Estruturas dos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico (Adaptado de IRO Alginate Industry Co, 2013) e (B) sua estrutura secundária em blocos MM e GG.

Em razão de suas propriedades, como biocompatibilidade, porosidade e facilidade de manipulação, o alginato tem sido extensivamente utilizado na indústria, principalmente alimentícia, de fármacos e biotecnológica, para o uso em microencapsulação e formação de membranas. No que diz respeito a enzimas, o alginato pode ser utilizado em processos de extração, imobilização e purificação; sendo denominado de polímero inteligente ou *smart polymer* em razão de sua capacidade de gelificação em condições de presença de cátions bivalentes (MARQUES, 2011).

Juntamente com a solução da enzima de interesse, o alginato forma um complexo e, pela afinidade entre as moléculas, a enzima co-precipita, de modo a facilitar sua separação do meio inicial. As lipases apresentam afinidade com o alginato, o que favorece a precipitação por afinidade em que a solução enzimática de lipase é misturada ao alginato e, em seguida, precipitada com cálcio, sendo possível obter lipase com atividade enzimática aumentada em até cinco vezes, além de melhor afinidade e estabilidade para com o substrato (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2012; FERREIRA, 2016; MARQUES, 2011; MÖRSCHBÄCHER; VOLPATO; SOUZA, 2016; NOREEN et al., 2016; TSAI; MEYER, 2014).

6. Caracterização de lipases

Em razão da grande heterogeneidade das lipases produzidas é necessário se ter esclarecidas as características bioquímicas da enzima, como pH e temperatura ótimos, estabilidade e efeitos de íons metálicos, uma vez que o efeito desses fatores estão diretamente ligados à atuação enzimática e alterações que ocorram durante a reação enzimática, e conseqüentemente sua aplicação na indústria (MAZHAR et al., 2016; PATEL et al., 2016; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016).

Observa-se sensibilidade das lipases a variações de pH e temperatura. De maneira geral, o pH ótimo de atuação das lipases estão na faixa de 4 a 11, enquanto que a estabilidade se observa na faixa de 3 a 12. O pH afeta a atividade e estabilidade das lipases de acordo com as variações no estado de ionização dos componentes do sistema. É necessário se ter bem elucidado o ponto isoelétrico (pI) da enzima, que é onde a carga líquida total da enzima é nula, ou seja, quando o pH do meio propicia a ausência de cargas na estrutura da enzima. Comumente, observa-se pI na faixa de 4 a 10 em lipases

microbianas (MAZHAR et al., 2016; PATEL et al., 2016; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016). Hiol et al. (2000) apontam o pH de 7,5 como o pH ótimo de atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*, bem como lipase de *Mucor hiemalis*, a qual apresentou pH ótimo na faixa de 7 – 9 (ULKER; KARAOĞLU, 2012).

Lipases também tem sua atividade e estabilidade influenciada pela ação da temperatura. A temperatura pode tanto favorecer a reação como prejudicar, isso porque o aumento na temperatura transmite maior energia cinética às moléculas, gerando maior número de colisões produtivas por unidade de tempo, o que aumenta a taxa de reação. No entanto, valores muito elevados de temperatura podem romper a estrutura terciária da enzima, promovendo a perda de atividade enzimática, num processo que se chama de desnaturação (MAZHAR et al., 2016; PATEL et al., 2016; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016).

Desse modo, a relação entre atividade e temperatura está de acordo com a aceleração da reação pela elevação da temperatura em contraposição a desnaturação. Foi observado que a temperatura ótima das lipases geralmente está entre 30 e 60°C, já sua estabilidade térmica é observada em torno de 50°C. Fatores como aumento das cargas superficiais, o número de cadeias β e as ligações de hidrogênio, auxiliam na estabilidade térmica da enzima (MAZHAR et al., 2016; PATEL et al., 2016; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016). Minovska; Winkelhausen; Kuzmanova (2005) relatam temperatura ótima de 30 °C para lipase de *Candida rugosa*, assim como para lipase de *Aspergillus niger* no estudo de Silva; Contesini; Carvalho (2008), cuja temperatura ótima concentra-se na faixa de 30 – 35 °C.

Outro ponto a ser observado é o efeito de solventes, os quais atuam na atividade, estabilidade e especificidade da enzima. A estabilidade de lipases é observada na presença de solventes tais como etanol, metanol, isopropanol, dimetilsulfóxido e benzeno. É importante ressaltar que quanto mais hidrofóbico os solvente, melhor para atividade da enzima, uma vez que não interferem significativamente com a camada de hidratação da enzima. Além do efeito de solventes, o efeito de íons pode tanto estimular como inibir a atividade de lipases. Alguns íons metálicos bivalentes são descritos pelo seu poder ativador, tal como Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} , enquanto Zn^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} podem inibir a ação das enzimas. No entanto, isso varia de acordo com a fonte produtora e deve ser levado em consideração no estudo (PATEL et al., 2016; SETHI; NANDA; SAHOO,

2016). Brígida et al. (2014) em estudo com lipase de *Yarrowia lipolytica*, aponta ativação da lipase na presença de Ca^{2+} e inibição por Fe^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} , enquanto Mg^{2+} não afetou a atividade enzimática. Já em relação à presença de solventes, mostra que numa concentração de 20%, acetona, etanol e isopropanol desativaram completamente a enzima.

7. Aplicações biotecnológicas de lipases

Lipases são enzimas muito versáteis e sua imobilização as torna ainda mais promissoras, de modo que são requeridas para aplicação em uma ampla gama de indústrias, como na produção de biocombustíveis, indústria de papel, indústria de alimentos, indústria de cosméticos e farmacêutica, hidrólise de lipídios e indústria de detergentes para utilização doméstica e industrial (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; PATEL et al., 2016).

Desde sua descoberta, as lipases tornaram-se parte integrante da indústria de detergentes, juntamente com proteases, amilases e celulasas, para remoção de manchas de óleo e gorduras. Hoje em dia, são amplamente utilizadas em detergentes, desengraxantes e no processamento de couro. Lipase também tem sido utilizada para limpeza de ralos entupidos, devido à deposição de alimentos e materiais não alimentares, além de serem incluídas na lavagem de pratos, limpeza de lentes de contato, a degradação de resíduos de compostos orgânicos na superfície de tubos de escape e vasos sanitários. Em comparação com detergentes sintéticos os detergentes de base biológica tem boa propriedade de limpeza e podem ser utilizados em baixa quantidade, são biodegradáveis e não afetam o ambiente (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; SALIHU; ALAM, 2012).

Lipases têm aplicação potencial em cosméticos e perfumarias, uma vez que apresentam atividades em tensoativos e na produção de aromas. Monoacilgliceróis e diacilgliceróis são produzidos por esterificação de gliceróis e são usados como agentes tensoativos na indústria de cosméticos e perfumes (PATEL et al., 2016). Na indústria farmacêutica as lipases catalisam reações de acilação, transesterificação e hidrólise regioselectiva, em substratos pró-quirais e resolução cinética de misturas racêmicas, sendo que alguns grupos sobre os quais as lipases atuam são álcoois e ésteres

carboxílicos, aminas, cianonidrinás e cloridrinás, entre outros (LASONÍ; OGONOWSKI, 2010; MESSIAS et al., 2011).

O biodiesel é composto por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, produzido através de triglicerídeos (óleo e gordura animal) com esterificação de álcool (metanol ou etanol) na presença do catalisador. A produção do biocombustível é um problema em virtude da alta exigência de energia, recuperação de glicerol e reações secundárias que podem gerar poluição. Desse modo, a produção biológica de combustível com o auxílio de lipases tem se apresentado muito promissora. A lipase catalisa a reação com menos necessidade de energia, além de que a imobilização de lipase diminui os custos de produção por resultar em uso repetido e estabilidade. Outro fator importante é que na produção de biodiesel o metanol inativa a lipase, de modo que a imobilização é uma vantagem para a produção de biodiesel por fornecer maior proteção à enzima (EL-BATAL et al., 2016; NISHA; ARUN; GOBI, 2012; ZHAO et al., 2016, 2015).

Lipases tornaram-se parte integrante da indústria alimentar moderna. É desejável na produção de aroma e sabores no queijo, acelerando sua maturação, para interesterificação de óleos e gorduras e lipólise de manteiga, gorduras e creme. A adição de lipases a esses produtos libera principalmente ácidos graxos de cadeia curta, o que contribui para a formação de um sabor suave. As lipases também são empregadas na indústria de laticínios para a hidrólise da gordura do leite, além da utilização na produção de carne como a carne de peixe sem excesso de gordura, sendo que a gordura é removida adicionando as lipases durante o processamento do peixe e este procedimento é chamado de biolipólise (JOOYANDEH; KAUR; MINHAS, 2009; PATEL et al., 2016).

Dentre as aplicações de lipases, é necessário chamar a atenção para hidrólise de óleos e gorduras, visto que a utilização de enzimas como catalisadores em processos industriais têm se tornado cada vez mais interessantes em virtude de suas vantagens sobre as reações químicas convencionais (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002). Os métodos existentes para a produção de ácidos graxos são baseados em métodos físicos, em que há hidrólise dos óleos a alta temperatura e pressão, o que gera ácidos graxos escuros e solução de glicerol aquosa descolorada devido à polimerização de gordura, além da formação de subprodutos. Desse modo, as desvantagens da hidrólise

convencional podem ser evitadas pelo processo catalisado por lipase, sendo um método que utiliza temperaturas mais brandas, gera economia de energia, além de ser um procedimento operacional simples, de baixo custo e que minimiza a degradação térmica dos produtos. Ácidos graxos produzidos a partir de hidrólise de óleos e gorduras por técnicas enzimáticas naturais são preferíveis, especialmente em indústrias de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (GUPTA, 2016).

Os óleos e gorduras são matérias-primas versáteis para aplicação podendo ser utilizados em processos implementados em escala comercial (CASTRO et al., 2004). Nesse contexto, vários tipos de óleos e gorduras podem ser utilizados, como óleo de coco, soja, mostarda, girassol e arroz (GHOSH; BHATTACHARYYA, 1995), óleo de palma (AL-ZUHAIR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003), óleo de oliva, sebo (LINFIELD et al., 1984) e óleo de peixe (BYUN et al., 2007). Além desses substratos, é necessário dar a devida atenção para a gordura de frango, que apresenta grande proporção de ácidos graxos insaturados e polinsaturados, sendo que entre os ácidos graxos insaturados, os ácidos graxos monoinsaturados, tais como ácido oleico, são considerados como desejáveis o que a deixa em situação mais promissora que outras gorduras animais (CENTENARO; FURLAN; DE SOUZA-SOARES, 2008; LEE; FOGLIA, 2000).

Além disso, a produção de lipase com gordura de frango é relatada como uma alternativa viável (ALMEIDA, 2012), bem como sua hidrólise, como relatado por Almeida; Tauk-Tornisielo; Carmona (2013), uma vez que a produção de ácidos graxos por hidrólise de óleos e gorduras foi explorada utilizando matérias-primas renováveis; sendo considerada uma importante operação industrial, uma vez que 1,6 milhões de toneladas de ácidos graxos são produzidos a nível mundial a cada ano por este processo (ALMEIDA et al., 2016).

8. Fontes produtoras de lipases

Lipases são encontradas em todos os organismos vivos, porém, as de origem microbianas apresentam maior valor econômico por serem enzimas extracelulares e por

apresentarem facilidades de otimização de meios de cultura e separação do caldo fermentado. As lipases podem ser produzidas tanto por procariotos como por eucariotos (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017), sendo descritos gêneros como *Bacillus* (MAZHAR et al., 2016), *Rhizopus* (HIOL et al., 2000; YU; XU; XIAO, 2016) e *Aspergillus* (SALIHU; BALA; ALAM, 2015; SETHI; NANDA; SAHOO, 2016), e *Yarrowia* (BRÍGIDA et al., 2014; DARVISHI et al., 2009), nos quais demonstram atividade fosfolipídica e atuam como mecanismo de defesa, uma vez que ao serem secretadas favorecem a competição com a microbiota e digestão de lipídios, sendo os ácidos graxos livres liberados utilizados na adesão tecidual célula-célula e célula-hospedeiro (MESSIAS et al., 2011).

Os microrganismos potencialmente produtores de lipases podem ser encontrados em vários habitats, como resíduos de óleos vegetais e de petróleo, solos contaminados, alimentos deteriorados, indústrias de produtos lácteos, ambiente marinho e antártico, entre outros (CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; MESSIAS et al., 2011). Dentre esses microrganismos, as leveduras apresentam-se como fontes promissoras, em virtude de possibilitarem a produção de grandes quantidades de enzimas, menores tempos de fermentação e baixo custo (SILVA, 2011). Nesse sentido, destacam-se leveduras do gênero *Candida* como *Candida rugosa* (BARRIUSO et al., 2016), *Candida antártica* (EOM et al., 2013), *Candida cylindracea* (SALIHU et al., 2011) e *Candida viswanathii* (ALMEIDA et al., 2016).

9. *Candida viswanathii*

Candida viswanathii é uma levedura cujas colônias são esféricas, sem brilho, de coloração creme e podem ser lisas ou rugosas, de acordo com o tempo e condições de incubação. Em relação às células, observa-se que possuem tamanhos variados, de 1,4 – 6,0 x 2,0 – 10,8 µm, sendo únicas ou na forma de cadeias ramificadas e arredondadas, ovais ou cilíndricas (Figura 13). Os primeiros relatos da linhagem são de isolamento de fluído cerebrospinal de um caso fatal de meningite, sendo posteriormente isolada de escarros durante investigações de rotina em materiais clínicos (SANDHU e RANDHAWA, 1962).

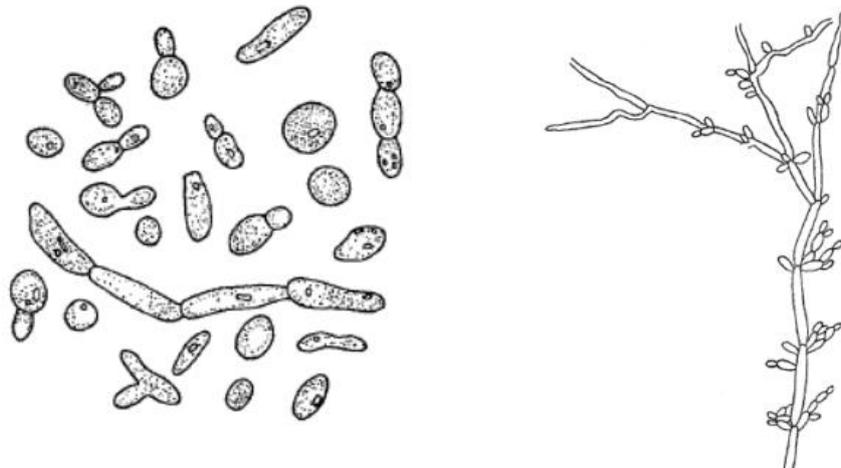


Figura 13: (A) Células de *Candida viswanathii* e (B) pseudomicélio (SANDHU e RANDAWA, 1962).

Uma linhagem de *Candida viswanathii* isolada de águas residuais de uma refinaria de petróleo brasileira (Replan / Petrobras, Paulínia, São Paulo, Brasil) (Soares et al., 2008), foi utilizada em estudo de Almeida; Taulk-Tornisielo; Carmona (2013) com o objetivo deste trabalho de selecionar as melhores cepas microbianas isoladas de diferentes ecossistemas brasileiros ou de efluentes industriais, tendo apresentado o maior crescimento celular e produção de lipases; e com isso, sendo utilizada para o presente trabalho.

Barnett et al. (2000) afirmam que *C. viswanathii* possui capacidade de assimilação de diversos compostos como D-glicose, maltose, D-galactose, sacarose, amido, xilitol, e glicerol, entre outros, além de fermentar glicose, galactose e maltose. No entanto, Sandhu; Randhawa (1962) apontam que a levedura não é capaz de assimilar fontes de nitrogênio como nitrato de potássio e ureia.

O estudo de Almeida; Taulk-Tornisielo; Carmona (2013) mostra que *Candida viswanathii* apresenta bons resultados na presença de ácido oleico e trioleína. No entanto, possui maior eficácia na produção de lipases e no crescimento celular na presença de triacilgliceróis naturais, como azeite de oliva, em comparação com ácidos graxos e triacilgliceróis puros; além de que demonstra preferência por fontes orgânicas de nitrogênio, sendo o extrato de levedura a melhor fonte para aumento de produtividade de lipases e crescimento celular.

10. Referências Bibliográficas

- AB ENZYMES. Re: Gras Notification for Triacylglycerol Lipase From a Genetically Modified Strain of *Trichoderma Reesei*. n. 631, p. 1–72, 2016.
- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 545–551, 2013.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties, and potential application. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225–1234, 2013.
- ALMEIDA, A. F. DE. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii*. **Tese (Doutorado)**, 2012.
- ALMEIDA, A. F. DE et al. Agroindustrial Wastes as Alternative for Lipase Production by *Candida viswanathii* under Solid-State Cultivation: Purification, Biochemical Properties, and Its Potential for Poultry Fat Hydrolysis. **Enzyme Research**. v. 2016, 2016.
- AL-ZUHAIR, S.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1155–1163, 2003.
- ANDRADE, M. F. C. et al. Lipase immobilized on polydopamine-coated magnetite nanoparticles for biodiesel production from soybean oil. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 2, p. 403–409, 2016.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257–270, 2016.

ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051–3056, 2008.

BACCIOTTI, F. Fisiologia e formação de partículas lipídicas durante o crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 . **Tese (Doutorado)**, 2015.

BARBOSA, A. DOS S. et al. Immobilization of Lipase By Encapsulation in Silica Aerogel. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 969–976, 2014.

BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.

BARRIUSO, J. et al. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. **Biotechnology Advances**, 2016.

BEOPOULOS, A. et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 24, p. 7779–89, 2008.

BEOPOULOS, A. et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, n. 6, p. 375–387, 2009.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. Yeast: A new oil producer? v. 19, n. 1, p. 22–28, 2012.

BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1193–1206, 2011.

BETTIN S. M.; FRANCO D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Cienc Tecnol Aliment*; 25(2):234-8, 2005.

BEZERRA, T. M. D. S. et al. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 378–387, 2015.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases : classi e cation , properties and application in biocatalysis. v. 26, p. 73–81, 2002.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, n. 1–3, p. 173–187, 2008.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 101, p. 148–158, mar. 2014.

BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego, 1990.

BUSSAMARA, R. et al. Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology. *Enzyme Research*, v. 2012, 2012.

BYUN, H. G. et al. Lipase-catalyzed hydrolysis of fish oil in an optimum emulsion system. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 12, n. 5, p. 484–490, 2007.

CAO, S.-L. et al. Preparation and Characterization of Immobilized Lipase from *Pseudomonas Cepacia* onto Magnetic Cellulose Nanocrystals. *Scientific Reports*, v. 6, n. August 2015, p. 20420, 2016.

CASTRO, H. F. DE et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

CELSON, R. et al. Lipase-producing fungi for potential wastewater treatment and bioenergy production. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 18, p. 759–767, 2016.

CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; DE SOUZA-SOARES, L. A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, n. 3, p. 619–630, 2008.

CHANG, Y. H. et al. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corncob hydrolysate as carbon source. *Biomass and Bioenergy*, v. 72, p. 95–103, 2015.

- CHEN, C. et al. Immobilization of lipase onto functional cyclomatrix polyphosphazene microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 67–74, 2016.
- COLLA, L. M. et al. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 1–7, 2016.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2012.
- CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. DE; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. X, n. 0, p. 1–12, 2017.
- COSTA, S. A.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 301–324, 2005.
- DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 32, n. 2, p. 105–112, 2010.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
- DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9–10, p. 657–663, 2000.
- DARVISHI, F. et al. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2009, p. 562943, 2009.
- DAS, A. et al. Coconut oil induced production of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* under submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, p. 1–7, 2016.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, p. 1–9, 2012.

EASY BIOLOGY CLASS. Enzyme Immobilization - Methods and Applications (Biotechnology Lecture Notes). EBC, 2016. Disponível em: <<http://www.easybiologyclass.com/enzyme-cell-immobilization-techniques/>> Acesso em: 22 de setembro de 2016.

ELAKKIYA, M. .; PRABHAKARAN, D. .; THIRUMARIMURUGAN, M. . Methods of cell immobilization and its applications. **Internation Jornal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 5, n. 4, p. 5429–5433, 2016.

EL-BATAL, A. et al. Biodiesel Production by *Aspergillus niger* Lipase Immobilized on Barium Ferrite Magnetic Nanoparticles. **Bioengineering**, v. 3, n. 2, p. 14, 2016.

EL-SEDAWY, H. F. et al. Scaling up for the industrial production of rifamycin B; optimization of the process conditions in bench-scale fermentor. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, v. 51, n. 1, p. 43–48, 2013.

EOM, G. T. et al. High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 165–70, 2013.

FAISAL, P. A. et al. Optimization of Parameters for the Production of Lipase from *Pseudomonas* sp . BUP6 by Solid State Fermentation. n. December, p. 125–133, 2014.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* (2012).

