



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

MAYRA FERREIRA NETTO TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Candida viswanathii*: OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE CULTIVO, PURIFICAÇÃO EM SISTEMA AQUOSO
BIFÁSICO E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS**

**GURUPI - TO
2017**



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

MAYRA FERREIRA NETTO TEIXEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Candida viswanathii*: OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE CULTIVO, PURIFICAÇÃO EM SISTEMA AQUOSO
BIFÁSICO E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Coorientadora: Prof. Dr. Claudia Cristina Auler do Amaral Santos

**GURUPI - TO
2017**

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar ao meu lado e por me guiar em mais uma oportunidade em minha vida.

Ao meu esposo Rúllio por todo amor, carinho, compreensão, motivação, companheirismo e por me fortalecer todos os dias.

Aos meus pais Ivonete, Hugo, Celso e Marli por todo amor e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Gustavo, Fernanda e em especial à Camila por toda ajuda, amizade, amor e estatística.

Aos meus sogros Florisvaldo e Goreth pelo carinho e acolhida em sua casa.

Aos meus cunhados Túllio e Loren pela amizade e por toda disponibilidade durante minha estadia em Gurupi.

À Taís, Keilinha, Sara, Anna Karla por serem companheiras e deixarem os dias mais divertidos.

À Família LABAP, pela amizade e companheirismo, especialmente Kleydiane pelos ensinamentos e por toda paciência em me passar as metodologias e à Claudiany pela companhia e ajuda me dada em Gurupi.

Ao Natan por todas as dúvidas esclarecidas.

À Carla por ser companheira e solícita na UFT Palmas.

Ao professor Dr. Alex Fernando de Almeida, pela orientação, pelos ensinamentos, paciência e confiança durante todo o trabalho.

À professora Dra. Claudia Auler pela coorientação e colaboração para o desenvolvimento desse projeto.

Ao professor Dr. Abraham pelos ensinamentos, pela colaboração para execução do capítulo 3 da dissertação e por participar da banca examinadora.

A professora Dra. Solange pelos ensinamentos, por me acolher em seu laboratório e por fazer parte da banca examinadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nome do coordenador Gessiel Scheidt, pela oportunidade.

À Capes pela concessão da bolsa.

A todos aqueles que contribuíram para concretização de mais uma etapa em minha vida, o meu muito obrigada.

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

- T266p Teixeira, Mayra Ferreira Netto.
 Produção de lipase por *Candida viswanathii*: otimização das condições de cultivo, purificação em sistema aquoso bifásico e propriedades bioquímicas. / Mayra Ferreira Netto Teixeira. – Gurupi, TO, 2017.
 83 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico)- Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2017.
 Orientador: Alex Fernando de Almeida
 Coorientador: Claudia Cristina Auler do Amaral Santos
1. Produção de lipase. 2. *Candida viswanathii*. 3. Otimização. 4. Sistema aquoso bifásico. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada 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
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

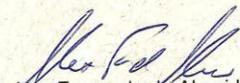
Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br

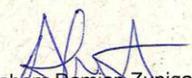


Ata de Defesa nº 27/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de MAYRA FERREIRA NETTO TEIXEIRA DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

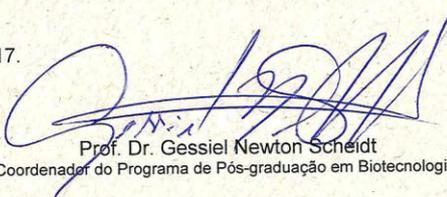
Aos 27 dias do mês de abril do ano de 2017, às 14 horas, na sala 02, bloco H, campus de Palmas, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. ALEX FERNANDO DE ALMEIDA da Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. ABRAHAM DAMIAN ZUNIGA da Universidade Federal do Tocantins e Profª Drª SOLANGE CRISTINA CARREIRO da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de MAIRA FERREIRA NETTO TEIXEIRA, intitulada "**Produção de lipase por *Candida viswanathii*: otimização das condições de cultivo, purificação em sistema bifásico aquoso e propriedades bioquímica**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


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


Prof. Dr. Abraham Damian Zuniga
Universidade Federal do Tocantins
1º Examinador


Profª. Drª. Solange Cristina Carreiro
Universidade Federal do Tocantins
2ª Examinadora

Palmas, 27 de abril de 2017.


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

SUMÁRIO

Lista de tabelas	I
Lista de figuras	III
Resumo	V
Abstract.....	VI
INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVOS GERAIS	13
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1. ENZIMAS	14
2. LIPASES.....	17
2.1 Produção de lipases.....	20
2.2 Fatores nutricionais	21
2.3Aplicações de lipases	22
3. SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)	23
4.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2. Otimização da produção de lipase por <i>Candida viswanathii</i> em cultivos submersos utilizando planejamento experimental <i>simplex-lattice</i>	34
CAPÍTULO 3. Extração líquido-líquido de lipase produzida por <i>Candida viswanathii</i> utilizando PEG-4000 e fosfato de potássio	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Otimização de meios de culturas para produção de enzimas utilizando planejamento experimental.	27
Tabela 2. Meios de cultivos utilizados para produção de lipase por <i>C. viswanathii</i>	37
Tabela 3. Matriz do simplex-lattice para otimização do meio para a produção de lipase de <i>Candida viswanathii</i>	38
Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ² para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa.	40
Tabela 5. Parâmetros característicos de produção e de biomassa de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes meios de cultivo.	41
Tabela 6. Parâmetros da fermentação para a produção de lipase e de biomassa por <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de lipídeo.	44
Tabela 7. Parâmetros da fermentação para a produção de lipase e de biomassa de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de nitrogênio.	47
Tabela 8. Parâmetros característicos de produção e de biomassa de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de carbono.	49
Tabela 9. Matriz do planejamento de mistura simplex-lattice e atividade enzimática por <i>Candida viswanathii</i>	50
Tabela 10. Parâmetros característicos de produção de lipase e de biomassa por <i>Candida viswanathii</i> no planejamento de mistura (<i>simplex-lattice</i>).	51
Tabela 11. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ² para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa.	56
Tabela 12. Coeficiente de regressão DCCR 2 ² para atividade ótima relativa da lipase por <i>Candida viswanathii</i> , função pH versus temperatura. R ² = 0,8525.	56
Tabela 13. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ² para separação da lipase de <i>Candida viswanathii</i>	67
Tabela 14. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2 ² para determinação de pH e temperatura ótimos da lipase parcialmente purificada.	68
Tabela 15. Atividade enzimática na fase superior e inferior no sistema de separação aquoso bifásico PEG/Fosfato com diferentes pesos moleculares.	69
Tabela 16. Matriz do planejamento DCCR 2 ² utilizada para avaliar o efeito das variáveis temperatura e pH na partição da lipase de <i>Candida viswanathii</i> em SAB.	71
Tabela 17. Coeficiente de regressão DCCR 2 ² para separação de lipase de <i>C. viswanathii</i> por SAB. Variável Resposta – Lipase recuperada na fase superior (%), R ² = 0,8491.	71

- Tabela 18.** Coeficiente de regressão DCCR 2² para separação de lipase de *C. viswanathii* por SAB. Variável Resposta – Atividade específica de lipase na fase superior, $R^2 = 0,9635$ 74
- Tabela 19.** Coeficiente de regressão DCCR 2² para separação de lipase de *C. viswanathii* por SAB. Variável Resposta – Fator purificação superior, $R^2 = 0,9639$ 75
- Tabela 20.** Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2² para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa da enzima purificada. 77
- Tabela 21.** Efeito dos solventes orgânicos sobre a atividade relativa da lipase. 80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de encaixe induzido (COELHO et al., 2008).....	14
Figura 2. Mercado de enzimas especializadas na América do Norte, por aplicação, 2013 - 2024 (US\$ Milhões) (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).	16
Figura 3. Hidrólise da tributirina pela lipase e formação dos produtos glicerol e ácido butírico (WU e TSAI, 2004; MAESTER, 2011).	18
Figura 4. Reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).	18
Figura 5. Ativação interfacial de lipase com interfases hidrofóbicas (VOLPATO, 2009).	19
Figura 6. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (PAQUES e MACEDO, 2006).	20
Figura 7. Diagrama de fases e composições de fase do fosfato de potássio - PEG 4000 (ANSEJO e ANDREWS, 2011).	25
Figura 8. Atividade enzimática (U.mL ⁻¹) (a) e produção de biomassa (g.L ⁻¹) (b) de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de óleos vegetais e animais (1% e 2%).....	43
Figura 9. Atividade enzimática (U.mL ⁻¹) e produção de biomassa (g.L ⁻¹) de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de nitrogênio.	46
Figura 10. Atividade enzimática (U.mL ⁻¹) e produção de biomassa (g.L ⁻¹) de <i>Candida viswanathii</i> em diferentes fontes de carbono.....	48
Figura 11. Diagrama de Pareto representando os efeitos de Lactose, Sorbitol e Glicerol na atividade enzimática.	52
Figura 12. Superfície de resposta (a) e contorno (b) da atividade de lipase (U/mL) por <i>Candida viswanathii</i> utilizando lactose, sorbitol e glicerol.	53
Figura 13. Perfil dos valores otimizados (a) e perfil de desejabilidade (b) para produção de lipase por <i>Candida viswanathii</i>	54
Figura 14. Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre atividade.	57
Figura 15. Esquema do procedimento experimental da partição a partir de extrato bruto de <i>C. viswanathii</i> em sistema aquoso bifásico PEG/Fosfato.	65
Figura 16. Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Lipase recuperada na fase superior. X1: temperatura (°C); X2: pH.....	72
Figura 17. Comportamento linear de lipase recuperada superior (%) em relação ao pH.....	73
Figura 18. Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Atividade específica superior (U.mg ⁻¹). X1: temperatura (°C); X2: pH.	73
Figura 19. Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre a atividade específica superior da lipase produzida por <i>Candida viswanathii</i> por SAB.....	74

- Figura 20.** Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Fator purificação superior. X1: temperatura (°C); X2: pH.....75
- Figura 21.** Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre o fator purificação superior da lipase produzida por *C.viswanathii* por SAB..... 75
- Figura 22.** Diagrama de Pareto representando os efeitos das variáveis pH e temperatura sobre a atividade relativa (%). X1: pH; X2: temperatura (°C).....77
- Figura 23.** Comportamento linear da atividade relativa sobre o pH.....78

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3) hidrolisam ligações éster de triacilgliceróis numa interface água-óleo. Por possuírem diversas aplicações industriais, são as enzimas mais utilizadas em sínteses orgânicas e mais de 20% de biotransformações são realizadas com lipases. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as condições nutricionais de meios de cultivo (fontes de óleos vegetais e animais, nitrogênio e carbono) para melhorar a produção de lipase por *Candida viswanathii* além de purificar a enzima em sistema aquoso bifásico e realizar a caracterização parcial da lipase. Entre os meios de cultivos analisados o meio de Vogel proporcionou a maior produção de lipase após 36 horas de cultivo (11,73 U/mL). Após analisar as fontes de carbono lipídicas e não-lipídicas e fontes de nitrogênio, um planejamento experimental de misturas foi aplicado para analisar o efeito de glicerol, lactose e sorbitol sobre a produção de lipase. Os resultados obtidos mostraram que a maior produção de lipase (20,41 U/mL) foi observada com 0,5% de lactose (p/v) e 0,5% (p/v) de sorbitol, sendo observado um aumento de 74% da produção de enzima. Nesse estudo observou-se que a lactose e sorbitol foram utilizados como adjuntos para a produção de lipase. A lipase produzida nas condições anteriores foi purificada em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio. O maior coeficiente de partição (1,34) foi encontrado no ensaio com PEG 4000/fosfato a Temperatura de 40 °C e pH 7,0, bem como o maior balanço de atividade (50,73%). Na caracterização parcial, a lipase não sofreu influência da temperaturana faixa de 20 – 60 °C e obteve atividade máxima em pH 8,1. A enzima apresentou também elevada estabilidade em solventes orgânicos como metanol e etanol, sendo estas propriedades consideradas importantes para aplicações em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Produção de lipase; *Candida viswanathii*; Otimização; Metodologia de superfície de resposta; Sistema aquoso bifásico.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) hydrolyze ester bonds of triacylglycerols at a water-oil interface. By they have several industrial applications, they are the enzymes most used in organic synthesis and more than 20% of biotransformations are performed with lipases. The objectives of this work were to evaluate the nutritional conditions of culture media (plant and animal oils, nitrogen and carbon) to improve the production of lipase by *Candida viswanathii* in addition to purifying the enzyme in a biphasic aqueous system and to realize the partial characterization of lipase. Among the culture media analyzed, the Vogel medium provided the highest lipase production after 36 hours of culture (11,73 U/mL). After analyzing the lipid and non-lipid carbon sources and nitrogen sources, an experimental design of blends was applied to analyze the effect of glycerol, lactose and sorbitol on lipase production. The results showed that the highest production of lipase (20,41 U/mL) was observed with 0.5% lactose (w/v) and 0.5% (w/v) sorbitol, with an increase of 74% of enzyme production. In this study it was observed that lactose and sorbitol were used as adjuncts for the production of lipase. The lipase produced under the above conditions was purified in a aqueous two-phase systems (ATPS) consisting of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate. The highest partition coefficient (1,34) was found in the PEG 4000/phosphate assay at temperature of 40 °C and pH 7,0, as well as the highest activity balance (50,73%). In the partial characterization, the lipase was not influenced by the temperature range of 20 - 60 °C and obtained maximum activity at pH 8,1. The enzyme also showed high stability in organic solvents such as methanol and ethanol, and these properties are considered important for applications in biotechnological processes.

Keywords: Production of lipase; *Candida viswanathii*; Optmization; Response surface methodology; Aqueous two-phase systems.

