

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

TÁSSIA DE SOUSA OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE FRUTOS DO CERRADO
TOCANTINENSE PARA PRODUÇÃO DE HIDROLASES E
OTIMIZAÇÃO DE SUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO**

PALMAS-TO

2015

TÁSSIA DE SOUSA OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE FRUTOS DO CERRADO
TOCANTINENSE PARA PRODUÇÃO DE HIDROLASES E
OTIMIZAÇÃO DE SUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO**

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

Orientador: Prof.^a Dra. Solange Cristina Carreiro

Co-Orientador: Prof.^o Dr. Alex Fernando de Almeida

Linha de pesquisa do PPGCTA:
Desenvolvimento de Novos Produtos

PALMAS-TO

2015

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

O48s Oliveira, Tássia de Sousa.

Seleção de leveduras de frutos do Cerrado Tocantinense para produção de hidrolases e otimização de suas condições de cultivo. / Tássia de Sousa Oliveira. – Palmas, TO, 2015.

77 f.

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

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

Coorientador: Alex Fernando de Almeida

1. Hidrolases. 2. Leveduras. 3. Lipase. 4. Plackett-Burman. I. Título

CDD 664

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

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

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

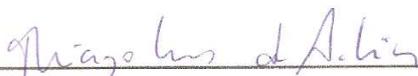
TÁSSIA DE SOUSA OLIVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS DE FRUTOS DO CERRADO
TOCANTINENSE PARA PRODUÇÃO DE HIDROLASES E
OTIMIZAÇÃO DE SUAS CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 28 de Agosto de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



Prof.º Dr. Guilherme Nobre L. do Nascimento
UFT



Prof.º Dr. Thiago Lucas de Abreu-Lima
UFT



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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser a minha esperança nos momentos mais difíceis.

Minha família, por ser o motivo da minha persistência.

A orientadora Solange Cristina Carreiro, por ter exercido seu papel de professora com excelência, sempre me ouvindo e me orientando da melhor maneira possível, por todo o carinho, consideração, atenção e amizade.

Ao meu co-orientador Alex Fernando de Almeida, por estar sempre disposto a ajudar e por todos os esclarecimentos e ensinamentos prestados.

Ao professor Thiago Lucas de Abreu-Lima, por toda a ajuda e atenção.

A todos os meus professores, que sempre foram exemplos do tipo de profissional que eu quero ser e que me passaram valiosas lições não somente acadêmicas, mas também de vida.

Aos meus amigos, por me ajudarem em tudo que podiam, especialmente aos colegas de mestrado que compartilharam comigo os momentos de preocupação e alegria ao longo desses dois anos.

Aos colegas de laboratório, em especial a Graziela Paludo, por toda a paciência nos momentos difíceis, compreensão, apoio e amizade.

A CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

As enzimas têm papel fundamental em diversos segmentos como, por exemplo, nas indústrias de detergentes, fármacos, têxtil e alimentícia. A identificação de novas fontes microbianas para a produção de enzimas é de grande interesse industrial, bem como a otimização do meio de cultivo para sua produção. A aplicação de abordagens estatísticas envolvendo as metodologias de Plackett-Burman e superfície de resposta são ferramentas úteis para compreensão e otimização das interações entre os diversos parâmetros envolvidos na produção de determinada enzima. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial, como produtoras enzimáticas, de linhagens de leveduras isoladas a partir de cocos de babaçu (*Orbignya sp.*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tucum (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*), frutas típicas do Cerrado tocantinense. Foram testadas 142 leveduras quanto a capacidade de produção das enzimas lipase, amilase, protease e pectinase em meios sólidos específicos com tempo de incubação de 21 dias e temperatura de 35 °C. Um total de 61 linhagens apresentaram resultados positivos para lipase, das quais 28 (45,9%) tinham índice enzimático (IE) ≥ 2 . Apenas uma levedura apresentou halo indicador de produção de amilase (IE = 1,57), e não houve resultados positivos para pectinase e protease. Posteriormente, a levedura codificada com número 13, que obteve a melhor atividade lipolítica em meio sólido, foi submetida ao cultivo em meio submerso de acordo com um planejamento experimental Plackett-Burman seguido por um delineamento composto central rotacional para otimizar as condições de produção da enzima. A melhor condição encontrada, com atividade lipolítica de 41,45 U.mL⁻¹, foi: 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 30 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1 g.L⁻¹ de Tween 20, 1,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,7 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 10 g.L⁻¹ de óleo de oliva. Quando comparado com os óleos de buriti e babaçu, o óleo de oliva se mostrou o melhor indutor para a produção de lipase.

Palavras-chave: Leveduras, Enzimas Hidrolíticas, Frutos do Cerrado, Lipase, Plackett-Burman.

SELECTION OF HYDROLYTIC ENZYME PRODUCING YEAST FROM FRUITS OF THE CERRADO IN TOCANTINS

ABSTRACT

Enzymes have an essential role in various segments, for example, in detergents, pharmaceuticals, textile and food industries. The identification of new microbial sources for production of enzymes is of great industrial interest, as well as the optimization of culture medium for production. The application of statistical approaches involving the Plackett-Burman and response surface methodologies are useful tools for understanding and optimizing interactions between the various parameters involved in the production of a particular enzyme. This study aimed to evaluate the enzymatic production potential of yeasts strains from babassu coconuts (*Orbignya sp.*), buriti palm (*Mauritia flexuosa*), tucumán (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*), typical fruits of the Cerrado in Tocantins. A total of 142 yeasts were tested for their ability to produce lipase, amylase, protease and pectinase in specific solid media at incubation time of 21 days at 35 °C. A total of 61 strains were positive for lipase, of which 28 (45.9%) had an enzymatic index (EI) ≥ 2 . Only one yeast presented halo indicator of amylase production (EI = 1.57), and there were no positive results for pectinase and protease. Subsequently, the yeast coded with number 13, which obtained the best lipolytic activity on solid medium, was subjected to cultivation in liquid medium according to a Plackett-Burman experimental design followed by a rotational central composite design to optimize the enzyme production conditions. The best condition, with lipase activity of 41.45 U.mL⁻¹, was found to be 10 g.L⁻¹ of yeast extract, 10 g.L⁻¹ peptone, 30 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 1 g.L⁻¹ Tween 20, 1.5 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.7 g.L⁻¹ KH₂PO₄ and 10 g.L⁻¹ of olive oil. When compared with buriti and babassu oils, the olive oil was the best inducer for the lipase production.

Keywords: Yeast, hydrolytic enzymes, the Cerrado fruits, Lipase, Plackett-Burman.

SUMÁRIO

PARTE 1	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO GERAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. CERRADO	11
3.2. LEVEDURAS	12
3.3. ENZIMAS	15
3.3.1 Amilases	19
3.3.2. Proteases	21
3.3.3. Pectinases	22
3.3.4. Lipases	24
3.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SUBMERSO	28
4. REFERÊNCIAS	29
PARTE 2	38
5. ARTIGO 1 – ANÁLISE DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE COCOS DO CERRADO TOCANTINENSE	38
Resumo.....	38
Abstract.....	39
5.1. INTRODUÇÃO.....	40
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
5.2.1. Microrganismos: origem e manutenção	41
5.2.2. Triagem das linhagens produtoras de enzimas	41
5.2.2.1. Lipase.....	41
5.2.2.2. Amilase.....	42
5.2.2.3. Protease.....	42
5.2.2.4. Pectinase.....	42
5.2.3. Índice Enzimático	42
5.2.4. Análise Estatística	43
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.4. CONCLUSÃO.....	48
5.5. REFERÊNCIAS	49
6. ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EM MEIO SUBMERSO POR UMA LEVEDURA ISOLADA DE DE TUCUM (<i>Bactris inundata</i>).....	51
Resumo.....	51
Abstract.....	52
6.1. INTRODUÇÃO.....	53
6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
6.2.1. Microrganismo, cultivo e manutenção	55
6.2.2. Preparo do inóculo.....	55
6.2.3. Otimização das condições de cultivo.....	55
6.2.4. Efeito das condições de cultivo na produção de lipase.....	56
6.2.5. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	56
6.2.6. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).....	56
6.2.7. Procedimentos analíticos.....	57
6.2.7.1. Biomassa.....	57
6.2.7.2. Determinação de atividade lipolítica.....	57
6.3 RESULTADOS	59
6.3.1 Planejamento Experimental Plackett-Burman.....	59
6.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	61
6.3.3. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para o sulfato de amônio.....	63
6.3.4. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para os óleos de buriti e babaçu	64
6.4 CONCLUSÃO.....	67
6.5 REFERÊNCIAS	68
7. CONCLUSÃO GERAL	71
APÊNDICE A– Análise de variância (ANOVA) para o delineamento Plackett-Burman.....	73
APÊNDICE B– Análise de variância (ANOVA) para o Delineamento Composto Central Rotacional.....	77

PARTE 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir diversos tipos de enzimas (PANDEY et al., 1999). Considerando que uma mesma reação pode ser catalisada por enzimas provenientes de diferentes microrganismos, o estudo de fontes diversas é interessante para que se encontrem enzimas capazes de atuar sob diferentes condições.

As enzimas são produtos importantes para atender diversas necessidades humanas e um grande número de processos nas áreas da indústria, meio ambiente e biotecnologia de alimentos as utilizam em alguma de suas etapas (PANDEY et al., 1999). De acordo com Sharma et al. (2001), com o entendimento de processos bioquímicos, fermentativos e dos métodos de recuperação, um número crescente de enzimas podem ser produzidas de maneira mais acessível. Assim, as várias transformações que elas podem catalisar e suas aplicações na indústria continuarão a se multiplicar.

A utilização de enzimas em escala industrial depende fortemente do uso de fontes microbianas. Dentre os motivos pelos quais os microrganismos são utilizados temos: uma razão superfície/volume elevada, o que facilita a absorção rápida de nutrientes necessários para suportar altas taxas de metabolismo e biossíntese; a capacidade de realizar uma grande variedade de reações; facilidade de adaptação a uma grande variedade de ambientes, permitindo que uma cultura seja transportada do laboratório até o fermentador de uma fábrica, onde é capaz de crescer em fontes de carbono e nitrogênio baratas e produzir compostos valiosos; facilidade de manipulação genética, tanto *in vivo* quanto *in vitro*; procedimentos de triagem simples; e grande diversidade, permitindo que várias espécies produzam enzimas diferentes que catalisam a mesma reação, oferecendo uma maior flexibilidade no que diz respeito às condições de funcionamento do reator (DEMAIN; ADRIO, 2008).

Leveduras são usadas em vários processos industriais, como a produção de bebidas, biomassa e vários outros produtos metabólicos. A última categoria inclui enzimas, vitaminas, polissacarídeos capsulares, carotenóides, alcoóis poli-hídricos, lipídeos, glicolipídeos, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono, e componentes sintetizados pela introdução de DNA recombinante (DEMAIN et al., 2011). O uso de leveduras para produção de enzimas é bastante abordado pela literatura, autores como Alimardani-Theuil et al. (2011), Bataiche et al. (2014), Ciafardini et al. (2006), Moftah et al. (2012), Yalçın e Çorbac (2013) relatam a capacidade de leveduras para a produção de lipases, amilases, proteases e pectinases, as quais

têm importantes aplicações nos mais diversos setores industriais. Diversos substratos são fontes importantes para o isolamento de leveduras, dentre os quais flores e frutos. Os frutos se destacam pela riqueza em açúcares simples, baixo pH e serem frequentemente visitados por insetos vetores. As leveduras isoladas de frutos são filogeneticamente diversas e o estudo de leveduras de diferentes comunidades de frutos é útil para o isolamento de novas espécies (LACHANCE et al., 2001; TRINDADE et al., 2004).

O IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) considera o cerrado a savana tropical mais rica do mundo em biodiversidade. E segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (2007), o cerrado representa 33% da diversidade biológica do Brasil, o que justifica a realização de pesquisas cada vez mais apuradas visando não somente a exploração dessa diversidade como também a sua preservação. Dessa maneira, esse trabalho teve como enfoque o estudo da capacidade de produção de enzimas por leveduras isoladas a partir deste habitat, contribuindo assim para o melhor aproveitamento de sua riqueza biológica e também para a descoberta de microrganismos capazes de produzir enzimas com possível aplicação industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de leveduras isoladas de cocos de babaçu (*Orbignya sp.*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tucum (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*) provenientes do Cerrado do estado do Tocantins como produtoras de enzimas hidrolíticas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a capacidade das diversas linhagens isoladas de cocos do Cerrado quanto a produção das enzimas lipase, amilase, pectinase e protease, selecionando de acordo com o índice enzimático, as leveduras com melhor produção de cada enzima em meio sólido específico;
- Testar a capacidade de produção de enzimas em meio submerso da levedura que apresentar melhor potencial produtor em meio sólido;
- Otimizar a produção de enzima em meio submerso por meio da aplicação de metodologias estatísticas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CERRADO

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. Sua localização é estratégica servindo de corredor de ligação entre biomas como o Pantanal, Floresta Amazônica e Caatinga, contribuindo assim para a garantia do equilíbrio ecológico e biodiversidade (SILVA et al., 2012). A sua área contínua incide sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves no Amapá, Roraima e Amazonas. Neste espaço territorial encontram-se as nascentes das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Amazônica/Tocantins, São Francisco e Prata), o que resulta em um elevado potencial aquífero e favorece a sua biodiversidade (BRASIL, 2015; BRASIL, 2010).

O Cerrado contém 5% da biodiversidade do planeta e é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas, cerca de 199 espécies de mamíferos são conhecidas, 837 espécies de aves, 1200 de peixes, 180 de répteis e 150 de anfíbios. De acordo com estimativas recentes, o Cerrado é o refúgio de 13% das borboletas, 35% das abelhas e 23% dos cupins dos trópicos (BRASIL, 2015; BRASIL, 2010).

O Cerrado é um dos biomas brasileiros mais ameaçados, apresenta apenas 8,21% de seu território legalmente protegido por unidades de conservação; desse total, 2,85% são unidades de conservação de proteção integral e 5,36% de unidades de conservação de uso sustentável. Até 2008 já havia perdido 47,84% de sua cobertura de vegetação de acordo com o Projeto de Monitoramento do Desmatamento dos Biomas Brasileiros por Satélite (projeto de cooperação técnica entre o Ministério do Meio Ambiente - MMA, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - PNUD), executado pelo Centro de Sensoriamento Remoto do IBAMA (BRASIL, 2015; BRASIL, 2010).

Esse bioma apresenta ainda grande potencial em relação a plantas medicinais e segundo Neto e Morais (2003), os recursos naturais oferecidos pelo cerrado, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações. Entre estes, pode-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais. E dentro desse prejuízo considera-se também um alto custo ambiental devido à perda da biodiversidade, invasão de espécies, degradação e erosão

do solo, poluição da água, mudanças no regime de fogo, desequilíbrios no ciclo de carbono e provável modificação climática (KLINK; MACHADO, 2005).

Apesar de estudos como os de Trindade et al. (2002) com microrganismos isolados de acerola, pitanga, umbu e mangaba, e de Ferreira e Junqueira (2007) que fizeram a avaliação microbiológica de pequi, e de Quirino et al. (2009) que estudaram a diversidade filogenética de bactérias em amostras de solo do Cerrado e de solos de pastagem, pouco do potencial microbiológico do Cerrado já foi estudado.

3.2. LEVEDURAS

Franco e Landgraf (2008) definem as leveduras como fungos cuja forma predominante é unicelular. Podem ser esféricas, ovóides, cilíndricas ou triangulares. Algumas são bastante alongadas formando filamentos semelhantes às hifas dos bolores e em alguns casos pode haver a formação de um micélio verdadeiro, quando, após divisão celular, as células permanecem unidas. As leveduras formadoras de pseudomicélios ou de micélios verdadeiros constituem a transição entre as leveduras unicelulares e os fungos filamentosos.