FERREIRA, I. M. Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 632–644, 2011.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. OS LIPÍDIOS E SUAS PRINCIPAIS FUNÇÕES. p. 55–61, 2016.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D. K. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 12, p. 1541–1544, 1995.

GONÇALVES, F. A. G.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. Optimization of cultivation conditions for extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica* using response surface method. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 17, p. 2270–2278, 2013.

GORDILLO, M. A. et al. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 131–142, 1998.

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 1797–1809, 2016.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem Soc Rev**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

HEGDE, A.; RAMESH, C. Isolation and Screening of Fungi for the Production of Xylanase Using Solid- State Fermentation from Sirsi Region of Western Ghats of Karnataka , India. v. 5, n. 2, p. 547–556, 2016.

HIOL, A. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 5–6, p. 421–430, 1 mar. 2000.

HOMAEI, A. Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry. **Advances in Food Biotechnology**, n. October, p. 145–164, 2015.

HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 497–507, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual review of microbiology**, v. 53, p. 315–51, 1999.

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

JAFARY, F. et al. Stability Improvement of Immobilized Alkaline Phosphatase Using Chitosan. v. 33, n. 2, p. 243–250, 2016.

JAKUBOWSKI, H. B: Lipids in Water. CHAPTER 1 - LIPID STRUCTURE. Biochemistry Online: Table of Contents, 2016. Disponível em: < <https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/lipidstruct/ollipidwater.html> > Acesso em: 20 de setembro de 2016.

JOHNSON, Q. R. et al. Pressure-induced conformational switch of an interfacial protein. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 84, n. 6, p. 820–827, 2016.

JOOYANDEH, H.; KAUR, A.; MINHAS, K. S. Lipases in dairy industry: A review. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 46, n. 3, p. 181–189, 2009.

JUDE, O.; OGOONNA, U. S. Lipase Production in Submerged Fermentation by a Bacterium Isolated from Nigerian Soil. **African Journal of Education, Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 100–105, 2016.

KAM, Y. C. et al. *Schizophyllum commune* Lipase Production on Pretreated Sugarcane Bagasse and Its Effectiveness. v. 2016, 2016.

KOHLEIN, S. D. Obese and Slim Yeast Cells. Microscopic Insights into Cellular Lipid Metabolism. Science Lab, 2008. Disponível em: < <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/obese-and-slim-yeast-cells/> > Acesso em: 15 de setembro de 2016.

LASON, E.; OGONOWSKI, J. Lipase – characterization , applications and methods of immobilization. **Science Technique**, v. 64, n. 2, p. 97–102, 2010.

- LEE, K.; FOGLIA, T. A. Synthesis, Purification and Characterization of Structured Lipids Produced from Poultry Fat. **Jaocs**, v. 77, n. April, p. 1027–1034, 2000.
- LINDSAY, R. J. et al. DMSO enhanced conformational switch of an interfacial enzyme. **Biopolymers**, p. 1–76, 2013.
- LINFIELD, W. M. et al. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 191–195, 1984.
- LOPES, V. R. O. et al. Nitrogen sources on tpmw valorization through solid state fermentation performed by *Yarrowia Lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 261–270, 2016.
- MANOEL, E. A. Resolução de derivados racêmicos do mio -inositol catalisada por lipases. p. 1–133, 2011.
- MARQUES, P. P. Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química., 2011.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MATHESH, M. et al. Opening Lids: Modulation of Lipase Immobilization by Graphene Oxides. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 7, p. 4760–4768, 2016.
- MAZHAR, H. et al. Purification and Characterization of Lipase Production from *Bacillus subtilis* Biological and Chemical Research Purification and Characterization of Lipase Production from *Bacillus subtilis*. 2016.
- MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, 2011.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas : Produção , propriedades e aplicações biotecnológicas Microbial lipases : Production , properties and biotechnological applications. p. 213–234, 2011.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 4, p. 609–624, 2005.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MOHSENI, S. et al. Solid State Fermentation of Agricultural Residues for Lipase Production in a Tray-Bioreactor. **World Applied Science Journal**, v. 16, n. 7, p. 1034–1039, 2012.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; SOUZA, F. C. V. DE. *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. p. 921–926, 2016.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnol. Bioprocess Eng**, v. 7, p. 57–66, 2002.

MUTHUMARI, G. M.; THILAGAVATHI, S.; HARIRAM, N. Industrial enzymes: lipase producing microbes from waste volatile substances. v. 7, n. 5, p. 2201–2208, 2016.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, J. Systems biology of lipid metabolism: From yeast to human. **FEBS Letters**, v. 583, n. 24, p. 3905–3913, 2009.

NIKPOUR, M.; PAZOUKI, M.; DASHT, M. Lipase Immobilized into Novel GPTMS: TMOS Derived Sol-Gels and its Application for Biodiesel Production from Waste Oil. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 32–46, 2016.

NILSSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. **Scientific reports**, v. 6, n. November 2015, p. 22264, 2016.

NISHA, S.; ARUN, K. S.; GOBI, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Reiew and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.

NOREEN, S. et al. Performance improvement of Ca-alginate bead cross- linked laccase from *Trametes versicolor* IBL-04. **BioResources**, v. 11, n. 1, p. 558–572, 2016.

OYEDEJI, F. N.; IJIGBADE, B. Growth and Extracellular Enzyme Production of *Micrococcus* Species from Fermented “Ugba”. v. 9, n. 2, p. 93–97, 2016.

ÖZTÜRK, B. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. A dissertation submitted to the graduate school in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Department of Biotechnology and Bioengineering. **İzmir Institute of Technology**, İzmir, Turkey., p. 105, 2001.

PAPANIKOLAOU, S. et al. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 215–224, 2001.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 11, p. 651–655, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Review Article Lipids of oleaginous yeasts . Part I: **Biochemistry of single cell oil production**. p. 1031–1051, 2011.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Chapter 2 – Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2017.

PATEL, M. et al. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. v. 5, n. 8, p. 214–232, 2016.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRÁNYIK, T. Advanced Fermentation Processes. **Engineering Aspects of Food Biotechnology**, n. August 2013, p. 89–110, 2013.

RAMOS-SÁNCHEZ, L. B. et al. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 2, p. 1–9, 2015.

REHM, F.; CHEN, S.; REHM, B. Enzyme Engineering for In Situ Immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1370, 2016.

RUEDA, N. et al. Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octyl-Amino agarose beads prevents enzyme desorption. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

SALIHU, A. et al. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1–2, p. 66–73, 2011.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Production and applications of microbial lipases : A review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667–2677, 2012.

SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, M. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**, n. 0, 2015.

SANDHU, R. S.; RANDHAWA, H. S. On there - Isolation and taxonomic study of *Candida viswananthii*. Viswanathan et Randhawa 1959 by 1962.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513–521, 1958.

SAYGÜN, A.; SAHIN-YESILCUBUK, N.; ARAN, N. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1521–1530, 2014.

SCHÜTZHOLD, V. et al. Computational Modeling of Lipid Metabolism in Yeast. v. 3, n. September, p. 1–13, 2015.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 143–149, 2016.

- SHARMA, A. K. et al. Lipase production from a wild (LPF-5) and a mutant (HN1) strain of *Aspergillus niger*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 41, p. 2292–2300, 2016.
- SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.
- SHODA, S. et al. Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2307–2413, 2016.
- SHUKLA, B. N.; DESAI, P. V. Isolation , Characterization and Optimization of Lipase Producing *Pseudomonas* spp . from Oil Contaminated Sites. v. 5, n. 5, p. 902–909, 2016.
- SILVA, M. D. S. Atividade Enzimática extracelular de Leveduras Isoladas da Fermentação do Cacau. p. 1–103, 2011.
- SILVA, V. C. F. DA; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. D. O. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468–1474, 2008.
- SITEPU I. R.; GARAY L. A.; SESTRIC R.; LEVIN D.; BLOCK D. E.; BRUCE GERMAN J.; BOUNDY-MILLS K. L. Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnol Adv*, 32:1336–1360, 2014.
- SOUSA, S. F. et al. Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 5877–5887, 2015.
- SUNDAR, A.; KUMARESAPILLAI, N. Academic Sciences. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 5–8, 2013.
- TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495–1502, 2004.
- TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1937–1945, 2004.

- THANGARAJ, B. et al. Lipase NS81006 immobilized on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for biodiesel production. **Ovidius University Annals of Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 13–21, 2016.
- THEVENIEAU, F.; NICAUD, J. Microorganisms as sources of oils. v. 20, n. 6, p. 1–8, 2013.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. Food Bioprocess and Technology, vol. 3, p. 182–196, 2010.
- TSAI, C. T.; MEYER, A. S. Enzymatic cellulose hydrolysis: Enzyme reusability and visualization of B-glucosidase immobilized in calcium alginate. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19390–19406, 2014.
- ULKER, C.; GOKALP, N.; GUVENILIR, Y. A. Poly (ϵ -caprolactone) Synthesis By A Novel Enzymatic Catalyst: *Candida Antarctica* Lipase B (CALB) Immobilized On A Modified Silica-based Material By Physical Adsorption. **Advanced Materials Letters**, v. 7, n. 1, p. 54–59, 2016.
- ULKER, S.; KARAOĞLU, S. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. corticola isolated from soil. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385–90, out. 2012.
- VALONI, É. D. E. A. Envolvimento das proteínas fosfatases no acúmulo de lipídios em *Saccharomyces cerevisiae* e síntese em biorreator utilizando glicerina loira como fonte de carbono. **Dissertação (Mestrado)**, v. Universida, p. Rio de Janeiro, 2014.
- YU, X. W.; XU, Y.; XIAO, R. Lipases from the genus *Rhizopus*: Characteristics, expression, protein engineering and application. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 57–68, 2016.

ZHANG, D.-H. et al. The Application of Ionic Liquids in Enzyme Immobilization and Enzyme Modification. **Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v. 3, n. 2, p. 1060–1064, 2016.

ZHANG, J. et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1906–1911, 2011.

ZHAO, K. et al. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase and the Characterization of Different Co-Immobilizing Agents and Immobilization Methods. **Sustainability**, v. 8, n. 9, p. 764, 2016.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, n. April, p. 182–197, 2015.

CAPÍTULO 2

**Acúmulo de lipídeo intracelular e produção de lipase por *Candida viswanathii*
usando fontes de carbono renováveis em condições limitantes de nitrogênio**

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono e condições limitantes de nitrogênio em cultivo submerso. A maior produção de lipase foi observada utilizando azeite de oliva (26,78 U/ml), enquanto que a maior acúmulo de lipídio ocorreu com trioleína (44,6%). As condições limitantes de nitrogênio mostraram que *C. viswanathii* pode utilizar nitrato de amônio para o crescimento, mas a maior acúmulo de lipídio e produção de lipase ocorreu com extrato de levedura. A adição de glicose ao meio de cultivo causou repressão na produção de lipase, mas aumentou o acúmulo de lipídio no decorrer do tempo de cultivo, provavelmente devido ao excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio. A avaliação do perfil dos ácidos graxos revelou predominância de ácido oleico (C18:1), obtendo porcentagem de 69,31, 60,69 e 68,84%, para azeite de oliva, glicose e azeite+glicose, respectivamente. Conclui-se que a linhagem *C. viswanathii* pode ser considerada como uma linhagem oleaginosa capaz de acumular altas concentrações de lipídios intracelulares e simultaneamente produzir altos níveis de lipase. O lipídio produzido por esta linhagem tem potencial para utilização em vários setores da indústria alimentícia como suplementos alimentares devido ao seu alto teor de ácidos graxos monoinsaturados da família ômega-6.

Palavras-chaves: Levedura lipolítica; Azeite de oliva; Triacilglicerol.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the culture conditions for lipase production and lipid accumulation by yeast *Candida viswanathii* using different carbon sources and nitrogen limiting conditions in submerged cultures. The highest lipase production was observed using olive oil (26,78 U/ml), while the highest lipid accumulation occurred with triolein (44,6%). Limiting nitrogen conditions showed that *C. viswanathii* can utilize ammonium nitrate for growth, but increased lipid accumulation and lipase production occurred with yeast extract. The addition of glucose to the culture medium caused repression of lipase production, but increased lipid accumulation over time, probably due to carbon excess and nitrogen limiting conditions. The evaluation of the fatty acid profile showed a predominance of oleic acid (C18:1), obtaining a percentage of 69,31, 60,69 and 68,84%, for olive oil, glucose and olive oil+glucose, respectively. It is concluded that the strain *C. viswanathii* can be considered as an oleaginous lineage capable of accumulating high concentrations of intracellular lipids and simultaneously producing high levels of lipase. The lipid produced by this lineage has potential for use in various food industry sectors as dietary supplements because of its high content of monounsaturated fatty acids in the omega-6 family.

Keywords: Lipolytic yeast; Olive oil; Triacylglycerol.

1. INTRODUÇÃO

Lipases, também denominadas como triacilglicerol ester hidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de óleos e gorduras em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol em condições aquosas, mas também podem facilitar reações como esterificação e transesterificação, na presença de solventes orgânicos (BARRIUSO et al., 2016; BORNSCHEUER et al., 2002; CORZO; REVAH, 1999; JAEGER; REETZ, 1998; JAEGER; EGGERT, 2002; KAPOOR; GUPTA, 2012; REETZ, 2002; SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001). Estas enzimas são consideradas como uma das classes mais importantes de enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 10% do mercado de enzimas. Algumas de suas aplicações são na indústria de detergentes, processamento de couro, em cosméticos, perfumaria, produção de biocombustíveis, química fina, indústria de papel e celulose, alimentos humanos e animais, diagnósticos médicos e produtos farmacêuticos (CORZO; REVAH, 1999; JAEGER; REETZ, 1998; REETZ, 2002; SALIHU; BALA; ALAM, 2015).

Lipases são obtidas a partir de plantas e animais (SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001). No entanto, lipases comerciais são obtidas mais frequentemente a partir de fontes microbianas por meio de fermentação de diferentes bactérias, fungos e leveduras como *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa*, *Rhizopus delemar* e *Yarrowia lipolytica* (CORZO; REVAH, 1999). A principal forma de produção de enzimas em processos industriais é fermentação submersa que apresenta grandes vantagens, em virtude da facilidade de esterilização e controle do processo, além de tornar possível a utilização de substratos de baixo custo como óleos vegetais, resíduos agroindustriais, gorduras de aves e sebo (ALMEIDA; TAU-K-TORNISIELO; CARMONA, 2013; PAULOVÁ; PATÁKOVÁ; BRÁNYIK, 2013).

Algumas espécies microbianas, além de produzirem lipases, tem potencial em sintetizar e armazenar quantidades relevantes de lipídeos em sua biomassa (CHANG et al., 2015). Microrganismos que armazenam teores de óleo em cerca de 20% de sua biomassa são considerados microrganismos oleaginosos, e entre estes estão microalgas, bactérias, fungos e leveduras, sendo que estes últimos sintetizam lipídios de composição semelhante à triacilgliceróis de óleos vegetais (PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011).

Leveduras oleaginosas são de rápido crescimento e acumulam teor elevado de lipídio em sua biomassa celular, uma vez que pode armazenar cerca de 40% de seu peso seco em lipídios em condições normais de crescimento e até 70% em condições limitantes de nutrientes. Algumas leveduras importantes no acúmulo de lipídios são dos gêneros *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Lipomyces*, *Yarrowia* e *Candida* (THEVENIEAU; NICAUD, 2013).

Desse modo, leveduras oleaginosas apresentam grande potencial na acúmulo de lipídios em função da sua alta taxa de acúmulo. Esses lipídios são classificados em: neutros (triglicerídeos) e polares (glicolipídios e fosfolipídios), sendo a grande parte constituída por triglicerídeos saturados e monoinsaturados (HUGENHOLTZ; SMID, 2002). Esses lipídios acumulados podem ser utilizados em diversos segmentos, como geração de produtos especiais - lubrificantes e polímeros, ou produtos de base - biocombustíveis. Além disso, estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de óleos microbianos enriquecidos em Ômega-3 e Ômega-6, para fins dietéticos e infantis, e em substituição à manteiga de cacau (ANGERBAUER et al., 2008; CHANG et al., 2015; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2011; THEVENIEAU; NICAUD, 2013; ZHANG et al., 2014). Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *Candida viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio em condições submersas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e condições de cultura

A levedura *C. viswanathii* é mantida no Laboratório de Biotecnologia, Análise de alimentos e Purificação de produtos (LABAP), Habite – Incubadora de Empresas de Base Biotecnológica, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. Cultivos periódicos foram realizados em tubo inclinado contendo meio BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar) e incubados a 28 ° C, durante 72 horas.

2.2 Cultivo submerso

Os cultivos foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de meio de Sais de Vogel (Vogel, 1956). As culturas foram suplementadas com fontes de carbono e nitrogênio. Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C durante 20 min, inoculados com 1 ml do inóculo padronizado, sendo o inóculo preparado em solução de NaCl a 0,85%, e padronizado para 10⁷ células por ml. Os cultivos foram mantidos a 180 rpm, a 28 ° C por 72 horas.

2.3 Fontes de carbono e condições limitantes de nitrogênio

As fontes de carbono puras e complexas trioleína, tributirina, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola ou azeite foram adicionadas aos meios de cultura na concentração de 1,0% (p/v). Condições limitantes de nitrogênio foram proporcionadas utilizando o mesmo meio de cultura suplementado com trioleína ou azeite de oliva e adição de 0,2% (p/p) de extrato de levedura ou glutamina. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 por adição de NaOH 1 M antes da esterilização.

2.4 Biomassa e extrato bruto

Para a obtenção do extrato em bruto, os cultivos foram centrifugados a 7500xg a 4 °C durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para quantificação de enzima e proteína. As biomassas foram lavadas com água destilada e centrifugadas para remover o meio de cultura residual. As biomassas foram secas a 60 °C em estufa até peso constante.

2.5 Efeito de glicose no acúmulo de lípidios e na produção de lipase

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de sais de Vogel (Vogel, 1956) suplementado com 0,2% de extrato de levedura e 1,0% de azeite de oliva ou de glicose. Glicose a 1% (p/v) foi adicionada aos cultivos que continham azeite de oliva 1,0%. Amostras foram retiradas de 12 em 12 horas e usadas para determinar o crescimento microbiano, a acúmulo de lipídios e produção de lipase. Os cultivos foram realizados em triplicata a 28 °C, agitado a 180 rpm por 96 horas.

2.6 Métodos analíticos

2.6.1 Atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada utilizando palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) como substrato (Almeida et al., 2013). Dissolveu-se 3,8mg de p-NPP em 0,5 ml de dimetilsulfóxido, depois diluído para 50 mM com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise de pNPP foi determinada descontinuamente a 37 °C através da liberação de p-nitrofenol (p-NP). Após 5 min de pré-incubação de 0,9 ml desta solução de substrato num banho de água, a reação foi iniciada por adição de 0,1 ml de amostra diluída apropriadamente. A reação foi interrompida em intervalos diferentes (1 e 2 min) por choque térmico (90 °, 1 min), seguida pela adição de 1 ml de solução de tetraborato de sódio saturado. A absorbância foi medida a 405 nm e a atividade foi determinada de acordo com a curva padrão feita com p-nitrofenol (coeficiente de extinção molar de pNP: $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os

controles foram preparados sem enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por ml por min.

2.6.2 Determinação de lipídio microbiano

A extração de lípidios foi realizada após a biomassa ter sido desidratada a 60 °C até peso constante, utilizando o método de Folch (FOLCH et al., 1956). Cerca de 100 mg de biomassa foram transferidas para frascos cônicos selados para extração de lípidios utilizando 5,0 ml de clorofórmio e 2,5 ml de metanol. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente durante 24 h, e $\frac{1}{4}$ do volume da solução de KCl a 0,85% foi adicionado para formação de mistura bifásica de clorofórmio, metanol e água (2,0: 1,0: 0,8 v/v). A mistura foi agitada e centrifugada a 340xg por 30 min. A camada superior foi dispensada e a fase inferior contendo clorofórmio foi cuidadosamente transferida para um tubo de ensaio, previamente pesado. O solvente foi removido em chapa aquecedora a 60 °C. O teor total de lipídio foi determinado por gravimetria.

2.6.3 Quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Foram pesadas em balança analítica, 100 mg de biomassa liofilizada da levedura nos diferentes tratamentos em triplicata e transferidas para tubos *headspace* de 20ml. Para realizar a extração e transesterificação *in situ* dos lípidios da biomassa, utilizou-se a metodologia adaptada do NREL (WYCHEN; RAMIREZ; LAURENS, 2015). Foram adicionados em cada tubo, 2 ml de solução de clorofórmio e metanol (2:1) (Preparados com 100 ml de Clorofórmio e 50 ml de Metanol) e 3 ml da solução de HCl em metanol a 0,6M (Preparados com 5 ml de HCl 37% e 95 ml de Metanol) e deixados em banho ultrassônico termostatizado em potência máxima a 55 °C por 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 ml de hexano para realizar a separação das fases onde na parte superior se encontrava os FAMES (ácidos graxos metilados) da reação diluídos no hexano. Foram retirados 1,5 ml da fase do hexano com os FAMES e

passados para *vial* para ser analisados por cromatógrafo gasoso com detector de FID (AOAC, 2005).