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos que convertem um composto específico (como substrato) em produtos a velocidades de reação mais elevadas (PATEL et al., 2017). Enzimas de origem microbiana são utilizadas em várias indústrias e aplicações (ADRIO e DEMAIN, 2014). São mais úteis do que as derivadas de plantas e animais devido à sua grande variedade de atividades catalíticas, rendimento elevado, a facilidade na modificação genética do microrganismo e o acelerado crescimento microbiano em meios de baixo custo (PATEL et al., 2017).

As enzimas são utilizadas na fabricação de alimentos e rações animais, cosméticos e produtos farmacêuticos, detergentes, para aplicações de celulose e papel, na indústria têxtil, na indústria química, na indústria de couro, na produção de combustíveis, medicamentos e como uma ferramenta para Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (BINOD et al., 2013). As lipases fazem parte de uma das classes de enzimas mais amplamente utilizadas na biotecnologia, as hidrolases (KAPOOR e GUPTA, 2012).

As lipases são enzimas ubíquas, pertencentes ao grupo das hidrolases. Catalizam a hidrólise da ligação éster de ácidos graxos bem como os álcoois com cadeia de vários comprimentos (KAPOOR e GUPTA, 2012; ANGAJALA et al., 2016). Atualmente, a lipase continua a ser a escolha de enzimas para bioquímicos, farmacêuticos, químicos orgânicos, biofísicos, biotecnólogos e microbiologistas. Devido sua natureza regioseletiva e enantioseletiva, a lipase tem sido empregada na resolução de fármacos quirais, preparação de vários substituintes de manteiga de cacau, produção de biocombustíveis, modificação de gorduras, síntese de cosméticos, na degradação de resíduos (ANGAJALA et al., 2016). Os microrganismos são os mais promissores para a produção de lipase e as leveduras têm sido amplamente utilizadas para esse fim (OLIVEIRA et al., 2014).

É necessário, para a produção de lipases microbianas, fornecer ao microrganismo condições adequadas que permitam seu crescimento e a produção do metabólito de interesse (OLIVEIRA et al., 2014). Assim, a busca por meios de cultura que melhorem e aumentem a produção de lipase é muito importante. O presente trabalho apresenta a identificação e otimização das condições de cultivo para a produção de lipase, bem como a purificação por sistema aquoso bifásico e a caracterização parcial das propriedades bioquímicas.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram identificar e otimizar as melhores condições de cultivo para a produção de lipase por *Candida viswanathii* em cultivos submersos e purificar a enzima utilizando sistemas aquoso bifásico bem como caracterizar bioquimicamente a enzima purificada.

Objetivos específicos

- Avaliar diferentes composições de sais minerais do meio de cultivo para a produção de lipase;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de carbonos puras quanto à produção de lipase;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de óleos vegetais e animais para a produção de lipase;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de lipase;
- Otimizar as condições de cultivo para a produção de lipase utilizando metodologia de superfície de resposta;
- Purificar a lipase produzida utilizando sistemas aquosos bifásicos polietilenoglicol e tampão fosfato;
- Caracterizar bioquimicamente o extrato bruto enzimático e a enzima purificada quanto a estabilidade ao pH, a temperatura e solventes orgânicos.

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enzimas

Enzimas são macromoléculas biológicas que são produzidas por um organismo vivo, que atuam como catalisadores de reações bioquímicas específicas. Ou seja, são altamente seletivas e podem acelerar processos biológicos e bioquímicos dentro e fora da célula (GURUNG et al. 2013; SELISTEANU et al. 2014). Podem formar moléculas complexas a partir de outras mais simples, ou quebram moléculas complexas em outras mais simples ou ainda modificam moléculas. Elas são muito importantes em processos industriais devido à especificidade, propriedade que lhe permite reconhecer um substrato, pois são capazes de catalisar reações entre produtos químicos específicos (PATEL et al., 2017). Para possuir a atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores, de natureza não protéica, (co-fatores que podem ser Zn^{2+} , Ca^{2+} , etc.) ou moléculas orgânicas (coenzimas). São exemplos de coenzimas os dinucleotídeos (NAD^+ , $NADP^+$, FAD) e a coenzima A entre outros (LIMA et al., 2001).

O sítio ativo de uma enzima é uma região tridimensional, que ao se ligar aos substratos e cofatores, pode promover a quebra ou geração de ligações. Os sítios ativos se ligam aos substratos por atrações fracas, como ligações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio. O modelo de encaixe induzido (Figura 1), postulado por Daniel E. Koshland Jr., explica que o sítio ativo é flexível e pode se modificar para se ligar ao substrato (COELHO et al., 2008). O nível de especificidade varia com a enzima considerada (MARZZOCO e TORRES, 2007).

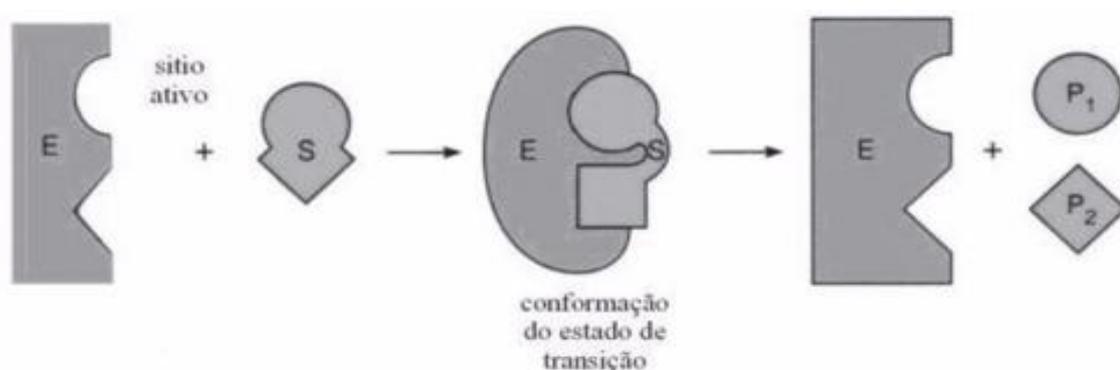


Figura 1. Modelo de encaixe induzido (COELHO et al., 2008).

A União Internacional de Bioquímica criou uma Comissão Internacional de Enzimas, em 1956, para determinar alguns critérios para a nomenclatura e classificação das enzimas. As enzimas foram, então, divididas em seis classes conforme o tipo de reações que catalisam (LIMA et al., 2001; GURUNG et al. 2013; SANCHEZ e DEMAIN, 2017):

- I. Oxirredutases: catalisam reações de oxidação-redução.
- II. Transferases: transferem grupos funcionais (amina, fosfato, acil, carboxil) entre moléculas.
- III. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente
- IV. Liases: adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação.
- V. Isomerasas: reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.
- VI. Ligases: condensação de duas moléculas.

As enzimas ao serem descritas recebem um número de classificação, conhecido por “E.C.” (Enzyme Commission). A nomenclatura é composta por 4 dígitos que são: classe, sub-classe dentro da classe, grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima propriamente dita (LIMA et al., 2001).

Desde a antiguidade, tem-se utilizado enzimas, encontradas naturalmente, na fabricação de produtos como linho e couro. Estes processos dependem de enzimas de origem microbianas ou enzimas presentes em preparações adicionadas, como, exemplo, o rúmen de vitelo ou fruta de mamão. Assim, desenvolveram-se processos de fermentação direcionados para a produção de enzimas por meio da utilização de estirpes particularmente selecionadas. (GURUNG et al. 2013).

A maioria das enzimas industriais é produzida por microrganismos, sendo que os maiores produtores de enzimas são encontrados naturalmente. A indústria vem explorando esse aspecto há aproximadamente 50 anos. O manuseio dos microrganismos é mais fácil e possui uma taxa de crescimento muito elevada (PATEL et al., 2017). Essa produção é considerada econômica em grande escala, pois os meios de cultura são baratos e os ciclos de fermentação são curtos (SANCHEZ e DEMAIN, 2017). É possível produzir enzimas purificadas e bem caracterizadas em larga escala (GURUNG et al. 2013).

A tecnologia enzimática que pertence ao ramo da Ciência e Tecnologia está em constante evolução. Influenciadas pela Biotecnologia e Bioinformática, novas e melhoradas aplicações enzimáticas estão surgindo no mundo (PATEL et al., 2017). Existem, em média,

3000 enzimas conhecidas, sendo apenas 150-170 exploradas na indústria (BINOD et al., 2013). Todavia, estão surgindo processos enzimáticos ecológicos e economicamente viáveis em substituição aos processos físico-químicos e mecânicos. As enzimas industriais podem ser classificadas, de acordo com a aplicação, em: enzimas na indústria de alimentos, enzimas para auxiliar processos, enzimas como biocatalisadores industriais, enzimas em engenharia genética e enzimas em cosméticos (BINOD et al., 2013; PATEL et al., 2017).

Os avanços na biotecnologia, como na genética e engenharia de proteínas, abriram uma nova era de aplicações de enzimas em muitos processos industriais, bem como experiências de iniciativas de P&D (pesquisa e desenvolvimento), resultando no desenvolvimento de uma série de novos produtos, melhorias no processo e no desempenho de vários processos existentes (BINOD et al., 2013). O uso de enzimas em processos industriais tem sido de grande importância, pois pode eliminar a utilização de temperaturas elevadas, valores de pH extremos, solventes orgânicos e, simultaneamente, oferecer alta especificidade ao substrato, baixa toxicidade e pureza do produto (SANCHEZ e DEMAIN, 2017).

Em 2012 o mercado global de enzimas industriais valeu quase US\$ 4,5 bilhões e em 2013 em torno US\$ 4,8 bilhões (DEWAN, 2014). Em 2015, foi de US\$ 8,18 bilhões e espera-se um crescimento significativo nos próximos oito anos, devido à sua crescente aplicação em detergentes, produtos farmacêuticos e alimentos e bebidas (GRAND VIEW RESEARCH, 2016). A Figura 2 representa uma projeção de aplicações de enzimas na América do Norte até 2024, sendo bastante promissor.

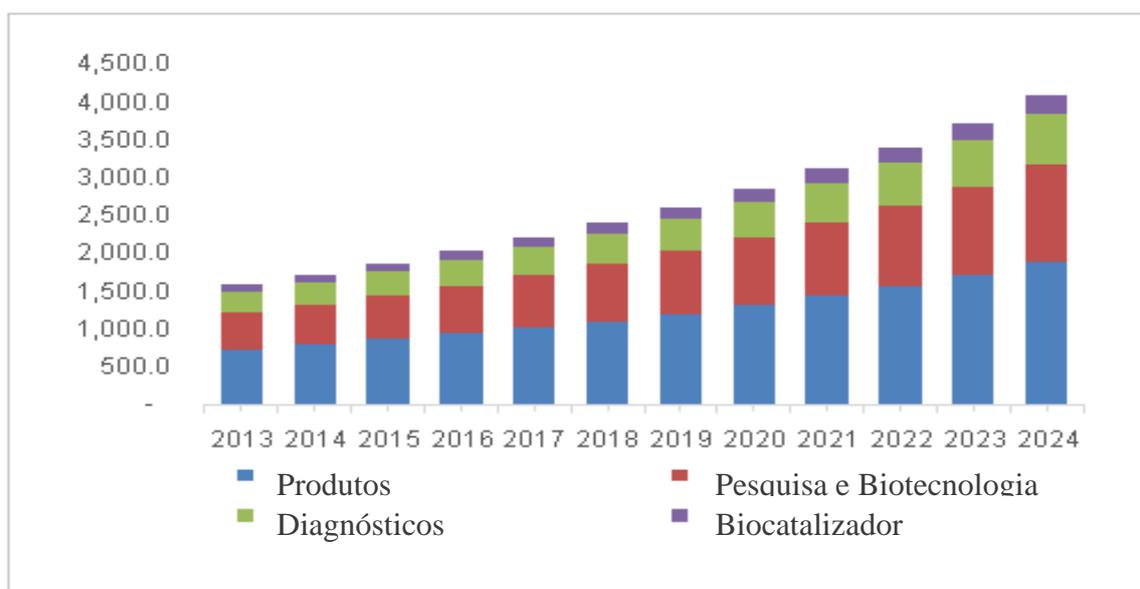


Figura 2. Mercado de enzimas especializadas na América do Norte, por aplicação, 2013 - 2024 (US\$ Milhões) (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

As principais enzimas comercialmente disponíveis são amilases, proteases, lipases, celulases, xilanases e catalases. São bastante aplicadas em indústrias como de detergentes, processamento de alimentos, nutrição animal, de suco e aromatizantes, cosméticos, medicamentos, produtos farmacêuticos, couro, seda, produtos químicos e em P & D (KUMAR et al., 2014). A utilização como aditivos em detergentes representa uma das aplicações principais de enzimas industriais (SANCHEZ e DEMAIN, 2017).

A indústria de detergentes representa de 25-30% do uso total de enzimas industriais. Cerca de metade dos detergentes encontrado no mercado contém enzimas nas suas formulações, porém, raramente são publicadas informações sobre as formulações (PATEL et al., 2017). Nas indústrias de tecido e de papel, enzimas vêm sendo, cada vez mais, utilizadas no desenvolvimento de processos mais limpos, para reduzir o uso de matérias-primas e a produção de resíduos (SANCHEZ e DEMAIN, 2017). Estudos intensivos têm sido realizados durante os últimos 20 anos para aplicar muitas enzimas diferentes na indústria de celulose e papel (PATEL et al., 2017). Na indústria química têm sido utilizadas em substituição a processos químicos. Geralmente, requerem menos energia, produzem menos desperdício e menores volumes de fluxos de águas residuais. Nos processos agro-biotecnológicos, as enzimas têm sido aplicadas na produção de suplementos alimentares para melhorar a eficiência alimentar. E na indústria farmacêutica, são utilizados na preparação de antibióticos e no desenvolvimento de novos produtos (SANCHEZ e DEMAIN, 2017).