No século XVII, Antonie Van Leeuwenhoek foi capaz de observar leveduras pela primeira vez graças ao auxílio de um microscópio rudimentar elaborado por ele próprio. Leeuwenhoek observou que as leveduras consistiam de glóbulos que flutuavam no fluido, mas ele acreditou que fossem apenas partículas de amido provenientes do mosto da produção de cerveja (HUXLEY, 1984). Mais tarde, em 1755, as leveduras foram definidas por Samuel Johnson no Dicionário da Língua Inglesa como “O fermento colocado na bebida para fazê-la trabalhar, e no pão para clarear e inchar.” Até então, ninguém acreditava que as leveduras fossem vivas, elas eram vistas apenas como agentes químicos orgânicos necessários para a fermentação (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

Com o desenvolvimento de microscópios mais potentes, a natureza das leveduras foi mais bem compreendida. Em 1835, Charles Cagniard de La Tour, um inventor francês, observou que durante a fermentação alcoólica as leveduras se multiplicavam por germinação. Ao mesmo tempo, Theodor Schwann, Friedrich Kützing e Christian Erxleben concluíram de forma independente que “os corpúsculos, globulares ou ovais que flutuam no fermento tão densamente fazendo-o barrento” são organismos vivos (BARNETT, 1998). O reconhecimento de que as leveduras são entidades vivas mudou a ideia prevalente de que a fermentação era

apenas um processo químico. Essa descoberta abriu o caminho para a compreensão do papel das leveduras na fermentação (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

Louis Pasteur é o responsável pela nossa compreensão atual do processo fermentativo. Foi o primeiro a demonstrar experimentalmente que as bebidas fermentadas são resultado da transformação da glicose em etanol feita por leveduras vivas. Ele também realizou experiências que demonstraram que os produtos finais da fermentação alcoólica são mais numerosos e complexos do que os inicialmente relatados por Lavoisier, podendo então sugerir que a fermentação fosse um processo orgânico (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010; BARNETT, 2000).

Em 1858, ao analisar sedimentos de diferentes contêineres de uma destilaria que enfrentava problemas na sua produção, Pasteur percebeu que havia uma quantidade substancial de ácido lático em vez de álcool nos que apresentavam o resultado diferente do esperado. Ao comparar os sedimentos no microscópio, pôde constatar que havia uma grande quantidade de leveduras nos recipientes em que ocorreu a produção de álcool, já nos recipientes com ácido lático, era predominante a presença de “células muito menores que a levedura”. E assim demonstrou-se que existiam dois tipos de fermentação: a alcoólica e a láctica (ALBA-LOIS; SEGAL-KISCHINEVZKY, 2010).

A elucidação do processo fermentativo abriu caminho para o isolamento de culturas puras, denominadas culturas *starter*. Em meados de 1880, Emil Christian Hansen, funcionário do Laboratório Carlsberg em Copenhague, capital da Dinamarca, descreveu várias técnicas para o isolamento de células microbianas simples e foi o primeiro a ter sucesso no isolamento de linhagens puras de leveduras. Em novembro de 1883, o *Old Carlsberg Brewery* iniciou o uso de um dos isolados de Hansen para a produção de cervejas *lager*. Esse foi o primeiro relato do uso de uma cultura *starter* de leveduras bem definida e caracterizada e devido a sua extraordinária eficiência, essa técnica foi rapidamente adotada por outros fabricantes de cerveja e também outros tipos de indústria (BARNETT, 2001; STEENSELS et al. 2014).

Dessa forma, as leveduras vêm sendo utilizadas nos mais diversos setores das indústrias de alimentos, no caso da produção de cerveja, tem impacto direto na qualidade produzindo não somente dióxido de carbono, mas também outros componentes como alcoóis, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos de enxofre, tendo assim influência marcante no seu perfil sensorial (FERREIRA et al., 2010; PINHO, 2006).

A utilização de culturas *starter* se tornou uma prática comum na indústria de fermentação em larga escala atualmente, onde a consistência e a eficiência do processo são os objetivos principais. No entanto, existem vários processos industriais em que a utilização

dessas culturas não é comum. Um dos exemplos é a fermentação dos grãos de cacau para a produção de chocolate. Por outro lado, para alguns processos, incluindo a produção de cerveja e vinho, onde as culturas *starter* são amplamente utilizadas, alguns artesãos estão revendo a prática de contar com uma microflora local em uma tentativa de introduzir características, complexidade, e autenticidade em seus produtos (STEENSELS et al. 2014).

À medida que mais estudos são realizados e mais linhagens são identificadas novas aplicações são dadas as leveduras. De acordo com Çelik e Çalık (2012), vários sistemas de expressão de leveduras têm sido utilizados com sucesso ao longo dos anos para a produção de proteínas recombinantes, incluindo proteínas terapêuticas. A disponibilidade de grandes coleções de linhagens, extensa variedade de vetores, promotores, marcadores dominantes ou auxotróficos e protocolos de transformação eficientes, combinados com a longa tradição das técnicas de fermentação em larga escala, os avanços revolucionários de última geração no sequenciamento de DNA, sistemas e biologia sintética, tecnologia de micro-vetores e a rápida evolução dos bancos de dados web, tem assegurado às leveduras um lugar de destaque na área de plataformas de expressão.

Além de serem hospedeiras industriais para proteínas recombinantes e produção de metabólitos, leveduras são usadas como uma ferramenta poderosa nos ensaios de alto rendimento para genômica funcional e triagem de drogas. A característica de alta eficiência da recombinação homóloga das leveduras é amplamente explorada como uma ferramenta de engenharia genética para superar as dificuldades na clonagem de segmentos maiores de DNA, até mesmo na criação recente da bactéria sintética, abrindo portas para uma nova era (ÇELIK; ÇALIK, 2012; GIBSON et al., 2008; LARTIGUE et al., 2009).

Os produtos da tecnologia do DNA recombinante variam desde proteínas até organismos construídos. A tecnologia pode produzir grandes quantidades de proteínas comercialmente úteis, planejar microrganismos para tarefas especiais e construir plantas e animais com características interessantes para a agricultura ou medicina. Alguns produtos dessa tecnologia foram aprovados para consumo ou uso profissional e muitos outros estão em desenvolvimento. Enzimas produzidas pela tecnologia do DNA recombinante já são utilizadas na produção de detergentes, açúcares e queijo. Proteínas construídas estão sendo usadas como aditivos alimentares para suplementar a nutrição, o sabor ou a fragrância dos produtos (LEHNINGER, 2006).

Com a quantidade crescente de leveduras dos mais diversos habitats sendo estudada e os avanços especialmente da engenharia genética e biotecnologia é natural que cada vez mais estes microrganismos sejam utilizados para otimizar os processos já existentes bem como para

a criação de outros. É bastante promissor o mercado de produção de enzimas a partir de leveduras e ainda existe muito a ser explorado e descoberto nesta área.

3.3. ENZIMAS

As enzimas são macromoléculas protéicas que atuam como biocatalisadores das reações celulares. Estas moléculas aumentam em várias ordens de grandeza a velocidade das reações e por serem altamente específicas, selecionam, entre todas as reações possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer. Estão presentes em todas as células vivas controlando os processos metabólicos e sua ação é diretamente influenciada por fatores como temperatura e pH. Atualmente, mais de 3000 enzimas diferentes foram isoladas e classificadas de acordo com a natureza das reações que catalisam (MARZZOCO; TORRES, 1999; LONG, 2009). Elas podem ser subdivididas em seis diferentes classes de acordo com suas propriedades catalíticas: oxirredutases (oxidação/redução), transferases (transferência de grupos funcionais), hidrolases (hidrólise), liases (adição/eliminação de pequenas moléculas de carbono sp^2 -hibridizado), isomerases (isomerização), ligases (formação/clivagem de carbono sp^3 -hibridizado) (HELD et al., 2000).

As enzimas têm sido utilizadas pelo homem ao longo do tempo, seja na forma de vegetais ricos em enzimas, ou de microrganismos usados na produção de cerveja, iogurte, queijos, etc. O emprego de enzimas em processos industriais tem aumentado a cada dia, como reflexo de sua atratividade como catalisadoras. As vantagens de seu uso na elaboração de alimentos estão diretamente relacionadas com a sua capacidade de catalisar determinadas reações devido a sua grande especificidade, sem causar reações secundárias, sendo possível controlar a velocidade das reações por meio do ajuste de parâmetros como pH, temperatura e concentração dos componentes do meio. A alta enantiosseletividade mostrada por várias enzimas é útil para a preparação de componentes enantiomericamente puros (FELLOWS, 2006; SANDSTRÖM et al., 2012; TANG; ZHAO, 2009).

A história da tecnologia enzimática moderna começou realmente em 1874, quando o químico dinamarquês Christian Hansen produziu o primeiro exemplar do coalho. Em 1876, William Kuhne propôs que o nome "enzima" fosse usado como o termo para se referir a fermentos isolados a partir de organismos viáveis. A palavra em si significa "na levedura" e é derivada do grego 'en' significado 'em' e 'zyme' significando 'fermento'. Em 1897, Eduard Buchner começou a estudar a capacidade dos extratos de levedura para fermentar o açúcar,

apesar da ausência de células de levedura vivas. Em uma série de experimentos na Universidade de Berlim, ele descobriu que o açúcar foi fermentado mesmo quando não havia células vivas de levedura na mistura. Nomeou a enzima que causou a fermentação da sacarose como 'zymase'. Em 1907, ele recebeu o Prêmio Nobel de Química por sua pesquisa e sua descoberta da fermentação não celular. Em 1965, foi desenvolvida a fermentação microbiana de forma específica em larga escala e enormes quantidades de amilases e proteases bacterianas foram produzidas por fermentação submersa (LONG, 2009).

A partir de então, os estudos sobre o isolamento, caracterização, propriedades e aplicações das enzimas vêm evoluindo continuamente. Microrganismos selecionados, incluindo bactérias, fungos e leveduras têm sido estudados para a biossíntese de preparados de várias enzimas economicamente viáveis para aplicação industrial (NIGAN, 2013; PANDEY et al.; 1999).

Isso acontece porque, teoricamente, é possível encontrar um microrganismo produtor de cada enzima, além disso, eles podem ser alterados por mutações e mudanças genéticas de forma a ampliar essa produção. Como a maioria de suas enzimas é extracelular, sua recuperação é fácil, soma-se ainda o baixo custo das matérias-primas e o alto índice de crescimento e produção enzimática dos microrganismos. Porém, a separação e purificação de enzimas a partir de células microbianas ou de fontes animais e vegetais para o uso no processamento de alimentos se desenvolveu recentemente (FELLOWS, 2006; ORDÓÑEZ et al., 2005).

As enzimas microbianas são secretadas pela célula em meio extracelular ou retidas dentro da célula e tem atividade ótima nas mesmas condições que permitem o ótimo crescimento celular. Para que uma enzima microbiana possa ser usada comercialmente é preciso que o microrganismo cresça bem em substratos baratos e que estejam disponíveis facilmente em quantidade e qualidade adequadas. Esses microrganismos devem produzir um alto rendimento constante em curto tempo, os métodos para a recuperação da enzima devem ser simples e baratos e por fim, a preparação da enzima deve ser estável (FELLOWS, 2006).

Das várias classes de enzimas, as hidrolases têm encontrado a mais ampla gama de aplicações. As enzimas são empregadas na indústria têxtil, de papel, de detergentes e alimentícia, sendo que o uso de enzimas como aditivo na produção de detergentes representa a maior parte do uso industrial de enzimas (VAN BEILEN; ZHI LI, 2002). Proteases, lipases, amilases, oxidases, peroxidases, e celulasas são adicionadas aos detergentes onde catalisam a quebra de ligações químicas (DEMAIN; ADRIANO, 2008; HELD et al., 2000).

As enzimas podem ser utilizadas ainda na análise de alimentos para o estudo de componentes específicos, sem a necessidade de procedimentos de purificação muito complexos, oferecendo como vantagens a grande sensibilidade e rapidez (minutos), enquanto os principais inconvenientes são o custo e a necessidade de conhecer e controlar perfeitamente a especificidade da enzima (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Na indústria alimentícia, a utilização de enzimas tem como objetivo melhorar o processo de produção de alimentos, reduzindo custos e proporcionando produtos finais de maior qualidade. As principais aplicações visam melhorar o sabor, a cor, a textura, o aroma, a digestibilidade e a viscosidade, ampliar a vida útil do produto acondicionado, e/ou eliminar as características indesejadas que estavam presentes inicialmente (ORDÓÑEZ et al., 2005). São utilizadas ainda na produção de produtos de panificação, sucos de frutas, xaropes de glicose e queijos. As enzimas podem ser adicionadas aos alimentos na forma de soluções concentradas ou em pó, ou imobilizadas em materiais que servem de suporte em um reator, onde são reutilizadas por longos períodos (FELLOWS, 2006).

Em reações catalíticas convencionais utilizando biocatalisadores, o uso de enzimas na forma livre ou imobilizada é dependente da especificidade da enzima. A partir dos recentes avanços da biotecnologia, de acordo com a necessidade de um processo, diversas enzimas podem ser propostas. Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas para melhorar a qualidade e o desempenho de enzimas microbianas ampliando suas aplicações industriais. Como resultado vários produtos de alto valor agregado tem sido sintetizados no mercado global com o uso de enzimas modificadas por engenharia de proteínas (CHIRUMAMILLA et al., 2001; NIGAM, 2013).

Dentre as características especiais das enzimas microbianas está a sua capacidade de trabalhar em condições variadas, principalmente de temperatura e pH. Por isso, as enzimas podem ser categorizadas como termofílicas, acidófilas ou alcalílicas. Microrganismos com sistema de enzimas termofílicas podem ser usados em reações em escala industrial onde são necessárias altas temperaturas por um tempo prolongado diminuindo a possibilidade de contaminação (NIGAM, 2013; ZHANG; WU, 2011; WANG et al., 2012).

Temos ainda, a disponibilidade das chamadas extremozimas que são enzimas derivadas de microrganismos extremofílicos. Estes microrganismos são capazes de resistir a condições duras de processamento industrial que por muito tempo foram consideradas destrutivas para proteínas. Biocatalisadores tolerantes ao calor e a solventes são ferramentas valiosas para processos como, por exemplo, a decomposição de polímeros que precisam ser liquefeitos e degradados, enquanto enzimas frio-ativas são de relevância para as indústrias de

detergentes e alimentos. Essas enzimas são capazes de catalisar suas respectivas reações em ambientes não aquosos, misturas água/solvente, pressões extremamente elevadas, pH ácido e alcalino, temperaturas de até 140 °C, ou próximo do ponto de congelamento da água (ADAMS et al., 1995; ELLEUCHE et al., 2014) .

As enzimas apresentam grande potencial biotecnológico devido a vantagens técnicas como a promoção de mudanças altamente específicas e controladas, perda nutricional mínima quando permitem que reações que antes eram realizadas em temperaturas elevadas possam ocorrer em condições mais moderadas, menor consumo de energia quando comparada com reações químicas correspondentes e produção de novos produtos impossíveis de se obter por outros métodos. As enzimas são utilizadas para reduzir custos de processamento, aumentar a produção de extratos de matérias-primas e melhorar a manipulação de materiais, a vida de prateleira e as características sensoriais dos alimentos. Portanto, aumentam o rendimento do produto gerado e a economia do processo biotecnológico (COUTINHO et al., 2013; FELLOWS, 2006; SHARMA; SATYANARAYANA, 2012).

De acordo com Tang e Zhao (2009), com grande frequência as enzimas selvagens não são adequadas para os processos industriais e neste ensejo a engenharia de proteínas tem papel de destaque projetando e otimizando o desempenho da enzima para torná-la comercialmente viável. Na maioria dos casos os esforços da engenharia de proteínas não são unidimensionais, mas sim multidimensionais, e são geralmente uma combinação do aumento de taxas (substrato fraco e inibição da produção), do escopo do substrato (aceitação e seletividade) e estabilidade (por exemplo, no sentido de solventes, reagentes e temperatura). Dada a capacidade de se desenvolver os vários recursos das enzimas simultaneamente, o novo paradigma é primeiro vislumbrar o processo químico desejado e determinar todos os critérios que o biocatalisador deve cumprir, e depois “evoluir” uma enzima até atender ou exceder esses objetivos (LUETZ et al., 2008).

Apesar da disponibilidade de uma ampla gama de ferramentas de seleção, suas aplicações são frequentemente bastante específicas para uma combinação particular substrato/enzima e ainda muito esforço é necessário para personalizar e otimizar esses métodos para diferentes experimentos de evolução dirigida (TANG; ZHAO, 2009).