Os ácidos graxos metilados foram analisados em cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, acoplado com coluna HP-88 (60 m x 0,250 mm x 0,20 μ m), utilizando gás hélio como gás de arraste, fluxo constante de 1 ml/min. O detector utilizado foi detector de ionização de chama (FID). A temperatura do injetor foi de 260 °C. com divisão de amostra 50:1. A temperatura do detector foi de 260 °C. com fluxo de hidrogênio de 30 ml/min e fluxo de ar de 400 ml/min. As condições de análise dos ácidos graxos iniciaram com a temperatura do forno a 140 °C, mantido por 5 min, aumentando a temperatura em 4 °C por minuto até 240 °C. Os ácidos graxos foram identificados e quantificados utilizando padrões de ácidos graxos.

2.6.4 Determinação do óleo residual após o cultivo

O sobrenadante da cultura foi transferido para tubos falcon (50 ml) e acidificou-se com ácido sulfúrico concentrado até pH 1,0. Em seguida, 10 ml de hexano foram adicionados às amostras, as quais foram agitadas vigorosamente e mantidas em repouso até a separação de fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi seca em estufa a 60 °C até peso constante e a biomassa foi pesada em balança analítica.

2.6.5 Parâmetros da fermentação

O rendimento de lipase e lipídio sobre substrato ($Y_{p/s}$) e sobre biomassa ($Y_{p/x}$), rendimento de biomassa ($Y_{x/s}$), produtividade de lipase (PL) e de biomassa (Px), e a taxa específica de produção de lipase foram determinados de acordo as equações abaixo (qL):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (1) \quad Y_{P/X} = \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3) \quad q_L = \frac{P_{X/S}}{T} = \frac{\frac{P_f - P_0}{X_f - X_0}}{T} \quad (4)$$

$$P_L = \frac{P_f - P_0}{T} \quad (5) \quad P_X = \frac{X_f - X_0}{T} \quad (6)$$

Em que:

X_0 e X_f = concentrações (g/L) inicial e final de Biomassa;

S_0 e S_f = concentrações (g/L) inicial e final de Substrato e

P_0 e P_f = concentrações (U/L) inicial e final de Lipase, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1 Efeito de fontes de carbono sobre o crescimento, produção de lipase e acúmulo de lipídio

A linhagem *C. viswanathii* foi analisada quanto ao potencial em produzir lipase e acumular lipídios em cultivo submerso utilizando diferentes fontes de carbono de origem lipídica (Figura 1). As fontes lipídicas tributirina (4:0) e trioleína foram escolhidas devido a sua composição no triacilglicerol, sendo quatro carbonos em tributirina e dezoito carbonos e uma insaturação no carbono 9, ácido oleico, (18:1cis- Δ 9), enquanto que as fontes de lipídio renováveis, azeite de oliva, óleo de linhaça e óleo de girassol foram escolhidas por comporem em seus triacilgliceróis 79% de ácido oleico, 66% ácido linoleico (18:2 cis- Δ 9,12) e 53% de ácido linolênico (18:3 cis- Δ 6,9,12).

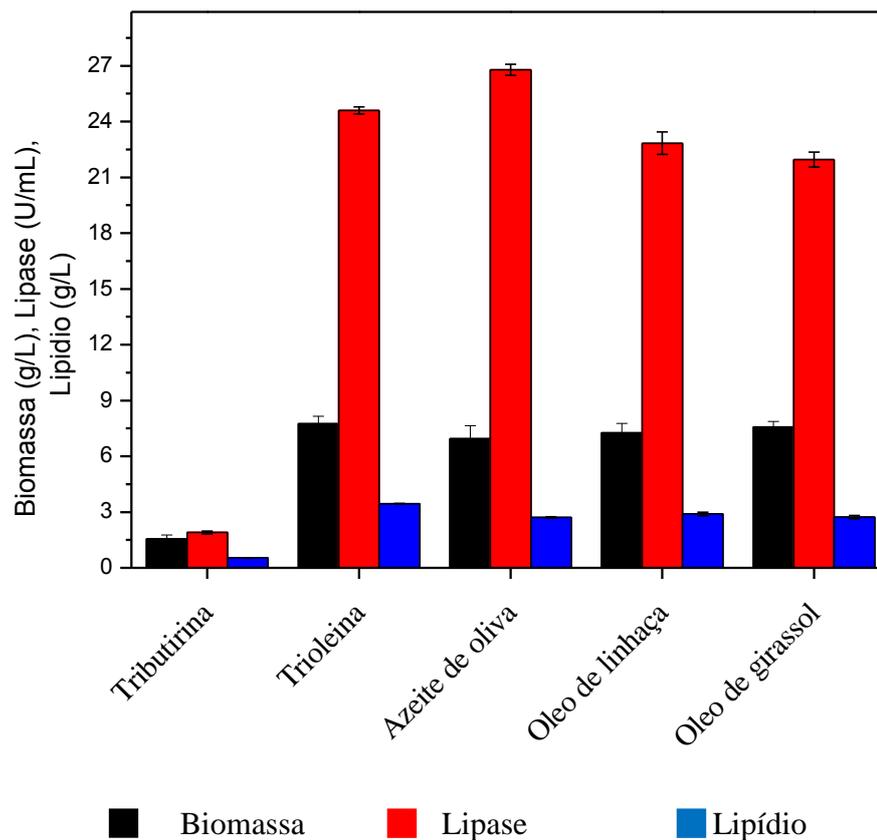


Figura 1: Efeito de fontes de carbono puras e complexas sobre o crescimento de *C. viswanathii*, produção de lipase e acúmulo de lipídio. Condições de cultivo: meio líquido de Vogel suplementado com 1% (p/v) de triacilglicerol, pH 6,0, 72 h, 200 rpm, 28 °C.

A linhagem de *C. viswanathii* foi capaz de se desenvolver em todos os triacilgliceróis analisados apresentando valores de biomassa seca de, aproximadamente, 7,0 g/L. As maiores taxas observadas foram com trioleína e óleo de girassol (7,75 g/L e 7,57 g/L, respectivamente) e o menor crescimento com tributirina (1,56 g/L). A maior produção de lipase foi observada com azeite de oliva (26,78 U/ml) seguido por trioleína (24,60 U/ml). Valores intermediários foram observados com óleo de linhaça (22,84 U/ml) e óleo de girassol (21,96 U/ml). O maior acúmulo de lipídio intracelular foi observado com a fonte de lipídio puro trioleína (3,45 g/L), que correspondeu a 44,57% do peso seco da biomassa da levedura.

Na Figura 2 é apresentada a morfologia da linhagem de *C. viswanathii* com as vesículas de lipídios intracelulares. O acúmulo de lipídio utilizando fontes renováveis de lipídio óleo de linhaça, azeite de oliva e óleo de girassol não apresentou diferença

(~2,7 g/L). A menor concentração de lipídio intracelular foi observada com tributirina (0,55 g/L). O acúmulo de lipídio utilizando azeite de oliva correspondeu 39% da biomassa seca, enquanto que para tributirina, óleo de linhaça e óleo de girassol o lipídio intracelular correspondeu a aproximadamente 34%.

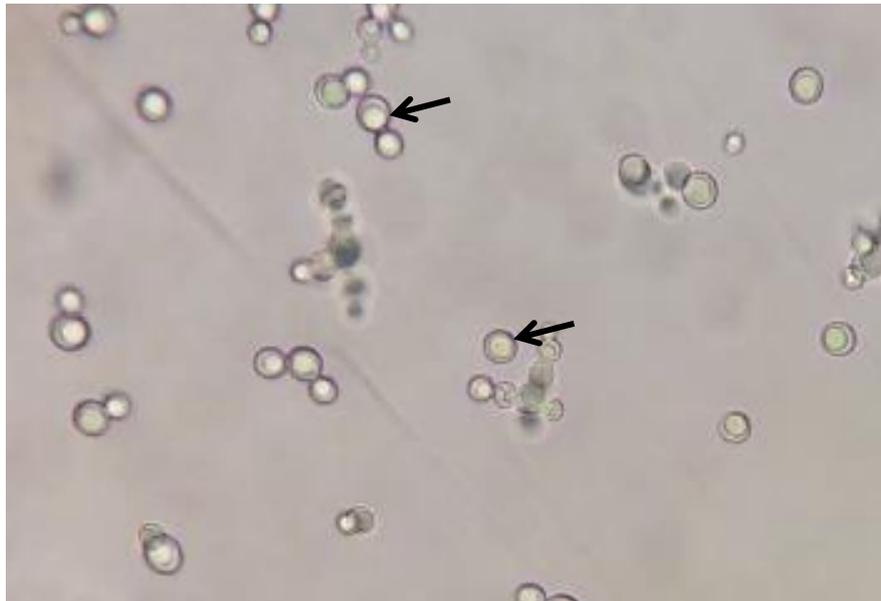


Figura 2: Células de levedura *C. viswanathii* após 72h de incubação em meio de cultivo contendo azeite de oliva. Setas indicam as vesículas com lipídios. Aumento 400x.

Os parâmetros da fermentação foram analisados quanto aos rendimentos de biomassa, produção de lipase e acúmulo de lipídio ($Y_{X/S}$, $Y_{lipase/S}$, $Y_{lipídio/S}$, respectivamente), produtividade em biomassa (P_X), lipase (P_{lipase}) e lipídio ($P_{lipídio}$) e a taxa específica de produção (q) (Tabela 1). A maior produtividade em biomassa foi observada com trioleína ($P_X=0,110$ g/h).

As fontes de lipídio renováveis, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de linhaça, apresentaram produtividade de aproximadamente 0,10 g/h, enquanto que a tributirina apresentou a menor produtividade ($P_X=0,022$ g/h). Os maiores rendimentos de biomassa foram observados com azeite de oliva ($Y_{X/S}=1,435$ g/g de substrato consumido) e óleo de girassol ($Y_{X/S}=1,316$ g/g de substrato consumido), enquanto que com linhaça ($Y_{X/S}=0,855$ g/g de substrato consumido) e trioleína ($Y_{X/S}=0,820$ g/g de substrato consumido) apresentaram valores intermediários e a tributirina apresentou o menor valor de rendimento ($Y_{X/S}=0,168$ g/g de substrato consumido).

Tabela 1: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa *C. viswanathii* com utilização de triacilgliceróis puros e complexos.

Triacilgliceróis	Ácidos Graxos	Biomassa		Acúmulo de Lipídio					Produção de Lipase			
	Predominantes	$Y_{X/S}$	P_x	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$P_{lipídio}$	q	Lipid (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	P_{lipase}	q
Tributirina	4:0 (100%)	0,168	0,022	0,059	0,350	0,008	0,0048	35,0	167,6	1.217,9	26,4	16,91
Trioleína	18:1 (100%)	0,820	0,110	0,405	0,446	0,050	0,0061	44,6	2.460,0	3.174,2	341,7	44,10
Azeite de Oliva	18:1 (76-79%)	1,435	0,0970	0,276	0,389	0,0376	0,0054	39,0	2.678,0	3.853,2	371,9	53,16
Óleo de Girassol	18:2 (66%)	1,316	0,105	1,224	0,361	0,0378	0,0050	36,1	2,196,0	2.900,9	317,2	40,30
Óleo de Linhaça	18:3 (53%)	0,855	0,101	0,409	0,400	0,04034	0,0055	31,4	2,284,0	3.146,0	305,0	43,70

Condições de cultivo: os cultivos foram realizados em meio Vogel com 1% (p/v) de óleos vegetais ou gorduras animais, pH 6,0, 72 h, 200 rpm at 28 °C. YX/S produção de biomassa em substrato consumido (g/g); YP/S produto por substrato consumido; PX produtividade em biomassa (g/h); P produtividade (P/h); q taxa específica de formação de produto (P/biomass,h-1), Lipídio (%) formação de lipídio nas células.

As maiores produtividades de lipase foram observadas com azeite de oliva e trioleína ($P_{lipase}=371,9$ U/L/h e $P_{lipase}=341,7$ U/L/h, respectivamente) e a maior produtividade de lipídio com trioleína ($P_{lipidio}=0,050$ g/h). Óleo de linhaça, óleo de girassol e azeite de oliva apresentaram produtividade de, aproximadamente, 0,040 g/h e tributirina de 0,008 g/h. O rendimento em lipase e lipídio sobre o consumo de substrato foi maior com azeite de oliva ($Y_{lipase/S}=2.678,0$ U/g de substrato consumido) com óleo de girassol ($Y_{lipidio/S}=1,222$ g/g substrato consumido), enquanto que o óleo de linhaça e trioleína foi as segundas e terceiras melhores fontes para a acúmulo de lipídio ($Y_{lipidio/S}=0,409$ e $Y_{lipidio/S}=0,405$ g/g substrato consumido, respectivamente). O menor rendimento de produção lipase e lipídio sobre o substrato consumido foi observado com tributirina ($Y=167,6$ U/g substrato consumido e $Y=0,059$ g/g substrato consumido, respectivamente),

O parâmetro de rendimento da produção de lipase sobre a produção de biomassa apresentou o maior índice com azeite de oliva ($Y= 3.853,2$ U/g biomassa) e trioleína ($Y=0,446$ U/g biomassa) para a acúmulo de lipídio e a maior taxa específica da produção de lipase foi de 53,16 U/g biomassa/h com azeite de oliva, enquanto que para a acúmulo de lipídio foi de 0,006 g/g biomassa/h com trioleína. Os menores valores de rendimento e taxa específica para lipase e acúmulo de lipídio foram observados com tributirina.

3.2 Efeito de fontes de nitrogênio sobre o crescimento, produção de lipase e acúmulo de lipídio

Em razão de os parâmetros da fermentação indicarem melhores resultados com a utilização de azeite de oliva e trioleína, fontes de nitrogênio orgânica e inorgânicas na concentração de 0,2% foram avaliadas para a produção de lipase e acúmulo de lipídios por *C. viswanathii* utilizando tais fontes de carbono (Figura 3). A maior produção de biomassa foi observada utilizando-se nitrato de amônio e trioleína (8,83 g/L), seguido por azeite de oliva (8,35 g/L). A produção de biomassa em trioleína e azeite de oliva com extrato de levedura foi de 7,96 e 6,95 g/L, respectivamente.

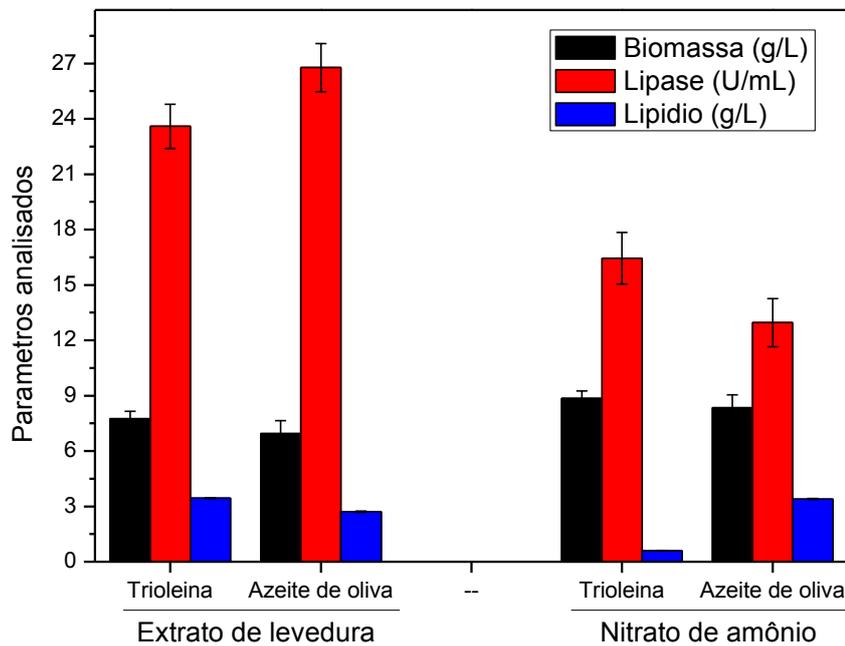


Figura 3: Efeito de fontes de nitrogênio sobre o crescimento de *C. viswanathii*, produção de lipase e acúmulo de lipídio, Condições de cultivo: meio líquido de Vogel suplementado com 1% (p/v) de triacilglicerol e 0,2% (p/v) de fonte de nitrogênio, pH 6,0, 72 h.

As maiores produções de lipase foram observadas utilizando-se fonte de nitrogênio orgânica (extrato de levedura) com azeite de oliva e trioleína (26,78 U/ml e 23,6 U/ml, respectivamente). A maior acúmulo de lipídio foi observada com trioleína (3,45 g/L). O nitrato de amônio reduziu tanto a produção de lipase quanto a acúmulo de lipídio, sendo que com trioleína os maiores valores foram de 16,45 U/ml para lipase e 0,6 g/L para lipídio e com azeite de oliva de 12,96 U/ml e 3,40 g/L, respectivamente.

Os parâmetros da fermentação analisados para as duas fontes de nitrogênio são apresentados na Tabela 2. O cultivo com extrato de levedura apresentou o maior rendimento de biomassa utilizando-se azeite de oliva ($Y_{X/S}=1,435$ g/g); no entanto, em conjunto com trioleína apresentou $Y_{X/S}=0,820$ g/g. O uso de nitrato de amônia também causou redução nos parâmetros analisados, tendo $Y_{X/S}=1,265$ g/g com azeite de oliva e $Y_{X/S}=0,920$ g/g com trioleína. No que diz respeito à produtividade de biomassa, nitrato de amônio apresentou-se como a melhor fonte de nitrogênio, a qual obteve $P_X=0,123$ g/h para trioleína e $P_X=0,115$ g/h para azeite de oliva.

Tabela 2: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa *C. viswanathii* com utilização de diferentes fontes de nitrogênio.

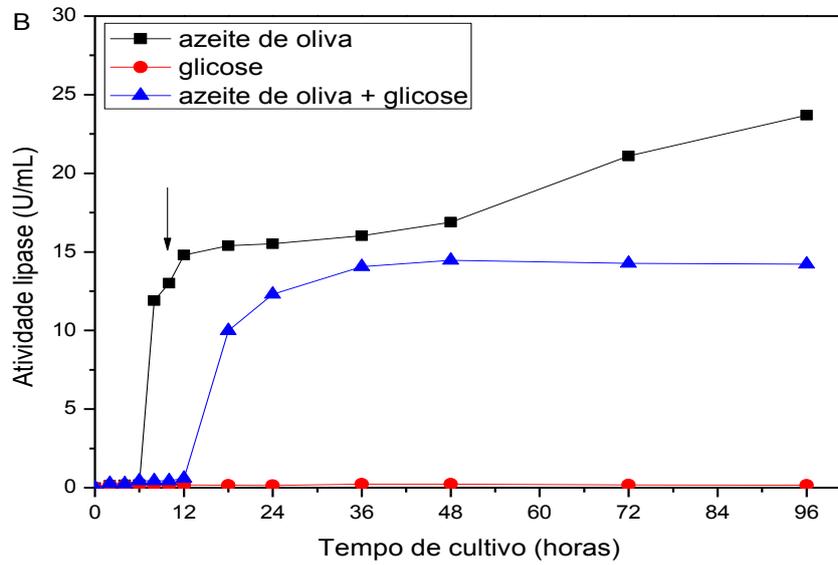
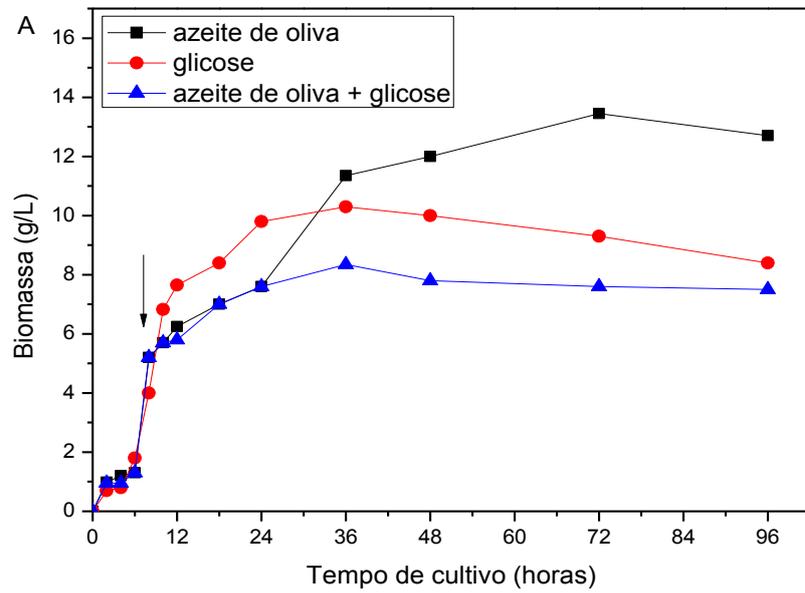
Fonte de Nitrogênio	Biomassa		Acúmulo de Lipídio				Produção de Lipase				
	$Y_{X/S}$	P_x	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	$P_{lipidio}$	q	Lipid (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	P_{lipase}	q
Extrato de levedura											
Trioleína	0,820	0,110	0,405	0,446	0,0500	0,0061	44,6	2.460,0	3.174,2	341,7	44,10
Azeite de oliva	1,435	0,0970	0,276	0,389	0,0376	0,0054	39,0	2.678,0	3.853,2	371,9	53,51
Nitrato de amônio											
Trioleína	0,939	0,123	0,0627	0,0668	0,0061	0,0007	6,7	1.645,0	1.862,0	228,5	25,82
Azeite de oliva	1,265	0,115	0,5152	0,4072	0,0354	0,0042	40,7	1.296,0	1.552,7	180,0	21,14

Condições de cultivo: os cultivos foram realizados em meio Vogel com 1% (p / v) de óleos vegetais ou gorduras animais e 0,2% (p/v) de fonte de nitrogênio, pH 6,0, 72 h, 200 rpm at 28 °C. $Y_{X/S}$ produção de biomassa em substrato consumido (g/g); $Y_{P/S}$ produto por substrato consumido; P_X produtividade em biomassa (g/h); P produtividade (P/h); q taxa específica de formação de produto (P/biomass,h-1), Lipid (%) formação de lipídio nas células.