2. Lipases

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases – E.C. 3.1.1.3) são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações de ésteres de triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol utilizando o complexo de ativação interfacial (TREICHEL et al., 2010; THAKUR, 2012; ALMEIDA et al., 2013; SELITEANU et al., 2014). Estas enzimas também catalisam a hidrólise e transesterificação de outros ésteres, bem como a síntese de ésteres e exibem propriedades enantiosseletivas (Figuras 3 e 4) (TREICHEL et al., 2010; THAKUR, 2012).

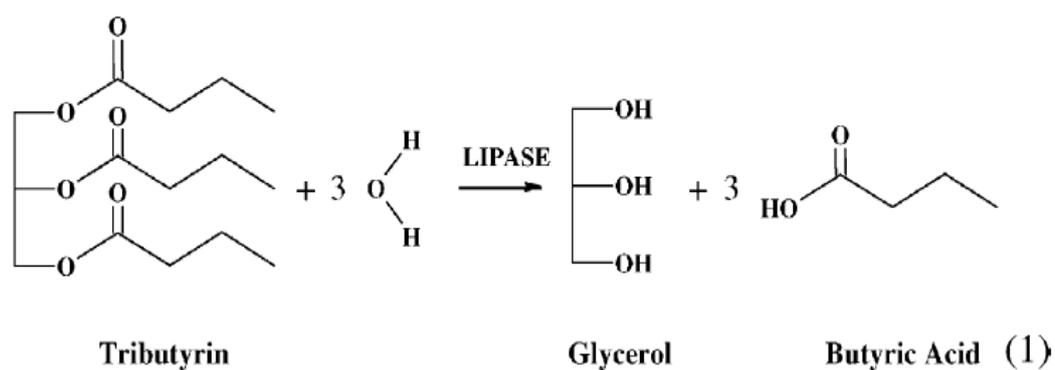


Figura 3. Hidrólise da tributirina pela lipase e formação dos produtos glicerol e ácido butírico (WU e TSAI, 2004; MAESTER, 2011).

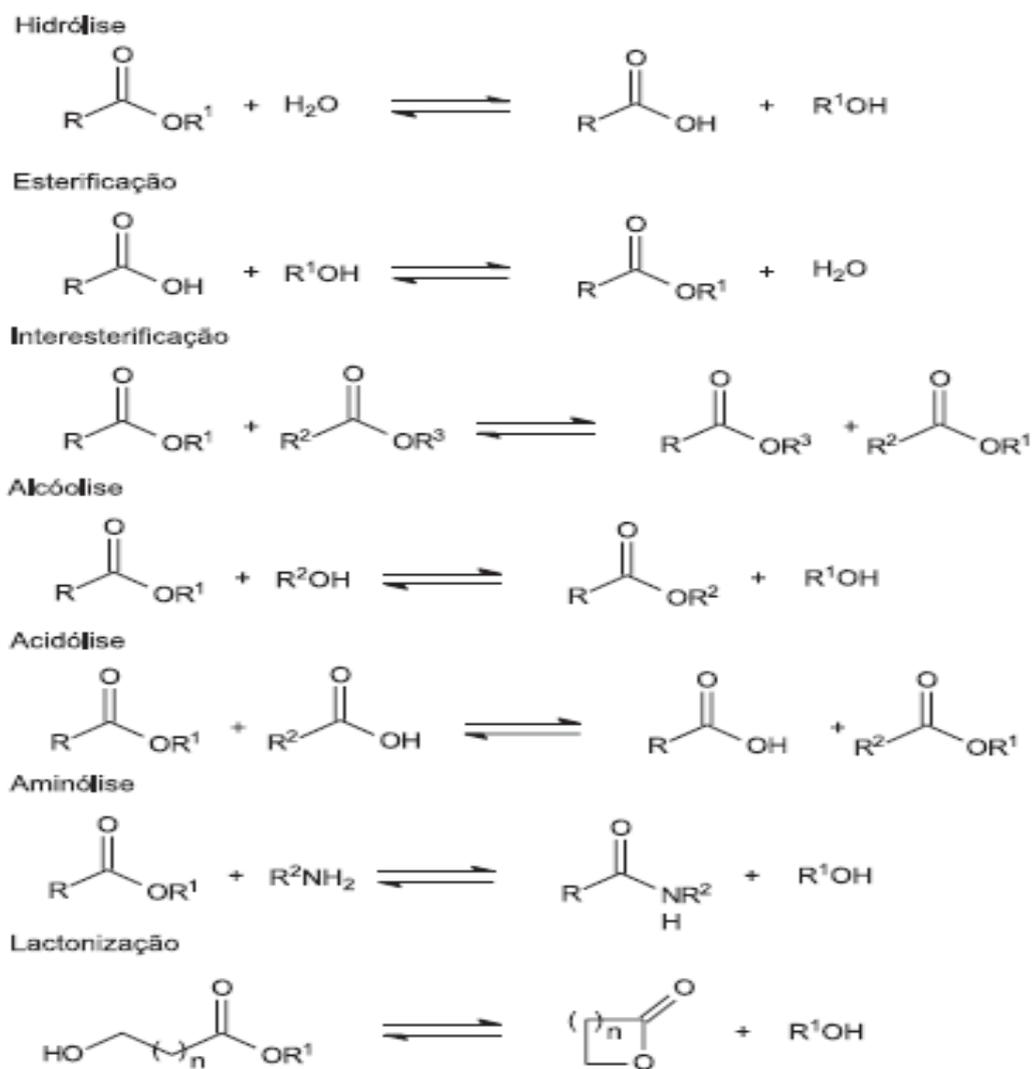


Figura 4. Reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).

A ativação interfacial das lipases, considerada como a característica estrutural única de lipases, ocorre geralmente na interface água lipídica. O sítio ativo das lipases é protegido por uma unidade oligopeptídica helicoidal. Esta tampa, ou *lid*, da unidade sofre alterações sequenciais durante a interação com uma interface hidrofóbica e expõe o sítio ativo proporcionando acesso livre ao substrato (Figura 5) (ANGAJALA et al.,2016).

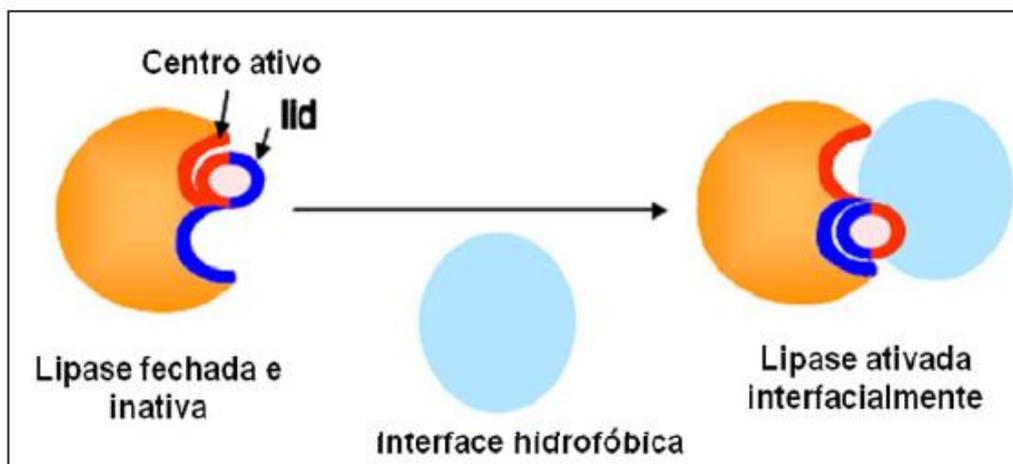


Figura 5. Ativação interfacial de lipase com interfaces hidrofóbicas (VOLPATO, 2009).

As lipases são classificadas em três classes. Primeira, em regioseletivas que promovem a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula e são subdivididas em duas classes: lipases não-específicas que hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2; e lipases 1,3-específicas que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3, (Figura 6). A segunda classe são as lipases tipo-seletivas que estão relacionadas ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila. A terceira classe são as enantioseletivas que são propriedades que algumas lipases possuem em discriminar os enantiomêros de uma mistura racêmica (PAQUES e MACEDO, 2006; KAPOOR e GUPTA, 2012).

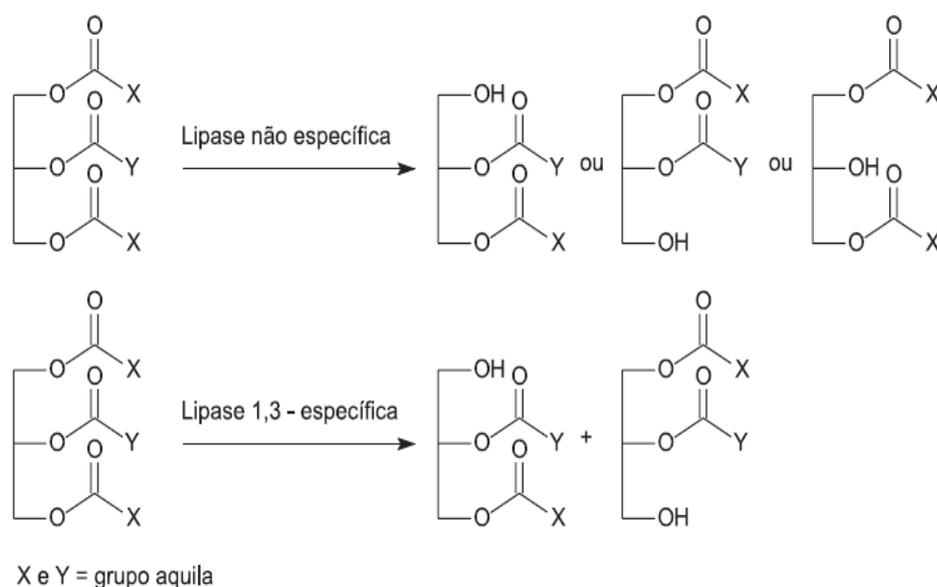


Figura 6. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (PAQUES e MACEDO, 2006).

A transesterificação catalisada por lipase é muito atraente, pois a lipase atua reduzindo a energia de ativação de uma reação e aumentando a sua taxa. Além da alta seletividade e alta eficiência de rendimento de certos produtos, sendo uma alternativa ambientalmente favorável à síntese da química convencional (BLOISI et al., 2016).

2.1 Produção de lipases

As lipases podem ser obtidas de vários organismos, contudo, os microrganismos são mais promissores para este fim, sendo as leveduras amplamente utilizadas na produção dessas enzimas (OLIVEIRA et al., 2014). Os microrganismos com potencial para produção de lipases podem ser encontrados em diferentes habitats, ou seja, a natureza oferece um enorme potencial para identificação de novas fontes de lipases com novas propriedades (SALIHU et al., 2012).

As espécies de microrganismos produtores de lipase mais importantes são os fungos pertencentes aos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor*; as leveduras dos gêneros *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Saccharomycopsis*; bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Staphylococcus* (LIU e KOKARE, 2017).

A produção de lipase depende em grande parte do microrganismo produtor, meio de cultura (líquido ou sólido) e composição mineral do meio. Muitas técnicas de produção foram

desenvolvidas para encontrar lipases específicas, estáveis e de maior rendimento para aplicação industrial (SALIHU et al., 2012). Os dois processos fermentativos que são mais utilizados para a produção de enzimas microbianas são a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES). Nos dois tipos, a composição do meio e condições para produção possuem um papel importante na otimização do processo. Na FSm, o crescimento acontece num meio líquido com nutrientes solúveis. Já no FES, ocorre em meio úmido, no entanto sem água livre com teor de umidade até 70% (OLIVEIRA et al., 2013).

A FSm é um método bem estabelecido e a produção de lipases industriais utiliza componentes convencionais no meio como fontes de carbono e nitrogênio, bem como indutores (óleos e ácidos graxos) que podem influenciar na atividade de lipase. As vantagens são a homogeneidade do meio de cultura e a manutenção dos parâmetros do processo (temperatura e pH) (SALIHU et al., 2012).

A FSm pode ser realizada em frascos dispostos em incubadora rotatória, biorreatores de bancada ou de escala industrial. Os fermentadores em grande escala para FSm variam em milhares de volume e possuem controle *on-line* sobre vários fatores como pH, temperatura, oxigênio e formação de espuma. Esses fatores tornam o sistema FSm superior ao FES e amplamente aceito para a produção de enzimas industriais (PATEL et al., 2017).

Já na fermentação em estado sólido, os microrganismos se desenvolvem com uma quantidade de água suficiente para o seu crescimento e metabolismo. Os fungos filamentosos são as espécies mais adaptadas utilizadas na FES, pois são capazes de crescer em superfícies de substratos variáveis e penetrar nas interpartículas dos substratos sólidos, enquanto bactérias e leveduras são amplamente cultivadas em FSm (SALIHU et al., 2012).

2.2 Fatores nutricionais

A produção das lipases microbianas é fortemente influenciada por fatores tais como os tipos e concentrações de nutrientes, presença e concentração de indutores (COLLA et al., 2016), além dos fatores físico-químicos como temperatura, pH e agitação (TREICHEL et al., 2010), pois a estrutura e o sítio ativo da enzima pode ser afetada por agentes que provocam mudanças conformacionais na estrutura protéica (BORZANI et al., 2001). A temperatura de incubação dos meios de crescimento varia de um microrganismo para outro (RAMANI et al., 2010).

Para a produção eficiente de lipases, o meio de cultura deve conter fontes de carbono, como glicose, xilose, maltose, lactose, sacarose e glicerol, entre outras, e as fontes de

nitrogênio e vitaminas necessárias (MORAIS JUNIOR et al., 2016). As fontes de nitrogênio e carbono de fácil metabolização são necessárias para uma satisfatória secreção de lipases e para que o microrganismo apresente um crescimento ideal. Lipases são enzimas de caráter indutivo e a escolha do indutor ideal determina a produtividade do biocatalisador (OLIVEIRA et al., 2013).