Entretanto, o custo de muitas enzimas é alto e o fato de que em alguns casos precisam ser inativadas após o processamento eleva ainda mais o preço do produto final e, como são proteínas, podem causar respostas alérgicas em algumas pessoas; por isso existe a necessidade de serem encapsuladas ou imobilizadas para reduzir o risco de inalação de poeira enzimática por operadores da linha de produção (FELLOWS, 2006). É inegável que os processos

industriais são e serão cada vez mais dependentes do uso de enzimas, dessa maneira, estudos para a obtenção de enzimas de formas cada vez mais baratas e a ampliação de suas aplicações através de métodos da engenharia contribuem para a obtenção de produtos com qualidade cada vez melhor e menor custo.

3.3.1 Amilases

A história das amilases se inicia em 1811 quando a primeira enzima capaz de degradar amido foi descoberta por Kirchoff. As amilases podem ser divididas em endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula de amido, o que causa a formação de oligossacarídeos lineares e ramificados de vários comprimentos de cadeia. As exoamilases hidrolisam a partir da extremidade não redutora resultando em produtos finais curtos. É necessária a ação combinada de várias enzimas para hidrolisar o amido completamente. Já em 1930, Ohlsson sugeriu a classificação das enzimas capazes de digerir amido no malte como α - e β -amilases de acordo com o tipo de açúcar anomérico produzido pela reação enzimática (GUPTA et al., 2003).

O amido, composto pelos polímeros amilose e amilopectina, é um dos polissacarídeos de plantas mais amplamente utilizado pelo homem. Segundo definição da NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) as α -amilases (EC 3.2.1.1) atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos afins, e, em oligossacarídeos aleatórios, grupos redutores são liberados da α -configuração. As α -amilases estão entre as enzimas mais importantes por serem utilizadas na produção de cervejas, indústria têxtil e principalmente, na indústria de bioetanol (CRUEGER; CRUEGER, 1989; GUPTA et al., 2003; SAHA et al., 2014). Podem ser usadas ainda na dieta de animais promovendo o crescimento de bactérias benéficas do rúmen, as quais na presença de amido crescem muito lentamente, modificando assim a digestão e melhorando a produtividade. Os efeitos benéficos incluem ganho de peso, melhor acabamento, melhor rendimento protéico e redução da proporção de gordura no leite (ALONSO et al., 2010; TRICARICO et al., 2008).

Ainda de acordo com a NC-IUBMB, as β -amilases (EC 3.2.1.2) realizam a hidrólise de ligações (1 \rightarrow 4)- α -D-glicosídicas em polissacarídeos removendo sucessivas unidades de maltose a partir das extremidades da cadeia não redutora. Atuam em amidos, glicogênio e polissacarídeos relacionados e em oligossacarídeos que produzem β -maltose por inversão.

Embora as amilases derivem de várias fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, as enzimas microbianas são as que mais atendem às demandas da indústria.

Atualmente, um grande número de amilases microbianas está disponível comercialmente e substituíram quase que completamente a hidrólise química de amido no processamento industrial (GUPTA et al., 2003; XIE et al., 2014).

Diversos microrganismos utilizam enzimas extra e intracelulares para hidrolisar o amido e utilizá-lo como fonte de energia. Assim, a seleção de microrganismos é interessante, pois facilita a descoberta de novas amilases para diferentes fins. O interesse por leveduras amilolíticas tem crescido nos últimos anos depois do reconhecimento de seu valor potencial para a conversão da biomassa de amido em proteínas de célula única e etanol (CHI et al., 2009; GUPTA, et al, 2003).

Várias espécies de leveduras são conhecidas como boas produtoras de amilases. Dentre estas podemos citar *Lipomyces kononenkoae*, *Saccharomycopsis fibuligera* e *Cryptococcus flavus* (COUTINHO et al., 2013; WANDERLEY et al., 2004). Isso explica porque vários laboratórios tem se envolvido nos últimos anos no isolamento, avaliação e/ou eventual construção de linhagens de leveduras amilolíticas (GONZÁLEZ et al., 2008).

Temperatura, pH, meio de cultivo, teor de umidade e inibidores estão entre os fatores que podem influenciar na produção de enzimas sendo necessário que as condições ótimas de cultivo para cada microrganismo sejam levadas em conta. Muitos cátions metálicos, especialmente íons de metais pesados, reagentes do grupo sulfidrilo, N-bromosuccinimida, iodoacetato, dentre outros, inibem a atividade amilolítica (GUPTA et al., 2003; SARANRAJ e STELLA, 2013).

A temperatura ótima para a atividade de amilase está relacionada com o crescimento do microrganismo. A temperatura ótima mais baixa relatada para amilase é de 25 a 30 °C para *Fusarium oxysporum* e a mais alta de 100 e 130 °C para as arqueobactérias, *Pyrococcus furiosus* e *Pyrococcus woesei*, respectivamente. A temperatura ótima de enzimas provenientes de *Micrococcus varians* é dependente do cálcio e as de *Halomonas meridiana* são dependentes do cloreto de sódio (GUPTA et al., 2003; MAC GREGOR et al., 2001; SARANRAJ; STELLA, 2013). Assim, a otimização da temperatura de cultivo de cada microrganismo para a produção de amilases é bastante relevante.

De acordo com Saranraj e Stella (2013) os principais impedimentos para explorar o potencial comercial de amilases são o rendimento, estabilidade e custo de produção. Além disso, existe ainda a necessidade de amilases mais eficientes em vários setores, o que pode ser obtido tanto por modificações químicas como por engenharia protéica. As amilases têm ganhado importância para aplicações biofarmacêuticas, ainda assim, as indústrias baseadas

em alimentos e amido continuam sendo seu principal mercado e mantêm a procura por estas enzimas sempre em alta.

3.3.2. Proteases

As proteases ocupam uma importante posição no que diz respeito aos campos fisiológicos e comerciais. São enzimas degradativas que catalisam a hidrólise total de proteínas. Essas enzimas são fisiologicamente necessárias para a vida podendo ser encontradas em uma diversidade de fontes como plantas, animais e microrganismos, dentre as quais, os microrganismos apresentam grande potencial devido sua ampla diversidade bioquímica e a sua susceptibilidade para a manipulação genética (CASTRO et al., 2014; POWERS et al., 2002; RAO et al., 1998).

As proteases são classificadas pela NC-IUBMB dentro da classe 3, subclasse 3.4, na qual se encontram as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, sendo chamadas peptidases. As peptidases são divididas ainda em exopeptidases, que atuam somente próximo a extremidade da cadeia polipeptídica, e endopeptidases, que atuam internamente nas cadeias de polipeptídeos. O termo peptidase é recomendado como sinônimo de protease.

A vasta diversidade de proteases ilustra claramente a influência destas enzimas na biosfera. Elas desempenham também um papel essencial na nutrição devido a sua atividade de despolimerização e são classificadas em ácidas, neutras, ou alcalinas com base no intervalo de pH em que apresentam atividade ótima (SANDHYA et al., 2005).

Essas enzimas são muito utilizadas nas indústrias de detergentes e produção leiteira (renina). Também são utilizadas pela indústria farmacêutica, de couro, para a produção de hidrolisados protéicos e para o processamento de água. Na indústria de alimentos, sua principal aplicação é para melhorar o sabor, a textura e o aspecto dos produtos, ou ainda na eliminação da turbidez da cerveja, na redução do tempo de maturação de queijos duros e semiduros, em produtos de confeitaria controlando a viscosidade e melhorando a textura e aparência final, na indústria cárnea acelerando o processo de maturação e melhorando a maciez, dentre outras aplicações (CRUEGER; CRUEGER, 1989; ORDÓÑEZ et al., 2005).

As proteases alcalinas tiveram sua aplicação aumentada como catalisadores industriais nos últimos anos por oferecerem diversas vantagens em detrimento dos catalisadores químicos convencionais. Dentre as características vantajosas que apresentam encontram-se a alta atividade catalítica, alto grau de especificidade pelo substrato, podem ser produzidas em

larga escala, são economicamente viáveis e biodegradáveis, reduzindo assim, também a poluição ambiental (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; SILVA, 2011).

As proteases são comercialmente produzidas a partir de bactérias e fungos. Entre os microrganismos, os fungos apresentam muitas vantagens como produtores de enzimas, dentre as quais as proteases, já que são normalmente considerados como linhagens seguras e produzem enzimas extracelulares. Cada organismo ou linhagem tem suas próprias condições especiais de cultivo, por isso, a otimização da composição do meio tem que ser realizada para manter o equilíbrio entre todos os reagentes, minimizando assim a quantidade de componentes não utilizados no final da fermentação (SANDHYA et al., 2005).

3.3.3. Pectinases

Em razão da grande diversidade de substâncias pécnicas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias. As pectinases são um complexo de enzimas que degradam a pectina, um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas (VILELA, 2011; WHITAKER, 1984). Tem grande importância para a indústria de alimentos pelo seu impacto na textura de produtos feitos a partir de maçãs, pêssegos e tomates (WHITAKER, 1984).

A classificação dessas enzimas se baseia em seu modo de ação contra a estrutura de galacturana da pectina. Os dois principais grupos de enzimas pectinolíticas são: o de desesterificação e o de despolimerização. O primeiro catalisa a desesterificação de pectinas, enquanto o último quebra a ligação α -(1,4)-glicosídica em pectinas ou por hidrólise (hidrolase) ou pela β -eliminação (liases). Para a maioria das enzimas, o tipo de clivagem é casual (endo) ou terminal (exo) (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011). A Tabela 1 apresenta as reações catalisadas por pectinases.

Tabela 1. Modo de ação das enzimas pectinolíticas.

Enzima	Número EC	Reação catalítica
Pectinesterase (PE)	3.1.1.11	Pectina + nH ₂ O → pectato + n metanol
Pectina-acetil esterase (PAE)	3.1.1.6	Pectina + nH ₂ O → pectato + n acetato
Endopoligalacturonase (EndoPG)	3.2.1.15	Ácido pécico + H ₂ O → oligogalacturonatos
Exopoligalacturonase (ExoPG)	3.2.1.67	Protopectina + H ₂ O → pectina solúvel
Exo-poli- α -galacturonosidase	3.2.1.82	Ácido pécico + H ₂ O → monogalacturonatos
Endo-pectato liase (EndoPaL)	4.2.2.2	Ácido pécico + H ₂ O → digalacturonatos
Exo-pectato liase (ExoPaL)	4.2.2.9	Ácido pécico → oligogalacturonatos insaturados
Endo-pectina liase (EndoPL) ou pectinaliase(PL)	4.2.2.10	Ácido pécico → digalacturonatos insaturados
Protopectinases (PPase)		Pectina → metil oligogalacturonatos insaturados

Fonte: ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011.

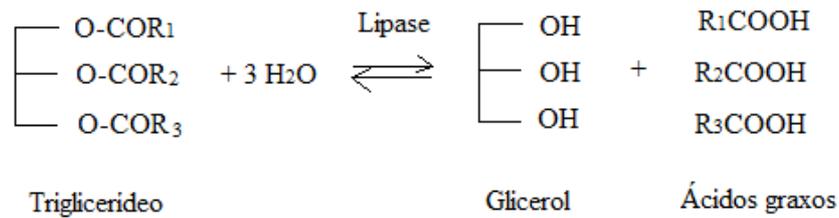
Pectinases são utilizadas frequentemente na indústria aumentando o rendimento e otimizando o processo de clarificação de sucos de frutas e na fabricação de vinho, tendo como principal fonte o fungo filamentoso *Aspergillus niger*, porém, também são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, insetos, nematódeos e plantas (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2006; SANDRI, 2010).

As preparações comerciais de origem fúngica são de fato caldos líticos que contêm uma mistura complexa de diferentes enzimas com atividade pectinolítica, incluindo endo e exo poligalacturonases, pectinaliase e pectinesterase. Outras enzimas não pectinolíticas como amilases, arabinofuranosidas entre outras, também podem estar presentes na mistura. Nesse sentido, poligalacturonases produzidas por leveduras podem ter vantagens sobre os fungos e ser uma boa alternativa aos preparados enzimáticos fúngicos, isso porque algumas linhagens de leveduras são capazes de produzir apenas um tipo de enzima pectinolítica e não apresentam atividade de pectinesterase. São microrganismos geralmente reconhecidos como seguros e as enzimas pécicas podem ser produzidas com baixo custo (BLANCO et al. 1999). Além disso, seu crescimento é relativamente simples, não necessitam de um indutor no meio de crescimento, e a manipulação e clonagem de genes podem melhorar a produção enzimática (JIA e WHEALS, 2000).

A tendência atual é a busca de fontes alternativas de pectinases, em especial a partir de leveduras. Leveduras pectinolíticas produzem enzimas diferentes de acordo com sua carga genética. Elas podem produzir poligalacturonases, pectinaliases, pectinesterases, ou pectato liases, dependendo de fatores como a temperatura, pH, condições e disponibilidade do substrato (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011; BLANCO et al. 1999).

3.3.4. Lipases

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases EC 3.1.1.3) podem catalisar diversas reações, como a hidrólise total ou parcial de triacilgliceróis (TAG) fornecendo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol e ácidos graxos livres, além de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Em organismos eucarióticos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios, incluindo a digestão, absorção, reconstituição de gorduras e o metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (COLLA et al.; 2012; SHARMA et al., 2001). Essas enzimas constituem importante grupo de biocatalizadores para aplicações biotecnológicas e são muito relevantes tanto do ponto de vista fisiológico como biotecnológico (BUSSAMARA et al., 2010). A Figura 1 exibe a representação da hidrólise de um triglicerídeo por uma lipase e a molécula de lipase com suas características.



(a)

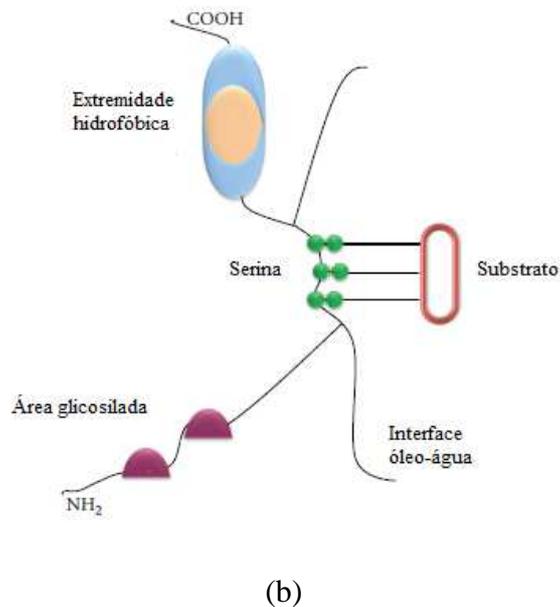


Figura 1. (a) Hidrólise de um triglicerídeo por uma lipase. Após a hidrólise completa os triglicerídeos são convertidos em glicerol e ácidos graxos. (b) Representação de uma molécula de lipase com suas características. O substrato pode ser qualquer triglicerídeo. Regiões interativas do substrato são exibidas. Fonte: Gopinath et al., 2013.

Em 1856, Claude Bernard descobriu uma lipase no suco pancreático, uma enzima que hidrolisa gotículas de óleo insolúveis e as converte em produtos solúveis. As lipases eram obtidas tradicionalmente a partir do pâncreas de animais e utilizadas como um ajudante da digestão para consumo humano, purificada ou na forma bruta misturada com outras hidrolases (pancreatina). O interesse por lipases microbianas surgiu inicialmente devido a escassez de pâncreas e dificuldades em coletar o material (HASAN et al., 2006).

Conforme Ordóñez e colaboradores (2005), as lipases hidrolisam apenas lipídeos emulsificados, atuando nas interfaces. Do ponto de vista de sua especificidade, distinguem-se entre as que hidrolisam na mesma velocidade as três ligações éster dos triglicerídeos e as que hidrolisam determinada ligação concreta.

Quando uma lipase está na fase aquosa, abaixo do seu limite de solubilidade, na ausência de uma emulsão ou em baixa concentração de um substrato lipídico, há, normalmente, uma hélice que cobre o centro ativo, um oligopeptídeo helicóide denominado “lid” ou “tampa”. Essa tampa, anfifílica, é constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna, em contato com o centro ativo (KAMIYA et al., 1999; VAZ; CHOUPINA, 2012).