A fonte de nitrogênio orgânica também apresentou bons resultados para os demais parâmetros da fermentação como produção de lipase e acúmulo de lipídios. Os melhores valores de rendimento para acúmulo de lipídio foram observados com trioleína, enquanto que para lipase o azeite de oliva foi melhor fonte de carbono. A taxa de específica para a produção de lipase é maior utilizando-se azeite de oliva ($q=53,51$ U/g biomassa/h), representando um aumento de 48,2% com relação à taxa específica dos cultivos realizados com nitrato de amônio. A acúmulo de lipídio utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e azeite de oliva como fonte de carbono nos cultivos mostrou que os parâmetros da fermentação apresentaram-se próximos aos observados com extrato de levedura ($Y_{\text{lipídio/S}}=0,5152$ g/g, $Y_{\text{lipídio/X}}=0,4072$ g/g, $P_X=0,0354$ g/h, $q=0,0042$ g/g biomassa/h e 40,7% lipídio acumulado). Esses resultados podem estar relacionados com o tipo de fonte de carbono utilizada, uma vez que, o azeite de oliva possui, além dos ácidos graxos monoinsaturados, outras substâncias como tocoferol que podem ter influenciado na acúmulo de lipídio microbiano.

3.3 Cinética de acúmulo de lipídio e produção de lipase

A cinética de produção de biomassa, produção de lipase e acúmulo de lipídio utilizando-se a azeite de oliva e/ou glicose 1,0% (p/v) e extrato de levedura 0,2% (p/v) foi realizada durante 96h em cultivos sob agitação constante de 180 rpm, a 28 °C (Figura 4a). Os resultados observados para a produção de biomassa sugerem que a linhagem de *C. viswanathii* possui maior preferência para o crescimento em fontes lipídicas do que em carboidratos. A maior produção de biomassa foi observada no cultivo com azeite de oliva após 72 h de cultivo (13,45 g/L). O crescimento microbiano em glicose mostrou-se acelerado nas primeiras 24 h de cultivo, enquanto que no meio de cultivo com azeite de oliva+glicose, o crescimento foi inferior com produção máxima de biomassa após 36 h (8,35 g/L).



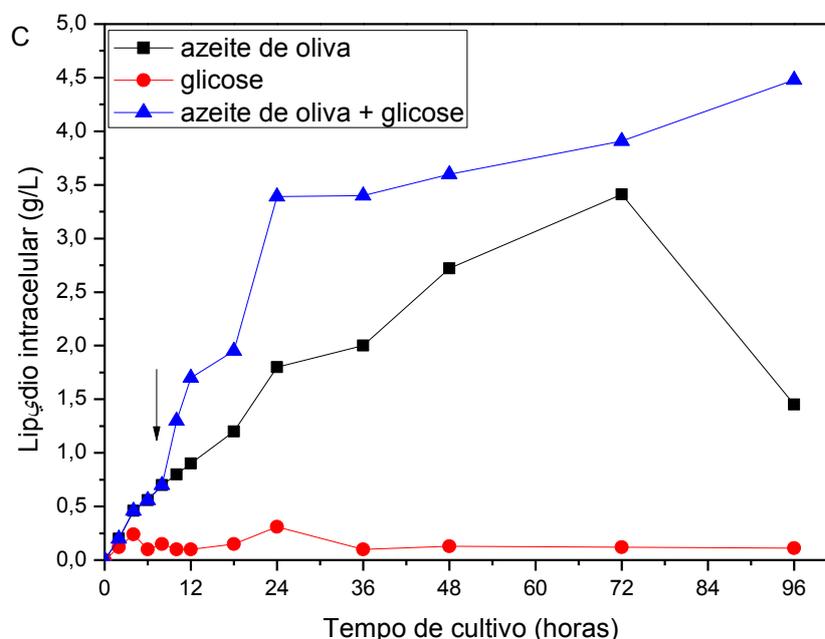
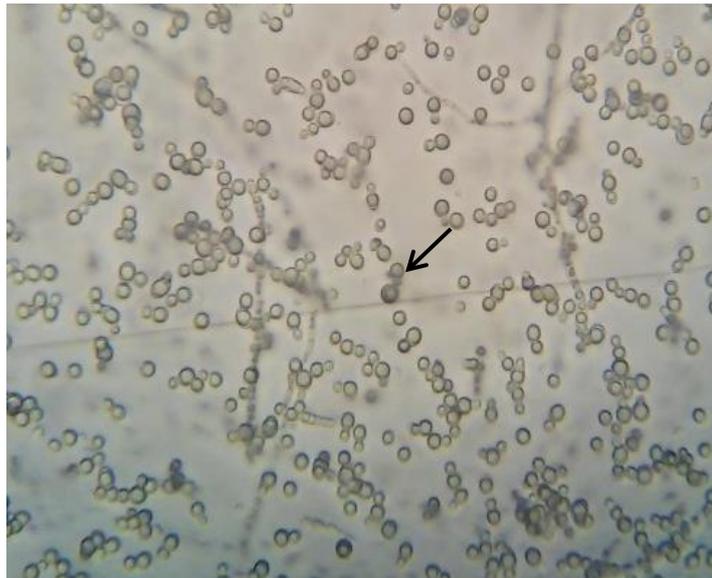
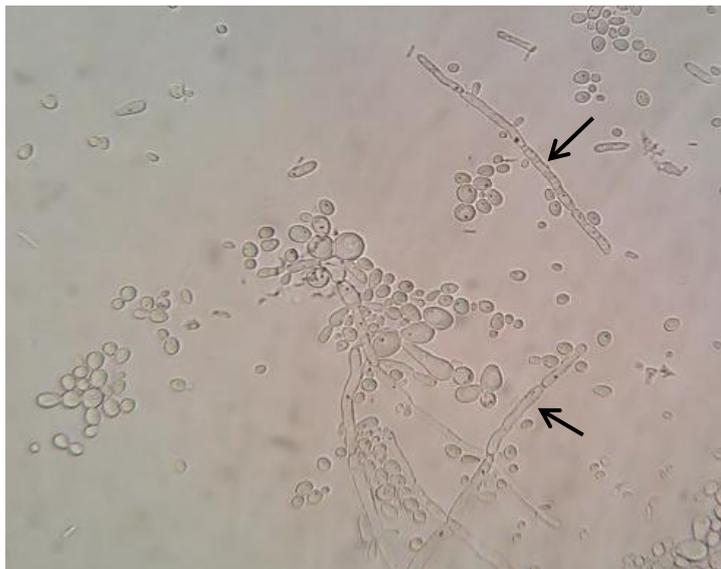


Figura 4: Crescimento de *C. viswanathii* (A), produção de lipase (B) e cinética de acúmulo lipídica (C). Condições de cultura: as culturas foram realizadas em meio Vogel com fonte de carbono a 1% (p / v) e fonte de nitrogênio a 0,2% (p / v), pH 6,0, 72h, 200 rpm a 28 ° C. Setas indicam a adição de glicose ao meio de cultivo.

A produção de lipase foi extremamente influenciada com as condições de cultivo estabelecidas (Figura 4b). O meio de cultivo com a adição de azeite de oliva apresentou a maior produção de lipase após 96 h de cultivo (23,7 U/ml). O meio de cultivo contendo glicose apresentou repressão quanto a produção da enzima, evidenciando sua propriedade indutiva na presença de compostos lipídicos. Esta característica também foi observada no meio de cultivo contendo azeite de oliva+glicose. A adição de glicose ao meio de cultivo após 6 h de cultivo mostrou repressão catabólica pela linhagem de *C. viswanathii*, tendo início da produção de lipase após 18 h de cultivo, com a produção máxima após 36 h (14 U/ml). Nas condições de cultivo estabelecidas, observou-se alteração na morfologia celular da linhagem crescida em glicose, onde as células apresentaram-se alongadas e com formação de pseudo-

hifas, uma característica presente no gênero *Candida* (Figura 5b). As células crescidas em azeite de oliva apresentaram-se tamanho inferior às células crescidas nos cultivos com azeite de oliva+glicose.

A**B**

C

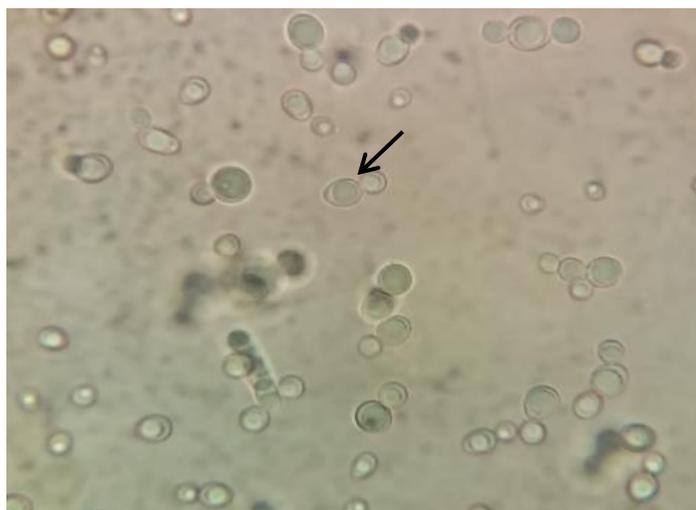


Figura 5: Morfologia de células de *C. viswanathii* crescida em azeite de oliva (A), glicose (B) e azeite de oliva+glicose (C) por 72 h de cultivo, a 180 rpm, 28 °C. Aumento 400x.

O acúmulo de lipídio intracelular teve resposta contrária à produção de biomassa e lipase (Figura 4c). O meio de cultivo que continha azeite de oliva + glicose apresentou maior produção e acúmulo de lipídio após 96 h de cultivo (4,50 g/L). Interessantemente, o acúmulo de lipídio aumentou após a adição de glicose ao meio de cultivo. O meio de cultivo contendo azeite de oliva apresentou o maior acúmulo de lipídio após 72 h de cultivo (3,41 g/L), como também observado para a produção de biomassa. No meio de cultivo contendo glicose, o maior acúmulo de lipídio foi de 0,3 g/L. Este fato pode estar relacionado com a alteração da morfologia celular observada na Figura 5.

Os parâmetros da cinética de fermentação foram analisados quanto aos rendimentos de biomassa, lipase e lipídio ($Y_{X/S}$, $Y_{lipase/S}$, $Y_{lipídio/S}$, respectivamente), produtividade em biomassa (P_X), lipase (P_{lipase}) e lipídio ($P_{lipídio}$) e a taxa específica de produção (q) (Tabela 3). Em relação à conversão de substrato, percebe-se que a melhor conversão de substrato em biomassa foi observada em cultivo utilizando-se glicose como fonte de carbono ($Y_{X/S}=2,53$ g/g). O uso de azeite de oliva favoreceu a melhor conversão de substrato em lipase ($Y_{lipase/S}=2,740,64$ g/g), enquanto que a maior conversão de substrato em lipídio foi observada no cultivo azeite+glicose ($Y_{lipídio/S}=0,75$ g/g). O mesmo é observado em relação à taxa de conversão, em que azeite de oliva apresentou-se como melhor fonte de carbono para taxa de conversão de lipase e o cultivo azeite/glicose foi o melhor para taxa de conversão de lipídio, apresentando valores de $q=19,4219$ e $0,0088$ U/g biomassa/h, respectivamente. Em relação à

produtividade de lipase observa-se superioridade do azeite de oliva, obtendo valores de $P_{lipase}=2246,6579$ U/h, enquanto que a produtividade de lipídio apresentou melhores resultados no cultivo azeite/glicose ($P_{lipídio}=0,0681$ g/h).

Tabela 3: Acúmulo de lipídio, produção de lipase e biomassa *C. viswanathii* em 96h de cinética de cultivo.

Parâmetros	Glicose	Azeite de Oliva	Azeite + Glicose
Biomassa (g/L)	7,17	12,70	7,72
Lipase (U/L)	167,15	23679,16	14065,10
Lipídio (g/L)	0,065	1,655	6,537
Conversão de substrato em lipase ($Y_{P/S}$)	59,17	2740,64	1627,90
Conversão de substrato em lipídio ($Y_{P/S}$)	0,023	0,191	0,757
Conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$)	2,54	1,47	0,89
Taxa de conversão lipase (q_L)	0,243	19,420	18,966
Taxa de conversão lipídio (q_L)	0,00009	0,00130	0,00880
Produtividade lipase (P)	1,74	246,65	146,51
Produtividade lipídio (P)	0,0006	0,0172	0,0681

3.4 Perfil de ácidos graxos

A análise das amostras de lipídios realizada por cromatografia gasosa revelou o perfil dos ácidos graxos produzidos pela levedura nas condições de cultivos contendo como fonte de carbono azeite de oliva, glicose ou azeite de oliva + glicose (Tabela 5). Nas três condições de cultivo, o maior teor de lipídio intracelular foi obtido com azeite de oliva+glicose (59,73%, p/p), seguido por azeite de oliva (25,35%, p/p) e glicose (3,16%, p/p). Observou-se também

maior quantidade de ácidos graxos insaturados que de ácidos graxos saturados, porém, nos cultivos com glicose houve aumento na quantidade de ácidos graxos saturados (33,36%, p/p). Nos cultivos em que o azeite de oliva estava presente, com ou sem glicose, houve maior acúmulo dos ácidos graxos insaturados (86,06 e 85,62%, p/p); enquanto que, no cultivo com glicose a concentração desses ácidos foram de 66,64% (p/p).

Tabela 4: Perfil dos ácidos graxos produzidos por *C. viswanathii* em diferentes fontes de carbono.

Parâmetros (%)	Nomenclatura	Glicose	Azeite de oliva +	
			Azeite de oliva	Glicose
Lípido total		3,16 ± 0,13	25,35 ± 1,89	59,73 ± 2,87
Ácido graxo saturado		33,36 ± 0,51	13,94 ± 0,40	14,38 ± 0,76
Ácido graxo insaturado		66,64 ± 0,86	86,06 ± 2,87	85,62 ± 4,46
Ácido mirístico	C 14:0	n,d,	n,d,	n,d,
Ácido palmístico	C 16:0	17,56 ± 0,13	10,80 ± 0,28	10,79 ± 0,59
Ácido palmitoleico	C 16:1 Δcis-9	5,95 ± 0,13	1,19 ± 0,05	1,31 ± 0,08
Ácido esteárico	C 18:0	15,79 ± 0,38	3,14 ± 0,12	3,59 ± 0,18
Ácido oleico	C 18:1Δcis-9	60,69 ± 0,72	69,31 ± 2,33	68,84 ± 3,55
Ácido vacênico	C 18:1 Δtrans-11	n,d,	1,80 ± 0,05	1,79 ± 0,09
Ácido linoleico	C 18:2 Δcis-9,12	n,d,	12,55 ± 0,40	12,84 ± 0,69
Ácido linolênico	C 18:3 Δcis-6,9,12	n,d,	0,79 ± 0,03	0,85 ± 0,05
Ácido eicosadienóico	C 20:2 Δcis-11,14	n,d,	0,42 ± 0,01	n,d,

Entre os perfis de ácidos graxos, não foi observada presença de ácido graxo de cadeia carbônica de 14 C em nenhuma das condições. Além disso, em todas as condições testadas observou-se predominância de ácido oleico, obtendo porcentagem de 69,31, 60,69 e 68,84%, para azeite de oliva, glicose e azeite/glicose, respectivamente. Utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono, percebe-se a presença de ácidos graxos de tamanhos variados de cadeia carbônica, de 16 a 20 C, sendo observados também, como constituintes, 12,55% de ácido linoleico (C18:2n-6c) e 10,80% de ácido palmítico (C16:0). O mesmo também é observado no cultivo azeite + glicose, onde observou-se presença de ácidos graxos de tamanhos variados. No entanto, no cultivo azeite + glicose não observou-se a presença de ácido cis-11,14-eicosadienóico (C20:2n6), assim como no cultivo com glicose como fonte de carbono, em que também não observou-se a presença de ácido vacênico (C18:1 trans-11), linoleico (C18:2) e alfa-linolênico (C18:3) como constituintes. Com a utilização de glicose no meio de cultivo notou-se presença de 17,56% de ácido palmítico e 15,79% de ácido esteárico (C18:0).

4. DISCUSSÃO

A co-produção de metabólitos com valor agregado por microrganismos é uma alternativa viável para o aproveitamento de produtos extracelulares e intracelulares em um mesmo processo fermentativo. Desta forma, o caldo fermentado é fonte de moléculas extracelulares solúveis como enzimas e, a biomassa pode ser utilizada para obtenção de metabólitos intracelulares como lipídios, proteínas, vitaminas entre outros. A linhagem *C. viswanathii* demonstrou produzir alta quantidade de biomassa em substratos lipídicos para a produção de lipase e acúmulo de lipídio. Em todos os cultivos foram mantidas as condições limitantes de nitrogênio com o objetivo de verificar a influência da fonte de carbono sobre o acúmulo de lipídio intracelular. Os microrganismos acumulam lipídios durante o crescimento secundário contendo elevadas concentrações de carbono e concentrações limitadas de nitrogênio. Eles convertem o carbono residual em óleos quando a quantidade de nitrogênio é esgotado no meio de cultura (SAYGÜN et al., 2014).

A utilização de fontes de carbono lipídicas, como tributirina, trioleína, azeite de oliva, óleo de girassol e óleo de linhaça, influenciou a produção de lipase, biomassa e de

acúmulo de lipídios. Estes resultados estão relacionados com a composição dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol. A maior produção de lipase foi observada com azeite de oliva, seguida pela trioleína. Estas fontes de carbono são ricas em ácido oleico. A produção de lipase por microrganismos é mediada, em sua maioria, pelo uso de azeite de oliva como fonte de carbono (SHARMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010). Além disso, o azeite de oliva possui fatores nutricionais, como tocoferol, que favorecem o crescimento microbiano e a produção de lipase (BALDIOLI et al., 1996). O uso de tributirina inibiu a produção de lipase pela linhagem de *C. viswanathii*. Estas observações corroboram com os resultados obtidos em estudos anteriores, indicando que a linhagem produz uma lipase verdadeira, pois tem preferência por ácidos graxos de cadeia longa (ALMEIDA et al., 2013).

A acúmulo de lipídio utilizando fontes oleaginosas mostrou que a linhagem de *C. viswanathii* acumulou acima de 30% de lipídio em todas as fontes analisadas, tendo a maior acúmulo em trioleína (44,6%), seguido por azeite de oliva (39%). A menor concentração de lipídio foi observada com óleo de linhaça (31,4%). Embora tributirina tenha apresentado as menores produções de biomassa e lipase, na presença desta fonte de carbono a linhagem acumulou 35,0% de lipídio. A adição de diferentes óleos ao meio de cultivo pode aumentar a acúmulo de lipídios dependendo da composição dos ácidos graxos presentes (SAYGÜN et al., 2014). A acúmulo de lipídios por *Yarrowia lipolytica* foi diretamente influenciada pela composição dos ácidos graxos dos substratos hidrofóbicos utilizados no meio de cultivo (PAPANIKOLAOU et al., 2001). A acúmulo de lipídio nas células de *C. viswanathii* decresceu de acordo com o aumento do número de insaturações nos ácidos graxos presentes nos lipídios utilizados como fonte de carbono. Trioleína apresenta 100% de ácido oleico (18:1) em sua composição e apresentou 44,6% de lipídios acumulados nas células. Azeite de oliva era composto por ~80% de ácido oleico (lipídio acumulado – 39,0%), óleo de girassol possui 66% de ácido linoleico (18:2) (lipídio acumulado – 36,1%) e óleo de linhaça possui 53% de ácido linolênico (18:3) (lipídio acumulado – 31,4%).