A fonte de carbono tem sido relatada com o fator principal para expressão da atividade de lipase, já que são enzimas que necessitam de indutores. Geralmente são produzidas na presença de óleo ou qualquer outro indutor, tal como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais biliares e glicerol (TREICHEL et al., 2010). As fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais devem ser cuidadosamente avaliadas na produção de lipase. As fontes de nitrogênio mais comuns são peptona, extrato de levedura, extrato de malte, caseína e triptona (TREICHEL et al., 2010; BRÍGIDA et al., 2014). Oliveira et al. (2013) avaliaram resíduos agroindustriais e substratos de baixo custo para a produção de lipase de *Candida guilliermondi*, observando que ao utilizarem sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, foi obtido a maior produção. Tan *et al.* (2003) estudaram a produção de lipase de *Candida sp.* e relataram que a caseína foi a melhor fonte de nitrogênio.

2.3 Aplicações de lipases

As lipases atraem grande atenção de pesquisadores e indústrias devido ao seu potencial biotecnológico. Estas enzimas são importantes biocatalisadores para aplicações biotecnológicas para a síntese de biopolímeros e biodiesel, na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos e perfumaria, compostos enantiômeros, agroquímicos, tratamento de águas residuais, compostos de sabor, indústria de aditivos, indústria de alimentos (HASAN et al., 2006; HORCHANI et al., 2012; SELITEANU et al., 2014). As lipases microbianas ganharam especial atenção industrial devido à sua estabilidade, seletividade e especificidade do substrato (SELITEANU et al., 2014).

A indústria de detergentes tem sido o setor com a maior aplicação das lipases, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água. Estas enzimas são adicionadas em detergentes líquidos e sólidos, de uso doméstico e industrial. Devem ser estáveis em pH alcalino, em altas temperaturas e não devem sofrer desnaturação pela ação de surfactantes (MESSIAS et al., 2011). Na indústria têxtil, as lipases são utilizadas para a remoção de lubrificantes, de modo a

proporcionar um tecido com maior absorção para melhorar o tingimento. São utilizadas em tecidos de algodão e jeans durante a sua preparação comercial (GURUNG et al., 2013).

O uso na indústria de alimentos tem sido para modificar o sabor dos alimentos por síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e alcoóis (aromatizantes) (GURUNG et al., 2013). Os ácidos graxos livres, de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e grau de insaturação, conferem sabor e aroma peculiares aos alimentos. As lipases têm sido empregadas na obtenção de ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico e o ácido α -linolênico (MESSIAS et al., 2011). Possuem um papel muito importante na fabricação de salsichas e são utilizadas para medir as alterações nos ácidos graxos de cadeia longa liberados durante a maturação (GURUNG et al., 2013). São aplicadas também na hidrólise de gordura do leite e na aceleração dos processos de maturação de queijo (BON et al., 2008). Na panificação, são utilizadas para reforçar o glúten, fazendo uma massa mais estável e de melhor qualidade (PATEL et al., 2017).

Na indústria química e farmacêutica, o uso de lipases vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Além de catalisarem reações de hidrólise regioseletiva, acilação e transesterificação, uma crescente variedade de processos enantiosseletivos tem sido relatada. Estas hidrolases catalisam reações sobre substratos pró-quirais e resolução cinética de misturas racêmicas. (MESSIAS et al., 2011). São utilizadas em cosméticos na fabricação de fragrâncias (PAQUES e MACEDO, 2006) e também na preparação de derivados de retinol solúveis em água e na preparação de cremes anti-obesidade (GURUNG et al., 2013).

3. Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

A escala de produção de biocompostos tem aumentado muito devido aos avanços da biologia molecular e biotecnologia. Porém, a tecnologia de purificação desses produtos não foi desenvolvida rapidamente quando comparada a de produção, pois são sistemas complexos que precisam manter a biomolécula em atividade biológica (PERUMALSAMY e BATCHA, 2011). Como há formação de co-produtos durante o processo fermentativo, a utilização do caldo fermentado bruto normalmente prejudica o uso em processos industriais (BARBOSA et al., 2011). Considerando esse contexto, são desejáveis processos que proporcionem a recuperação e purificação de enzimas com baixos custos e de forma eficiente (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Alguns métodos convencionais são utilizados para realizar a purificação da lipase como ultrafiltração, precipitação com sais (sulfato de amônio ou solvente orgânico),

cromatografia de interação hidrofóbica, de interação por afinidade e de troca iônica. Em geral, esses métodos têm algumas desvantagens, incluindo baixo escalonamento, custos elevados e rendimento insatisfatório do produto (DUARTE et al., 2015).

A separação por sistema aquoso bifásico surgiu como uma técnica prática que permite a recuperação e purificação de produtos biológicos, e foi descrita pela primeira vez por Albertsson em 1958, que explora interações hidrofóbicas entre proteínas e polímeros em ambientes aquosos (AGUILAR e RITO-PALOMARES, 2010). O SAB possui vantagens que incluem o potencial de operação, facilidade de integração do processo, baixa toxicidade da fase em formar produtos químicos e biocompatibilidade (ANSEJO e ANDREWS, 2011). Ainda apresenta baixa tensão interfacial entre as fases conjugadas, baixo custo dos materiais, que podem ser reciclados, a rápida obtenção do equilíbrio de partição e a disponibilidade de separadores comerciais, que podem ser facilmente ampliados (ZHOU et al., 2013; JIANG et al., 2014). Contudo, uma das principais desvantagens é a falta de especificidade. A especificidade, normalmente, não é suficientemente elevada para conseguir a separação completa entre o produto e os contaminantes, mesmo que a manipulação dos parâmetros do sistema venha favorecer a partição do composto de interesse para uma fase particular (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

O SAB é normalmente formado misturando soluções aquosas de dois polímeros estruturalmente diferentes (polietilenoglicol, dextrano) ou um polímero e um sal (fosfato de potássio, citrato de sódio, sulfato de sódio) acima de determinada concentração (AGUILAR e RITO-PALOMARES, 2010; JIANG et al., 2014). A partição de proteínas no SAB depende da concentração e do peso molecular do polímero, das propriedades do sal, do pH e de outros fatores (ZHOU et al., 2013). A separação aquosa bifásica é utilizada devido à incompatibilidade entre soluções aquosas de dois polímeros ou um polímero e um sal com elevada força iônica. Dessa maneira, ao passo que os polímeros são misturados, são formados agregados e os dois polímeros tendem a separar-se em duas fases diferentes (CARVALHO et al., 2016). O polietilenoglicol (PEG) e dextrano são os polímeros mais utilizados. Contudo, pode ser observado um fenômeno de exclusão similar entre um polímero e uma solução de elevada concentração de sal como PEG e fosfato, sulfato, citrato, dado que o sal capturará uma grande quantidade de água presente (ANSEJO e ANDREWS, 2011; CARVALHO et al., 2016).

Os sistemas formados por um solvente orgânico e uma solução aquosa, não são geralmente adequados para a separação de moléculas biológicas devido à baixa solubilidade de proteínas. Já os sistemas aquosos bifásicos são mais adequados e vem sendo usados com

sucesso, pois são utilizados para desenvolver bioprocessos de recuperação e purificação de muitos produtos biológicos, incluindo proteínas, material genético, bionanopartículas, células e organelas (ANSEJO e ANDREWS, 2011).

O diagrama de fases é de imensa importância, pois é por meio dele que pode ser feita uma escolha sistemática de composições para as experiências de partição. Por meio dele obtém-se a concentração de componentes formadores de fases necessários para formar um sistema bifásico em equilíbrio (CHAKRABORTY e SEN, 2016). Podem ser construídos para cada Polímero/sal (Figura 7). A composição global de qualquer sistema é dada pela ordenada (PEG) e pela abscissa (sal). Uma mistura de composição dada pelo ponto M irá separar em duas fases (ANSEJO e ANDREWS, 2011).

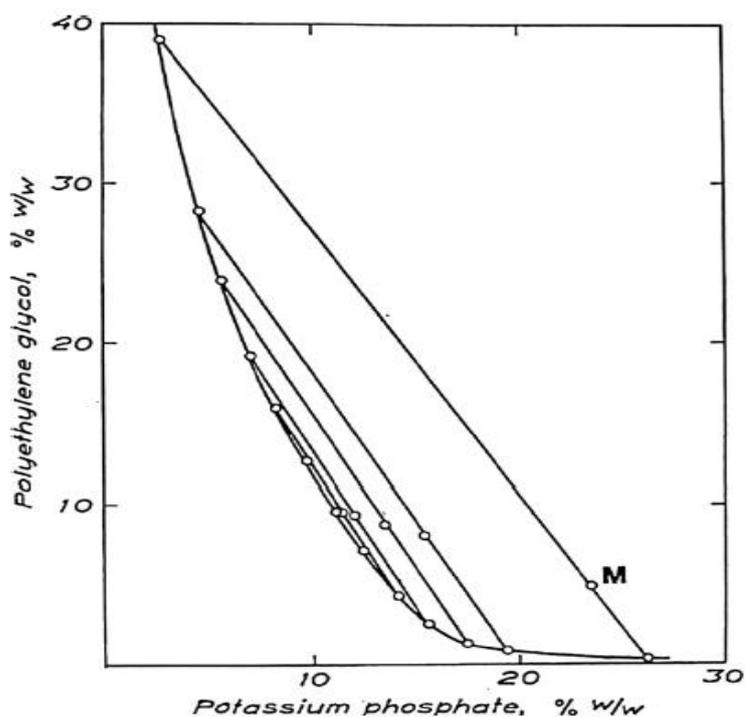


Figura 7. Diagrama de fases e composições de fase do fosfato de potássio - PEG 4000 (ANSEJO e ANDREWS, 2011).

4. Planejamento experimental

Atualmente, tem crescido a necessidade de otimizar produtos e processos para minimizar custos e tempo, maximizar rendimento, produtividade e qualidade de produtos. Para desenvolver ou melhorar um processo é necessário planejar um procedimento

experimental para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes ou fatores têm sobre as respostas (RODRIGUES e IEMMA, 2014). Ver a influência que uma ou mais variáveis tem sobre outra variável de interesse é um dos problemas mais comuns na experimentação. No planejamento, primeiramente deve-se decidir os fatores e a resposta. Os fatores são as variáveis controladas e os níveis são os valores dos fatores que serão utilizados nos ensaios. Pode existir mais de uma resposta a ser analisada no processo produtivo, sendo qualitativas ou quantitativas (BARROS NETO et al., 2010).

As abordagens estatísticas tornaram-se ferramentas que compreendem as interações entre diversos parâmetros com um número mínimo de experimentos (FABISZEWSKA et al., 2015). A redução do número de experimentos quando comparado às metodologias convencionais e a melhora da qualidade de informações obtidas por meio dos resultados, é considerada uma vantagem, pois significa redução do tempo e custo (RAO e BARAL, 2011; RODRIGUES e IEMMA, 2014). Os métodos estatísticos do Delineamento Experimental fornecem um plano sistemático e eficiente para a experimentação, de modo que simultaneamente, muitos fatores que podem influenciar um processo são estudados (FABISZEWSKA et al., 2015).

Os planejamentos de mistura são uma classe especial de *designs* de superfície de resposta onde as proporções dos componentes ou fatores são consideradas importantes em vez de sua magnitude e são úteis na concepção da mistura (RAO e BARAL, 2011). O planejamento de misturas permite a obtenção de dados robustos e confiáveis, assim otimizando a formulação, com redução significativa de tempo e custo. Qualquer variação que haja nos componentes é de se esperar uma variação proporcional na resposta (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Numa concepção experimental de mistura, a resposta medida depende apenas das proporções dos ingredientes presentes na mistura (que variam entre 0 e 1 e a soma é igual a um) e não da quantidade de mistura. Assim, a resposta função das proporções desses componentes é inteiramente determinada por elas (CORNELL, 2002; RAO e BARAL, 2011).

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que utilizaram planejamentos experimentais para otimização de meios de culturas para produção de enzimas. A otimização do meio de cultura é um processo de aprimoramento, pois a presença de alguns nutrientes pode influenciar significativamente a produção da enzima alvo (LIMA et al., 2001).

Tabela 1. Otimização de meios de culturas para produção de enzimas utilizando planejamento experimental.

Microrganismo	Planejamento Experimental	Produção de lipase	Referência
<i>Acinetobacter sp.</i>	DCCR	48 U.mL ⁻¹	GURURAJ et al., 2016.
	Plackett–Burman	4 U	
<i>Aspergillus flavus</i>	Planejamento Fatorial completo 2 ³	2 U	COLLA et al., 2016.
	DCCR	3,04 U	
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Simplex centroide</i>	89,22 U/g	DIAS et al., 2015.
<i>Aspergillus niger</i>	DCC	49,37 U/g	SALIHU et al., 2016
<i>Candida cylindracea</i>	DCCR	20,26 U.mL ⁻¹	SALIHU et al., 2011.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Plackett–Burman	4559 U.mL ⁻¹	HASAN-BEIKDASHTI et al., 2012.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Simplex lattice</i> <i>Simplex centroide</i>	0,1 U.mL ⁻¹	FABISZEWSKA et al., 2015.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Planejamento fatorial fracionado 2 ^{k-p}	13 U.mL ⁻¹	GONÇALVES et al., 2013.

*DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional; DCC: Delineamento Composto Central.

Os experimentos fatoriais envolvem combinações entre dois ou mais fatores. Os parâmetros são analisados simultaneamente, assim pode-se verificar e quantificar os efeitos sinérgicos e antagônicos, analisar mais de uma resposta ao mesmo tempo, e ainda permite calcular e avaliar o erro experimental (RODRIGUES e IEMMA, 2014). O delineamento composto central (DCC) é um planejamento de superfície de resposta amplamente utilizado quando a região experimental é definida pelos limites superior e inferior de cada fator e não se estende além deles, o qual uma combinação de fatores gera uma resposta ótima (PAPAGORA et al., 2013).