A lipase com a tampa que cobre o centro ativo está numa conformação fechada, e na presença de uma emulsão ao entrar em contato com a interface formada pelo lipídeo, as

lipases sofrem uma mudança conformacional na região da tampa, expondo o seu centro ativo para a hidrólise das moléculas de triacilglicerol (BRZOZOWSKI et al., 2000). O centro ativo só fica exposto quando a tampa abre, ou seja, a enzima só catalisa uma reação em interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas ou ainda na presença de um solvente hidrofóbico. O mecanismo de passagem à conformação fechada para conformação aberta é então designado por ativação interfacial (KUNCOVA et al., 2003; VAZ; CHOUPINA, 2012).

A especificidade do substrato é muito importante para a aplicação da enzima com fins analíticos e industriais, assim, a habilidade das lipases para executar transformações químicas muito específicas (biotransformação) as tem tornado populares em alimentos, detergentes, cosméticos e na indústria farmacêutica (FRANKEN et al., 2010; TREICHEL et al., 2010).

As lipases podem ser utilizadas também nas indústrias de couro, têxteis, papel entre outras. Na indústria de alimentos elas são muito aplicadas na potencialização do sabor, como, por exemplo, em laticínios onde são usadas para hidrolisar a gordura do leite, na melhoria do sabor de queijos e na lipólise de gordura de manteiga e creme. São capazes ainda de aumentar o sabor do leite no chocolate e são empregadas em produtos de panificação para ampliar a vida útil em relação a textura pois sua adição aumenta a proporção de monoglicerídeos, que, ao unirem-se com o amido, retardam a retrogradação e fazem com que o miolo conserve sua maciez (LONG, 2009; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Novas aplicações biotecnológicas têm sido estabelecidas com sucesso utilizando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, produtos farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e compostos de *flavour* (HASAN, 2009; JAEGER; EGGERT, 2002).

Gorduras, óleos e compostos relacionados são os principais alvos da lipase em tecnologia de alimentos. É importante um controle da concentração da enzima, pH, temperatura e teor de emulsão para maximizar a produção de sabor e fragrância (DEMAIN; ADRIO, 2008).

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas apesar de também poderem ser obtidas a partir de fontes vegetais e animais. As enzimas microbianas produzidas por fungos são especialmente valorizadas por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo (COLLA et al. 2012; CARVALHO et al., 2003).

As principais leveduras lipolíticas isoladas do ambiente terrestre são: *Candida rugosa*, *C. tropicalis*, *C. antarctica*, *C. cylindracea*, *C. parapsilopsis*, *C. deformans*, *C. curvata*, *C. valida*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *R. pilimornae*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis crataegenesis*, *Torulaspora globosa* e *Trichosporon asteroides* (BATAICHE et al., 2014; VAKHLU; KOUR, 2006).

A análise quantitativa é importante para comparar a atividade lipolítica de vários isolados. Não existe um único método para essa análise. A escolha do método específico dependerá dos próprios requisitos específicos do pesquisador. Para o ensaio de qualquer enzima, a sensibilidade, a disponibilidade de substratos e a facilidade do processo devem ser consideradas (HENDRICKSON, 1994).

Para uma dada espécie produtora, a quantidade de lipase vai depender da concentração da biomassa no caldo fermentativo, das características nutricionais do meio de cultura e de outras condições de produção (SALEHMIN et al., 2014). Dessa forma, a composição química do meio fermentativo é um ponto bastante importante. Para uma secreção satisfatória de lipases, são necessárias fontes de carbono e nitrogênio facilmente metabolizáveis, para que o crescimento microbiano ocorra de forma adequada. Além disso, quando se fala em produção de lipases, o indutor é um ponto crucial para o sucesso da fermentação, pois, sendo as lipases enzimas de caráter indutivo, a escolha do indutor ideal é determinante para a produtividade do biocatalizador (CONTESINI et al., 2010, IFTIKHAR et al., 2010; LI; ZONG, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). Segundo Gordillo et al. (1998), a produção de lipase pode ser induzida por ácido oléico extracelular, mas está relacionada também com a taxa substrato/biomassa. No entanto, o verdadeiro papel do indutor ainda não é claramente compreendido.

A reação das lipases pode ser acelerada ainda pela presença de íons de cálcio, que atuam precipitando os ácidos graxos liberados na forma de sais de cálcio insolúveis. Outras enzimas importantes são as fosfolipases e as glicolipases, por serem altamente específicas hidrolisando os fosfolipídeos e os galactosil-acilgliceróis, respectivamente (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O efeito de vários fatores sobre a atividade e estabilidade de lipases brutas e purificadas, como o pH, a temperatura, o efeito de íons metálicos, solventes orgânicos, detergentes/surfactantes e outros inibidores, podem aumentar ou suprimir a atividade das lipases. A relação entre enzima e substrato é complexa, porque a adsorção da lipase na interface é um processo dinâmico e suas propriedades físico-químicas mudam continuamente com o tempo em função de fatores ambientais, incluindo o aparecimento de produtos da reação. A caracterização de uma lipase pode determinar sua utilização para uso em diferentes situações (CONTESINI et al., 2010; FERRER et al., 2001; HASAN et al., 2009; HELISTÖ; KORPELA, 1998).

As lipases têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa, pois a recuperação das enzimas extracelulares e a recuperação da biomassa são facilitadas podendo

ser realizadas por uma simples filtração ou centrifugação, sendo a forma de cultivo predominante em escala industrial. A fermentação em estado sólido também tem sido usada para a produção de lipases, e tem algumas vantagens sobre a fermentação líquida, tais como, a utilização de resíduos agrícolas, requerer menos água e energia e fácil aeração do meio, mas ainda é pouco empregada do ponto de vista industrial (CORADI et al., 2012).

3.4. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SUBMERSO

Desde que a fermentação em estado submerso foi lançada como uma forma de aumentar a capacidade de produção da penicilina durante a Segunda Guerra Mundial, ela se tornou um modelo tecnológico para a fabricação de produtos. Aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por fermentação submersa comumente com o uso de linhagens modificadas geneticamente (HÖLKER et al., 2004; LI e ZONG, 2010).

De acordo com esta técnica os microrganismos são suspensos em um meio líquido onde os nutrientes estão dissolvidos. A homogeneidade do meio de cultura e a manutenção de parâmetros do processo como a temperatura e pH são parte de suas vantagens, porém, é bastante importante a manutenção da esterilidade já que a alta disponibilidade de água pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos competidores (COLLA et al., 2010; PANDEY et al., 2000; SALIHU et al., 2012).

Em comparação com a fermentação em estado sólido, a fermentação submersa se mostra como uma operação fácil e com alta eficiência. Esse tipo de fermentação é mais adequado para microrganismos que exigem um alto teor de umidade, como as bactérias. Uma vantagem adicional dessa técnica é que a purificação dos produtos finais é mais fácil e mais rápida (THIRUGNANASAMBANDHAM et al, 2014).

Trabalhos como os de Roveda et al. (2010), Salihu et al. (2011), Smaniotto et al. (2012) e Thirugnanasambandham et al. (2014) abordam a utilização da fermentação submersa para a produção de enzimas. São comuns estudos que visam otimizar a produção de enzimas por um determinado microrganismo em fermentação submersa, justamente por ser esta a mais usada na indústria. Diversos fatores podem ser estudados, desde as condições de fermentação, como temperatura, pH, tempo de incubação, composição do meio, agitação entre outros, até o tipo de reator utilizado.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. W.; PERLER, F.B.; KELLY, R.M. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. **Biotechnology**, vol. 13, p. 662-668, 1995.
- ALBA-LOIS, L.; SEGAL-KISCHINEVZKY, C. Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine. **Beer & Wine Makers. Nature Education**, vol 3, p. 9-17, 2010.
- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**, vol. 46, p. 1525–1537, 2011.
- ALONSO, S.; ARÉVALO-VILLENA, M.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Study of Starch Degradation by Yeasts During Fermentation for Using in Animal Feed. **Appl Biochem Biotechnol**, vol.162, p. 2058–2066, 2010.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline Proteases: a review. **Bioresource Technology** vol. 64, p. 175-183, 1998.
- BARNETT, J. A. A History of Research on Yeasts 1: Work by Chemists and Biologists 1789–1850. **Yeast**, vol. 14, p. 1439–1451, 1998.
- BARNETT, J. A. A History of Research on Yeast 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. **Yeast**, vol. 16, p. 755–771, 2000.
- BARNETT, J. A.; LICHTENTHALER, F.W. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880–1900. **Yeast**, vol. 18, p.363–88, 2001.
- BATAICHE, I.; KACEM-CHAOUCHE, N.; DESTAIN, J.; LEJEUNE, A.; THONART, P. Screening of *Candida boidinii* from Chemlal spent olive characterized by higher alkaline-cold adapted lipase production. **African Journal of Biotechnology**, vol 13, p. 1287-1294, 2014.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts - MiniReview. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 175, p. 1-9, 1999.
- BRASIL, 2015. Ministerio do Meio ambiente. **O bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 30 jun. 2015.
- BRASIL, 2010. Ministério do meio ambiente. **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado**. Brasília: MMA, 2011. 200 p.
- BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structural origins of the interfacial activation in thermomyces (humicola) lanuginosa lipase. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 49, 15071-15082, 2000.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 268–275, 2010.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, Vol. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol.3, p. 20–25, 2014.

ÇELIK, E.; ÇALIK, P.; Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances** vol. 30, p. 1108–1118, 2012.

CHI, Z.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G.; LI, J.; WANG, X. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology Advances**, vol. 27, p. 236–255, 2009.

CHIRUMAMILLA, R. R.; MURALIDHAR, R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. **Mol. Cell. Biochem**, vol. 224, p. 159–168, 2001.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, vol. 23, p. 60–67, 2006.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V.; Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, vol.4, p. 1-14, 2012.

CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. **Ann Microbiol**. DOI 10.1007/s13213-012-0500-1. 2012.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 8308–8314, 2010.

CONTENSINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 67, p. 163–171, 2010.

COUTINHO, F. S.; MARQUEZ, D. R.; DIAS, D.S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A.; GONÇALVES, D. B.; GALDINO, A. S. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, p. 15-21, 2013.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: manual de microbiologia industrial**. Editorial Acribia, S.A. 1989. 413 p.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. **Mol Biotechnol**, vol. 38, p. 41-55, 2008.

DEMAIN, A. L.; PHAFF, H. J.; KURTZMAN, C. P. **The yeasts: a taxonomic study** (Vol. 1). Elsevier (Eds.). Capítulo 3, p. 13-19. 2011.

ELLEUCHE, S.; SCHRÖDER, C.; SAHM, K.; ANTRANIKIAN, G. Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 29, p.116–123, 2014.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Souza, E. S. Biodiversidade do bioma Cerrado. Disponível em: <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_2_111200610412.htm
 > Acesso em: 26 de março de 2015.

FELLOWS, P. J. Tecnologia das fermentações e enzimas. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 7, p. 183-206.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Importância dos microrganismos nos alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, 2008. Cáp. 1 , p. 5-7.

FERREIRA, L. C.; JUNQUEIRA, R. G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made from a typical Brazilian fruit. **World J Microbiol Biotechnol**, vol. 23, p. 1179–1181, 2007.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 21, p. 77-84, 2010.

FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; SOLÀ, C. Production of Native and Recombinant Lipases by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Vol. 95, p. 221-255, 2001.

FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity. **Food Bioprocess Technol**, vol. 3, p. 511–520, 2010.

GIBSON, D. G.; BENDERS, G. A.; AXELROD, K. C.; ZAVERI, J.; ALGIRE, M. A.; MOODIE, M.; MONTAGUE, M. G.; VENTER, J. C.; SMITH, H. O.; HUTCHISON III, C. A. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, vol. 105, p. 20404–20409, 2008.

GONZÁLEZ, C.F.; FARIÑA, J.I.; FIGUEROA, L.I.C. Optimized amylolytic enzymes production in *Saccharomycopsis fibuligera* DSM-70554 An approach to efficient cassava starch utilization. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 42, p. 272–277, 2008.

GOPINATH, S.C.B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. **BioMed Research International**, vol. 2013, p. 1-10, 2013.

- GORDILLO, M. A.; MONTESINOS, J. L.; CASAS, C.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 93, p.131–142, 1998.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 1599-1616, 2003.
- HASAN, F.; SHAH, A. A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HASAN, F.; AAMER, A. S.; ABDUL, H. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, vol. 27, p. 782–798, 2009.
- HELD, M.; SCHMID, A.; VAN BEILEN, J.B.; WITHOLT, B. Biocatalysis. Biological systems for the production of chemicals. **Pure Appl. Chem.**, vol. 72, p. 1337–1343, 2000.
- HENDRICKSON, H. S. Fluorescence-based assays of lipases, phospholipases, and other lipolytic enzymes. **Anal Biochem**, vol.219, p. 1–8, 1994.
- HELISTÖ, P.; KORPELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanooate esters. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 23, p.113–117, 1998.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol. 64, p. 175–186, 2004.
- HUXLEY, T. H. **Popular Lectures and Addresses II**. Chapter IV, Yeast (1871). Macmillan, 1894.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). Biomas, cerrado. Disponível em: <<http://7a12.ibge.gov.br/vamos-conhecer-o-brasil/nosso-territorio/biomas>> Acesso em: 04 de abril de 2015.
- IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; ZIA, M.A.; HAQ, I. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1124-1132, 2010.
- JAEGER, K. E., EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol**, vol.13, p. 390–397, 2002.
- JIA, J. H.; WHEALS, A. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Curr. Genet.**, vol. 38, p. 264–270, 2000.
- KAMIYA, N.; KASAGI, H.; INOUE, M.; KUSUNOKI, K.; GOTO, M. Enantioselective recognition mechanism of secondary alcohol by surfactant-coated lipases in nonaqueous media. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 65, p. 227-232, 1999.

KUNCOVÁ, G.; SZILVA, J.; HETFLEJS, J.; SABATA, S.. Catalysis in organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique. *J. Sol-Gel. Sci. Technol.*, v. 26, p. 1183-1187, 2003.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, vol. 19, p. 707–713, 2005.

LACHANCE, M.; STARMER, W. T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; STUART, J.; BARKER, F.; JANZEN, D. H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, vol. 1, p. 1-8, 2001.

LARTIGUE, C.; VASHEE, S., ALGIRE, M. A.; CHUANG, R. Y.; BENDERS, G. A., MA, L.; NOSKOV, V. N.; DENISOVA, E. A.; GIBSON, D. G.; ASSAD-GARCIA, N.; ALPEROVICH, N.; THOMAS, D. W.; MERRYMAN, C.; HUTCHISSON III, C. A.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C.; GLASS, J. I. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. **Science**, vol.325, p. 1693–1696, 2009.

LEHNINGER, A. L. Tecnologia da informação baseadas no DNA. **Princípios de Bioquímica**. 4º edição. São Paulo. Sarvier, 2006. cap. 09, p. 303-340.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 66, p. 43–54, 2010.

LONG, K. Unlocking the miracle of lipases. **Malaysian Agricultural Research and Development Institute**, 2009.

LUETZ, S., GIVER, L., LALONDE, J., Engineered enzymes for chemical production. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 101, p. 647–653, 2008.

MAC GREGOR, E. A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the amylase family of enzymes. **Biochemistry and Biophysics**, vol. 46, p. 1-20, 2001.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Editora Guanabara Koogan S.A. Segunda edição, p. 360, 1999.

MOFTAH, O. A. S.; GRBAVEIĆ, S.; ZUZA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding Value to the Oil Cake as a Waste from Oil Processing Industry: Production of Lipase and Protease by *Candida utilis* in Solid State Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**, vol.166, p. 348–364, 2012.

NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 3.2.1.1. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/1.html>> Acesso em: 03 maio 2015.

NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 3.2.1.2. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/2.html>> Acesso em: 31 de maio de 2015.

NC-IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 3.2.1.2. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#EC34> > Acesso em: 10 de julho de 2015.

NETO, G. G.; MORAIS, R. G. de. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 17, p. 561-584, 2003.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, **Biomolecules**, v.3, p.597-611, 2013.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, **Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 26, p.853-860, 2006.