O crescimento em diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura e NH_4NO_3) teve pouco efeito sobre a produção de biomassa total por *C. viswanathii* e sobre o acúmulo de lipídio, exceto no meio de cultivo contendo trioleína e NH_4NO_3 . Os resultados mostram que, embora o nitrato de amônio tenha sido utilizado para o crescimento microbiano, a maior acúmulo de lipídio e lipase foi observada com fonte de nitrogênio orgânica. Estas observações também foram encontradas por Certik; Megova; Horenitzky (1999) com o fungo filamentosos

Cunninghamella echinulata e Evans; Ratledge (1984) com leveduras oleaginosas. Estes autores observaram que os microrganismos cresceram rapidamente nos meio de cultivo contendo nitrogênio orgânico, mas pouco lipídio foi produzido e armazenado pelas células. A natureza e concentração da fonte de nitrogênio usado no meio de cultivo é um fator essencial para a regulação da lipogênese.

As razões para a acúmulo de lipídios envolve a capacidade de produzir um fornecimento contínuo de acetil-CoA diretamente no citosol da célula como um precursor necessário para a síntese de ácidos graxos e a capacidade de produzir um suprimento suficiente de NADPH como redutor essencial para a biossíntese de ácidos graxos. Em condições limitantes de nitrogênio os microrganismos induzem uma cascata de reações que levam á formação de acetil-CoA (RATLEDGE, 2004). Certik; Megova; Horenitzky (1999) observaram que a acúmulo de lipídios em *C. echinulata* ocorreu em fontes de nitrogênio orgânicas, onde também foi observado o aumento da atividade da enzima acetil-CoA carboxilase. Os autores observaram que a mudança das condições de cultivo para condições limitantes de nitrogênio provocou um aumento das atividades de ATP-citrato liase e acetil-CoA carboxilase acompanhada de uma aumento no acúmulo de lipídios.

A cinética de crescimento, produção de lipase e acúmulo de lipídio de *C. viswanathii* foram realizadas utilizando azeite de oliva, glicose e uma terceira condição, onde a glicose foi adicionada ao meio de cultivo após 8 horas de cultivo. A morfologia celular de *C. viswanathii* nas diferentes condições de cultivo mostrou interferência direta sobre a acúmulo de lipídio. As células crescidas em meio contendo azeite de oliva apresentaram-se menores e com vesículas de lipídios grandes no centro da célula. Nos cultivos com glicose como fonte de carbono, a células apresentaram-se alongadas com formação de pseudo-hifas e gotas pequenas de lipídio intracelular. Nos cultivos em que a glicose foi adicionada ao meio contendo azeite de oliva, as células apresentaram-se maiores e também com vesículas de lipídios grandes. Nestas condições, a produção de lipase também foi influenciada, uma vez que nos meio de cultivo contendo glicose, houve produção muito baixa de lipase e no meio contendo azeite de oliva, após a adição de glicose, ocorreu repressão catabólica e a produção de lipase foi interrompida. Enquanto que, no meio com azeite de oliva, a produção de lipase ocorreu até 96 h de cultivo,

A glicose presente no meio de cultivo foi rapidamente consumida pela linhagem de *C. viswanathii*, que pode ter levado a levedura entrar em estado de estresse nutricional e consumir os lipídios intracelulares para seu crescimento. A filamentação de leveduras do gênero *Candida* ocorre em condições de estresse como falta de nutrientes. Zhang et al. (2011) observou que uma mudança significativa da morfologia na linhagem de *Cryptococcus curvatus* durante o crescimento para a acúmulo de lipídios. Durante os estágios iniciais, as células cresceram dramaticamente por causa da abundância de nutrientes e apresentaram-se alongadas com grandes vesículas de lipídios no centro da célula. Após 48 h de cultivo, quando a fonte de nitrogênio foi exaurida do meio, as hifas tornaram-se fragmentadas e as vesículas de óleo diminuíram de tamanho. Almeida et al. (2013) mostraram que a linhagem *C. viswanathii* produz lipase somente na presença substratos hidrofóbicos, sendo melhor induzida na presença de ácido oleico ou trioleína,

A adição de glicose ao meio de cultivo contendo azeite de oliva reduziu a produção de biomassa e de lipase em 26,4% e 40%, respectivamente; mas promoveu aumento na acúmulo de lipídio em 31,40%. Resultados semelhantes foram observados com a levedura *Y. lipolytica* quando cultivada em substratos hidrofóbicos e com glicose (BEOPOULOS et al., 2008). Os resultados mostraram que com a adição de glicose ao meio de cultivo, a acúmulo de lipídio nas células passou de 14,1% para 37,0%, correspondendo a um aumento de 2,6 vezes. A adição de glicose ao meio de cultivo pode ter causado um excesso de carbono nas condições limitantes de nitrogênio, permitindo que o carbono fosse diretamente direcionado para a síntese de lipídio, tendo como resultado síntese de triacilgliceróis dentro das células com vesículas de lipídios (RATLEDGE, 2004).

Alterações no perfil dos ácidos graxos de *C. viswanathii* também foram observadas quando cultivada nas diferentes condições (azeite de oliva, glicose e azeite de oliva + glicose). A utilização de azeite de oliva ou azeite de oliva + glicose nos meios de cultivo reduziu a produção de ácidos graxos saturados, como ácido palmítico (16:0) e ácido oleico (18:0), tendo um acúmulo de ácidos graxos saturados totais de 13,94% e 14,30%, respectivamente. Enquanto que no meio de cultivo contendo glicose a produção de 16:0 e de 18:0 foi de 17,56% e 15,79%, respectivamente, representando 33,35% dos ácidos graxos saturados totais. Por outro lado, observou-se produção de ácidos graxos insaturados de 86,06% e 85,56% nos cultivos contendo azeite de oliva e azeite de oliva + glicose. O ácido oleico foi o ácido graxo insaturado encontrado em maior concentração, seguido do ácido linoleico (~12%) também

nos cultivos contendo azeite de oliva e azeite de oliva + glicose. Outros ácidos graxos poli-insaturados não foram observados nos cultivos contendo glicose como fonte de carbono.

O perfil dos ácidos graxos dos lipídios acumulados por linhagens microbianas são diretamente afetados pelo conteúdo dos ácidos graxos presentes nos óleos utilizados como substrato. A adição de diferentes óleos aos meios de cultivo de *Y. lipolytica* pode aumentar a produção de ácidos graxos poli-insaturados dependendo do conteúdo dos ácidos graxos das fontes lipídicas (PAPANIKOLAOU et al., 2001; PAPANIKOLAOU et al., 2003). Chatzifragkou et al. (2011) observaram que a adição de óleos essenciais ao meio de cultivo alterou o perfil dos ácidos graxos de *Y. lipolytica*, sendo que o meio de cultivo que continha ácido gama-linolênico favoreceu a produção de óleo microbiano com alto teor desse ácido graxo. De acordo com os resultados obtidos para *C. viswanathii*, o uso de azeite de oliva favoreceu o aumento na produção de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico, linoleico, linolênico e eicosadienóico e, conseqüentemente redução dos ácidos palmítico e esteárico.

Darvish et al (2009) explicam que a entrada seletiva de ácidos graxos em células microbianas pode ocorrer por dois diferentes sistemas de transporte seletivo de ácidos graxos de diferentes tamanhos: um sistema carreador é específico para os ácidos láurico e mirístico (12:0 e 14:0) e um segundo para os ácidos palmítico e esteárico (16:0 e 18:0). Nestes sistemas, observado para células de *Y. lipolytica*, os ácidos láurico e mirístico são usados para o crescimento celular, enquanto que o ácido oleico é acumulado como lipídio de reserva e armazenado (PAPANIKOLAOU et al., 2001; PAPANIKOLAOU et al., 2003). No caso da linhagem de *C. viswanathii*, indica que os ácidos graxos presentes no substrato podem ser usados para o seu crescimento ou em processos de biotransformação para produzir novos ácidos graxos que não existiam previamente no substrato.

Beopoulos; Nicaud (2012) relatam que o conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos diferem entre as espécies de leveduras oleaginosas, porém as proporções principais de ácidos graxos são similares àsquelas produzidas pelas plantas e consistem principalmente em: ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2; C18:3). Desse modo, o fato de que a maioria dos perfis lipídicos observados ser semelhantes em tipo e composição aos lipídios de plantas pode, portanto, ter muitas vantagens pelo fato de não serem competitivas com alimentos, terem curtos ciclos de processo e seu cultivo não depender de fatores climáticos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo em diferentes substratos hidrofóbicos para a produção de lipase e acúmulo de lipídio mostrou que a linhagem de *C. viswanathii* pode ser classificada como uma linhagem pertencente ao grupo dos microrganismos oleaginosos. Este é o primeiro estudo que relata a produção e acúmulo de lipídios por esta linhagem. A adição de glicose ao meio de cultivo contendo azeite de oliva reduziu a produção de lipase, mas aumentou o acúmulo de lipídio sem alterar significativamente o perfil dos ácidos graxos, em especial, os ácidos graxos insaturados como ácido oleico que pertencem à família ômega 9. Dessa forma, os lipídios produzidos por *C. viswanathii* possuem grande potencial para seu uso como suplementos alimentares. Estudos envolvendo o controle fisiológico para a produção de lipase e acúmulo de lipídios em outros substratos hidrofóbicos e com resíduos agroindustriais devem ser realizados para otimizar a co-produção destes metabólitos e aprofundar o entendimento nos mecanismos de biotransformação dos lipídios dos substratos em lipídios microbianos.

6. REFERÊNCIAS

- AOAC INTERNATIONAL, Official Procedure, Approved Procedure Ce 1-62 - Fatty Acid Composition by gas chromatography. **American Oil Chemists Society**. 2005.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties, and potential application. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- ANGERBAUER, C. et al. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3051–3056, 2008.
- BALDIOLI, M. et al. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p. 1589–1593, 1996.
- BARRIUSO, J. et al. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. **Biotechnology Advances**, 2016.
- BEOPOULOS, A. et al. Control of lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 24, p. 7779–89, 2008.
- BEOPOULOS, A.; NICAUD, J. Yeast : A new oil producer ? v. 19, n. 1, p. 22–28, 2012.
- BORNSCHEUER, U. T. et al. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433–7, out. 2002.
- CERTIK, M.; MEGOVA, J.; HORENITZKY, R. Effect of nitrogen sources on the activities of lipogenic enzymes in oleaginous fungus *Cunninghamella echinulata*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 45, n. 6, p. 289–293, 1999.
- CHANG, Y. H. et al. Microbial lipid production by oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in the batch cultures using corn cob hydrolysate as carbon source. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 95–103, 2015.
- CHATZIFRAGKOU, A. et al. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, v. 36, n. 2, p. 1097–1108, 2011.
- CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 173–180, 1999.

- DARVISHI, F. et al. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2009, p. 562943, 2009.
- EVANS, C. T.; RATLEDGE, C. Effect of Nitrogen Source on Lipid Accumulation in Oleaginous Yeasts. **Microbiology**, v. 130, n. 1984, p. 1693–1704, 1984.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**, Maryland, **226**, p. 497-509, 1957.
- HUGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 497–507, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, set. 1998.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–7, ago. 2002.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Review Article Lipids of oleaginous yeasts . Part I: Biochemistry of single cell oil production. p. 1031–1051, 2011.
- PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRÁNYIK, T. Advanced Fermentation Processes. **Engineering Aspects of Food Biotechnology**, n. August 2013, p. 89–110, 2013.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current opinion in chemical biology**, v. 6, n. 2, p. 145–50, abr. 2002.
- SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, M. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science**, n. 0, 2015.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

- THEVENIEAU, F.; NICAUD, J. Microorganisms as sources of oils. v. 20, n. 6, p. 1–8, 2013.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, 13, 42-43, 1956.
- WYCHEN, S. VAN; RAMIREZ, K.; LAURENS, L. M. L. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. **Contract**, v. 303, n. December, p. 275–3000, 2015.
- ZHANG, J. et al. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1906–1911, 2011.
- ZHANG, H. et al. Enhanced lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica* by over-expression of ATP: Citrate lyase from *Mus musculus*. **Journal of Biotechnology**, v. 192, n. Part A, p. 78–84, 2014.

CAPÍTULO 3

Encapsulação da lipase de *Candida viswanathii* em alginato de sódio e hidrólise da gordura de frango em biorreator tipo cesto

RESUMO

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. Contudo, a imobilização dessas enzimas as torna ainda mais promissoras, de modo que são requeridas para aplicação em uma ampla gama de indústrias, bem como na hidrólise de lipídios produzindo ácidos graxos de grande interesse. Assim, o objetivo deste estudo foi a encapsulação da lipase de *Candida viswanathii* em alginato e avaliação do seu potencial para hidrólise da gordura de frango em biorreator tipo cesto. Desse modo, estudou-se a influência do diâmetro da esfera e da concentração de alginato, obtendo-se o melhor diâmetro de 2 mm e concentração de 2% de alginato, com atividade enzimática de 13,42 U/g e 28 U/g, respectivamente. Utilizou-se alginato de sódio em sua forma convencional e modificado com glutaraldeído, álcool polivinílico e carboximetilcelulose, sendo que o alginato na forma convencional foi o que apresentou melhores resultados, obtendo-se 28,6 U/g e mais de 50% de atividade após 15 ciclos de reuso. A caracterização da lipase livre e encapsulada de *C. viswanathii* revelou temperatura ótima de atividade de 35 °C para a enzima encapsulada e na faixa de 40 – 45 °C para a lipase livre sobre a hidrólise do palmitato de paranitrofenila (p-NPP). Sobre a hidrólise de gordura de frango, tanto enzima livre quanto encapsulada apresentaram temperatura ótima de atividade à 40 °C. Quanto à estabilidade térmica, a enzima livre apresentou boa estabilidade até 12h de incubação nas temperaturas de 30 e 40 °C. Já a enzima encapsulada mostrou-se estável em até 72 horas de incubação nas mesmas temperaturas. A enzima livre apresentou aumento de atividade na presença de NH₄Cl e CaCl₂ (117,50% e 111,25%, respectivamente). Já a lipase encapsulada apresentou aumento na atividade com todos os íons analisados, sendo CaCl₂ (152,94%), NH₄Cl (145,88%), BaCl₂ (144,12%) e NaCl (138,24%). Em relação à hidrólise, observou-se que tanto a enzima livre como encapsulada apresentaram maior atividade hidrolítica após 96 horas de incubação, em que a enzima encapsulada obteve 34,66% de hidrólise e a enzima livre obteve 17,91% de hidrólise. Assim, a lipase encapsulada de *Candida viswanathii* apresentou boa estabilidade e potencial para aplicação na hidrólise de gordura de frango.

Palavras-chave: Levedura Lipolítica; Encapsulação; Hidrólise; Gordura.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3) are enzymes that catalyze the hydrolysis of triglyceride ester bonds in diglycerides, monoglycerides, fatty acids and glycerol. However, the immobilization of these enzymes makes them even more promising, so they are required for application in a wide range of industries, as well as in lipid hydrolysis producing fatty acids of great interest. Thus, the objective of this study was the encapsulation of *Candida viswanathii* lipase in sodium alginate and evaluation of its potential for hydrolysis of poultry fat in a basket-type bioreactor. Thus, the influence of the ball diameter and alginate concentration was studied, obtaining the best 2 mm diameter and 2% alginate concentration, with enzymatic activity of 13.42 U/g and 28 U/g, respectively. Sodium alginate was used in its conventional form and modified with glutaraldehyde, polyvinyl alcohol and carboxymethylcellulose, and the alginate in the conventional form gave the best results, obtaining 28.6 U/g. In addition, the enzyme encapsulated in conventional sodium alginate showed 100% activity in the first 6 cycles and more than 50% activity after 15 cycles of reuse. The free and encapsulated lipase characterization of *C. viswanathii* revealed optimal activity temperature of 35 °C for the encapsulated enzyme and in the 40-45 °C range for free lipase on the hydrolysis of p-NPP. On the hydrolysis of poultry fat, both free and encapsulated enzyme had an optimum temperature of activity at 40 °C. As for thermal stability, the free enzyme presented good stability up to 12 h of incubation at temperatures of 30 and 40 °C. The encapsulated enzyme was stable in up to 72 hours of incubation at the same temperatures. The free enzyme presented increased activity in the presence of NH₄Cl and CaCl₂ (117.50% and 111.25%, respectively). In addition, the encapsulated lipase presented increased activity with all the ions analyzed, being CaCl₂ (152.94%), NH₄Cl (145.88%), BaCl₂ (144.12%) and NaCl (138.24%). In relation to the hydrolysis, it was observed that both the free and encapsulated enzyme presented higher hydrolytic activity after 96 hours of incubation, in which the encapsulated enzyme obtained 34.66% hydrolysis and the free enzyme obtained 17.91% hydrolysis. Thus, the encapsulated lipase of *Candida viswanathii* showed good stability and potential for application in poultry fat hydrolysis.

Keywords: Lipolytic Yeast; Encapsulation; Hydrolysis; Fat.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol, e são consideradas as enzimas mais importantes entre as enzimas industriais (BARRIUSO et al., 2016; BRÍGIDA et al., 2014; FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011). São utilizadas em uma ampla gama de aplicações, como na indústria de detergentes (HASAN et al., 2010), indústria alimentícia (GANDRA et al., 2008), tratamento de efluentes (MENDES et al., 2005) e produção de biodiesel (YU et al., 2013), entre outros.

No entanto, as enzimas podem tornar o processo oneroso, sendo que em muitos casos é requerida a sua recuperação e reuso para tornar o processo economicamente viável (MATEO et al., 2007). Nesse contexto, destaca-se a imobilização enzimática, que apresenta vantagens como redução do volume de reação, melhoria da estabilidade da enzima e sua reutilização, facilidade de controle do processo e purificação do produto e redução de inibidores (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; ÖZTÜRK, 2001).

A classificação dos métodos de imobilização de enzima compreende ligações covalentes da enzima a uma matriz insolúvel; ligação cruzada intermolecular, utilizando reagentes funcionais; adsorção a uma matriz insolúvel em água; aprisionamento dentro de uma estrutura insolúvel em água ou membranas semipermeáveis (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Em relação a lipases, os principais métodos utilizados incluem adsorção, ligação covalente e encapsulação (ABDULLA; RAVINDRA, 2013; ELAKKIYA; PRABHAKARAN; THIRUMARIMURUGAN, 2016; NIKPOUR; PAZOUKI; DASHT, 2016); sendo que a encapsulação é vantajosa por imobilizar a enzima em uma membrana semipermeável, que impõe uma barreira física, mas não restringe sua mobilidade, além de favorecer uma maior área de superfície entre o substrato e a enzima (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A utilização de lipases imobilizadas torna essas enzimas ainda mais promissoras, de modo que são requeridas para aplicação em uma ampla gama de indústrias (NISHA; ARUN; GOBI, 2012; PATEL et al., 2016). Nesse contexto, deve-se dar atenção à hidrólise de lipídios, uma vez que as desvantagens da hidrólise convencional podem ser evitadas pelo processo catalisado por lipase, sendo um procedimento operacional simples, de baixo custo e que

minimiza a degradação térmica dos produtos. Além disso, ácidos graxos produzidos a partir de hidrólise de óleos e gorduras por técnicas enzimáticas naturais são mais preferíveis, especialmente em indústrias de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (GUPTA, 2016).

Outro ponto importante é que entre óleos e gorduras utilizados nesses processos de hidrólise, destaca-se a gordura de frango, que apresenta grande proporção de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, sendo que seus ácidos graxos insaturados são bastante desejáveis, o que torna a gordura de frango mais promissora que outras gorduras animais (CENTENARO; FURLAN; DE SOUZA-SOARES, 2008; LEE; FOGLIA, 2000). Desse modo, este trabalho objetivou encapsular a lipase de *Candida viswanathii* em alginato e avaliar seu potencial para hidrólise da gordura de frango em biorreator tipo cesto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção da linhagem

A linhagem *Candida viswanathii* é mantida no Laboratório de Biotecnologia e Análise de Alimentos e Purificação de Produtos (LABAP), Habite – Incubadora de Empresas de Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi-TO. Cultivos periódicos foram realizados em meio BDA a 30 °C, por 3 dias. Cultura estoque da linhagem é mantida em geladeira a 4 °C pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1967).

2.2 Condições de cultivo e obtenção do extrato proteico extracelular

Cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100 ml, contendo 20 ml de meio líquido de Vogel (VOGEL, 1956) que foram preparados com as seguintes modificações: 1,0% (p/v) de azeite de oliva e 0,2% (p/v) de extrato de levedura; pH inicial 6,0 e previamente autoclavados a 121 °C, por 30 min. Os meios de cultivo foram então inoculados com 1 ml de uma suspensão contendo 10^7 células/ml e mantidos por 72 horas, sob agitação orbital de 180 rpm, a 28 °C. Após o crescimento, as células foram separadas do meio por centrifugação (8500xg, 30 min, 4 °C) e o sobrenadante submetido a liofilização para posterior utilização como preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada por método espectrofotométrico pela hidrólise de palmitato de p-nitrofenila; e por método titulométrico, pela hidrólise de gordura de frango.