A metodologia de superfície de resposta (RSM – *Response Surface Methodology*) é uma técnica estatística útil para a investigação e otimização de processos complexos (PAPAGORA et al., 2013). É utilizada para analisar processos com vários fatores, construir modelos, avaliar os efeitos dos fatores analisados e buscar condições ótimas para a resposta desejada (HASAN-BEIKDASHTI et al., 2012).

A RSM possui duas etapas distintas que são modelagem e deslocamento. A modelagem geralmente é feita ajustando-se modelos simples (linear ou quadrático) a respostas obtidas com planejamento fatorial ou com planejamento fatorial ampliado. O deslocamento se dá ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO et al., 2010).

A figura obtida da metodologia de superfície de resposta é representada graficamente em função dos fatores avaliados. Outra representação é por meio de curva de nível que identifica os valores dos fatores analisados para qual resposta é constante (BARROS NETO et al., 2010).

Essa metodologia tem sido considerada muito importante por alguns autores, pois é crescente a utilização da RSM em trabalhos para otimização da produção de enzimas de bactérias, fungos e leveduras (SALIHU et al., 2011; PAPAGORA et al., 2013; COLLA et al., 2016; GURURAJ et al., 2016).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. **Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes**. *Biomolecules* 4, 117-139, 2014.

AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase systems strategies for the recovery and characterization of biological products from plants. **J Sci Food Agric** 90: 1385–1392, 2010.

ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, 2013.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R.; Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2016.

ASENJO, J.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, 1218. 8826– 8835. 2011.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; A. FRICKS, T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M.F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3853– 3858, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria**. 4ª Ed. Editora Bookman. Campinas, SP: 2010.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K. M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**. Vol. 72, pp. 271-286, 2013.

BLOISI, F.; CALIFANO, V.; PERRETTA, G.; NASTI, L.; ARONNE, A.; GIROLAMO, R.; AURIEMMA, F.; ROSA, C.; VICARI, L. R. M. Lipase immobilization for catalytic applications obtained using fumed silica deposited with MAPLE technique. **Applied Surface Science** 374, 346–352, 2016.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**, Rio de Janeiro, 2008.

BORZANI, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. Fundamentos. Volume I. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BRÍGIDA, A. I.S.; AMARAL, P. F.F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B.; Review. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 101 148– 158, 2014.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. 1º ed, editora E-papers.. Rio de Janeiro. 159 p. 2003.

CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F.F. Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia lipolytica* Extracellular Lipase Purification. **Process Biochemistry**, 2016.

CHAKRABORTY, A.; SEN, K. Impact of pH and temperature on phase diagrams of different aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography A**, 1433, 41–55, 2016.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLINA, T. E.; COSTA, J. A.V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 47, 461-467, 2016.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture data**. 3^a Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002.

DEWAN, S. S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. In: BCC Research, 2014.

DIAS, F.F.G.; CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M.P.; SATO, H. H. Simplex centroid mixture design for improve lasparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2015.

DUARTE, A. W. F.; LOPES, A. M.; MOLINO, J.V. D.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology** 156, 215-225, 2015.

FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. **Ann Microbiol** 65:1495–1503, 2015.

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), 2016.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; V.; RAI, V. Review Article A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**. Vol. 2013.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S., NANDHINIDEVI, G.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solventtolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07P. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2016.

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

HASAN-BEIKDASHTI, M.; FOROOTANFAR, H.; SAFIARIAN, M.S.; AMERI, A.; GHAREMANI, M.H.; KHOSHAYAND, M.R.; FARAMARZI, M.A. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 43, 670–677, 2012.

HORCHANI, H.; AISSA, I.; OUERTANI, S.; ZARAI, Z.; GARGOURI, Y.; SAYARI A.; Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 76, 125– 132, 2012.

JIANG, B.; FENG, Z.; LIU, C.; XU, Y.; LI, D.; JI, G. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **J Food Sci Technol.** 52, 2014.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Review: Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry** 47, 555–569, 2012.

KUMAR, V.; SINGH, D.; SANGWAN, P.; GILL, P. K.; Global market scenario of industrial enzymes. Chapter 10. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes.** 2016.

LIMA, U. DE A; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial.** Processos fermentativos e enzimáticos. Volume 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry , Chapter 11. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes.** 2017.

MAESTER, T. C. Prospecção de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MARZZOCO, A; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 60-61, 2007.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MORAIS JÚNIOR, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification** 123, 2016.

OLIVEIRA, A. C. D; FERNANDES, M. L.; MARIANO, A. B. Production and characterization of an extracellular lipase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology** 45, 4, 1503-1511, 2014.

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**, Campina Grande, v.15, n.1, p.19-26, 2013.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**. 2013.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 93-99, 2006.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. Chapter 2. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2017.

PERUMALSAMY, M.; BATCHA, M. I. Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system. **Process Biochemistry**. Vol 46. 494–497, 2011.

RAMANI, K.; JOHN KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry** 45, 1683–1691, 2010.

RAO, P. V.; BARAL, S. S. Experimental design of mixture for the anaerobic co-digestion of sewage sludge. **Chemical Engineering Journal** 172, 977–986, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3ª Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, 1244, 1–13, 2012.

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

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIMA, M. I.; SALLEHA, 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** 69, 2011.

SALIHU, A.; BALA, M.; ALAM, M. Z. Lipase production by *Aspergillus niger* using sheanut cake: An optimization study. **Journal of Taibah University for Science** 10, 850–859. 2016.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful Microbial Enzymes-An Introduction. Chapter 1. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2016.

SELISTEANU, D.; TEBBANI, S.; ROMAN, M.; PETRE, E.; GEORGEANU, V. Microbial production of enzymes: Nonlinear state and kinetic reaction rates estimation. **Biochemical Engineering Journal** 91, 23–36, 2014.

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** 39, 459/465, 2003.

THAKUR, S. Lipases, its sources, properties and applications: a review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**. v.3, n.7, p.1-40, 2012.

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

VOLPATO, G. Produção, purificação e imobilização de lipase de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

WU, H. S.; TSAI, M. J. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 488-493, 2004.

ZHOU, Y.; HU, C.; WANG, N.; ZHANG, W.; YU, X. Purification of porcine pancreatic lipase by aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate. **Journal of Chromatography B**, 92, 677– 82, 2013.

CAPÍTULO 2

Otimização da produção de lipase por *Candida viswanathii* em cultivos submersos utilizando planejamento experimental *Simplex-Lattice*

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3) são hidrolases que possuem diversas aplicações industriais devido a sua estrutura molecular e as propriedades catalíticas. Em meio aquoso, hidrolisam ligações ésteres de triacilgliceróis a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Neste estudo, diferentes composições do meio de cultivo variando-se fontes de óleos vegetais e animais, nitrogênio e carbono foram avaliadas para a produção de lipase por *Candida viswanathii*. O meio mineral saís de Vogel, azeite de oliva e extrato de levedura foi selecionado para a produção de lipase. As maiores produções de lipase foram com lactose, sorbitol e glicerol 16,04 U/mL, 15,81 U/mL e 14,35 U/mL, respectivamente e tiveram a sua influência avaliada por meio de um design de mistura (*simplex-lattice*). A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para a otimização das concentrações de nutrientes no meio de cultura para a produção de lipase, sendo lactose e sorbitol considerados adjuntos para a produção de lipase. A composição final do meio de Vogel com 1% (p/v) de azeite de oliva, 0,2% (p/v) de extrato de levedura, 0,5% de lactose (p/v) e 0,5% (p/v) de sorbitol proporcionou um aumento de 74% na produção de lipase.

Palavras-chave: produção de lipase; fonte de carbono; metodologia de superfície de resposta; otimização; *Candida viswanathii*.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are hydrolases that have various industrial applications due to their molecular structure and as catalytic properties. In aqueous medium, they hydrolyze ester bonds of triglyceride into diacylglycerides, monoacylglycerides, fatty acids and glycerol. In this study, different compositions of the mineral medium, sources of vegetable and animal oils, nitrogen and carbon were evaluated for lipase production by *Candida viswanathii*. The mineral medium Vogel, olive oil and yeast extract was selected for lipase production. The presented the highest lipase production were with lactose, sorbitol and glycerol 16.04 U/mL, 15.81 U/mL and 14.35 U/mL, respectively and these carbon sources were evaluated by means of a mixture design (*simplex-lattice*). The response surface methodology was applied for the optimization of the nutrient concentrations in the culture medium for the enzyme production. Lactose and sorbitol was used as adjuncts for lipase production. The final composition of Vogel's medium with 1% (w/v) olive oil, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.5% lactose (w/v) and 0.5% (w/v) sorbitol provided an increase of 74% of the lipase production.

Keywords: lipase production; carbon source; surface response analysis; optimization; *Candida viswanathii*.

INTRODUÇÃO

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam as ligações éster em substratos lipídicos. Na presença de água, elas catalisam a hidrólise de triacilglicerol formando monoacilglicerol, diacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (GURURAJ et al., 2016) importantes em diversas aplicações biotecnológicas. As lipases possuem um potencial diverso de aplicações em indústrias como de detergentes, sínteses orgânicas, laticínios, produtos farmacêuticos e tratamento de efluentes (SALIHU et al., 2011).

As lipases podem originar-se de várias fontes como plantas, animais e microrganismos (LIU et al., 2011). As lipases de origem microbiana são comercialmente mais importantes, pois são provenientes de fungos ou bactérias, sendo, em sua maioria, produzidas e secretadas para o meio extracelular. As lipases microbianas apresentam baixo custo de produção, maior estabilidade e disponibilidade quando comparadas a lipases oriundas de plantas e animais (BANSOD e RATHOD, 2017).

Diferentes microrganismos, suplementos e substratos têm sido utilizados em combinações diversas com a finalidade de reduzir o custo de produção em escala industrial e de obter uma maior produção de lipase (SALIHU et al., 2011; MORAIS JUNIOR et al., 2016). Fatores como composição do meio de cultura, fontes de carbono, fonte de nitrogênio, fontes lipídicas, sais minerais, pH e temperatura influenciam fortemente a produção de lipase (FABISZEWSKA et al., 2014). As fontes de lipídeos são consideradas essenciais para um rendimento elevado de lipase, pois essas enzimas necessitam de fontes indutoras (TREICHEL, et al. 2010). Portanto, tipos e concentrações de nutrientes e de indutores afetam a produtividade desses bioprocessos (COLLA et al., 2016), tornando-se essenciais quando o objetivo é aumentar a produção.

A otimização estatística de processos tem a vantagem de avaliar os efeitos de interação entre variáveis com um menor número de experimentos e tempo. Muitos autores têm utilizado essa técnica a fim de obter resultados de forma mais eficaz (COLLA et al., 2016; MORAIS JUNIOR et al., 2016; GURURAJ et al., 2016). A metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta eficiente para analisar os resultados por meio de desenho de experimentos, construção de modelos, avaliação de fatores que tiveram efeitos e condições ótimas para a resposta desejada (HASAN-BEIKDASHTIET al., 2012).

Assim, esse estudo teve como objetivo identificar e otimizar as melhores condições de cultivo para a produção de lipase por *Candida viswanathii* em cultivos submersos, avaliando as composições de sais minerais do meio, bem como fontes de óleos vegetais e animais,

nitrogênio e carbono, por meio de design de mistura e caracterizar parcialmente a lipase produzida frente ao pH e temperatura de atividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e Preparação do Inóculo

A *Candida viswanathii* foi isolada das águas residuais de uma refinaria brasileira (Replan / Petrobras, Paulínia, São Paulo, Brasil) (SOARES Jr. et al., 2008). E cultivada em tubo de ensaio inclinado contendo meio de cultura BDA (2% Ágar, 20% Batata, 2% Dextrose) a 28 °C por 3 dias. Em seguida, foi realizada uma suspensão das células em solução salina NaCl 0,85%. A concentração de células no inóculo foi de 10^7 cel/mL. Posteriormente, 1 mL desta suspensão foi inoculado nos cultivos submersos. A contagem das células procedeu-se em câmara de Neubauer e microscópio óptico comum.

Seleção de meios de cultivo para a produção de lipase

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meios de cultura (Tabela 2). Esses meios foram suplementados com 1,0 % (m/v) de azeite de oliva, 0,2 % de extrato de levedura (m/v) e o pH ajustado a 6,0 com solução de NaOH (2 M). Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121°C. Os cultivos foram mantidos a 180 rpm, 28 °C por períodos de 36 e 72 horas, em três repetições.

Tabela 2. Meios de cultivos utilizados para produção de lipase por *C. viswanathii*.

Meios de Cultura	Composição (g.L ⁻¹)	Referência
A	5,5 de K ₂ HPO ₄ ; 15 de KHPO ₄ ; 0,5 de MgSO ₄ .7H ₂ O	DALMAU, et al., 2000.
B	MgSO ₄ .H ₂ O 0,14; K ₂ HPO ₄ 0,5; com substituição de CaCO ₃ 5,0 por CaCl ₂ .2H ₂ O 7,2;	KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006; VIDEIRA, 2014.
C	NaH ₂ PO ₄ 12,0; KH ₂ PO ₄ 2,0; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,03; ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,03; FeSO ₄ .7H ₂ O 0,005;	ÜLKER et al., 2011.
D	NaH ₂ PO ₄ 12,0; KH ₂ PO ₄ 2,0; MgSO ₄ .H ₂ O 0,168; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,331;	RIFAAT et al., 2010.
E	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O 50; ZnSO ₄ .7H ₂ O 50; Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O 10; CuSO ₄ .5H ₂ O 2,5; MnSO ₄ .H ₂ O 0,05; H ₃ BO ₃ 0,05; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 0,05; Solução de sais: Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O 150; KH ₂ PO ₄ 250; NH ₄ NO ₃ 100; MgSO ₄ .7H ₂ O 10; CaCl ₂ .2H ₂ O 5 e biotina (0,1 mg mL ⁻¹) 5 mL; 0,2 mL clorofórmio.	VOGEL, 1956.