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

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos, componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 06, p. 92-100.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Curr. Sci.**, vol. 77, p. 149–162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, vol. 35, p. 1153–1169, 2000.

PINHO, O., FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; SANTOS, L. H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography**, vol. 1121, p. 145-153, 2006.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. **Chem. Rev.**, vol. 102, p. 4639–4750, 2002.

QUIRINO, B. F.; PAPPAS, G. J.; TAGLIAFERRO, A. C.; COLLEVATTI, R. G.; NETO, E. L.; SILVA, M. R. S. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRUGUER, R. H. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. **Microbiological Research**, vol.164, p. 59-70, 2009.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 62, p. 597–635, 1998.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 30, p. 126-131, 2010.

SAHA, K.; MAITY, S.; ROY, S.; PAHAN, K.; PATHAK, R.; MAJUMDAR, S.; GUPTA, S. Optimization of Amylase Production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC 1270) Using Solid State Fermentation. **Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology**, vol. 2014, p. 1-7, 2014.

SALEHMIN, M. N. I.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. High cell density fed-batch fermentation for the production of a microbial lipase. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 85, p. 8–14, 2014.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resources, **Conservation and Recycling**, vol. 58, p. 36–44, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 69, p. 66–73, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 40, 2689–2694, 2005.

SANDRI, I. G.; **Enzimas pectinolíticas: seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processos da indústria de alimentos**. Dissertação Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, p. 129, 2010.

SANDSTROM, A. G.; WIKMARK, Y.; ENGSTROM, K.; NYHLÉN, J.; BACKVALL, JAN-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. **PNAS - Exploring Copper Compounds**, v. 3, p. 78-83, 2012.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal amylase – a review. **International Journal of Microbiological Research**, vol. 4, p. 203-211, 2013.

SHARMA, A.; SATYNARAYANA, T. Production of Acid-Stable and High-Maltose-Forming α -Amylase of *Bacillus acidicola* by Solid-State Fermentation and Immobilized Cells and Its Applicability in Baking. **Appl Biochem Biotechnol**, vol. 168, p.1025–1034, 2012.

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

SILVA, M. S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. Dissertação Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, p. 83, 2011.

SILVA, S. M. F. Q.; PINHEIRO, S. M. B.; QUEIROZ, M. V. F.; PRANCHEVICIUS, M. C.; CASTRO, J. G. D.; PERIM, M. C.; CARREIRO, S. C. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 17, p.1649-1656, 2012.

SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S.M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Synthetic lipase: production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.43, p. 1490-1498, 2012.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J.; Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. **Annu. Rev. Microbiol.**, vol. 68, p.61–80, 2014.

TANG, W. L., ZHAO, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. **Biotechnol J**, vol. 4, p. 1725–1739, 2009.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V.; MARAN, J. P. Modeling and investigation of submerged fermentation process to produce extracellular polysaccharide using *Lactobacillus confusus*. **Carbohydrate Polymers**, vol.114, p. 43–47, 2014.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol**, vol.3, p. 182–196, 2010.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* alpha-amylase. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 145, p. 136–150, 2008.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; PIMENTA, R. S.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 86, p. 27–32, 2004.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. **System. Appl. Microbiol.**, vol. 25, p. 294–300, 2002.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; PIMENTA, R. S.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Candida sergipensis*, a new asexual yeast species isolated from frozen pulps of tropical fruits. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 86, p. 27–32, 2004.

VAN BEILEN, J. B. e ZHI LI. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, p. 338–344, 2002.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lípases: enzyme purification biochemical properties and gene cloning. **Electron. J. Biotechnol**, vol. 9, p. 69-85, 2006.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilglicerois. **REB**, vol. 5, p. 42-58, 2012.

VILELA, D. M. **Seleção in vitro de culturas iniciadoras para fermentação de frutos de café (*Coffea arabica* L.) processados via seca e semi-seca.** Dissertação Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, p. 82, 2011.

WANDERLEY, K. J.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of alfa-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 231, p. 165-169, 2004.

WANG, X.; LI, D.; WATANABE, T.; SHIGEMORI, Y.; MIKAWA, T.; OKAJIMA, T.; MAO, L.; OHSAKA, T. A Glucose/O₂ Biofuel Cell Using Recombinant Thermophilic Enzymes. **Int. J. Electrochem. Sci.**, vol. 7, p. 1071 – 1078, 2012.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme Microb. Technol.** vol. 6, p. 341-349, 1984.

XIE, F.; QUANA, S.; LIUA, D.; MAA, H.; LI, F.; ZHOUB, F.; CHENB, G. Purification and characterization of a novel alfa-amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. **Process Biochemistry**, vol. 49, p. 47–53, 2014.

YALÇIN, H.T.; ÇORBAC, C. Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. **Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem**; vol. 38, p.101–108, 2013.

ZHANG, S.; WU, Z. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PopMusic algorithm. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 2093–2096, 2011.

PARTE 2

5. ARTIGO 1 – ANÁLISE DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DO CERRADO TOCANTINENSE

Resumo

As enzimas são úteis em vários setores da economia como, por exemplo, nas indústrias de detergentes, fármacos, têxtil e alimentícia. A identificação de novas fontes microbianas e a triagem de enzimas é de grande interesse para suprir os mais diversos tipos de processos industriais. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial enzimático, de linhagens de leveduras isoladas a partir de cocos de Babaçu (*Orbignya sp.*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), Tucum (*Bactris inundata*), Inajá (*Attalea maripa*) e Macaúba (*Acrocomia aculeata*), frutos típicos do cerrado Tocantinense. Foram testadas 142 leveduras quanto à capacidade de produção das enzimas lipase, amilase, protease e pectinase em meios sólidos específicos com tempo de incubação de 21 dias e temperatura de 35 °C, em três repetições. Um total de 61 linhagens mostrou resultados positivos para lipase, das quais 28 (45,9%) tinham índice enzimático (IE) ≥ 2 , apenas uma levedura apresentou halo indicador de produção de amilase (IE = 1,57) e não houve resultados positivos para pectinase e protease. Leveduras isoladas a partir de frutos do cerrado apresentaram potencial na produção de lipases.

Palavras-Chave: Leveduras, Enzimas Hidrolíticas, Frutos do Cerrado, Hidrolases, Lipase.

ARTICLE 1 - ANALYSIS OF THE ENZYMATIC POTENTIAL OF ISOLATED YEASTS FROM FRUITS OF THE CERRADO IN TOCANTINS

Abstract

Enzymes are useful in various sectors of the economy such as in the industries of detergents, pharmaceuticals, textile and food. The identification of new microbial sources of enzymes and screening are of great interest to meet the demands of several kinds of industrial processes. This study aimed to evaluate the enzymatic potential of yeasts strains isolated from babassu (*Orbignya sp.*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tucumán (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*), typical fruits of the Cerrado in Tocantins. A total of 142 yeasts were tested for their ability to produce lipase, amylase, protease and pectinase enzymes in specific solid media at incubation time of 21 days and 35 °C, in triplicate. A total of 61 strains showed positive results for lipase, 28 of which (45.9%) had an enzyme index (EI) ≥ 2 . Only one yeast showed a amylase production (EI = 1.57) and there were no positive results for protease and pectinase. Yeasts isolated from fruits of the cerrado showed potential as lipase producers.

Keywords: Yeasts, Hydrolytic Enzymes, Fruits of the Cerrado, Hydrolases, Lipase.

5.1. INTRODUÇÃO

As enzimas têm papel fundamental em diversos segmentos da indústria e seu potencial de aplicações tem se ampliado diante da realização de novas pesquisas e da otimização dos processos enzimáticos. Sua utilização se deve ao alto grau de especificidade das reações que catalisam, pois efetuam conversões eficientes e econômicas, podem atuar em concentrações baixas de substrato, sob condições brandas de pH e temperatura e, principalmente, são biodegradáveis. As amilases, pectinases, lipases e proteases são úteis em vários setores da economia como, por exemplo, nas indústrias de detergentes, fármacos, têxtil e alimentícia, o que demonstra a sua importância (MACIEL, 2010; SILVA, 2011).

Estas enzimas são altamente específicas e as condições ótimas para a sua aplicação variam muito. Mesmo aquelas que têm perfil de atuação idêntico podem variar umas das outras em relação ao pH, temperatura, concentração iônica, dentre outros fatores, o que torna necessária a seleção da enzima mais adequada para determinada finalidade. Diante disso, a identificação de novas fontes microbianas é de grande interesse para suprir os mais diversos tipos de processos industriais (ALVES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

No Brasil, a variedade de biomas resulta em uma grande riqueza de fauna e flora. Cerca de mais de 10% das espécies conhecidas na Terra, como plantas, animais e fungos, são encontrados nesses ambientes brasileiros (ALHO, 2008; VALENCIA; CHAMBERGO, 2013). Dentre os fungos, as leveduras se apresentam como uma fonte alternativa de produção de enzimas microbianas para a indústria de alimentos (SILVA et al., 2005). Leveduras não patogênicas são capazes de produzir enzimas industrialmente úteis e tem ganhado cada vez mais importância. Esse grupo de microrganismos pode ser facilmente cultivado e produz altos níveis de enzimas extracelulares (YALÇIN; ÇORBAC, 2013). Portanto, o *screening* de microrganismos é a chave para selecionar aqueles que produzam metabólitos desejáveis.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial enzimático de linhagens de leveduras isoladas a partir de frutos de babaçu (*Orbignya sp.*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tucum (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*) para a produção de lipase, amilase, protease e pectinase.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Microrganismos: origem e manutenção

As linhagens de leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de frutos de babaçu (*Orbignya sp.*), buriti (*Mauritia flexuosa*), tucum (*Bactris inundata*), inajá (*Attalea maripa*) e macaúba (*Acrocomia aculeata*), provenientes de diferentes regiões do estado do Tocantins. Esses microrganismos fazem parte da Coleção de Culturas Carlos Rosa, coordenada pela Prof^ª Dr^ª Paula Benevides de Moraes na Universidade Federal do Tocantins-UFT, onde são mantidas em caldo GYMP/glicerol a - 80 °C.

5.2.2. Triagem das linhagens produtoras de enzimas

A seleção das linhagens potencialmente produtoras de enzimas foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins (LAMA-UFT). As linhagens de leveduras foram reativadas em *yeast malt agar* (YMA) conforme metodologia de Wickerman (1951), meio composto por 2 g.l⁻¹ de glicose; 0,3 g.l⁻¹ de extrato de levedura; 0,3 g.l⁻¹ de extrato de malte; 0,5 g.l⁻¹ de peptona; 0,01 g.l⁻¹ de cloranfenicol; 1,8 g.l⁻¹ ágar e 1000 mL de água destilada. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas.

Foi avaliada a capacidade de produção das enzimas lipase, amilase, protease e pectinase de 142 linhagens em meios sólidos específicos, sendo 37 de buriti, 2 de babaçu, 72 de tucum, 30 de inajá e 1 de macaúba. Foram inoculadas 6 linhagens por placa com o auxílio de palitos de dente estéreis. Os ensaios foram realizados em 3 repetições e as placas incubadas a 35 °C por 21 dias. As condições de tempo e temperatura foram determinadas a partir de um teste piloto realizado com 20 linhagens no qual se verificou que para o cultivo em 7, 14 e 21 dias e com temperaturas de 25, 35 e 45 °C, os melhores resultados, de acordo com o índice enzimático, se deram nas condições de 21 dias de incubação a 35 °C.

5.2.2.1. Lipase

A avaliação da atividade lipolítica foi feita de acordo com o método de Sierra (1956) com modificações, utilizando-se Tween-20 (monolaurato de sorbitan) como substrato. O meio continha 10 g.l⁻¹ de peptona, 5 g.l⁻¹ de NaCl, 0,1 g.l⁻¹ de CaCl₂, 20 g.l⁻¹ de ágar, 1000 mL de

água destilada e pH ajustado para 6,0 com solução de KOH. O Tween-20 foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio (10 g.l^{-1}) momentos antes de vertê-lo às placas de Petri.

A atividade das enzimas lipolíticas foi observada como um precipitado visível devido à formação de cristais de sais de cálcio ou como um halo claro deste precipitado ao redor das colônias.

5.2.2.2. Amilase

A atividade amilolítica foi verificada em meio contendo 20 g.l^{-1} de amido solúvel, 5 g.l^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g.l^{-1} de KH_2PO_4 , 18 g.l^{-1} de ágar e 1000 mL de água destilada (LOODER, 1970). A revelação dos halos foi feita através coloração das placas com vapor de iodo, segundo Hankin e Anagnostakis, (1975).

5.2.2.3. Protease

A atividade proteolítica foi avaliada em meio contendo 10 g.l^{-1} de glicose, 5 g.l^{-1} de extrato de levedura, 10 g.l^{-1} de gelatina comercial sem sabor, 18 g.l^{-1} de ágar e 1000 mL de água destilada, em pH ajustado para 7,0 com solução de KOH. A atividade proteolítica foi avaliada de acordo com a presença de halos de liquefação do meio ao redor das colônias, segundo Yarrow (1998).

5.2.2.4. Pectinase

A atividade pectinolítica foi avaliada em meio contendo 5 g.l^{-1} de extrato de levedura, 10 g.l^{-1} de glicose, 10 g.l^{-1} de pectina cítrica, 5 g.l^{-1} de ágar, 1000 mL de tampão fosfato 50 mM e pH 5,5. Os halos de hidrólise foram verificados após tratamento das placas com vapor de iodo, segundo Gainvors et al. (1994) com adaptações.

5.2.3. Índice Enzimático

Em todos os casos os diâmetros dos halos de hidrólise e das colônias foram aferidos com o auxílio de paquímetro e com estes dados foi calculado o Índice Enzimático (IE), representado pela relação entre a média de diâmetro dos halos de degradação pela média de diâmetro da colônia conforme descrito por Hankin e Anagnostakis (1975). Foram

considerados satisfatórios os índices enzimáticos ≥ 2 de acordo com a recomendação de Lealem e Gashe (1994 apud STAMFORD et al., 1998)

5.2.4. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através de um delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições, aplicando o teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparar as médias dos tratamentos, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 142 leveduras, 61 apresentaram resultados positivos para lipase com os valores de índice enzimático variando de 1,22 a 9,59. Vinte e oito (45,9%) linhagens apresentaram índice enzimático ≥ 2 que, de acordo com Lealem e Gashe (1994 apud STAMFORD et al., 1998) é o índice considerado satisfatório para a produção de enzimas em meio sólido. Sendo que 16 foram isoladas de tucum (*Bactris inundata*), 6 de inajá (*Attalea maripa*), 5 de buriti (*Mauritia flexuosa*) e 1 de babaçu (*Orbignya sp.*). As linhagens de código T13 e T114 foram as que apresentaram os maiores índices enzimáticos médios, não diferindo entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Índice enzimático médio (IE) com resultados ≥ 2 para lipase.

Linhagem	IE médio*	Linhagem	IE médio*
I 130	2,78 ^{def}	T 44	2,36 ^{ef}
Bu 344	2,36 ^{ef}	T 124	2,46 ^{ef}
I 338	2,71 ^{def}	T 114	7,16 ^{ab}
I 296	2,75 ^{def}	T 60	2,8 ^{def}
Bu 66	2,77 ^{def}	T 13	9,59 ^a
Bu 86	2,46 ^{ef}	T 117	2,5 ^{ef}
Bu 345	2,59 ^{ef}	I 1363	2,84 ^{def}
I 258	2,09 ^f	I 1467	2,49 ^{ef}
T 841B	3,03 ^{def}	Ba 1020	2,13 ^{ef}
T 791	2,78 ^{def}	T 149	2,25 ^{ef}
T 183	2,75 ^{def}	T 348	2,03 ^f
T 43	3,44 ^{cdef}	T 187	2,26 ^{ef}
T 250	2,00 ^f	T 194	4,93 ^{bcdef}
T 7	2,44 ^{ef}	Bu 622B	2,53 ^{ef}

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$); DMS (Tukey) = 2.97556; CV = 27.81%. Letras anteriores ao código da linhagem indicam sua origem, T: tucum, I: inajá, Ba: babaçu e Bu: buriti.