2.3.1 Atividade enzimática por método espectrofotométrico

A atividade da lipase foi determinada utilizando palmitato de p-nitrofenila (pNPP) como substrato. O meio reacional utilizado foi composto por 3,8 mg de pNPP solubilizado em 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 4,0

contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do p-nitrofenol. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 900 µl de meio reacional e pré-incubou-se em banho-maria por cerca de 5 min. Para a enzima livre, a reação foi iniciada pela adição de 100 µl da amostra devidamente diluída, e após 1 min a reação foi interrompida com choque térmico (90 °C, 1 min), seguida pela adição de 1 ml de solução saturada de tetraborato de sódio decahidratado. Já para a enzima imobilizada, adicionou-se 0,1g de esferas para início da reação, que foi interrompida retirando-se 100 µl e adicionando-se em banho-maria a 90 °C por 1 min, seguida pela adição de 100 µl de solução saturada de tetraborato de sódio decahidratado. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata e a leitura da absorbância foi realizada a 405 nm (Coeficiente de extinção molar (ϵ) do pNP: 22363 M⁻¹.cm⁻¹). Os controles (brancos) foram preparados sem adicionar a enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de pNP por min por ml.

2.3.2 Atividade enzimática por método titulométrico

A hidrólise de gordura de frango foi desenvolvida a 40 ° C seguindo-se os ácidos graxos liberados por titulação. A gordura de frango (10%, p/v) foi emulsionada em tampão de McIlvaine de pH 4,0, contendo 5% (p/v) de Triton X-100. Para a enzima livre, a reação foi iniciada pela adição de 1 ml de amostra a 5 ml da emulsão, e para a enzima imobilizada foi iniciada pela adição de 1 g de esferas. Ambas foram mantidas durante 30 min a 300 rpm de agitação orbital. A reação foi interrompida pela adição de 16 ml de uma mistura de acetona: solução de etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados até pH 11 com uma solução 0,05 M de NaOH. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por ml por min. Os resultados foram expressos como porcentagem de gordura hidrolisada.

2.4 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) utilizando soro albumina bovina como padrão.

2.5 Imobilização da lipase de *C. viswanathii*

2.5.1 Alginato e imobilização

As soluções de alginato foram preparadas dissolvendo o alginato sólido em água destilada na concentração desejada. Extrato enzimático e solução de alginato foram misturados em vórtex formando um volume total de oito mililitros. A mistura alginato/extrato enzimático foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2M sob constante agitação com o uso de agitador magnético. As esferas de alginato recém-formadas permaneceram por mais 20 minutos na solução para garantir total solidificação das partículas, sendo em seguida separadas da solução de cálcio com o uso de papel de filtro e lavadas com água destilada. A solução de cálcio e lavagens foram reservadas e utilizadas para análises enzimáticas e conteúdo proteico (WON et al., 2005).

2.5.2 Influência das variáveis na imobilização de lipase de *C. viswanathii*

2.5.2.1 Diâmetro da esfera

O diâmetro das esferas foi avaliado em utilizando diferentes tamanhos de agulhas: 1 mm e 2 mm, utilizou-se Seringa BD Ultra-Fine™ II Calibre 30G; e 3 mm, utilizou-se Seringa Calibre 22G. O procedimento de imobilização foi realizado nas condições anteriormente citadas.

2.5.2.2 Concentração de alginato

Foram testadas quatro concentrações de alginato: 1, 2, 3 e 4%, sendo o procedimento de imobilização realizado nas condições anteriormente citadas.

2.5.3 Modificação de alginato para imobilização de lipase de *C. viswanathii*

2.5.3.1 Modificação por Glutaraldeído

Adicionou-se 0,8 ml de solução de glutaraldeído (25%, p/p) em 20 ml de uma solução de alginato de sódio (2%, p/p). A mistura foi agitada durante 5 min, seguido por adição de 250µl de solução de lipase, resultando em uma solução diluída 40x. A mistura foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2M sob constante agitação com o uso de agitador magnético. A mistura foi agitada durante 10 min e as esferas foram recolhidos por filtração, e depois lavadas com água destilada.

2.5.3.2 Modificação por Álcool Polivinílico (PVA)

Uma solução de álcool polivinílico (10%, p/p) foi misturada a uma solução de alginato de sódio (2%, p/p), até dissolver completamente. Em seguida, adicionou-se 250µl de solução de lipase, resultando em uma solução diluída 40x. A mistura foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2M sob constante agitação com o uso de agitador magnético. A mistura foi agitada durante 10 min e as esferas foram recolhidas por filtração e lavadas com água destilada.

2.5.3.3 Modificação por Carboximetilcelulose (CMC)

Misturou-se uma solução de carboximetilcelulose (1%, p/p) a uma solução de alginato de sódio (2%, p/p), até dissolver completamente. Adicionou-se 250µl de solução de lipase, resultando em uma solução diluída 40x, e a mistura foi, então, gotejada em solução precipitante de cloreto de cálcio sob constante agitação com o uso de agitador magnético. Outras modificações foram feitas adicionando-se solução de glutaraldeído (25%, p/p) e de álcool polivinílico (10%, p/p) à mistura. A estas modificações adicionou-se 250µl de solução de lipase, resultando em uma solução diluída 40x. As misturas foram, então, gotejadas em solução precipitante de cloreto de cálcio 0,2M sob constante agitação com o uso de agitador magnético, deixadas sob agitação durante 10 min e as esferas foram recolhidas por filtração, e depois lavadas com água destilada.

2.5.4 Cálculos dos parâmetros de imobilização

2.5.4.1 Atividade Específica

Relaciona a atividade da enzima por massa de proteínas totais contida na solução avaliada.

$$\text{Atividade Específica } (A_e) = \frac{A}{P_t} (U/mg)$$

Onde:

A = Atividade enzimática (U/g)

P_t = Proteína Total (mg/g)

2.5.4.2 Taxa de imobilização

Relaciona a atividade específica da enzima imobilizada e atividade específica no extrato bruto enzimático usado na imobilização.

$$\text{Taxa de imobilização } (\%) = \frac{A_{e(im)}}{A_{e(l)}} * 100$$

Onde:

A_{e(im)} = Atividade específica da enzima imobilizada

A_{e(l)} = Atividade específica da enzima livre

2.5.4.3 Rendimento da imobilização

Relaciona a atividade enzimática da lipase livre antes da imobilização e a atividade no sobrenadante de filtração das esferas após a imobilização.

$$\text{Rendimento da imobilização} = \frac{A_l - A_s}{A_l} * 100$$

Onde:

A_l = Atividade enzimática antes da imobilização

A_s = Atividade no sobrenadante de filtração das esferas

2.6 Caracterização da lipase de *C. viswanathii* livre e imobilizada

2.6.1 Determinação da temperatura ótima de atividade

A temperatura ótima de atividade da enzima livre e imobilizada foi determinada nas temperaturas de 20 a 60 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão McIlvaine pH 4,0. A enzima foi convenientemente diluída no mesmo tampão e a atividade determinada conforme os itens 2.3.1 e 2.3.2.

2.6.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi avaliada pela incubação das amostras em diferentes temperaturas na ausência do substrato, sendo incubadas a 30, 40, 50 e 60 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo variados, transferidas para banho de gelo, e então utilizadas para a determinação da atividade residual, que foi ensaiada pelo método espectrofotométrico nas condições anteriormente citadas. A partir dos resultados obtidos, calculou-se a energia de ativação (E_a) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (JAVED et al., 2009):

$$\ln Kd = -\frac{E_a}{RT}$$

Onde:

E_a = Energia de ativação

Kd = Constante de primeira ordem para inativação

R = Constante dos gases = 8,314 kJ mol⁻¹

T = Temperatura Absoluta (em Kelvin)

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{Kd}$$

Onde:

$t_{1/2}$ = Meia-vida

Kd = Constante de primeira ordem para inativação

2.6.3 Efeito de íons metálicos

O efeito de íons metálicos sobre a atividade da enzima livre e imobilizada foi avaliado pela adição das mesmas às misturas de reação, realizando-se o cálculo das atividades em relação ao controle que não continha nenhuma dessas substâncias. Foram avaliados os efeitos das seguintes substâncias: cloreto de cálcio, cloreto de bário, cloreto de amônia, cloreto de sódio, na concentração de 10 mM. A dosagem da atividade de lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C, pelo método titulométrico.

2.6.4 Reuso da lipase imobilizada

O reuso da enzima imobilizada foi realizado em frascos erlenmeyer contendo 0,1g do derivado da imobilização no meio reacional com 0,5 mM p-nitrofenil palmitato como anteriormente descrito. Decorrido o tempo de reação, o meio foi removido e o derivado da imobilização lavado duas vezes com água destilada. Em seguida, um novo ciclo de reação foi iniciado adicionando-se novo meio reacional com substrato. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7 Hidrólise de gordura de frango por lipase de *C. viswanathii* livre e imobilizada em biorreator com agitação mecânica e do tipo cesto

A atividade hidrolítica da lipase foi realizada em biorreator de 1 litro, sendo o volume da reação de 800 ml, e determinada utilizando método de titulação modificado. A hidrólise da gordura de frango foi determinada a 40 °C, sendo em seguida, determinada a liberação de ácidos graxos por titulação. A hidrólise foi realizada utilizando-se 10% de gordura de frango (p/v) emulsificada em tampão McIlvaine pH 4,0, contendo 5% (p/v) Triton X-100 . A reação foi iniciada com a adição da lipase livre à emulsão e depois mantida sob agitação orbital durante 120 horas. O mesmo procedimento foi realizado para a enzima imobilizada. Em intervalos de 24 horas uma alíquota de 5 ml foi retirada e parou-se a reação adicionando 16 ml de uma solução de acetona: etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,1 M. Os resultados foram expressos como percentagem de gordura de frango hidrolisada, e o valor da conversão é calculado a partir da seguinte equação (NOOR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003):

$$X = \frac{W(V - V_0)M}{10mf_0}$$

Onde:

X = grau de hidrólise (%);

W = peso molecular médio dos ácidos graxos da gordura de frango (277,3 g.mol⁻¹);

V = volume (ml) da solução de NaOH titulada para a amostra;

V₀ = volume (ml) da solução de NaOH titulada para o controle;

M = molaridade da solução de NaOH = 0,05M;

m = peso da amostra (g); e

F₀ = fração em peso de óleo no início da reação.

E a taxa de reação é dada por:

$$r_0 = \frac{10^4 S_0}{W} \left(\frac{dX}{dt} \right)_{t=0}$$

Onde:

r₀ = Taxa inicial de hidrólise (mmol/L/min);

S₀ = Concentração inicial do óleo (g/L);

W = peso molecular médio dos ácidos graxos da gordura de frango (277,3 g.mol⁻¹);

(dX/dt)_{t=0} = Inclinação do grau de hidrólise (X) versus curva do tempo t=0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência de variáveis sobre a imobilização da lipase de *C. viswanathii*

A encapsulação da lipase em alginato de sódio com solução de íons cálcio foi analisada em diferentes diâmetros de esferas (Tabela 1). A adição de 20 unidades de lipase em 10 ml da solução de alginato de sódio permitiu a obtenção de 1,32 g de esferas de alginato de sódio com a enzima encapsulada. Nestas condições, a maior atividade recuperada da enzima encapsulada foi com as esferas de 2 mm de diâmetro (13,42 U/g de esferas). O diâmetro de 1,0 mm e 3,0 mm proporcionaram menores atividades da enzima encapsulada (9,57 e 11,79 U/g de esferas, respectivamente).

Tabela 1: Influência do diâmetro da esfera na imobilização de lipase de *C. viswanathii*.

Diâmetro da Esfera (mm)	Atividade Enzimática (U/g)
1,0	9,57
2,0	13,42
3,0	11,79

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C.

O tamanho das esferas e concentração de alginato são parâmetros que influenciam diretamente na transferência de massa em enzimas encapsuladas. As enzimas em esferas menores podem apresentar maior atividade catalítica devido à reduzida resistência de transferência de substrato (BHUSHAN et al., 2008; WON et al., 2005). Won et al. (2005) observaram que esferas de tamanho médio 1.1 e 3.4 mm não interferiram na atividade enzimática e não afetaram a eficiência de imobilização. Zeeb et al. (2015) também observaram os diâmetros de 2 a 3 mm como os melhores diâmetros médios das esferas produzidas. Pinto; Freire; Pinto (2014) indicam a ausência de correlação significativa entre os diâmetros de poros e a retenção de atividade e entre as características dos poros e o nível de carga de proteína em suportes de diferentes composições.

Os resultados observados para a encapsulação da lipase de *C. viswanathii* em diferentes tamanhos de esferas de alginato mostram que as esferas entre 1 e 3 mm apresentaram valores de atividade enzimática muito próximo (~10 a 13 U/g de esferas). A encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio em esferas de vários tamanhos mostrou que esferas entre 1 a 3 mm de diâmetros apresentaram melhores condições de atividade enzimática, podendo indicar maior contato entre a solução precipitante e a solução enzima/alginato de modo a favorecer a separação de proteínas contaminantes durante o tempo de solidificação do polímero (MARQUES, 2011).

O efeito da concentração do alginato de sódio sobre a encapsulação da lipase de *C. viswanathii* foi avaliado utilizando esferas de 2 mm de diâmetro (Figura 1). A maior atividade enzimática foi observada com a concentração de 2% de alginato de sódio (28,58 U/g de esferas), seguida por 1% (25,39 U/g de esferas). Com as concentrações de 3% e 4% observou-se as atividades de 13,29 e 15,82 U/g, respectivamente.

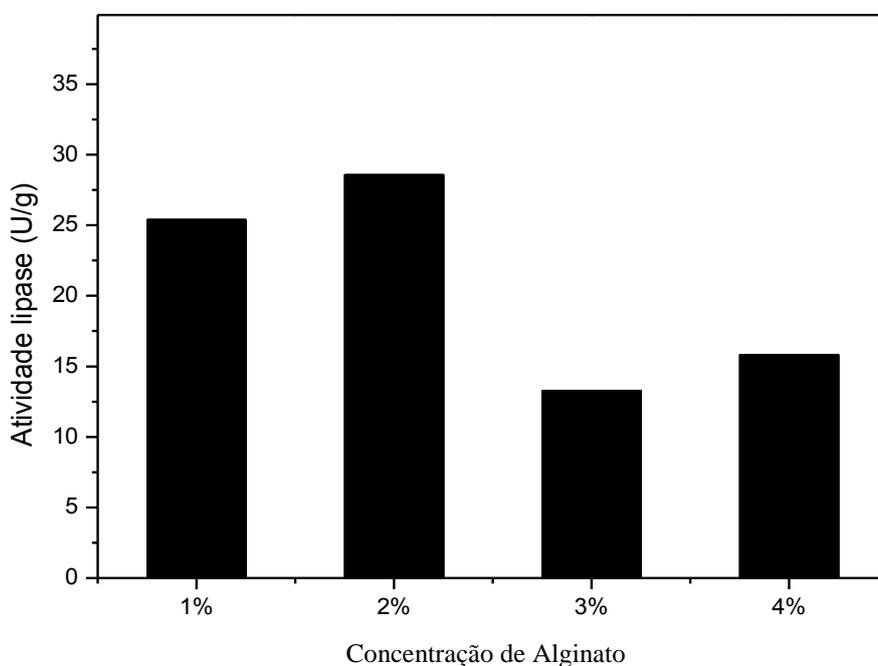


Figura 1: Efeito da concentração de alginato de sódio sobre a atividade enzimática de lipase produzida por *C. viswanathii*.

A ligação cruzada entre o alginato de sódio e os íons cálcio, que conduz à gelificação e a retenção da lipase no gel, está diretamente relacionada com as concentrações de ambos os constituintes. Won et al. (2005) avaliaram as concentrações de 1 a 2% de alginato para a encapsulação da lipase de *Candida rugosa*. A melhor concentração observada foi de 1% de alginato, tendo como parâmetro de análise a eficiência da encapsulação. Marques (2011) avaliou diferentes concentrações de alginato de sódio (1 a 3%) para a encapsulação da lipase de *Burkholderia cepacia*. Os autores observaram diminuição no valor da resposta da atividade enzimática de acordo com o aumento da concentração de alginato, indicando que quanto menor a concentração de alginato melhores os resultados obtidos. No entanto, essa concentração não deve ser demasiada pequena, pois pode levar à perda de forma e/ou quebra da esfera na solução precipitante, por levar maior tempo de solidificação. Outros estudos na literatura, obtiveram melhores resultados com a concentração de 1,5% de alginato para a encapsulação da lipase de *Arthrobacter* sp. (BHUSHAN et al., 2008) e com a concentração de 4% para a encapsulação de lacase e CMCase, respectivamente (NOREEN et al., 2016; SIDDIQUI; SIDDIQUI; VARMA, 2016).

A concentração do alginato altera a morfologia da esfera com relação ao tamanho dos poros e sua superfície. A adição de outros componentes ao alginato também pode alterar essas características e sua performance devido a alteração da conformação da enzima encapsulada. Assim, a modificação do alginato de sódio para a encapsulação de enzimas deve ser estudada para alcançar melhores rendimentos no processo.

3.2 Modificação de alginato para encapsulação da lipase de *C. viswanathii*

A imobilização de lipase foi realizada utilizando-se como polímero principal o alginato de sódio na concentração de 2% e as modificações realizadas empregando-se glutaraldeído, álcool polivinílico e carboximetilcelulose. Observam-se melhores resultados com a utilização de alginato convencional no que diz respeito a valores de atividade enzimática e proteína total separadamente, obtendo-se 28,60 U/g e 25,13 mg/g, respectivamente (Tabela 2). No entanto, esses resultados não se mantêm quando se observam resultados de atividade específica e taxa de imobilização, em que a imobilização somente com

alginate convencional obteve os valores mais baixos, 0,53 U/mg e 2,06%, respectivamente; sendo os melhores resultados observados com a matriz formada por alginato/carboximetilcelulose, com valores de 72,27 U/mg para atividade específica e 281,49% de taxa de imobilização. Valores maiores que 100% de taxa de imobilização também foram obtidos com matriz formada por alginato/glutaraldeído (155,33%), com atividade específica de 39,88 U/mg.

Wu et al. (2006) afirmam que a reticulação de biocatalisadores com reagentes bifuncionais como o glutaraldeído tem sido amplamente estudada devido ao seu baixo custo, alta eficiência e estabilização significativa dos biocatalisadores, de modo que favorece inicialmente o *cross-linking* das enzimas pela ação de glutaraldeído para posterior aprisionamento em esferas de alginato. Esses autores obtiveram resultados iguais a 2,1 mmol.h⁻¹.g⁻¹ (peso úmido de conjugado imobilizado) e atividade recuperada de 117% fazendo uso de glutaraldeído para *cross-linking* das enzimas na presença de 2-propanol.

Já o estudo de Cavalcante (2014) com lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em organo-géis à base de alginato de sódio ativadas com glutaraldeído 2% (v/v) apresentou valores de rendimento e eficiência 82,6 % e 0,5 % m/v, respectivamente na presença de hexano, e 60,6 % e eficiência 1,0 % na presença de heptano, chegando-se à conclusão que quantidades de glutaraldeído na etapa de reticulação do suporte provocaram uma diminuição na atividade dos derivados, bem como, uma redução nos tempos de meia-vida dos biocatalisadores produzidos.

Dalla-Vecchia et al. (2005) estudaram o efeito da imobilização de lipase de *Rhizopus oryzae* com carboximetilcelulose, álcool polivinílico e carboximetilcelulose/álcool polivinílico, afirmando que tais polímeros podem ser utilizados com sucesso como materiais alternativos para imobilização de lipases.

Tabela 2: Imobilização da lipase de *C.viswanathii* em diferentes métodos de modificação.

	Atividade	Proteína	Atividade	Taxa de	Rendimento
Imobilização	Enzimática	Total	Específica	Imobilização	Imobilização
	(U/g)	(mg/g)	(U/mg)	(%)	(%)
Extrato Bruto	8628,02	336,04	25,68	-	-
Alginato	28,60	25,13	0,53	2,06	99,91
Alginato+PVA	11,70	2,03	5,77	22,48	99,71
Alginato+Glu	10,90	0,27	39,88	155,33	99,93
Alginato+CMC	12,76	0,18	72,27	281,49	99,90
Alginato+CMC+PVA	12,63	1,74	7,27	28,32	99,91
Alginato+CMC+Glu	10,77	0,47	23,07	89,84	99,92

No que diz respeito ao rendimento da imobilização, observam-se valores praticamente idênticos entre os diversos tipos de matrizes avaliadas e, por esse motivo, optou-se por realizar um estudo de reutilização da lipase de *C. viswanathii* imobilizada nos diferentes métodos de modificação.

3.3 Reuso da lipase encapsulada

O reuso da lipase encapsulada foi avaliado em frascos Erlenmeyer (125 ml) contendo 0,1g do derivado da imobilização no meio reacional com 0,5 mM p-nitrofenil palmitato. Após cada ciclo, a enzima encapsulada foi lavada com água destilada e tampão McIlvaine e, então, novo meio reacional foi adicionado para determinar a atividade enzimática. Os resultados mostraram que a enzima encapsulada em alginato de sódio convencional apresentou 100% de

atividade nos 6 primeiros ciclos e mais de 50% de atividade após 15 ciclos de reuso, sendo que a redução na atividade se dá, provavelmente, pela liberação da enzima do suporte para o meio reacional (Figura 2). As enzimas encapsulada em alginato/CMC, alginato/glu, alginato/glu/CMC e alginato/PVA/CMC apresentaram reuso de quatro ciclo (~50% da atividade), enquanto que em alginato/PVA apresentou reuso de apenas 2 ciclos.