Seleção de Fontes de Lipídeo

Os meios de cultivos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultivo que apresentou maior produção. Esse meio foi suplementado com 0,2 % (m/v) de extrato de levedura e o pH ajustado a 6,0 com solução de NaOH. Foram testadas 8 tipos de fontes de óleos vegetais e animais, nas concentrações de 1% e 2%: azeite de oliva, óleo de canola, girassol, linhaça, milho, soja, gordura de frango e banha de porco. As fontes de lipídeos foram obtidas do comércio local, exceto a gordura de frango que foi doada pela Fricok Frigorífico S/A, Rio Claro-SP. Os meios de cultivo foram esterilizados, inoculados e mantidos a 180 rpm, a 28 °C por 36 horas. O experimento foi realizado em três repetições.

Seleção de Fontes de Nitrogênio

Os meios de cultivos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultivo e fonte de lipídeo que apresentaram maior produção. O pH foi ajustado a 6,0 com solução de NaOH. Foram analisados quatro tipos diferentes de fonte de Nitrogênio (0,2%): peptona de carne, extrato de levedura, cloreto de amônio e nitrato de

amônio. Os meios de cultivo foram esterilizados, inoculados e mantidos a 180 rpm, 28 °C por 36 horas. O experimento foi realizado três repetições.

Seleção de Fontes de Carbono

Os meios de cultivos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio de cultivo, fonte de lipídeo e fontes de nitrogênio que apresentaram maior produção. O pH foi ajustado a 6,0 com solução de NaOH. Foram testados nove tipos diferentes de fonte de carbono (1%): ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, glicerol, glicose, lactose, maltose, manitol e sorbitol. Os meios foram esterilizados, inoculados e mantidos a 180 rpm, 28 °C por 36 horas. O experimento foi realizado três repetições.

Planejamento de mistura simplex-lattice

Visando obter a máxima produção de lipase e com base nos resultados da seleção de diferentes fontes de carbono, a otimização do meio de cultura foi realizada utilizando-se um planejamento de misturas do tipo *simplex-lattice*. Foi utilizado o programa STATISTICA Trial[®] a fim de analisar estatisticamente a resposta do experimento. Os fatores definidos como variáveis foram lactose (A), sorbitol (B) e glicerol (C). As concentrações de cada um dos componentes variaram de 0 a 1% (Tabela 3). Os meios foram esterilizados, inoculados e mantidos a 180 rpm, 28 °C por 36 horas.

Tabela 3. Matriz do *simplex-lattice* para otimização do meio para a produção de lipase de *Candida viswanathii*.

Ensaio	A (Lactose, %)	B (Sorbitol, %)	C (Glicerol, %)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	1	0	0
8	0	1	0
9	0	0	1
10	0,5	0,5	0
11	0,5	0	0,5
12	0	0,5	0,5
13	0,5	0,5	0
14	0	0,5	0,5
15	0,5	0	0,5

Obtenção do Extrato Bruto

O extrato bruto foi obtido após o cultivo, por centrifugação do caldo fermentado a 5000 rpm por 20 minutos, a 4 °C. O extrato bruto foi retirado e congelado até o momento das análises de determinação da atividade enzimática e proteína total.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da lipase foi determinada com p-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato. O pNPP foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 4,0 contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do p-nitrofenol. Após pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL do extrato bruto devidamente diluído. A reação foi interrompida em diferentes intervalos com choque térmico (90 °C, 1 min), seguido da adição de 1mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 410nm [coeficiente de extinção molar para-nitrofenol (pNP): $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Controles foram preparados sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de pNP por min por mL. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Quantificação de proteínas

A proteína foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

Cálculos de Rendimento

Os cálculos de rendimento da produtividade biomassa (P_X) e produtividade lipase (P_L), produtividade da lipase sobre o substrato (P_S) e razão específica da produção de lipase (q) foram obtidos pelas seguintes equações:

$$P_X = \frac{\text{Biomassa (g)}}{h} \quad (1)$$

$$P_L = \frac{\text{Lipase (U)}}{h} \quad (2)$$

$$P_S = \frac{\text{Ativ. Lipase (U/L)}}{\text{Substrato } \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (3)$$

$$q = \frac{(L/X)}{h} \quad (4)$$

Onde, P_X produtividade biomassa; P_L produtividade lipase; P_S produtividade da lipase sobre substrato; q razão específica da produção de lipase; L/X atividade de lipase sobre biomassa.

Caracterização parcial da enzima produzida

Efeito do pH e temperatura sobre a atividade

Para determinação do pH e temperatura ótimos de atividade do extrato bruto foi realizado um delineamento central composto rotacional (DCCR 2²) (Tabela 4). Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine com pH de 2,1 a 6,9. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para a diluição das amostras. A atividade foi determinada nas temperaturas de 19,95 °C a 60°C, conforme descrito anteriormente.

Tabela 4. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2² para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa.

	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	2,1	2,8	4,5	6,2	6,9
Temperatura °C	20	26	40	54	60

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de meios de cultivo para a produção de lipase

Inicialmente cinco meios foram selecionados para verificar a melhor composição de nutrientes para induzir a produção de lipase. As maiores produções de lipase por *Candida viswanathii* foram observadas nos meios A e E (8,73 U/mL, 11,73 U/mL, respectivamente) em 36 horas de cultivo (Tabela 5). No Ensaio E também foi observada a maior produção de biomassa (13,30 g/L). Os meios C e D apresentaram baixa produção (2,90 U/mL, 3,15 U/mL, respectivamente). Os parâmetros analisados para o meio E com 36 horas de cultivo como atividade específica (4,80 U/mg), P_S (58,68 U/g), P_L (6,52 U/h) e q (0,025 U/g de biomassa/h) apresentaram maiores valores. Assim, o meio Vogel (E) foi o escolhido para a continuidade do processo de otimização.

Tabela 5. Parâmetros característicos de produção e de biomassa de *Candida viswanathii* em diferentes meios de cultivo.

Meios de Cultura	Tempo de Cultivo	Biomassa	Atividade Lipase	Atividade Específica	P _x	P _L	q	P _s
Meio A	36	11,90	8,73	2,78	0,33	4,85	0,020	43,644
	72	7,15	11,70	3,96	0,10	3,25	0,023	58,48
Meio B	36	6,75	2,12	2,02	0,19	1,17	0,009	10,57
	72	13,00	1,99	2,39	0,18	0,55	0,002	9,99
Meio C	36	2,90	2,17	0,66	0,08	1,21	0,021	10,86
	72	2,80	3,26	0,86	0,04	0,91	0,016	16,29
Meio D	36	3,15	1,32	0,37	0,09	0,73	0,012	6,60
	72	8,50	3,20	0,87	0,12	0,89	0,005	16,00
Meio E	36	13,30	11,73	4,80	0,37	6,52	0,025	58,68
	72	14,05	11,13	4,87	0,20	0,15	0,011	55,67

Legenda: Tempo de Cultivo (h); Biomassa (g/L); Atividade Lipase (U/mL); Atividade específica (U/mg); P_x, produção de lipase sobre biomassa (g/h); P_L, produtividade de lipase (U/h); q, razão específica da produção de lipase (U/g de biomassa/h); P_s, produtividade lipase sobre o substrato (U/g).

Lima et al. (2013) isolaram linhagens de *Aspergillus* de solo da Caatinga de Pernambuco e observaram maior produção de lipase em meio composto por óleo de oliva (30 mL/L), peptona (70g/L), NaNO₃ (1g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L), pH7,0. A máxima produção de lipases observada por uma linhagem de *Aspergillus* foi de 22,64 U/mL em 120 horas enquanto outra linhagem de *Aspergillus* produziu 26,52 U/mL em 144 horas. Rajendran et al.(2008) otimizaram a composição do meio para a produção de lipase de *Candida rugosa*. O meio continha glicose (20 g.L⁻¹), azeite, peptona e FeCl₃ · 6H₂O. A atividade máxima de lipase foi de 3,8 U/mL num cultivo de 50 horas, a 30° C, pH 6,8 a 120 rpm. Ramani et al. (2010) perceberam que com a adição de alguns íons metálicos (K⁺, Na⁺, Fe⁺² e Mg⁺²) ao meio de cultura, a produção de lipase por *Pseudomonas gerssadii* apresentava uma ligeira inibição, enquanto que o íon Ca⁺² mostrava um efeito estimulador na produção de lipase.

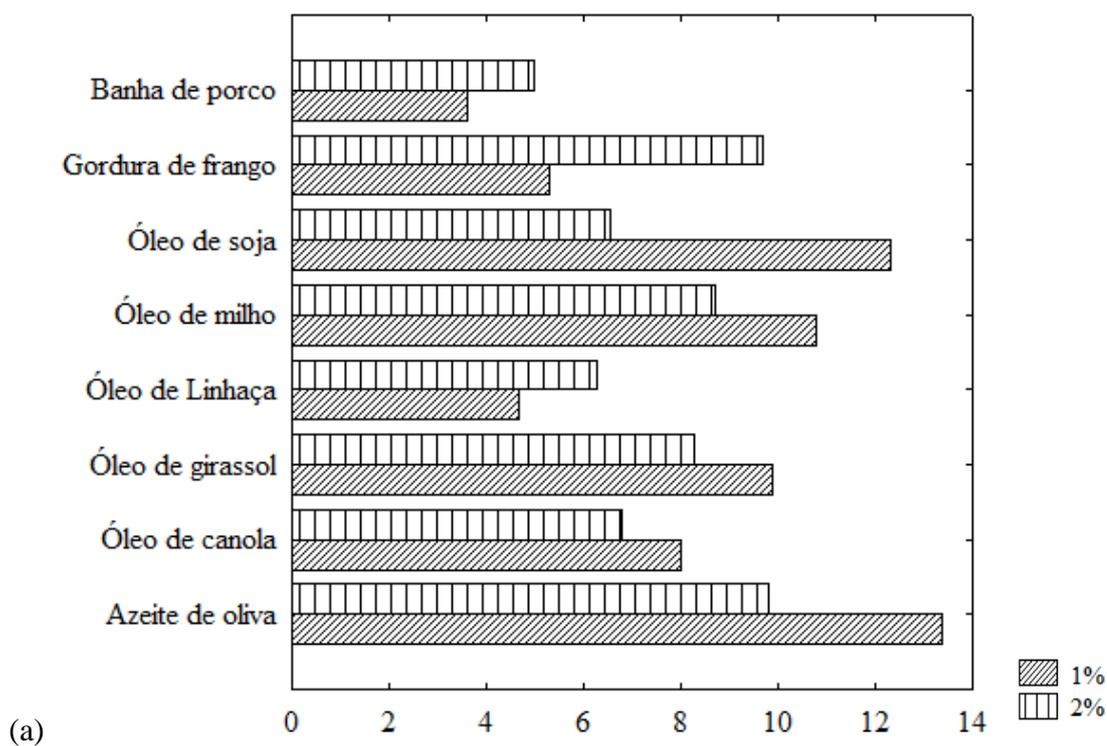
Tan et al. (2003) estudaram a produção de lipase por *Candida sp* em meios de fermentação com fontes nitrogênio, carbono e íons. Após a otimização, o meio composto por 4% de farelo de soja, 2,5% de óleo de soja, 0,1% K₂HPO₄, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,05% MgSO₄, pH 7,0 obteve uma produção de lipase em um fermentador (1500 L) de 8060 U/mL. Os autores observaram que Mg²⁺, Na⁺ e K⁺ foram benéficos para a síntese de lipase, enquanto que o íon Ca²⁺ forma complexos com os ácidos graxos, alterando sua solubilidade e o comportamento na interface óleo/água inibindo a síntese de lipase. No entanto, Colin et al.(2010) verificaram que a produção de lipase de *Aspergillus niger* com a presença de CaCl₂

e FeCl_3 no meio aumentou em 2,6 e 6,6 vezes a produção da enzima. Eles atribuíram esse aumento ao controle dos íons Ca^{2+} que exercem na secreção de proteínas. A escolha das condições de cultura, em particular da composição do meio, a composição química, fonte de carbono e nitrogênio são fatores importantes para produção de lipase (DALMAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2013).

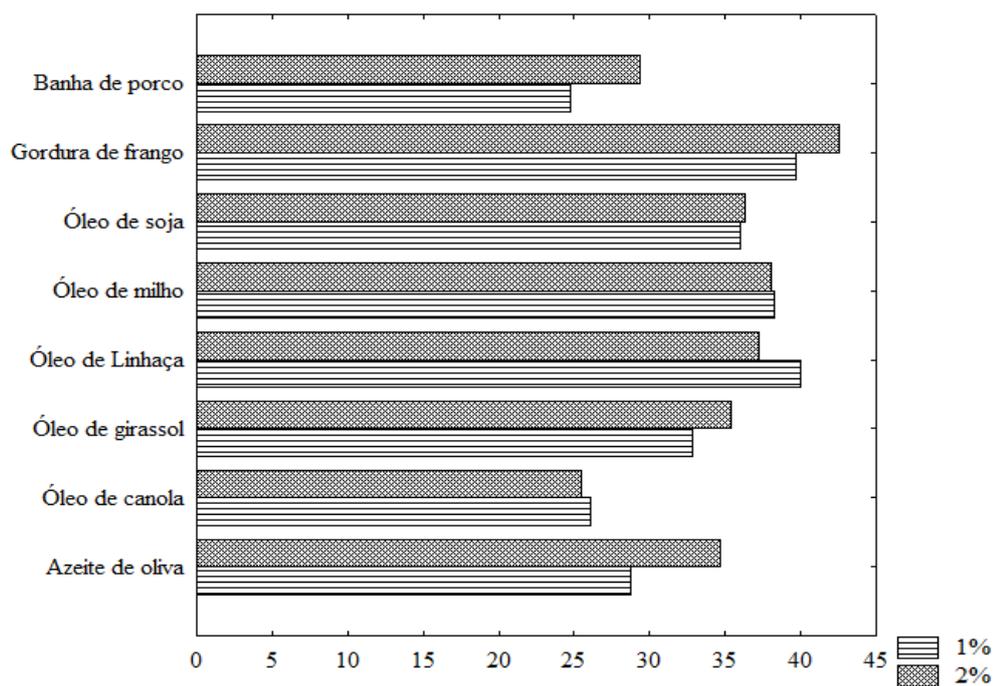
Seleção de fontes de óleos vegetais e animais

As lipases são enzimas indutivas e fontes lipídicas são essenciais para a obtenção de alto rendimento dessas enzimas (TREICHEL et al., 2010). Entre os oito tipos de fontes de lipídios utilizadas nas concentrações de 1 e 2% (p/p), a linhagem de *Candida viswanathii* apresentou a maior produção de lipase utilizando o azeite de oliva 1% (p/p) (13,36 U/mL) (Figura 8 a), seguido de óleo de soja (12,30 U/mL) e milho (10,77 U/mL). A maior produção de biomassa foi com 2 % (p/p) de gordura de frango (Figura 8 b).