Ferreira et al. (2008), ao fazerem a análise das propriedades físico-químicas do mesocarpo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.), também conhecido como tucum, encontraram uma concentração de 40,49% de lipídeos. Rodrigues et al. (2010) encontraram

38,42% ($\pm 1,45$) e 35,52% ($\pm 0,52$) como conteúdo total de óleo para buriti e inajá respectivamente. Já a amêndoa do babaçu pode conter até 72% de óleo de acordo com Soler et al. (2007). Toda essa riqueza lipídica favorece o desenvolvimento de leveduras lipolíticas e, portanto a tendência para a produção de lipase já era esperada.

Goldbeck e Filho (2013), ao fazerem a seleção quanto a atividade lipolítica de 372 leveduras isoladas de diversos biomas brasileiros como Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e Amazônia, obtiveram halo de hidrólise em 207 delas, representando 55,65%. Neste trabalho, o IE foi considerado como sendo a taxa entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, os $IE > 5$ foram classificados como grandes, IE entre 2 e 5 como médios e $IE < 2$ pequenos. Dos 120 microrganismos provenientes do Cerrado, 68 produziram halo, dos quais 10 (14,7%) apresentaram $IE > 5$ e 36 (52,9%) entre 2 e 5.

Em trabalho realizado por Bataiche et al. (2014), leveduras com capacidade lipolítica foram isoladas a partir de resíduos de óleo de oliva. A linhagem *Candida boibinii* KF156789 foi considerada a melhor produtora de lipase dentre as 25 linhagens avaliadas no experimento, sendo que do total, 24 apresentaram atividade lipolítica. Estes autores mediram o diâmetro das colônias (d) e o diâmetro total dos halos hidrolíticos incluindo a colônia (D) e usaram a relação (D-d) para selecionar os microrganismos com maior potencial para a produção de lipase. A linhagem com melhor atividade lipolítica apresentou halo com o diâmetro de 20 mm.

Lock (2007) ao avaliar a atividade catalítica de lipases produzidas por leveduras isoladas de folhas de bromélias no Parque de Itapuã testou 56 amostras utilizando Tween 20 como única fonte de carbono, obtendo 7 (26%) linhagens positivas quanto a produção de lipase extracelular pela formação de um precipitado composto de sais de ácido graxo.

Apenas uma levedura, codificada com o número 295, isolada a partir de tucum, apresentou halo indicador de produção de amilase, com índice enzimático de 1,57. Esse resultado deve estar relacionado com o substrato de onde foi isolada. Trabalhos como o de Costa et al. (2011), estudaram o potencial amilolítico de enzimas de 96 linhagens de leveduras isoladas de batata-doce, das quais, 16 (16,3%) linhagens apresentaram atividade amilolítica. Oliveira et al. (2006) que avaliaram o uso da farinha de pupunha na produção de amilase por isolados de rizóbio nativos da Amazônia Central encontraram 19 isolados com atividade amilolítica, sendo que 7 (36,8%) exibiram um $IE \geq 2$. O fato desses microrganismos terem sido isolados de substratos ricos em amido indica que a fonte de isolamento tem grande influência sobre o potencial enzimático dos microrganismos presentes.

Yalçın e Çorbac (2013) testaram a atividade amilolítica de 25 isolados provenientes de diferentes fontes (solo, pão, arroz e farinha de arroz) e também encontraram resultados positivos, neste caso, para 12 (48%) delas. Os resultados podem estar relacionados ainda, com o mecanismo de ação de suas enzimas bem como com a quantidade significativamente variável de enzimas que são secretadas entre diferentes leveduras. De acordo com Salyers et al. (1996), algumas bactérias possuem enzimas que ficam aderidas a sua superfície, ou em seu espaço periplasmático e, neste caso, precisam assim internalizar os polissacarídeos para então quebrá-los. Costa et al. (2011) sugere que algumas linhagens de leveduras possuam o mesmo mecanismo de ação e tenham suas enzimas adsorvidas a parede celular ou no espaço periplasmático o que não permitiria a formação de halos de hidrólise, justificando assim os resultados encontrados neste trabalho.

Nenhuma das 142 leveduras testadas apresentou halo indicador da produção de pectinase ou protease. Em trabalho de Silva et al. (2005), 300 leveduras isoladas a partir de frutas tropicais foram testadas em relação ao potencial de produção e secreção de enzimas. Sendo que somente 21 (7%) foram positivas para a atividade de poligalacturonase, e destas, 7 foram positivas para pectinase e não foi detectada atividade de pectinesterase em nenhuma das linhagens testadas. Neste trabalho, os autores identificaram as linhagens de *Kluyveromyces wickerhamii* 185 e *K. marxianus* 166 como as principais produtoras de pectinases. Segundo estes autores, as leveduras presentes em algumas frutas tropicais podem ser capazes de produzir pectinases para degradar a pectina presente na polpa da fruta e assimilar os açúcares presentes nas cadeias de pectina como a ramnose, galactose e arabinose.

A produção de enzimas pécticas tem sido bem estudada em bactérias e fungos filamentosos porque elas têm um papel importante na fitopatogênese, já a produção de pectinase em leveduras recebe menos atenção e poucas espécies têm mostrado essa habilidade (BLANCO, 1999).

Strauss et al. (2001) realizaram um estudo com 245 leveduras obtidas da *Wine and Fermentation Technology Division*, ARC Infruitech-Nietvoorbij. Essas leveduras eram linhagens nativas de vinhos de quatro regiões produtoras em Western Cape, África do Sul. Somente 9 isolados representados por *Candida stellata*, *C. oleophila*, *C. pulcherrima*, *Candida valida* e *Kloeckera apiculata* mostraram atividade pectinolítica em meio sólido. Já para a atividade proteolítica, 10 isolados de *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *K. apiculata* e um isolado de *Debaromyces hansenii* apresentaram resultados positivos.

Bedriñana et al. (2011), analisaram 420 cepas de leveduras, 14 das quais pertenciam a coleção SERIDA de culturas puras, e o restante foi isolado em duas adegas de Villaviciosa

durante três safras consecutivas. Em 15% dos isolados foi observada atividade proteolítica positiva, enquanto que nenhuma apresentou resultados positivos para pectinase cuja produção, segundo os autores, é incomum para esse tipo de leveduras.

Um dos fatores que podem explicar os bons resultados obtidos para lipase e não para as demais enzimas é a própria competição entre microrganismos no substrato em que se encontram. É natural que em um ambiente rico em lipídeos predominem as leveduras capazes de degradá-lo, mesmo que haja a presença de pectina, amido e proteínas.

5.4. CONCLUSÃO

As leveduras isoladas a partir de tucum, inajá, buriti e babaçu são promissoras para o isolamento de leveduras lipolíticas.

Os isolados de leveduras a partir de tucum apresentaram os maiores valores de índice enzimático para lipase.

A ausência de enzimas pectinolíticas e proteolíticas e baixa incidência de amilases pode estar relacionada com a origem das leveduras.

5.5. REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R. The value of biodiversity. **Braz. J. Biol.**, vol. 68 p. 1115-1118, 2008.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, poligalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol.33 p. 325-330, 2002.
- BATAICHE, I.; KACEM-CHAOUICHE, N.; DESTAIN, J.; LEJEUNE, A.; THONART, P. Screening of *Candida boidinii* from Chemlal spent olive characterized by higher alkaline-cold adapted lipase production. **African Journal of Biotechnology**, vol 13, p. 1287-1294, 2014.
- BEDRIÑANA, R.P.; QUEIPO, A.L.; VALLES, S.B. Screening of enzymatic activities in non-*saccharomyces* cider yeasts. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 36, p. 683–689, 2011.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts - MiniReview. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 175, p. 1-9, 1999.
- COSTA, S.T.C.; ABREU-LIMA, T.L.; CARREIRO, S.C. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). **RevBio - Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**, vol.17, p. 15-24, 2011.
- FERREIRA, E.S.; LUCIEN, V.G.; AMARAL, A.S.; SILVEIRA, C.S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **Alim. Nutr., Araraquara**, vol.19, p. 427-433, 2008.
- GAINVORS, A.; FRÉZIER, V.; LEMARESQUEIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, vol.10, p.1311-1319, 1994.
- GOLDBECK, R.; FILHO, F.M. Screening, Characterization, and Biocatalytic Capacity of Lipases Producing Wild Yeasts from Brazil Biomes. **Food Sci. Biotechnol**, vol. 22, p. 79-87, 2013.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Departments of Biochemistry and Genetics. **The Connecticut Agricultural Experiment Station**, vol. 67, p.597-607, 1975.
- LOODER, J. General classification of the yeast. In: **The yeast a taxonomic study**, 2.ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970.
- LOCK, L.L. **Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 125p. 2007.
- MACIEL, V.F.A.; PACHECO, T.F.; GONÇALVES, S.B. Padronização do uso de corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. **Comunicado Técnico**. Brasília, DF. Dezembro, 2010.

OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S.; CHAGAS-JÚNIOR, A.F.. Produção de amilases por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 61-66, 2006.

RODRIGUES, A.M.C.; DARNET, S.; SILVA, L.H.M. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) **Fruits. J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 21, p. 2000-2004, 2010.

SALYERS, A.A.; REEVES, A.; D'ELIA, J. Solving the problem of how to eat something as big as yourself: diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, vol. 17, p. 470-476, 1996.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Laboratory of Microbiology**, Amsterdam, Holland and Department of Biochemistry, Institute aime Ferrán of Microbiology, Madrid, Spain. p. 15-22, 1956.

SILVA, E.G.; BORGES, M.F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruit. **FEMS Yeast Research**, vol. 5, p. 859–865, 2005.

SILVA, M.S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. Dissertação Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 83 p., 2011.

SOLER, M. P.; VITALI, A. A.; MUTO, E. F. Tecnologia de quebra do coco babaçu (*Orbignya speciosa*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 27, p. 717-722, 2007.

STAMFORD, T. L.M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 18 n. 4 Campinas Oct./Dec. 1998**

STRAUSS, M.L.A.; JOLLY, N.P.; LAMBRECHTS, M.G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 91, p. 182-190, 2001.

VALENCIA, E.Y.; CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, vol. 60, p. 9–18, 2013.

WICKERMAN, L., J. Taxonomy of yeasts. **Technical Bulletin 1029US**. Department of Agriculture, Washington DC, 1951.

YALÇIN, H.T.; ÇORBAC, C. Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. **Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem**, vol. 38, p. 101–108, 2013.

YARROW, D. **Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts**. In: Kurtzman, C. P., Fell, J. W.(eds). *The yeasts – a taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier Science Publ., p.77-100, 1998.

6. ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE EM MEIO SUBMERSO POR UMA LEVEDURA ISOLADA DE TUCUM (*Bactris inundata*)

Resumo

Lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas biotecnologicamente relevantes e com diversas aplicações industriais sendo tradicionalmente produzidas por fermentação submersa. A otimização do meio de cultivo para a produção da enzima é um importante passo para o uso comercial e a aplicação de abordagens estatísticas envolvendo as metodologias de Plackett-Burman e superfície de resposta são ferramentas úteis para este fim e para compreensão das interações entre os diversos parâmetros envolvidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar as melhores condições de cultivo para a produção de lipase em meio submerso por uma levedura isolada de tucum (*Bactris inundata*). Foi avaliado o efeito da composição do meio na produção de lipase utilizando a técnica de planejamento de experimentos para maximizar a produção da enzima. A maior atividade enzimática ($41,45 \text{ U.mL}^{-1}$) foi obtida em meio contendo: 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 10 g.L^{-1} de peptona, 30 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g.L^{-1} de Tween 20, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e 10 g.L^{-1} de óleo de oliva. Quando comparado com os óleos de buriti e babaçu, o óleo de oliva se mostrou o melhor indutor para a produção de lipase.

Palavras-Chave: Leveduras, Enzimas Lipolíticas, Frutos do Cerrado, Fermentação Submersa, Plackett-Burman.

ARTICLE 2 - OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION IN SUBMERGED MEDIUM BY ISOLATED YEAST OF TUCUM (*Bactris inundata*)

Abstract

Lipases (triacylglycerol hydrolase, EC 3.1.1.3) are biotechnologically relevant enzymes with various industrial applications they are traditionally produced by submerged fermentation. Optimization of the medium for enzyme production is an important step for commercial use and the application of statistical approaches involving the Plackett-Burman methodologies and response surface are useful tools for the optimization of resources and understanding the interactions between the many parameters involved. This study aims to evaluate the best growing conditions for production lipase by an yeast isolated from tucum (*Bactris inundata*). The effect of medium composition in the lipase production using the experimental design technique to maximize production of the enzyme was evaluated. The highest enzymatic activity (41.45 U.mL^{-1}) was obtained in a medium containing 10 g.L^{-1} yeast extract, 10 g.L^{-1} peptone, 30 g.L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g.L^{-1} Tween 20, 1.5 g.L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.7 g.L^{-1} KH_2PO_4 and 10 g.L^{-1} olive oil. When compared with buriti and babassu oils, the olive oil proved to be the best inducer for the lipase production.

Keywords: Yeast, lipolytic enzymes, Cerrado fruits, Submerged Fermentation, Plackett-Burman.

6.1. INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são um importante grupo de enzimas biotecnologicamente relevantes devido a sua atividade catalítica em meios aquosos e não aquosos. Elas têm diversas aplicações em uma grande variedade de indústrias como a de detergentes, oleoquímica, síntese orgânica, laticínios, modificação de gorduras e óleos e farmacêutica (GUPTA et al., 2007). As lipases precisam ser robustas e versáteis em relação a gama de substratos em que podem atuar e ao mesmo tempo ter uma elevada especificidade para as reações que catalisam (GUPTA et al., 2004).

Fontes de carbono lipídicas são essenciais para a obtenção de um alto rendimento de lipases. Entretanto, fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais também devem ser cuidadosamente consideradas para o crescimento e otimização da produção. Essas exigências nutricionais para o crescimento microbiano podem ser satisfeitas por várias alternativas de meios com compostos definidos (meios sintéticos) como açúcares, óleos, e componentes complexos como peptona, extrato de levedura, extrato de malte, e também resíduos agroindustriais que contenham todos os componentes necessários para o desenvolvimento do microrganismo (TREICHEL, 2010).

A otimização do meio de cultivo para a produção de enzimas é um importante passo para o uso comercial e envolve vários parâmetros físico-químicos como a composição do meio de produção, as fontes de carbono e nitrogênio, minerais e traços de metais, pH, temperatura, aeração e idade do inóculo. Nos últimos anos, o uso de abordagens estatísticas envolvendo as metodologias de Plackett-Burman (PB) e superfície de resposta deram um grande impulso para a otimização dos meios e a compreensão das interações entre os diversos parâmetros envolvidos utilizando uma quantidade mínima de experimentos (COLLA et al., 2012; GUPTA et al., 2007; GUPTA et al., 2004, RATHI et al., 2002).

Lipases são amplamente distribuídas na natureza, e enzimas fúngicas têm sido escolhidas para aplicações industriais por serem geralmente reconhecidas como seguras e os fungos serem de fácil cultivo. Elas têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa porque a recuperação das enzimas extracelulares e a determinação da biomassa são facilmente realizadas por filtração ou centrifugação (CORADI et al., 2012; JAEGER et al., 1999).

Pesquisas com microrganismos isolados de ambientes pouco estudados bem como da composição dos meios de cultivo são importantes para que se alcance uma maior produção da

enzima de interesse com custos reduzidos e a otimização das condições de fermentação é uma via eficiente para melhorar a produção de lipases (LI e ZONG, 2010).

O objetivo deste trabalho foi encontrar as melhores condições de cultivo em meio submerso para a produção de lipase por uma levedura isolada de tucum (*Bactris inundata*).

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Microrganismo, cultivo e manutenção

A levedura utilizada neste trabalho pertence à Coleção de Culturas Microbianas Carlos Rosa, coordenada pela Prof^a Dr^a Paula Benevides de Moraes na Universidade Federal do Tocantins-UFT. A linhagem foi isolada a partir de frutos de tucum (*Bactris inundata*) e recebeu o código 13, sendo preservada a - 80 °C em caldo GYMP/glicerol.

A levedura foi reativada em *yeast malt agar* (YMA) conforme metodologia de Wickerman (1951), meio composto por 2 g.L⁻¹ de glicose, 0,3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 0,3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 0,5 g.L⁻¹ de peptona, 0,01 g.L⁻¹ de cloranfenicol, 1,8 g.L⁻¹ de agar, 1000 mL de água destilada e incubada a 28 °C por 48 horas.