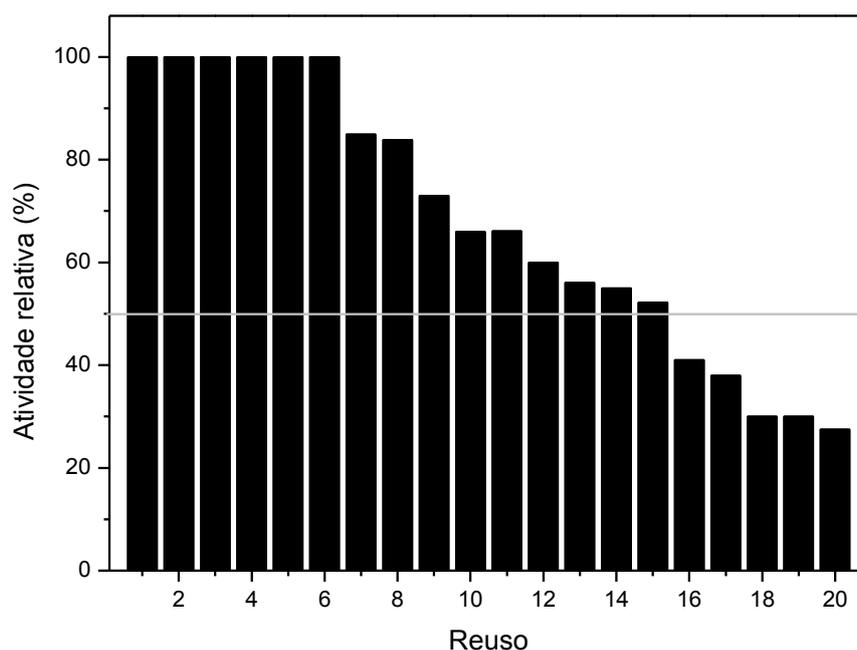


Figura 2: Reutilização da lipase de *C. viswanathii* imobilizada em alginato convencional. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C.

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentam-se semelhantes aos encontrados na literatura. A lipase de *Burkholderia cepacia* encapsulada em alginato e k-carragenina apresentou 75,54% de atividade residual após 10 ciclos de reutilização (ABDULLA; RAVINDRA, 2013). Chen et al. (2016) observaram retenção de 50% de atividade relativa em 10 ciclos de reuso da lipase de *Candida rugosa* encapsulada em microesferas funcionais de polifosfazeno ciclomatriz (PMS). Bhushan et al. (2008) também observaram reuso de 10 ciclos da lipase de *Arthrobacter* sp. encapsulada em alginato.

3.4 Caracterização operacional da lipase de *C. viswanathii* livre e encapsulada

3.4.1 Efeito da temperatura sobre a atividade

A Figura 3 apresenta a temperatura ótima de atividade da enzima livre e encapsulada sobre a hidrólise de palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) e da gordura de frango. A atividade enzimática máxima da enzima livre (100%) sobre a hidrólise do p-NPP foi obtida na temperatura entre 40 e 45 °C (111, 14 e 111,61 U/ml, respectivamente) (Figura 3A). A atividade de lipase apresentou elevação contínua até 45 °C, sendo observada queda nas demais temperaturas para 84,67% em 50 °C, 78,00% em 55 °C e 58,81% em 60 °C. A enzima encapsulada apresentou atividade ótima (100%) à 35 °C. Com o aumento da temperatura, observou-se queda de atividade, 92,61%, 89,49%, 71,02% e 59,66% de atividade nas temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C, respectivamente; chegando a 28,70% na temperatura de 60 °C.

Monier; El-Sokkary; Sarhan (2010) estudaram a temperatura ótima de atividade de lipase de *C. rugosa*, em que a temperatura ótima tanto para a lipase imobilizada quanto para a lipase livre foi de 40 °C. Almeida; Tauk-Tornisielo; Carmona (2013) observaram que a temperatura ótima de atividade da lipase de *C. viswanathii* livre e imobilizada foi de 40 °C. Lipase de *C. rugosa* foi avaliada no estudo de Chen et al. (2016), em que apresentou temperatura ótima de atividade a 30 °C para a enzima livre e de 33, 40 e 45 °C para a enzima imobilizada em VPMS (Microesfera de policiclotrifosfazeno), D-GPMS (Microesfera de policiclotrifosfazeno com glicose) e DPMS (Microesfera de policiclotrifosfazeno com dodecil), respectivamente.

Temperaturas ótimas de atividade mais elevadas são observadas para lipase imobilizada em PVDF-co-HFP (Polivinilideno-fluoreto-hexafluoropropileno), obtendo-se melhores resultados a 60 °C (KAYHAN; EYÜPOĞLU; ADEM, 2016) e para κ -carragenase, obtendo melhores resultados em 60 e 55 °C para enzima livre e imobilizada de *Pseudoalteromonas* sp., respectivamente (XIAO et al., 2016).

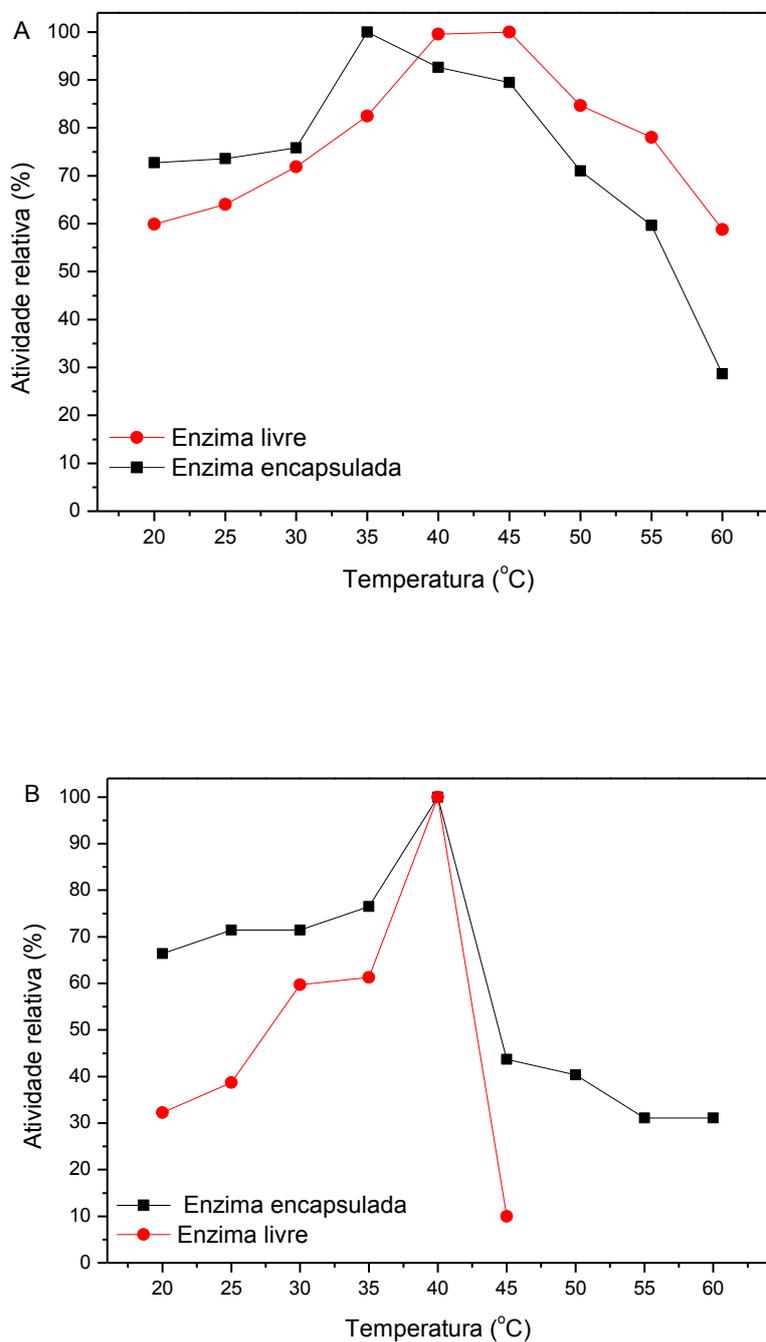


Figura 3: Temperatura ótima de atividade da lipase de *C. viswanathii* sobre a hidrólise de palmitato de p-nitrofenila (A) e gordura de frango (B), utilizando a enzima livre e encapsulada em alginato de sódio 2%. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH.

Na Figura 3B observa-se a temperatura ótima de atividade da enzima sobre a hidrólise de gordura de frango. A enzima livre apresentou elevada atividade enzimática nas temperaturas iniciais, sendo a atividade enzimática máxima obtida também na temperatura de 40 °C. No entanto, observa-se queda brusca de atividade após essa temperatura, obtendo-se 1,61% de atividade a 45 °C e nenhuma atividade nas demais temperaturas avaliadas. Em relação à enzima encapsulada, nota-se também atividade enzimática máxima na temperatura de 40 °C, com atividade acima de 70% nas temperaturas de 20 a 35 °C. Após a temperatura de 40 °C observa-se redução da atividade para 43,70% a 45 °C, para 40,34% a 50 °C e 31,09% nas temperaturas de 55 e 60 °C.

O presente estudo assemelha-se ao estudo de Silva; Contesini; Carvalho (2008) com lipase de *Aspergillus niger* na hidrólise de azeite de oliva, em que obtiveram temperatura ótima de 30 – 35 °C para enzima livre e 40 °C para enzima imobilizada. Temperaturas mais elevadas foram obtidas por Carvalho et al. (2013), que apontam temperatura ótima de atividade da lipase de *Bacillus* sp., livre e imobilizada, de 80 °C na hidrólise de azeite de oliva, sendo que a atividade relativa variou entre 75 e 100% na faixa de 25 a 100 °C. A lipase de *C. rugosa* apresentou temperatura ótima de 30 °C, tanto para enzima livre como imobilizada, sobre a hidrólise de azeite de oliva (MINOVSKA; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 2005).

A hidrólise de triacilgliceróis para produzir ácidos graxos livres e glicerol representa um grupo de reações químicas importantes para a transformação industrial de óleos e gorduras naturais, sendo a principal reação para a produção de ácidos graxos livres, que podem então ser interesterificados, transesterificados ou convertidos em álcoois graxos de alto valor (ROONEY; WEATHERLEY, 2001). Desse modo, a temperatura de reação é de suma importância, uma vez que pode proporcionar uma maior taxa de conversão, menor risco de contaminação microbiana, maior solubilidade dos substratos, e baixa viscosidade do meio reacional, o que favorece a transferência de massa (CARVALHO et al., 2013).

3.4.2 Estabilidade térmica

Na Figura 4 observa-se a estabilidade térmica da enzima livre e encapsulada, avaliada em tampão McIlvaine pH 4,0, na ausência de substrato. Observa-se que a estabilidade térmica da enzima foi aumentada após a encapsulação, uma vez que, quanto à

enzima livre, nota-se perda concomitante de atividade enzimática conforme o tempo de incubação, sendo que na temperatura de 30 °C observa-se 69,93% em 12 horas e menos de 50% de atividade em 24 horas de incubação (42,32%) (Figura 4A). Na temperatura de 40 °C observa-se atividade enzimática de 65,72% após 12 horas de incubação, mas em 18 horas de incubação, a enzima reteve 49,74% da sua atividade. Além disso, nota-se desativação da enzima antes mesmo de 10 horas de incubação nas temperaturas de 50 e 60 °C.

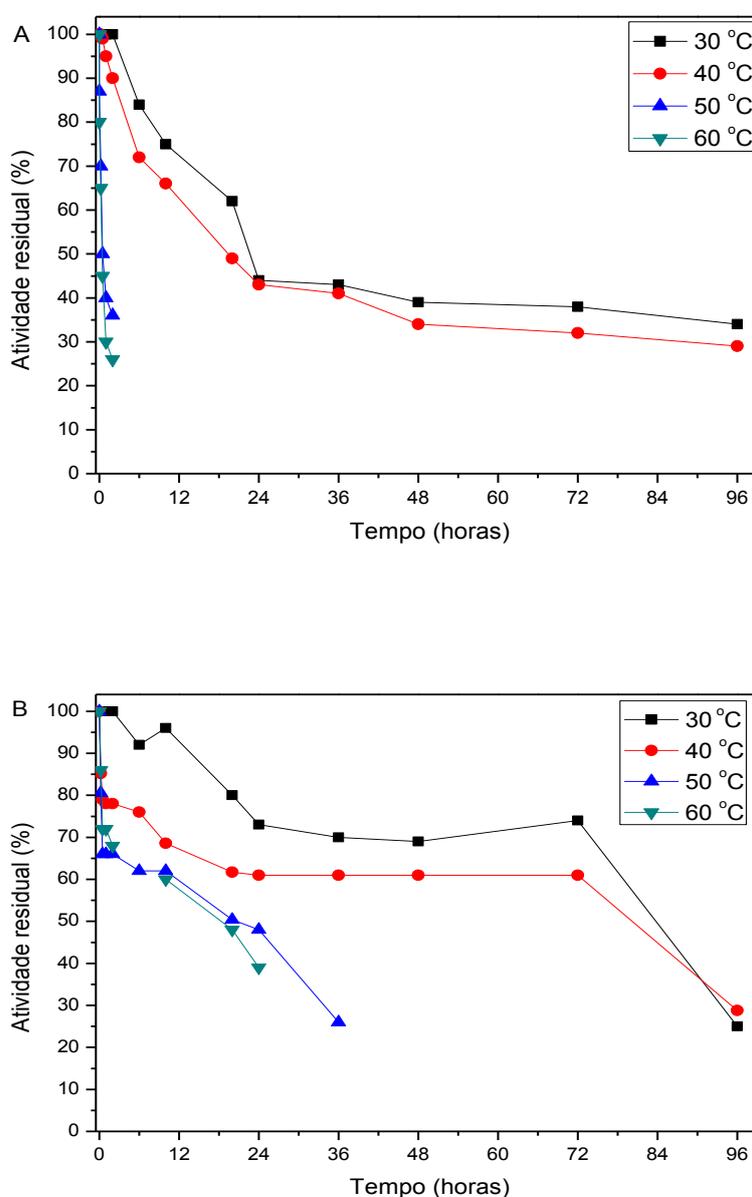


Figura 4: Termoestabilidade da lipase livre (A) e imobilizada (B) de *C. viswanathii*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C.

Em relação à enzima encapsulada, nota-se retenção de 62,10 e 61,17% de atividade relativa da enzima nas temperaturas de 30 e 40 °C até 72 horas de incubação, respectivamente; o que reflete maior estabilidade da enzima imobilizada em relação à enzima livre. Quanto às temperaturas de 50 e 60 °C, em ambas observa-se perda de mais de 50% de atividade em 16 horas de incubação, sendo observada maior estabilidade da enzima imobilizada nestas temperaturas que para a enzima livre.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos por Bhushan et al. (2008), em que a de *Arthrobacter* sp., apresentou maior estabilidade térmica após a encapsulação a 40 °C, e a enzima livre foi completamente desativada a 40 °C. Esses dados estão de acordo com a afirmação de Kartal; Akkaya; Kilinc (2009), de que a estabilidade térmica de uma enzima é melhorada quando acoplada a um portador polianiónico, sendo necessário ressaltar que devido ao seu carácter anfótero, as proteínas existem como polycations ou polianions, dependendo do pH do meio. Assim, podem formar complexos com polieletrólitos carregados de forma oposta, que é o caso do alginato, um polianiónico, que faz com que as interações entre eles permitem formar géis rígidos e, assim, mais proteção e estabilidade à enzima (HOMAEI, 2015).

A Tabela 3 apresenta os valores experimentais da constante de desativação (K_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para lipase livre e encapsulada, em função da temperatura. A partir da constante de desativação foi possível calcular a energia de ativação (E_a), a qual foi de 101,65 kJ.mol⁻¹ para a enzima livre e de 92,08 kJ.mol⁻¹ para a enzima encapsulada. Além disso, calculou-se o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), em que é possível observar que a 30 °C o ($t_{1/2}$) foi de 1372 min para a enzima livre e 1478 min para a enzima encapsulada. Nas temperaturas de 40 e 50 °C, obteve-se tempo de meia vida da enzima livre de 245 e 32 min, respectivamente; enquanto que para a enzima encapsulada o ($t_{1/2}$) foi de 266 e 53 min nessas mesmas temperaturas. No que diz respeito a temperatura de 60 °C, o tempo de meia vida foi de 9 e 19 min para enzima livre e encapsulada, respectivamente.

Com a observação dos resultados, pode-se notar que a enzima encapsulada apresentou-se mais estável que a enzima livre em todas as temperaturas observadas, sendo que a maior estabilidade foi observada na temperatura de 30 °C. Nelson; Cox (2014) relatam que durante uma reação a enzima tem a função de diminuir a energia de ativação, para que a reação ocorra no menor tempo. Heidtmann et al. (2012) em estudo da caracterização cinética

e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* também observou que a enzima foi mais estável em temperaturas próximas de 30 °C. A caracterização termoestável de lipase de *Bacillus sonorensis* mostra energia de ativação de 31,102 kJ.mol⁻¹, refletindo natureza altamente termoestável de lipases produzidas por *Bacillus* (BHOSALE; SHAHEEN; KADAM, 2016).

Tabela 3: Valores experimentais da constante de desativação (Kd) e tempo de meia-vida (t1/2) para lipase livre e encapsulada, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	Enzima Livre		Enzima Encapsulada	
		Kd (min)	t1/2(min)	Kd (min)	t1/2(min)
30	303	0,00047	1372	0,00046	1478
40	313	0,00260	245	0,00261	266
50	323	0,00131	32	0,00113	53
60	333	0,03470	9	0,02430	19

3.4.3 Efeito de íons metálicos

A Tabela 4 apresenta o efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e encapsulada. A enzima livre apresentou maior atividade na presença de NH₄Cl (117,50%), seguido pelo CaCl₂ (111,25%). Cloreto de bário e cloreto de sódio apresentaram pouco efeito sobre a atividade enzimática. A lipase encapsulada apresentou aumento na atividade com todos os íons analisados. A maior atividade foi observado com CaCl₂ (152,94%), seguido pelos íons NH₄Cl e BaCl₂ (145,88 e 144,12%, respectivamente). O íon NaCl promoveu um incremento na atividade de 138,24%.

Tabela 4: Efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*.

Íons (10 mM)	Atividade Relativa (%)	
	Enzima Livre	Enzima
		Imobilizada
Controle	100	100
BaCl ₂	104,58	144,12
CaCl ₂	111,25	152,94
NaCl	101,25	138,24
NH ₄ Cl	117,50	145,88

Os íons podem ter influência tanto positiva como negativa no que diz respeito à ligação enzima-substrato, isso porque podem inibir a ligação e assim diminuir a atividade enzimática, podendo também afetar a estrutura espacial da enzima e com isso gerar desnaturação. Por outro lado, os íons podem ativar a ligação enzima-substrato, melhorando esse complexo e aumentando a atividade enzimática, além de que determinados íons podem assumir a função de cofatores na ligação da enzima com o substrato, agindo como indutores e aumentando a atividade enzimática (NELSON; COX, 2014).

Desse modo, muitos autores relatam sobre o efeito estimulador que alguns íons exercem sobre a atividade da enzima, por exercer um efeito de rastreamento e dispersar as moléculas enzimáticas. Eles proporcionam uma força motriz para a ligação do substrato e catálise, reduzindo as barreiras de energia e aumentando a atividade enzimática através de transições conformacionais desencadeadas após a ligação a um local onde o íon não faz contato direto com o substrato (ABDULLA; RAVINDRA, 2013; CARVALHO et al., 2013).

Carvalho et al. (2013) observaram que na presença dos íons EDTA, Fe^{3+} ou Mn^{2+} , a lipase de *Bacillus* sp. imobilizada em matriz sol-gel apresentou maior atividade hidrolítica.

Öztürk (2001) observaram que íons de metais pesados podem inibir a atividade da lipase, enquanto que a maioria dos íons de metais alcalinos aumenta a atividade. Alguns dos íons relatados por inibir a atividade de lipase são Co^{2+} , Ni^{2+} e Hg^2 . Almeida; Tauk-Tornisielo; Carmona (2013) estudaram o efeito de íons metálicos sobre a atividade de lipase livre de *C. viswanathii* a 40 °C durante 1 h, à concentração final de 10 mM e 20 mM.. Nesse estudo, o autor observa que o íon Na aumentou a atividade, enquanto que Mg^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^- e Ca^{2+} não apresentaram efeito significativo sobre a atividade.