Os parâmetros analisados como atividade específica = 7,06 U/mg, $P_L = 7,42$ U/h, $q = 0,013$ U/g de biomassa/h e $P_S = 66,82$ U/g (Tabela 6) evidenciam que azeite de oliva 1% (p/p) foi mais adequada à produção de lipase. Esses resultados podem estar relacionados à composição de 71% de ácido oléico no azeite e ao fato de que as lipases hidrolisam preferencialmente os resíduos de ácidos graxos nas posições 1 e 3 dos glicerídeos e alguma lipase extracelular requer ácido oléico como estabilizador/ativador (MAFAKHER et al. 2010).



(a)



(b)

Figura 8. Atividade enzimática (U.mL⁻¹) (a) e produção de biomassa (g.L⁻¹) (b) de *Candida viswanathii* em diferentes fontes de óleos vegetais e animais (1% e 2%).

Tabela 6. Parâmetros da fermentação para a produção de lipase e de biomassa por *Candida viswanathii* em diferentes fontes de lipídeo.

Fontes de lipídios	Ácidos graxos*	1% (p/p)				2% (p/p)					
		Atividade Específica	P _x	P _L	q	P _s	Atividade Específica	P _x	P _L	q	P _s
Azeite de oliva	71 % oléico	7,06	0,80	7,42	0,013	66,82	3,19	0,96	5,44	0,008	48,95
Óleo de canola	21 % linoléico	3,83	0,72	4,44	0,009	39,96	1,51	0,71	3,77	0,007	33,95
Óleo de girassol	71% linoléico	4,14	0,91	5,49	0,008	49,37	2,86	0,98	4,60	0,007	41,41
Óleo de Linhaça	57% linolênico	2,38	1,11	2,60	0,003	23,37	1,62	1,03	3,49	0,005	31,43
Óleo de milho	57% linoléico	6,13	1,06	5,98	0,008	53,83	3,10	1,06	4,83	0,006	43,45
Óleo de soja	54% linoléico	5,99	1,00	6,83	0,010	61,49	2,29	1,01	3,63	0,005	32,66
Gordura de frango	55% oléico	2,80	1,10	2,94	0,004	26,48	3,93	1,18	5,39	0,006	48,47
Banha de porco	40% oléico	2,01	0,69	2,02	0,004	18,14	2,30	0,82	2,78	0,005	24,98

Legenda: Atividade Específica (U/mg); P_x, produção de lipase sobre biomassa (g/h); P_L, produtividade de lipase (U/h); q, razão específica da produção de lipase (U/g de biomassa/h); P_s, produtividade lipase sobre o substrato (U/g).

*Vaclavik (1998); Fonseca e Gutierrez (1974); Van de Berg et al. (2004).

A banha de porco, óleo de linhaça e gordura de frango (1%) apresentaram menor produção de lipase (3,63U/mL, 4,67 U/mL, 5,30 U/mL), baixos valores de atividade específica (2,38 U/mg, 2,80 U/mg, 2,01 U/mg) e baixa produtividade de lipase (2,60 U/h, 2,94 U/h, 2,01 U/h), respectivamente. A baixa produção com os cultivos com banha de porco e gordura de frango (1%) está relacionada à emulsão mecânica, pois em temperatura ambiente são sólidas dificultando a dispersão adequada dos substratos ao meio líquido (ALMEIDA et al., 2012).

Os cultivos com concentração de 2% (p/p) mostraram redução na produção de lipase. A produção com azeite de oliva reduziu para 9,79 U/mL, com óleo de soja para 8,69 U/mL e com o óleo de milho para 6,53 U/mL. A literatura mostra que quando há uma concentração elevada de fonte indutora, a produção de lipase pode ser inibida (GULATI et al., 1999; COLIN et al., 2010; LIU et al., 2011). Liu et al. (2011) estudaram a produção de lipase por *Burkholderia sp.* por adição de gradual de azeite e obtiveram uma inibição na produção quando a concentração foi maior que 0,25%. Colin et al. (2010) obtiveram atividade com 2% de azeite, no entanto, acima dessa concentração, houve um declínio. Tamilarasan e Kumar (2011) avaliaram o efeito da concentração da fonte lipídica na produção de lipase por *Bacillus sphaericus* com a adição de diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%) de azeite de oliva. A atividade de lipase máxima foi obtida em 1,0 a 1,5% de azeite utilizado como fonte lipolítica. Segundo os autores, a alta concentração de fonte de óleo pode afetar a transferência de oxigênio no meio de produção.

Papagora et al. (2013) otimizaram a produção de lipase por *Debaryomyces hansenii*, com azeite (1,9%) ao meio de cultivo, apresentando um aumento de aproximadamente 43% em relação ao meio inicial. Os autores afirmam que a atividade enzimática depende muito da propriedade da "ativação interfacial", ou seja, o aumento da atividade da lipase quando exposta à interface óleo-água. Colin et al.(2010) observaram a maior produção de lipase com azeite por *Aspergillus niger*, sugerindo uma correlação positiva entre a atividade específica da lipase e o teor de ácido oléico dos óleos analisados. Os óleos vegetais como fontes indutoras foram mais adequadas em relação às gorduras, o que pode estar relacionado à composição dos óleos vegetais, à presença de tocoferóis e vitaminas lipossolúveis (ALMEIDA et al., 2012). Ácidos graxos livres presentes nos óleos são bons indutores da síntese de lipases devido ao seu elevado teor de ácido oléico (FABISZEWSKA et al., 2015).

Seleção de Fontes de Nitrogênio

Fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais devem ser cuidadosamente considerados para o crescimento e otimização da produção, pois são requisitos nutricionais para o crescimento microbiano (TREICHEL et al., 2010). O efeito de fontes de nitrogênio orgânicas (peptona e extrato de levedura) e inorgânicas (cloreto e nitrato de amônio) é observado na Figura 9. A maior produção de lipase foi observada com extrato de levedura (13,67 U/mL), seguida de peptona de carne (9,89 U/mL), cloreto de amônio (8,33 U/mL) e nitrato de amônio (8,15 U/mL). A utilização de extrato de levedura proporcionou maior atividade específica 6,42 U/mL, bem como os parâmetros analisados $P_L = 7,60$ U/h, $q = 0,013$ U/g de biomassa/h e $P_S = 68,38$ U/g (Tabela 7).

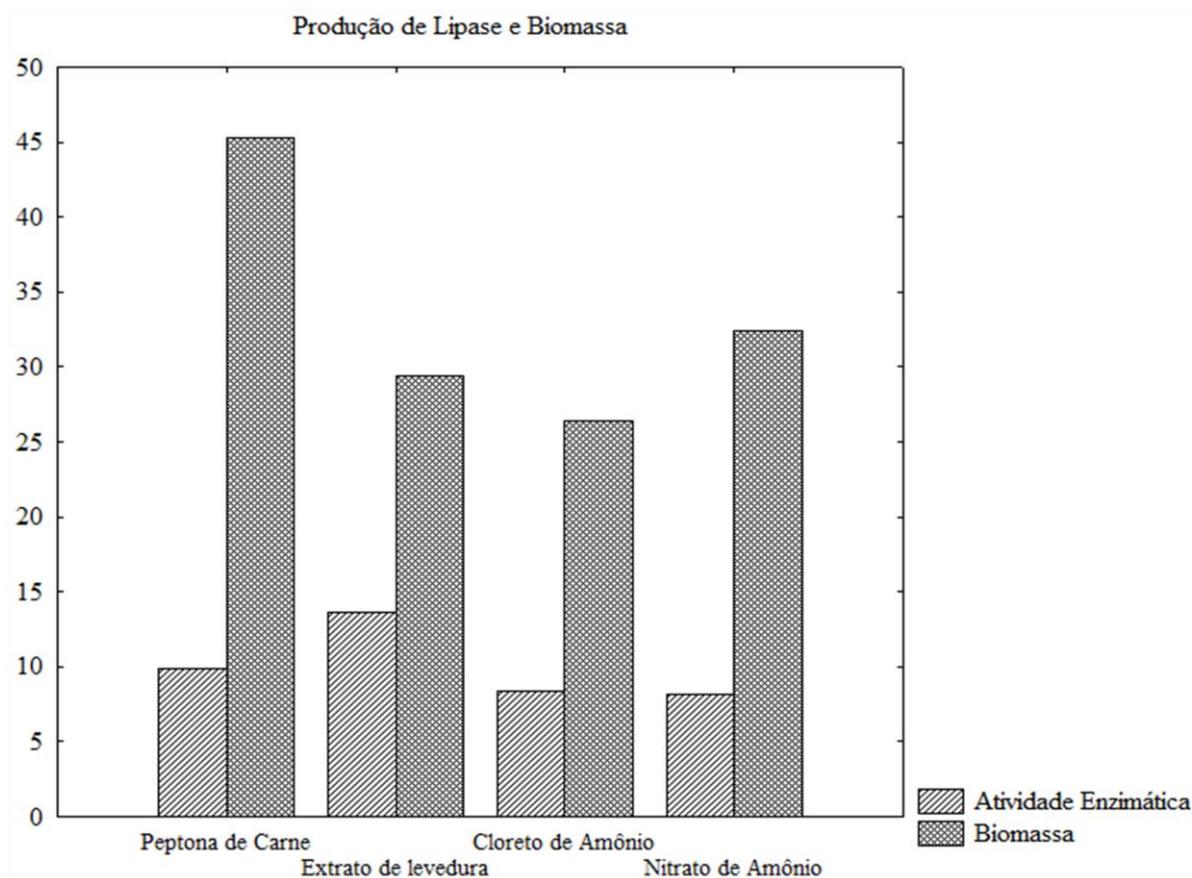


Figura 9. Atividade enzimática (U.mL⁻¹) e produção de biomassa (g.L⁻¹) de *Candida viswanathii* em diferentes fontes de nitrogênio.

Tabela 7. Parâmetros da fermentação para a produção de lipase e de biomassa de *Candida viswanathii* em diferentes fontes de nitrogênio.

Fontes de Nitrogênio	Atividade Específica	P _X	P _L	q	P _S
Peptona de Carne	3,73	1,26	5,50	0,006	49,46
Extrato de Levedura	6,42	0,82	7,60	0,013	68,38
Cloreto de Amônio	5,82	0,73	4,63	0,009	41,66
Nitrato de Amônio	5,66	0,90	4,53	0,007	40,78

Legenda: Atividade Específica (U/mg); P_X, produção de lipase sobre biomassa (g/h); P_L, produtividade de lipase (U/h); q, razão específica da produção de lipase (U/g de biomassa/h); P_S, produtividade lipase sobre o substrato (U/g).

As fontes inorgânicas e orgânicas de nitrogênio têm um papel muito importante na síntese de enzimas, principalmente as orgânicas que podem fornecer muitos fatores para o crescimento celular e aminoácidos, que são necessários ao metabolismo celular e a síntese de enzimas (TAMILARASAN e KUMAR, 2011). O efeito de fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a produção de lipase, por *Candida sp.*, foi investigado por Boonchaidung e Papone (2013) e a máxima produção foi obtida com extrato de levedura ao meio. No estudo de Ramani et al. (2010), em que purificaram e caracterizaram lipase ácida de *Pseudomonas gessardi*, foi encontrado um efeito estimulante de extrato do levedura na produção de lipase. Tamilarasan e Kumar (2011) verificaram a influência de fontes de nitrogênio em meio para produção de lipase por *Bacillus sphaericus* e observaram que entre as fontes orgânicas, o extrato de levedura (0,3%) proporcionou a maior produção de lipase. Já para várias fontes de nitrogênio inorgânicas testadas, a maior produção de lipase foi observada com 0,2% de cloreto de amônio.

Almeida et al. (2012) estudaram a influência de fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase de *Candida viswanathii*, indicando o extrato de levedura como melhor fonte na produção. Colla et al. (2016) verificaram que na produção de lipase por fungos filamentosos, com meio contendo extrato de levedura também gerou atividade lipolítica superior em relação ao nitrato de sódio, resultado que pode ser explicado pelo fato de extrato de levedura conter outros componentes além de uma fonte de nitrogênio que podem atuar como co-enzimas da via metabólica aeróbica, como, por exemplo, vitaminas do complexo B. O extrato de levedura e a peptona, quando utilizadas em meios de cultura, tem proporcionado rendimentos elevados de produção de lipase. O extrato de levedura é considerado uma das fontes de nitrogênio mais importantes para a produção de lipases por diferentes microrganismos (EBRAHIMPOUR et al., 2008; SMANIOTTO et al., 2012).