6.2.2. Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, foi realizado o crescimento da levedura em frascos erlenmeyer de 50 mL com 20 mL de caldo GYMP durante 18 h, 200 rpm a 35 °C, tendo sido a inoculação realizada através de uma alçada retirada do cultivo em placa de YMA. Em seguida os 20 mL foram transferidos para um erlenmeyer de 250 mL com 180 mL de caldo GYMP e submetido as mesmas condições de agitação e temperatura por mais 5 h. Essas condições de cultivo foram determinadas através de uma curva de crescimento realizada anteriormente. O caldo GYMP é composto por 20 g.L⁻¹ de glicose, 10 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g.L⁻¹ de NaH₂PO₄ e 1000 mL de água destilada. Alíquotas de 10 mL de inóculo foram adicionadas aos meios de cultivo correspondendo a uma concentração final de $4,4 \times 10^7$ células por mL.

6.2.3. Otimização das condições de cultivo

Todos os cultivos submersos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. Os meios foram solubilizados em tampão fosfato com a adição de KOH até o pH desejado e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min, com exceção dos óleos que foram esterilizados separadamente por calor seco (180 °C por 60 min) e adicionados assepticamente antes da inoculação. Os meios de cultivo foram mantidos a 35 °C e agitação de 200 rpm e amostras foram retiradas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 h. Após

períodos de incubação definidos, a biomassa foi separada por centrifugação a 5000 rpm por 1 h a 19 °C e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) obtido foi armazenado sob refrigeração (- 18 °C) para posterior análise de atividade enzimática.

6.2.4. Efeito das condições de cultivo na produção de lipase

Para se avaliar o efeito das variáveis na produção de lipase foi utilizado um planejamento experimental Plackett-Burman com 12 ensaios (PB-12) segundo Rodrigues e Iemma (2005). Os níveis das variáveis são apresentados na Tabela 1. A análise dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) com o uso do programa Statistica 7.0 assumindo $p < 0,1$, utilizando como resposta a atividade enzimática nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no PB-12 para a produção de lipase.

Variável*	-1	+1
Óleo de oliva	10	30
Extrato de levedura	10	20
Peptona	10	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	15
Tween 20	1	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	4
KH ₂ PO ₄	0,7	3,5
pH	4,5	6,5

*Variáveis em g.L⁻¹, exceto o pH.

6.2.5. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após analisar o efeito das 8 variáveis no planejamento PB-12, foram selecionadas aquelas que foram significativas e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para otimizar as condições de produção de lipase. Assim, foi realizado um DCCR 2² com quatro pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, com 96 h de incubação. As variáveis e níveis estudados estão apresentados na Tabela 2. As demais variáveis foram fixadas em valores escolhidos arbitrariamente.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados no DCCR para a produção de lipase.

Variável	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tween 20	1	1,58	3	4,42	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	2,18	7,5	12,82	15

6.2.6. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC)

Com base na variável significativa selecionada no DCCR, o Tween 20 foi fixado na menor concentração e foi realizado um DIC para se avaliar o efeito de diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄ (10, 15, 20, 25 e 30 g.L⁻¹) na produção de lipase. Após determinada a melhor concentração, foram realizados ensaios com óleos de buriti e babaçu sendo adicionados em substituição ao óleo de oliva.

Todos os experimentos foram realizados em 3 repetições, com 96 h de incubação. Os resultados obtidos foram comparados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

6.2.7 Procedimentos analíticos

6.2.7.1 Biomassa

A biomassa obtida conforme descrito no item 6.2.3 foi lavada em 10 mL de água destilada, centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente e ressuspensa em 6 mL de água destilada, foi então transferida para placas de petri e mantida em estufa a 80 °C até peso constante para obtenção do peso seco.

6.2.7.2. Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o método descrito por Freire et al. (1997) com alterações. Em frascos erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 19 mL de emulsão (1% de triton X-100 e 5% de óleo de oliva) em tampão McIlvaine (pH 7,0). Essa emulsão foi homogeneizada em shaker por 3 min a 37 °C e 200 rpm, em seguida foi adicionado 1 mL do extrato bruto enzimático (obtido conforme item 6.2.3) e incubada por 30 min a 37 °C e 200 rpm. Após a incubação paralisou-se a reação com 20 mL de solução de

acetona:etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,1 M até pH final 11. A atividade enzimática foi determinada de acordo com a equação:

$$\text{Atividade enzimática } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right) = \frac{(\text{Vtf} - \text{Vti}) \times 1000 \times \text{Fd} \times \text{M}}{t}$$

Onde:

Vtf = Volume de NaOH após 30 min de reação;

Vti = Volume de NaOH usado para titular o branco;

M = Molaridade do NaOH;

t = Tempo total de reação;

Fd = Fator de diluição.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Planejamento Experimental Plackett-Burman

A Tabela 3 mostra os níveis utilizados para cada variável do Planejamento Experimental Plackett-Burman. De acordo com a análise estatística, a variável $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi significativa em todos os tempos testados, e a variável Tween 20 também teve efeito significativo com 96 h de incubação, sendo que as maiores atividades lipolíticas se deram no maior nível de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dados na tabela 4.

Tabela 3. Níveis utilizados para cada variável no PB-12.

Ens.	Óleo	Ext. de Lev.	Pep.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Tween 20	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KH_2PO_4	pH
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabela 4. Resultados da atividade lipolítica $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ obtidos no PB-12 em diferentes tempos de incubação.

Ensaio	24h	48h	72h	96h
1	8,83	1,00	4,33	3,33
2	29,67	45,67	29,33	18,67
3	21,33	23,33	16,67	11,33
4	23,67	43,00	27,00	23,00
5	47,33	35,33	51,33	51,33
6	28,33	18,67	27,00	16,67
7	45,67	57,00	44,33	36,33
8	47,33	50,33	36,33	41,67
9	30,67	41,00	14,67	43,33
10	16,67	16,67	28,67	20,33
11	4,17	2,00	2,17	10,00
12	23,67	18,00	14,00	18,67

Oliveira et al. (2013) avaliaram a utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por *Candida guilliermondi* em fermentação submersa, e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ teve um impacto tão significativo que proporcionou um ganho de quase 10 U.mL^{-1} quando aumentado do nível mais baixo para o mais alto. Tan et al. (2003) relatam que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi a melhor fonte inorgânica de nitrogênio para a produção de lipase por *Candida* sp., sua utilização resultou em um aumento de 3 vezes na atividade lipolítica.

Já Oliveira e Lima (2014), ao testarem a influência da gordura de frango e fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio na produção de lipase por *Fusarium* sp. encontraram um efeito negativo do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre a resposta, causando decréscimo na atividade lipolítica de $1,59 \text{ U.mL}^{-1}$. Apesar da necessidade de fontes de nitrogênio para a produção de enzimas, a forma como todas as variáveis interagem e como são utilizadas variam de experimento para experimento bem como de acordo com o microrganismo em questão.

Teng e Xu (2008) ao investigarem a produção de lipase por *Rhizopus chinensis* em fermentação submersa em condições experimentais otimizadas encontraram atividade máxima de lipase de 14 U.mL^{-1} . *Candida* sp. é a levedura com maior potencial para a produção de lipases reportada na literatura (TREICHEL et al., 2010). He e Tan (2006) usaram a metodologia da superfície de resposta para otimizar o meio de cultivo para a produção de lipase por *Candida* sp. 99-125. Esses autores encontraram uma atividade lipolítica ótima de 6.230 e 9.600 U.mL^{-1} em frascos agitados e em um biorreator de 5 L, respectivamente.

Goldbeck e Filho (2013) testaram a atividade lipolítica em meio líquido de 372 microrganismos isolados de diferentes biomas do Brasil e somente 3 cepas tiveram resultados consideráveis, isso evidencia a dificuldade de se isolar e selecionar microrganismos produtores de enzimas com potencial de aplicação industrial e a grande importância de estudos de seleção.

A Tabela 5 apresenta a biomassa obtida em todos os ensaios. Houve influência significativa positiva do óleo de oliva nos tempos de 24, 48 e 72 h, e negativa do Tween 20 para os mesmos tempos, as amostras retiradas com 96 h de incubação não foram influenciadas significativamente por nenhuma das variáveis.

Açikel et al. (2010), ao otimizar a produção de lipase por *Rhizopus delemar* encontrou influência significativa das variáveis Tween 80 e óleo de girassol no crescimento celular, sendo que a produção de biomassa cresceu quando houve aumento da concentração do Tween 80 e do óleo de girassol.

Os resultados da biomassa quando comparados com os de atividade enzimática mostram que as maiores atividades enzimáticas estão relacionadas com baixos valores de

biomassa, como se observa nos ensaios 5 (24, 72 e 96 h), 7 (48h) e 8 (24 h). A adição de surfactantes ao meio de cultura pode resultar em um aumento da secreção de enzimas lipolíticas por certos microrganismos, devido ao seu efeito em enzimas ligadas nas células ou a alterações na permeabilidade celular levando a maior secreção da proteína (COSTAS et al., 2004; BINDIYA; RAMANA, 2012). O que pode explicar a influencia negativa do Tween 20 na produção de biomassa, tendo em vista que este se encontrava no maior nível para a maioria dos ensaios onde se obteve melhores resultados de atividade enzimática.

Tabela 5. Resultados obtidos pelo Planejamento Experimental Plackett-Burman para a biomassa em (g.L⁻¹).

Ensaio	24 h	48 h	72 h	96 h
1	7,6	10,4	10,9	7,2
2	5,7	10,2	13	12,5
3	3,8	6,5	7,9	8,8
4	7,7	11,1	12	10,3
5	3,9	6,2	6,7	6,9
6	5,9	7,2	11,4	13,7
7	4,1	6,4	8,8	8,3
8	4,4	5,2	6,9	8,3
9	3,7	4,6	6	8,5
10	5,6	7,4	7,8	9,8
11	5,3	7	11,3	13,2
12	4,3	5,1	6,5	8,3

6.3.2. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com base nos resultados obtidos no PB-12 foi realizado um DCCR (2²) com quatro pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 ensaios, com o objetivo de maximizar as condições de cultivo para a produção de lipase. As variáveis independentes utilizadas foram o Tween 20 e o (NH₄)₂SO₄, pois foram as únicas estatisticamente significativas no experimento anterior. As demais variáveis foram arbitrariamente fixadas em 10 g.L⁻¹ de óleo, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 1,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,7 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e pH 4,5. O tempo de incubação de 96 h foi escolhido por ter apresentado duas variáveis significativas no PB-12 (Tween 20 e o (NH₄)₂SO₄), enquanto nos demais apenas o (NH₄)₂SO₄ foi significativo. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para a atividade lipolítica e biomassa.

Tabela 6. Resultados da atividade lipolítica (U.mL⁻¹) e biomassa (g.L⁻¹) obtidos no DCCR.

Ensaio	(NH ₄) ₂ SO ₄	Tween 20	Atividade Lipolítica	Biomassa
1	2,18 (-1)	1,58 (-1)	10,67	4,3
2	12,82 (+1)	1,58 (-1)	36	4,5
3	2,18 (-1)	4,42 (+1)	11,33	3,6
4	12,82 (+1)	4,42 (+1)	21	2,8
5	0 (-1,41)	3 (0)	13,67	3,5
6	15 (+1,41)	3 (0)	54,33	3,1
7	7,5 (0)	1 (-1,41)	41,67	3,9
8	7,5 (0)	5 (+1,41)	17,33	2,9
9	7,5 (0)	3 (0)	28,67	3,4
10	7,5 (0)	3 (0)	20,67	2,8
11	7,5 (0)	3 (0)	19,33	3,5

Segundo a análise estatística apenas a variável (NH₄)₂SO₄ teve efeito significativo sobre a produção de lipase. Em todos os ensaios houve a produção de lipase sendo que a maior atividade, 54,33 U.ml⁻¹, ocorreu no ensaio 6 que continha a maior concentração do (NH₄)₂SO₄. O valor máximo de atividade lipolítica foi similar ao obtido no PB-12.

Fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas têm um papel importante para a síntese de enzimas. Enquanto o nitrogênio inorgânico pode ser utilizado rapidamente, o orgânico pode oferecer aminoácidos e muitos fatores para o crescimento celular, os quais são necessários para a síntese enzimática. Portanto, ambos são usados para a produção de lipase (TAN et al., 2004). Diante dos resultados obtidos se tornou interessante avaliar o impacto de um incremento da concentração do (NH₄)₂SO₄ na atividade enzimática. A biomassa foi influenciada significativamente apenas pelo Tween 20, porém de forma negativa.

Com os resultados obtidos foi possível determinar o coeficiente de regressão apresentado na Tabela 7. Os resultados mostraram que apenas o coeficiente linear do (NH₄)₂SO₄ foi significativo ($p < 0,1$), indicando que as variáveis atuam de forma independente, não havendo interação estatisticamente significativa entre os efeitos.

Tabela 7. Resultados do coeficiente de regressão, erro padrão e limites de confiança no estudo do efeito das variáveis independentes.

Parâmetros	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Limite de confiança (-90%)	Limite de confiança (+90%)
Média*	22,94	5,50	11,84	34,03
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)*	11,57	3,38	4,77	18,38
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	2,53	4,03	-5,58	10,65
Tween (L)	-6,09	3,38	-12,90	0,70
Tween (Q)	0,27	4,03	-7,85	8,39
1L x 2L	-3,91	4,77	-13,52	5,69

*Parâmetros estatisticamente significativos, (L) parâmetro linear, (Q) parâmetro quadrático.

Foi possível construir um modelo matemático de primeira ordem com o coeficiente de regressão do parâmetro significativo (Equação 1). O coeficiente de determinação obtido pela Análise de Variância (ANOVA) foi de 0,76%, dados na Tabela 8. O $F_{\text{calculado}}$ foi 1,78 vezes maior que o F_{tabelado} , o que demonstra que o modelo é estatisticamente significativo.

Tabela 8. Análise de variância no estudo dos efeitos das variáveis independentes na produção de lipase.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste Fcal
Regressão	1069,015	1	1069,015	11,75619
Resíduos	454,660	5	90,932	
Total	1918,990	10		

Coefficiente de determinação: R^2 : 0,76 $F_{\text{tab}_{0,95;1;5}} = 6,61$ e $F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}} = 1,78$

$$\text{Atividade de lipase} = 24,96 + 11,57(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ (L)} \quad \text{Equação (1)}$$

6.3.3. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para o sulfato de amônio

Como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi positivamente significativo no DCCR, foi avaliada a influência de diferentes concentrações deste componente (10, 15, 20, 25 e 30 g.L^{-1}) na produção de lipase. As concentrações dos demais componentes do meio foram fixadas em 10 g.L^{-1} de óleo, 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 10 g.L^{-1} de peptona, 1,5 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g.L^{-1} de KH_2PO_4 , 1 g.L^{-1} de Tween 20 e pH 4,5.

Houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), dados na tabela 9. Os resultados obtidos se encontram na tabela 10 onde os números 1, 2, 3, 4 e 5 indicam as concentrações crescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Não houve diferença significativa entre os níveis 4 (25 g.L^{-1}) e 5 (30 g.L^{-1}), mas o 5 (30 g.L^{-1}) diferiu dos níveis 1 (10 g.L^{-1}), 2 (15 g.L^{-1}) e 3 (20 g.L^{-1}), seria necessário um teste em uma faixa ainda mais ampla para determinar a quantidade ótima deste componente, mas é possível concluir que até a faixa de 30 g.L^{-1} não houve prejuízo para a atividade enzimática.

Lima et al. (2003) ao avaliarem o efeito da concentração da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum* fizeram um experimento com concentrações crescentes de sulfato de amônio com o objetivo de alcançar taxas C/N de 1, 2,5, 5 e 10. As maiores atividades lipolíticas foram de 17 U.mL^{-1} e 13 U.ml^{-1} para as taxas C/N iguais a 5 e 2,5, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de biomassa obtidos para os diferentes tratamentos, o que já era esperado tendo em vista que desde o primeiro experimento o incremento na biomassa não havia sido afetado pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tabela 9. Análise do Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para faixas crescentes de sulfato de amônio (10, 15, 20, 25 e 30 g.L⁻¹).