Na Figura 5 são apresentados os resultados para as diferentes concentrações dos íons analisados sobre a atividade da enzima livre e encapsulada. Todos os íons avaliados ativaram a lipase livre em todas as concentrações, exceto BaCl_2 na concentração de 40 mM e NaCl na concentração de 50 mM, que reduziram a atividade para 94,58% e 88,33%, respectivamente. O íon NH_4Cl promoveu ativação da enzima com um aumento de 145% na concentração de 50 mM (Figura 5A). Esses resultados também foram observados em relação à enzima imobilizada, em que NH_4Cl apresentou aumento da atividade enzimática nas concentrações do íon, alcançando 184,12% a 50 mM . Os demais íons metálicos avaliados também tiveram efeito de ativação da atividade de lipase encapsulada, sendo que BaCl_2 apresentou melhor resultado com concentração de 30 mM (165,88%), CaCl_2 na concentração de 40 mM (167,65%) e NaCl na concentração de 50 mM (150%).

Kanmani et al. (2015) observaram que baixas concentrações de diferentes sais metálicos (CaCl_2 , MgSO_4 , KCl, NaCl and CuSO_4) não exercem efeito significativo sobre a atividade da lipase de farelo de arroz livre. No entanto, inibiram a atividade da enzima imobilizada. Estes mesmos autores observaram que um aumento na concentração do íon Ca^{+2} reduziu a atividade da enzima livre de 97,63 para 64,51%, e da enzima imobilizada, de 78,18 para 26,56%. Por outro lado, Kanwar et al. (2006) observaram que na concentração de 1 mM dos íons Fe^{3+} , Hg^{2+} , NH_4^+ e Al^{3+} aumentaram as atividades hidrolíticas da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* livre e imobilizada, enquanto que os íons Co^{2+} inibiram de modo que a exposição de lipase livre ou imobilizada aos íons Fe^{3+} , Al^{3+} , NH_4^+ e Hg^{2+} a uma concentração de 5 mM aumentou fortemente a hidrólise do substrato, obtendo-se aumento da

atividade da lipase livre em 269, 387, 455 e 217% e para a lipase imobilizada em 297, 397, 478 e 170%, respectivamente, das suas atividades originais.

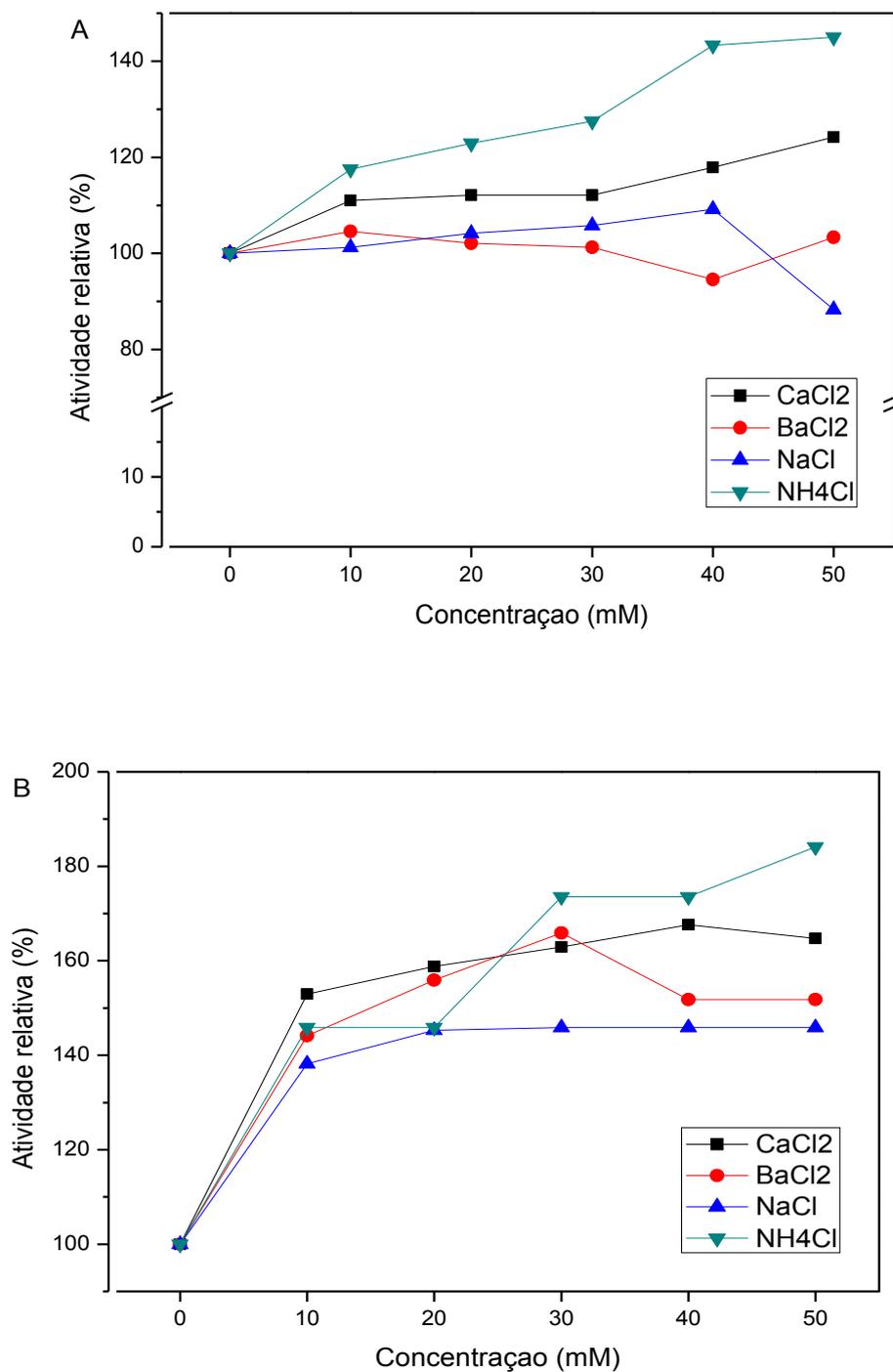


Figura 5: Efeito da concentração de íons metálicos sobre a atividade enzimática de lipase livre (A) e imobilizada (B) produzida por *C. viswanathii*.

3.5 Hidrólise de gordura de frango por lipase de *C. viswanathii* livre e imobilizada em biorreator do tipo cesto com agitação mecânica

A atividade hidrolítica de lipase de *C. viswanathii* livre e encapsulada sobre gordura de frango foi realizada em biorreator do tipo cesto (Figura 6), em que observa-se que tanto a enzima livre como encapsulada apresentaram maior atividade hidrolítica após 96 horas de incubação (Figura 7). A enzima encapsulada obteve 34,66% de hidrólise, sendo o grau de inclinação de hidrólise versus tempo em $(dX/dt)_{t=0}$ de 0,3086 e a taxa inicial de hidrólise nessa condição de 1112,8741 mmol/L/min. Observa-se que a enzima encapsulada foi bastante superior à enzima livre, a qual obteve 17,91% de hidrólise, com grau de inclinação de hidrólise versus tempo em $(dX/dt)_{t=0}$ de 0,1806 e taxa inicial de hidrólise de 651,2802 mmol/L/min.



Figura 6: Biorreator do tipo cesto com agitação mecânica.

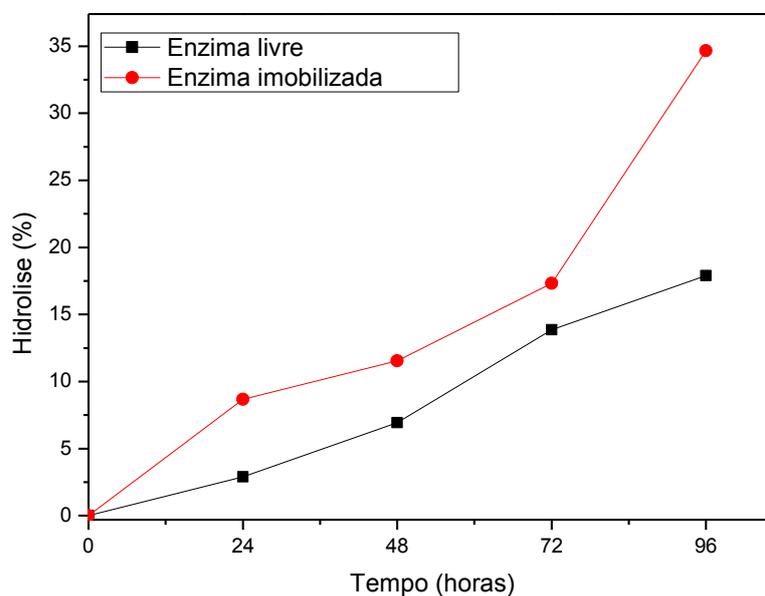


Figura 7: Perfil de hidrólise da gordura de frango por lipase de *C. viswanathii* livre e encapsulada.

Tabela 5: Parâmetros de hidrólise de gordura de frango utilizando lipase livre e encapsulada de *C. viswanathii*.

	r0	dX/dt	R2
Enzima livre	651,28	0,1806	0,9720
Enzima encapsulada	1.112,87	0,3086	0,9100

Dois requisitos são necessários para que ocorra o processo de hidrólise enzimática: a formação da interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface, sendo que uma interface maior favorece a adsorção de mais enzimas e com isso taxas mais altas de hidrólise. Desse modo, a utilização de técnicas que aumentem essa taxa de hidrólise é requerida, sendo uma dessas técnicas a utilização de lipases imobilizadas (BALCÃO et al., 1996; PIMENTEL et al., 2007).

A utilização de lipases imobilizadas para a hidrólise de óleos é atualmente um assunto de interesse crescente, devido ao fato de que o uso de lipases é mais rentável quando estas enzimas são empregadas na forma imobilizada em vez da forma livre. Em geral, os reatores multifásicos considerados para esta aplicação contêm uma fase sólida que pode ser móvel ou estacionária, sendo que a literatura aponta várias configurações de reator usadas em estudos de lipases imobilizadas. Dois tipos de fases são invariáveis, que são uma fase sólida (isto é, a matriz no qual a lipase está imobilizada) e uma ou duas fases líquidas (isto é, solventes) (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

Almeida et al. (2016) em estudo de hidrólise de gordura de frango por lipase de *Candida viswanathii*, obtiveram uma maior atividade hidrolítica com a enzima bruta até 72 h, atingindo 40% de hidrólise, sendo a taxa de reação inicial de 33,17 mmol/L/min e o grau de inclinação de hidrólise versus tempo de 0,0092. É necessário ressaltar que esses resultados foram obtidos em pH 4,0, mesmo pH utilizado no presente trabalho. No entanto, os autores citados realizaram a hidrólise em frascos erlenmeyers, enquanto o presente estudo realizou hidrólise em biorreator do tipo cesto.

O estudo de Bengtsson e Olivecrona (1980) aponta que cátions de sais inorgânicos favorecem a formação de ácidos graxos, possibilitando com que sejam removidos da interface óleo-água, isso gera uma maior disponibilidade da interface para ligação da lipase, o que faz com que haja um aumento de hidrólise. No entanto, tal fato não é observado no presente estudo, uma vez que a enzima encapsulada sem a presença de sal no meio gerou melhores resultados de atividade hidrolítica.

Quando se fala em lipases, a literatura apresenta principalmente biorreatores do tipo tanque agitado, com operação em batelada, por ser de operação facilitada, em que enzima e substrato são alocados no biorreator, com a remoção do produto ao final da reação. No caso de enzimas imobilizadas, utiliza-se um tipo de biorreator com agitação equipado com cesto denominado de *basket reactor* e que tem a função de aprisionar a enzima imobilizada permitindo sua reutilização como biocatalisador sem perdas significativas de massa (SOARES, 2014).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imobilização da lipase de *C. viswanathii* mostrou-se eficaz no presente estudo, sendo definido que o melhor diâmetro de esfera e concentração de alginato são 2 mm e 2%, respectivamente. A imobilização favoreceu a enzima, de modo que a encapsulação em alginato de sódio permitiu 15 ciclos de reuso com mais de 50% de atividade. A temperatura ótima de atividade tanto da enzima livre quanto da enzima encapsulada concentra-se na faixa de 35 a 40 °C. No entanto, a imobilização favoreceu a estabilidade térmica da enzima, sendo possível permanecer estável em até 72 horas de incubação nas temperaturas de 30 e 40 °C. Além disso, a imobilização favoreceu o poder catalítico da enzima no que tange à hidrólise de gordura de frango, obtendo 34,66% de hidrólise enquanto a enzima livre obteve 17,91% de hidrólise. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho, apontam a grande importância da imobilização de lipase para aplicações industriais, bem como seu grande potencial e amplas possibilidades de futuras aplicações na hidrólise de óleos e gorduras.

5. REFERÊNCIAS

- ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Characterization of cross linked *Burkholderia cepacia* lipase in alginate and k-carrageenan hybrid matrix. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 4, p. 545–551, 2013.
- ALMEIDA, A. F.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: Production, biochemical properties, and potential application. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- ALMEIDA, A. F. DE et al. Agroindustrial Wastes as Alternative for Lipase Production by *Candida viswanathii* under Solid-State Cultivation: Purification, Biochemical Properties, and Its Potential for Poultry Fat Hydrolysis. v. 2016, 2016.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State-of-the-art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.
- BARRIUSO, J. et al. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. **Biotechnology Advances**, 2016.
- BENGTSSON, G.; OLIVECRONA, T. Lipoprotein lipase: some effects of activator proteins. *Eur J Biochem.* May;106(2):549–555, 1980
- BHOSALE, H.; SHAHEEN, U.; KADAM, T. Characterization of a Hyperthermostable Alkaline Lipase from *Bacillus sonorensis* 4R. **Enzyme Research**, v. 2016, 2016.
- BHUSHAN, I. et al. Immobilization of Lipase by Entrapment in Ca-alginate Beads. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 23, n. 6, p. 552–562, 2008.
- BRÍGIDA, A. I. S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, n. 1–3, p. 173–187, 2008.
- CARVALHO, N. B. et al. Biochemical properties of *Bacillus* sp. Itp-001 lipase immobilized with a sol gel process. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. 1967. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 70: 181-184.

CAVALCANTE, K. F. Estudo da imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organogel para aplicação em síntese orgânica. **Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.**, 2014.

CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; DE SOUZA-SOARES, L. A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 619–630, 2008.

CHEN, C. et al. Immobilization of lipase onto functional cyclomatrix polyphosphazene microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 67–74, 2016.

DALLA-VECCHIA, R. et al. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2677–2682, 2005.

ELAKKIYA, M. .; PRABHAKARAN, D. .; THIRUMARIMURUGAN, M. . Methods of cell immobilization and its applications. **Internation Jornal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 5, n. 4, p. 5429–5433, 2016.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* (2012).

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 632–644, 2011.

GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008.

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 1797–1809, 2016.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010

HEIDTMANN, R. B. et al. Caracterização cinética e termodinâmica de α -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41–49, 2012.

HOMAEI, A. Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry. **Advances in Food Biotechnology**, n. October, p. 145–164, 2015.

JAVED, M. R. et al. Catalytic and Thermodynamic Characterization of Endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. p. 483–497, 2009.

KANMANI, P. et al. Rice Bran Lipase : Partial Purification , Immobilization in Calcium Alginate Beads , Characterization and Application as a Detergent Additive. v. 33, n. 2034, p. 1052–1058, 2015.

KANWAR, S. S. et al. Catalytic potential of a poly(AAc-co-HPMA-cl MBAm)-matrix-immobilized lipase from a thermotolerant *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 5, p. 4252–4259, 2006.

KARTAL, F.; AKKAYA, A.; KILINC, A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 55–61, 2009.

KAYHAN, N.; EYÜPOĞLU, V.; ADEM, Ş. The immobilization of lipase on PVDF-co-HFP membrane. n. April, p. 20108, 2016.

LEE, K.; FOGLIA, T. A. Synthesis, Purification and Characterization of Structured Lipids Produced from Poultry Fat. **Jaocs**, v. 77, n. April, p. 1027–1034, 2000.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1951.

MARQUES, P. P. Estudo da imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em alginato de sódio. **Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.**, 2011.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. *Química Nova*, 28 (2), 296-305, 2005.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 4, p. 609–624, 2005.

MONIER, M.; EL-SOKKARY, A. M. A.; SARHAN, A. A. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on modified natural wool fibers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 2, p. 122–128, 2010.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnol. Bioprocess Eng**, v. 7, p. 57–66, 2002.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIKPOUR, M.; PAZOUKI, M.; DASHT, M. Lipase Immobilized into Novel GPTMS: TMOS Derived Sol-Gels and its Application for Biodiesel Production from Waste Oil. **Iranian Journal of Chemical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 32–46, 2016.

NISHA, S.; ARUN, K. S.; GOBI, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. **Chemical Science Reiew and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 13–20, 2003.

NOREEN, S. et al. Performance improvement of Ca-alginate bead cross- linked laccase from *Trametes versicolor* IBL-04. **BioResources**, v. 11, n. 1, p. 558–572, 2016.

ÖZTÜRK, B. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. A dissertation submitted to the graduate school in partial fulfillment of

the requirements for the degree of Master of Science. Department of Biotechnology and Bioengineering. **İzmir Institute of Technology**, İzmir, Turkey., p. 105, 2001.

PATEL, M. et al. Isolation and Characterization of Lipase producing Bacteria from Vegetable Oil Spillage Site. v. 5, n. 8, p. 214–232, 2016.

PIMENTEL, M. C.; LEÃO, A. B. F.; MELO, E. H. M. LEDINGHAM; LIMA-FILHO, J. L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on Magnetized Dacron: Kinetic Study. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, v. 35, p. 1/15, 2007.

PINTO, M. C. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12509–12530, 2014.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947–953, 2001.

SIDDIQUI, M.; SIDDIQUI, N.; VARMA, R. Enhanced Production of Cellulolytic Enzymes from Immobilized Cells of *Aspergillus niger*. **International Journal of Pure and Applied Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 109–114, 2016.

SILVA, V. C. F. DA; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. D. O. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468–1474, 2008.

SOARES, M. D. K. G. Transesterificação etanólica de óleo de *Jatropha curcas* L. (Pinhão Manso) catalisada por lipase de *Candida rugosa* imobilizada por ligação covalente. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Tocantins, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, 13, 42-43, 1956.

WON, K. et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2149–2154, 2005.

WU, J. C. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by cross-linking with glutaraldehyde followed by entrapment in alginate beads. **Biocatalysis and**

Biotransformation, v. 24, n. October, p. 352–357, 2006.

XIAO, A. et al. Preparation and characterization of k-carrageenase immobilized onto magnetic iron oxide nanoparticles. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2016.

YU, C. Y.; HUANG, L. Y.; KUAN, I. C.; LEE, S. L. Optimized production of biodiesel from waste cooking oil by lipase immobilized on magnetic nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 24074-24086, 2013.

ZEEB, B. et al. Formation and characterization of filled hydrogel beads based on calcium alginate: Factors influencing nanoemulsion retention and release. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 27–36, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia, Análise de alimentos e purificação de produtos (LABAP), Habite – Incubadora de Empresas de Base Biotecnológica na Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi-TO.

Assim, a primeira parte deste trabalho dedicou-se em avaliar as condições de cultivo para a produção de lipase e acúmulo de lipídio pela levedura *C. viswanathii* utilizando diferentes fontes de carbono e condições limitantes de nitrogênio em cultivos submersos, em que se observou maior produção de lipase utilizando azeite de oliva (26,78 U/ml), maior acúmulo de lipídio com trioleína (44,6%), suplementados com extrato de levedura. O perfil dos ácidos graxos dos lipídios acumulados pela levedura *Candida viswanathii* aponta predominância de ácido oleico (C18:1), obtendo porcentagem de 69,31, 60,69 e 68,84%, para azeite de oliva, glicose e azeite+glicose, respectivamente.

Com isso, pode-se observar que a levedura *C. viswanathii* pode ser considerada como uma linhagem oleaginosa e os lipídios acumulados apresentam potencial para utilização em vários setores da indústria alimentícia em razão de seu alto teor de ácidos graxos monoinsaturados da família ômega-6.

Além disso, este trabalho objetivou encapsular a lipase de *Candida viswanathii* em alginato de sódio e avaliar seu potencial para hidrólise da gordura de frango em biorreator tipo cesto, onde observou-se melhor diâmetro de esfera de 2 mm e concentração de 2% de alginato, com atividade enzimática de 13,42 U/g e 28 U/g, respectivamente. A enzima encapsulada em alginato de sódio convencional apresentou 100% de atividade nos 6 primeiros ciclos, além de permitir 15 ciclos de reuso com mais de 50% de atividade. A atividade ótima tanto da enzima livre quanto da enzima encapsulada concentra-se na faixa de temperatura de 35 a 40 °C. No entanto, a imobilização favoreceu a estabilidade térmica da enzima, sendo possível permanecer estável em até 72 horas de incubação nas temperaturas de 30 e 40 °C. O poder catalítico da enzima também foi influenciado pela imobilização, uma vez que a hidrólise de gordura de frango pela enzima imobilizada obteve 34,66% de hidrólise enquanto a enzima livre obteve 17,91% de hidrólise.

Com isso, os resultados obtidos neste trabalho revelam que a levedura *Candida viswanathii* apresenta grande potencial como levedura oleaginosa, assim como a imobilização da lipase produzida, favorecendo a exploração de maiores aplicações, como a hidrólise de óleos e gorduras.