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	4	1912.84	478.21	7.4885 **
Resíduo	10	638.59	63.86	
Total	14	2551.44		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Tabela 10. Média da atividade lipolítica e biomassa encontrada para diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nível*	Atividade Lipolítica	Biomassa
1 (10)	8,33 ^b	3,17 ^a
2 (15)	14,67 ^b	3,43 ^a
3 (20)	24 ^{a^b}	3,37 ^a
4 (25)	26,44 ^{ab}	3,63 ^a
5 (30)	41,45 ^a	3,37 ^a

*Valores entre parênteses referem-se a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em g.L⁻¹, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$); DMS (Tukey) = 21,49; CV = 34,78%.

6.3.4. Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para os óleos de buriti e babaçu

Foi realizada a comparação entre os óleos de oliva, babaçu e buriti como indutores da atividade lipolítica. Os componentes do meio foram os mesmos utilizados no DCCR, com o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fixado em 15 g.L⁻¹, alterando-se apenas os óleos. Houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), dados na Tabela 11. O óleo de oliva se mostrou o mais eficiente com uma atividade lipolítica de 36,67 U.mL⁻¹, houve diferença estatística significativa entre ele e os demais, enquanto babaçu e buriti não apresentaram diferença entre si, dados apresentados na Tabela 12. O óleo de oliva é o principal substrato utilizado em cultivos visando a produção de lipases devido ao seu elevado teor de ácido oléico, servindo não apenas como indutor mas também como fonte de carbono para o microrganismo (DALMAU et al., 2000; D'ANNIBALE et al., 2006; TENG et al., 2009).

Tabela 11. Análise Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para comparação entre óleos de oliva, babaçu e buriti como indutores para a produção de lipase.

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	2	911,81	455,91	38,6484 **
Resíduo	3	35,39	11,79	
Total	5	947,20		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,1$)

Andrade et al. (2014) ao avaliarem a produção intracelular de lipase por *Mucor circinelloides* testaram 5 óleos vegetais (oliva, girassol, castanha do Brasil, linhaça e soja) com diferentes perfis de ácidos graxos e encontraram os melhores valores de atividade lipolítica nos ensaios em que o óleo de oliva foi utilizado. Os autores sugerem que estes resultados estão relacionados com a elevada proporção de ácido oléico no óleo de oliva, que corresponde a mais de 70%. Assim, os diferentes efeitos dos óleos na produção de lipase estariam relacionados com o seu perfil de ácidos graxos, com a melhor produção sendo obtida em função do teor de ácido oléico mais elevado.

Entretanto, considerando apenas a influência do perfil de ácidos graxos do óleo utilizado, era esperado que o óleo de buriti resultasse em uma atividade lipolítica semelhante ao de oliva já que este possui teor de ácido oléico em torno de 73,3-78,73% (ALBUQUERQUE et al. 2005) e o de babaçu possui apenas entre 9-20% segundo a RDC nº 482 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA (BRASIL, 1999).

De acordo com Lotti et al. (1998) e Rathi et al. (2002) o carbono é o principal fator para a expressão da atividade lipolítica, já que em geral as lipases são enzimas induzíveis mas o nitrogênio e os outros componentes do meio regulam o crescimento do microrganismo e o processo fermentativo. Assim, não se pode relacionar a atividade lipolítica apenas com o teor de ácido oléico de um óleo, pois existem interações entre todos os componentes do meio de cultivo, inclusive entre os outros tipos de ácidos graxos presentes, além de características próprias de cada microrganismo, e todos estes fatores afetam a produção de lipase.

Tabela 12. Média da atividade lipolítica encontrada usando como indutor os óleos 1 (babaçu), 2 (buriti) e 3 (oliva).

Nível*	Atividade Lipolítica	Biomassa
1	16,33 ^b	4,9 ^b
2	7,17 ^b	7,9 ^a
3	36,67 ^a	3,4 ^b

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ($p < 0,05$); DMS (Tukey) = 14,28; CV = 17,13%; biomassa em (g.L^{-1}) e de Atividade lipolítica em (U.mL^{-1}).

Houve diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% entre a biomassa do óleo de buriti e os demais tratamentos, os quais não diferiram entre si. Teng et al. (2009) relatam que os ácidos láurico, palmítico e esteárico podem melhorar a produção de biomassa, mas seu efeito não é tão notável quanto o de ácido oléico. Segundo estes autores, a biomassa é afetada pela taxa C/N e pelo tipo de substrato utilizado, assim, mesmo para um substrato com uma relação C/N elevada, a biomassa pode ser muito mais baixa do que quando comparada com outros ácidos graxos com a mesma relação C/N. Dessa maneira, o tipo de substrato utilizado estaria diretamente relacionado ao resultado obtido.

6.4. CONCLUSÃO

A linhagem T13 isolada de tucum (*Bactris inundata*) mostrou potencial lipolítico. O emprego da metodologia de Plackett-Burman permitiu a seleção das variáveis que influenciaram significativamente a produção da enzima, destacando-se a influência significativa do sulfato de amônio, o óleo de oliva foi o melhor indutor para a atividade de lipase pela linhagem avaliada neste estudo.

6.5. REFERÊNCIAS

- AÇIKEL, Ü.; ERSAN, M.; AÇIKEL, Y. S.; Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 88, p. 3-39, 2010.
- ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA JÚNIOR, P.; MOREIRA, S. G. C.; NETO, N. M. B.; CORREA, D. S.; ZILIO, S. C. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) Oil by Absorption and Emission Spectroscopies. **J. Braz. Chem. Soc.**, vol. 16, p. 1113-1117, 2005.
- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosyst Eng**, vol. 37, p. 2539–2548, 2014.
- BRASIL. ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 482, de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, 13 de outubro de 1999.
- BINDIYA, P.; RAMANA, T. Optimization of lipase production from an indigenously isolated marine *Aspergillus sydowii* of Bay of Bengal. **J Biochem Tech**, vol. 3(5), p. S203-S211, 2012.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V.; Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, vol.4, p. 1-14, 2012.
- CORADI, G. V.; VISITAÇÃO, V. L.; LIMA, E. A.; SAITO, L. Y. T.; PALMIERI, D. A.; TAKITA, M. A.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma*. **Ann Microbiol**. DOI 10.1007/s13213-012-0500-1. 2012.
- COSTAS, M.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. **Process Biochemistry**, vol 39, p. 2109–2114, 2004.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 26 p. 657–663, 2000.
- D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, vol. 97, p. 1828–1833, 2006.
- FREIRE, D.M.; TELES, E.M.F; BON, E.P.S; LIPPEL SANT'ANNA JR, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. **Appl. Biochem. Biotechnol**, vol. 63, p. 409-421, 1997.

GOLDBECK, R.; FILHO, F.M. Screening, Characterization, and Biocatalytic Capacity of Lipases Producing Wild Yeasts from Brazil Biomes. **Food Sci. Biotechnol**, vol. 22, p. 79-87, 2013.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 518–526, 2007.

GUPTA, N.; GUPTA, R. RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol.64, p. 763–781, 2004.

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

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, vol. 53, p.315–351, 1999.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 66, p. 43–54, 2010.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technol. Biotechnol**, vol. 41, p. 105–110, 2003.

LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J. L.; BROCCA, S. VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 93, p. 143–148, 1998.

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

OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G. Chicken fat and inorganic nitrogen source for lipase production by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). **African Journal of Biotechnology**, vol 13, p. 1393-1401, 2014.

RATHI, P.; GOSWAMI, V.K.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 93, p. 930–936, 2002.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas, BRA: Casa do Pão. (2005).

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

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 1495-1502, 2004.

TENG, Y.; XU, Y.; Culture condition improvement for wholecell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 3900–3907, 2008.

TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 57, p. 292–298, 2009.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol**, vol. 3, p.182–196, 2010.

WICKERMAN, L., J. Taxonomy of yeasts. **Technical Bulletin** 1029US. Department of Agriculture, Washington DC, 1951.

7. CONCLUSÃO GERAL

Os frutos do Cerrado Tocantinense avaliados neste estudo são uma boa fonte de microrganismos com capacidade produtora de enzimas. Devido as características próprias destes frutos, todos ricos em lipídeos, as leveduras se mostraram boas produtoras de lipase.

Como várias leveduras produziram halo característico da atividade lipolítica no meio sólido é interessante que mais trabalhos sejam realizados avaliando o seu comportamento em meio submerso, já que este é o mais usado do ponto de vista industrial.

Tanto em meio sólido quanto em meio submerso foi constatada atividade lipolítica. A metodologia estatística Plackett-Burman e o Delinamento Composto Central Rotacional foram úteis no processo de otimização da produção da enzima.

A linhagem T13 apresentou uma boa produção sendo importante a realização de mais estudos com a finalidade de avaliar a sua possível utilização industrial. Tendo sido o sulfato de amônio determinante para a atividade enzimática obtida.

APÊNDICE A – Análise de variância (ANOVA) para o delineamento Plackett-Burman.

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-12 com 24 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo	28,009	1	28,009	0,191431	0,691312
Ext. de Lev.	54,898	1	54,898	0,375206	0,583485
Peptona	44,083	1	44,083	0,301291	0,621288
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	1226,815	1	1226,815	8,384761	0,062724
Tween 20	261,333	1	261,333	1,786103	0,273723
MgSO ₄ .7H ₂ O	70,083	1	70,083	0,478990	0,538637
KH ₂ PO ₄	13,370	1	13,370	0,091381	0,782175
pH	71,704	1	71,704	0,490065	0,534302
Erro	438,944	3	146,315		
Total	2209,241	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,80.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-12 com 48 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo	81,815	1	81,815	0,72174	0,457994
Ext. de Lev.	12,000	1	12,000	0,10586	0,766280
Peptona	100,148	1	100,148	0,88347	0,416594
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	3093,370	1	3093,370	27,28850	0,013645
Tween 20	29,037	1	29,037	0,25615	0,647624
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,815	1	1,815	0,01601	0,907317
KH ₂ PO ₄	62,259	1	62,259	0,54923	0,512372
pH	100,148	1	100,148	0,88347	0,416594
Erro	340,074	3	113,358		
Total	3820,667	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,91.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-12 com 72 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo	130,021	1	130,021	1,003191	0,390344
Ext. de Lev.	175,058	1	175,058	1,350680	0,329214
Peptona	20,021	1	20,021	0,154473	0,720561
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	1011,391	1	1011,391	7,803508	0,068221
Tween 20	238,521	1	238,521	1,840336	0,267972
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,558	1	5,558	0,042882	0,849206
KH ₂ PO ₄	123,521	1	123,521	0,953040	0,400945
pH	387,225	1	387,225	2,987676	0,182346
Erro	388,822	3	129,607		
Total	2480,137	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,84.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para as atividades enzimáticas obtidas no PB-12 com 96 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo	65,333	1	65,333	0,81692	0,432706
Ext. de Lev.	3,000	1	3,000	0,03751	0,858799
Peptona	75,000	1	75,000	0,93779	0,404278
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	1496,333	1	1496,333	18,70994	0,022779
Tween 20*	464,593	1	464,593	5,80920	0,094998
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,815	1	1,815	0,02269	0,889819
KH ₂ PO ₄	81,815	1	81,815	1,02300	0,386301
pH	62,259	1	62,259	0,77848	0,442578
Erro	239,926	3	79,975		
Total	2490,074	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,90.

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-12 com 24 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo*	9,72000	1	9,720000	24,99429	0,015397
Ext. de Lev.	1,76333	1	1,763333	4,53429	0,123083
Peptona	2,08333	1	2,083333	5,35714	0,103599
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,75000	1	0,750000	1,92857	0,259057
Tween 20*	4,56333	1	4,563333	11,73429	0,041674
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,56333	1	0,563333	1,44857	0,315068
KH ₂ PO ₄	0,00333	1	0,003333	0,00857	0,932072
pH	0,85333	1	0,853333	2,19429	0,235118
Erro	1,16667	3	0,388889		
Total	21,46667	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,94.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-12 com 48 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo*	26,10750	1	26,10750	10,62841	0,047127
Ext. de Lev.	0,00750	1	0,00750	0,00305	0,959408
Peptona	3,30750	1	3,30750	1,34649	0,329845
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,00083	1	0,00083	0,00034	0,986461
Tween 20*	14,30083	1	14,30083	5,82189	0,094774
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,00083	1	0,00083	0,00034	0,986461
KH ₂ PO ₄	0,36750	1	0,36750	0,14961	0,724714
pH	0,30083	1	0,30083	0,12247	0,749499
Erro	7,36917	3	2,45639		
Total	51,76250	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,85.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-12 com 72 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo*	17,28000	1	17,28000	8,37480	0,062812
Ext. de Lev.	6,75000	1	6,75000	3,27141	0,168209
Peptona	3,63000	1	3,63000	1,75929	0,276648
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,48000	1	0,48000	0,23263	0,662581
Tween 20*	20,80333	1	20,80333	10,08239	0,050276
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,43000	1	2,43000	1,17771	0,357242
KH ₂ PO ₄	1,61333	1	1,61333	0,78191	0,441681
pH	8,00333	1	8,00333	3,87884	0,143520
Erro	6,19000	3	2,06333		
Total	67,18000	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,90.

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no PB-12 com 96 h de incubação.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Óleo	2,08333	1	2,08333	0,448136	0,551135
Ext. de Lev.	10,08333	1	10,08333	2,168977	0,237229
Peptona	0,56333	1	0,56333	0,121176	0,750757
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,20333	1	3,20333	0,689054	0,467371
Tween 20	1,20333	1	1,20333	0,258843	0,645972
MgSO ₄ .7H ₂ O	11,60333	1	11,60333	2,495937	0,212267
KH ₂ PO ₄	5,88000	1	5,88000	1,264818	0,342603
pH	10,08333	1	10,08333	2,168977	0,237229
Erro	13,94667	3	4,64889		
Total	58,65000	11			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,76.

APÊNDICE B – Análise de variância (ANOVA) para o Delineamento Composto Central Rotacional.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a atividade enzimática obtida através do DCCR.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)*	1069,015	1	1069,015	11,75619	0,018661
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	35,958	1	35,958	0,39544	0,557059
Tween 20 (L)	296,654	1	296,654	3,26237	0,130709
Tween 20 (Q)	0,409	1	0,409	0,00450	0,949144
1L X 2L	61,361	1	61,361	0,67480	0,448764
Erro	454,660	5	90,932		
Total	1918,990	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,76.

Tabela 8. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes na produção de lipases.

Parâmetros	Efeito	Erro padrão	t(5)	p
Média*	22,9367	5,505448	4,16618	0,008771
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)*	23,1539	6,752902	3,42873	0,018661
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	5,0672	8,057969	0,62884	0,557059
Tween 20 (L)	-12,1971	6,752902	-1,80620	0,130709
Tween 20 (Q)	0,5402	8,057969	0,06705	0,949144
1L X 2L	-7,8333	9,535829	-0,82146	0,448764

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,76.

Tabela 9. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes na produção de lipases excluindo as variáveis que não foram significativas.

Parâmetros	Efeito	Erro padrão	t(5)	p
Média*	24,96970	2,930121	8,521730	0,000013
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)*	11,57694	3,440993	3,364418	0,008330

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,55.

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para as biomassas obtidas no DCCR.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	0,169867	1	0,169867	1,05090	0,352312
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,121745	1	0,121745	0,75319	0,425153
Tween 20 (L)*	1,819927	1	1,819927	11,25917	0,020208
Tween 20 (Q)	0,218995	1	0,218995	1,35484	0,296952
1L X 2L	0,250000	1	0,250000	1,54665	0,268758
Erro	0,808198	5	0,161640		
Total	3,316364	10			

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,75.

Tabela 11. Estimativa dos efeitos das variáveis independentes na biomassa.

Parâmetros	Efeito	Erro padrão	t(5)	p
Média*	3,231551	0,232118	13,92205	0,000034
(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	-0,291868	0,284712	-1,02514	0,352312
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,294845	0,339735	0,86787	0,425153
Tween 20 (L)*	-0,955342	0,284712	-3,35547	0,020208
Tween 20 (Q)	0,395443	0,339735	1,16397	0,296952
1L X 2L	-0,500000	0,402044	-1,24364	0,268758

*Parâmetros estatisticamente significativos, R² = 0,75.