Seleção de Fontes de Carbono

A maior produção de lipase por *Candida viswanathii* foi obtida no meio suplementado com lactose (16,04 U/mL), seguido de sorbitol (15,81 U/mL) e glicerol (14,35 U/mL), que também apresentaram as maiores concentrações de proteínas (Figura 10 e Tabela 8). A produção de lipase em meio contendo ácido ascórbico, cítrico, láctico e glicose foi inibida, já a formação de biomassa para ácido cítrico e glicose foi maior que as outras duas fontes (17,98 g/L, 18,83 g/L, respectivamente). Maltose e manitol apresentaram baixa produção de lipase (6,05 U/mL; 6,32 U/mL) e elevada produção de biomassa (35,47 U/L; 142,17U/L).

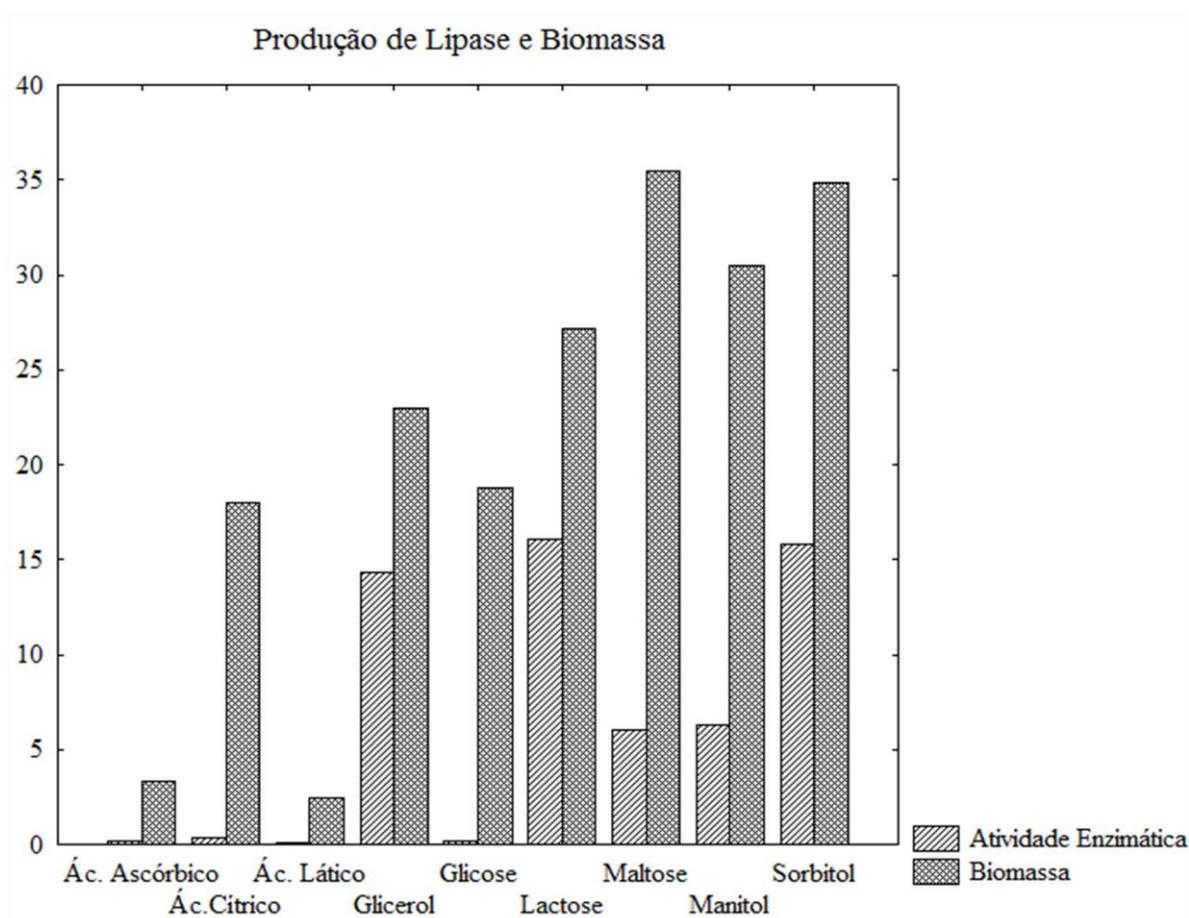


Figura 10. Atividade enzimática (U.mL⁻¹) e produção de biomassa (g.L⁻¹) de *Candida viswanathii* em diferentes fontes de carbono.

Era esperado que a glicose não contribuísse para a produção, pois relatos sobre a produção de lipase associaram sua presença à repressão catabólica (SALIHU et al., 2011). Dalmau et al. (2000) constataram que o uso de glicose juntamente com ácido oléico cessou a síntese de lipase por *Candida rugosa*, ficando evidente que a produção de lipase é reprimida pelo uso de glicose. No entanto, segundo Tamilarasan e Kumar (2011) a produção de lipases

por *Bacillus sphaericus* com meio suplementado com glicose teve uma forte influência, sendo esta, maior quando comparada a produção de lipase com meio suplementado com lactose. Papagora et al. (2013) observaram, em estudos de produção de lipase por *Debaryomyces hansenii*, uma forte influência com meio suplementado com azeite e glicose.

Tabela 8. Parâmetros característicos de produção e de biomassa de *Candida viswanathii* em diferentes fontes de carbono.

Fontes de carbono	Atividade Específica	P _x	P _L	q	P _s
Ácido Ascórbico	0,02	0,11	0,09	0,001	0,85
Ácido Cítrico	0,22	0,50	0,22	0,001	1,96
Ácido Lático	0,03	0,07	0,04	0,001	0,34
Glicerol	6,01	0,64	7,97	0,017	71,77
Glicose	0,04	0,52	0,09	0,001	0,79
Lactose	4,69	0,75	8,91	0,016	80,21
Maltose	1,84	0,99	3,36	0,005	30,26
Manitol	2,63	3,95	3,51	0,001	31,62
Sorbitol	6,10	0,97	8,78	0,013	79,04

Legenda: Atividade Específica (U/mg); P_x, produção de lipase sobre biomassa (g/h); P_L, produtividade de lipase (U/h); q, razão específica da produção de lipase (U/g de biomassa/h); P_s, produtividade lipase sobre o substrato (U/g).

O cultivo de *Yarrowia lipolytica* utilizando o glicerol como fonte de carbono, mostrou que foram produzidas grandes quantidades de ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, isocítrico e 2-cetoglutárico e inibiram a produção de lipase (MAKRI et al., 2010; FABISZEWSKA et al., 2015). Fabiszewska et al. (2014) demonstraram que é possível utilizar glicerol em meio para a produção de lipase na cultura de *Y. lipolytica*, porém é necessário a adição de um indutor tal como o azeite. O glicerol é considerado uma importante matéria-prima renovável e é um subproduto problemático da produção de biodiesel em escala comercial, sendo formado na reação de transesterificação do biodiesel, de fácil metabolização por muitos microrganismos (OLIVEIRA et al. 2013). Fabiszewska et al. (2015) observaram que o glicerol no meio de cultura pode não apresentar uma natureza repressiva em relação à produção de enzimas lipolíticas. Messias et al. (2009) ao estudarem a produção de lipase por *Botryosphaeria ribis* observaram, entre os carboidratos analisados, a maior produção de lipase com lactose.

Assim, a lactose e sorbitol, nesse estudo apresentaram um aumento de 17,34% e 15,65% respectivamente na produção de lipase. Podendo ser usados como adjunto ao meio para produção de lipase.

Planejamento de mistura simplex-lattice

O planejamento de misturas é eficaz para prever modelos e maximizar a produção de enzimas (DIAS et al., 2015). A influência das três melhores fontes de carbono no meio de cultura foi estudada em um planejamento de mistura *simplex-lattice* a fim de otimizar a produção de lipase por *Candida viswanathii*. A quantidade das fontes de carbono lactose, sorbitol e glicerol foram os componentes da mistura e o restante da composição do meio foi utilizada em quantidade constante. As maiores atividades enzimáticas foram observadas em meio contendo lactose e sorbitol (Tabela 9), bem como as maiores concentrações de proteínas totais (Tabela 10).

Tabela 9. Matriz do planejamento de mistura *simplex-lattice* e atividade enzimática por *Candida viswanathii*.

Ensaio	Lactose (%)	Sorbitol (%)	Glicerol (%)	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)
1	1	0	0	13,90
2	0	1	0	17,69
3	0	0	1	7,85
4	0,5	0,5	0	20,37
5	0,5	0	0,5	9,24
6	0	0,5	0,5	8,79
7	1	0	0	14,17
8	0	1	0	17,12
9	0	0	1	8,08
10	0,5	0,5	0	20,54
11	0,5	0	0,5	9,08
12	0	0,5	0,5	8,67
13	0,5	0,5	0	20,10
14	0	0,5	0,5	8,53
15	0,5	0	0,5	9,18

Tabela 10. Parâmetros característicos de produção de lipase e de biomassa por *Candida viswanathii* no planejamento de mistura (*simplex-lattice*).

Ensaio	Biomassa	Atividade Específica	P _X	P _L	q	P _S
1	22,35	3,73	0,62	7,72	0,017	69,50
2	21,05	5,76	0,58	9,83	0,023	88,45
3	26,55	2,90	0,74	4,34	0,008	39,23
4	28,55	6,00	0,79	11,32	0,020	101,85
5	17,90	2,94	0,50	5,13	0,014	46,19
6	22,00	3,59	0,61	4,88	0,011	43,94
7	20,30	3,50	0,56	7,87	0,019	70,83
8	27,90	5,80	0,78	9,51	0,017	85,60
9	25,45	3,04	0,71	4,48	0,009	40,38
10	22,65	6,62	0,63	11,41	0,025	102,70
11	21,35	2,83	0,59	5,04	0,012	45,39
12	26,30	3,17	0,73	4,82	0,009	43,35
13	22,40	6,30	0,62	11,17	0,025	100,50
14	32,20	4,00	0,89	4,73	0,007	42,63
15	16,80	3,15	0,47	5,10	0,015	45,91

Legenda: Biomassa (g/L); Atividade Específica (U/mg); P_X, produção de lipase sobre biomassa (g/h); P_L, produtividade de lipase (U/h); q, razão específica da produção de lipase (U/g de biomassa/h); P_S, produtividade lipase sobre o substrato (U/g).

A análise de variância (ANOVA) da matriz de planejamento de misturas mostrou que os modelos matemáticos gerados (linear ou quadrático) foram estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) e o que apresentou o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9989$) e menor média quadrática do erro ($MQ_E = 0,04114$) foi o modelo quadrático. Esses critérios podem ser utilizados para julgar a qualidade do modelo (CALADO e MONTGOMERY, 2003). Assim, como o coeficiente de determinação que quanto mais próximo de 1 mais o modelo se ajusta bem aos dados experimentais (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Dado que o modelo que melhor se ajusta ao planejamento foi determinado, foi utilizado o Diagrama de Pareto (Figura 11) para verificar se houve influência significativa das variáveis de estudo na atividade enzimática. O Diagrama de Pareto permite avaliar a sensibilidade dos parâmetros estudados sobre a resposta de interesse com o nível de significância estatística desejado. Assim, para esse estudo as três variáveis apresentaram influência significativa (ao nível de 95% de confiança) na produção de lipase.

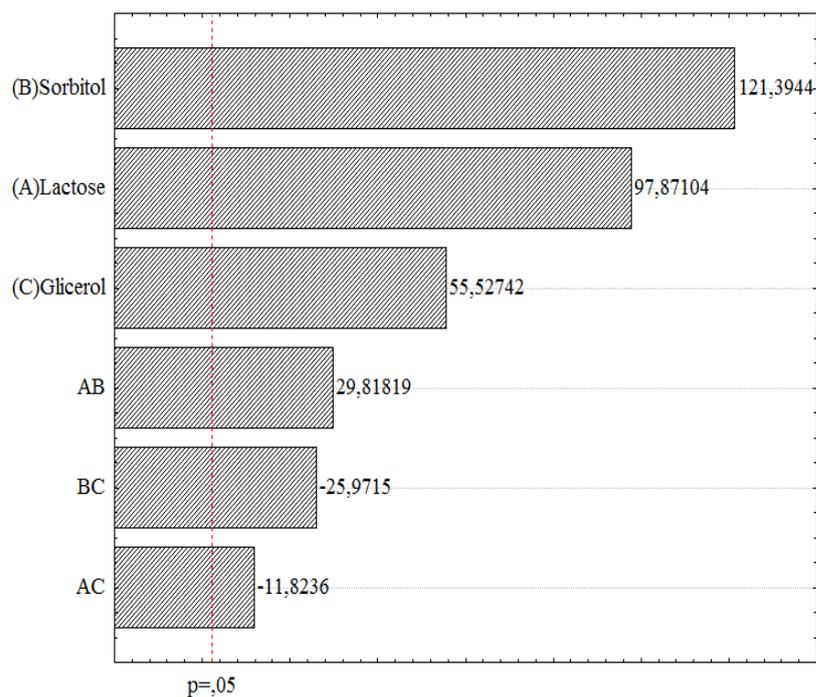


Figura 11. Diagrama de Pareto representando os efeitos de Lactose, Sorbitol e Glicerol na atividade enzimática.

O modelo polinomial que descreve a correlação entre as variáveis e resposta é dado por:

$$\text{At. enzimática} = 14,0325A + 17,4052B + 7,9614C + 18,4712AB - 7,3242AC - 16,0884BC$$

onde A, B e C são, respectivamente, lactose, sorbitol e glicerol. Os componentes AC e BC tiveram efeitos antagônicos na mistura, visto que os coeficientes são negativos.

A Metodologia de Superfície de Resposta é eficiente na redução de experimentos, tempo para investigar as condições ótimas para a resposta desejada e possibilidade de avaliar o efeito das variáveis (BUSSOMARA et al., 2012; COLLA et al., 2016). A análise do planejamento de mistura para produção de lipase foi realizada por superfície de resposta com a finalidade de apresentar graficamente as interações e influências entre as variáveis estudadas.

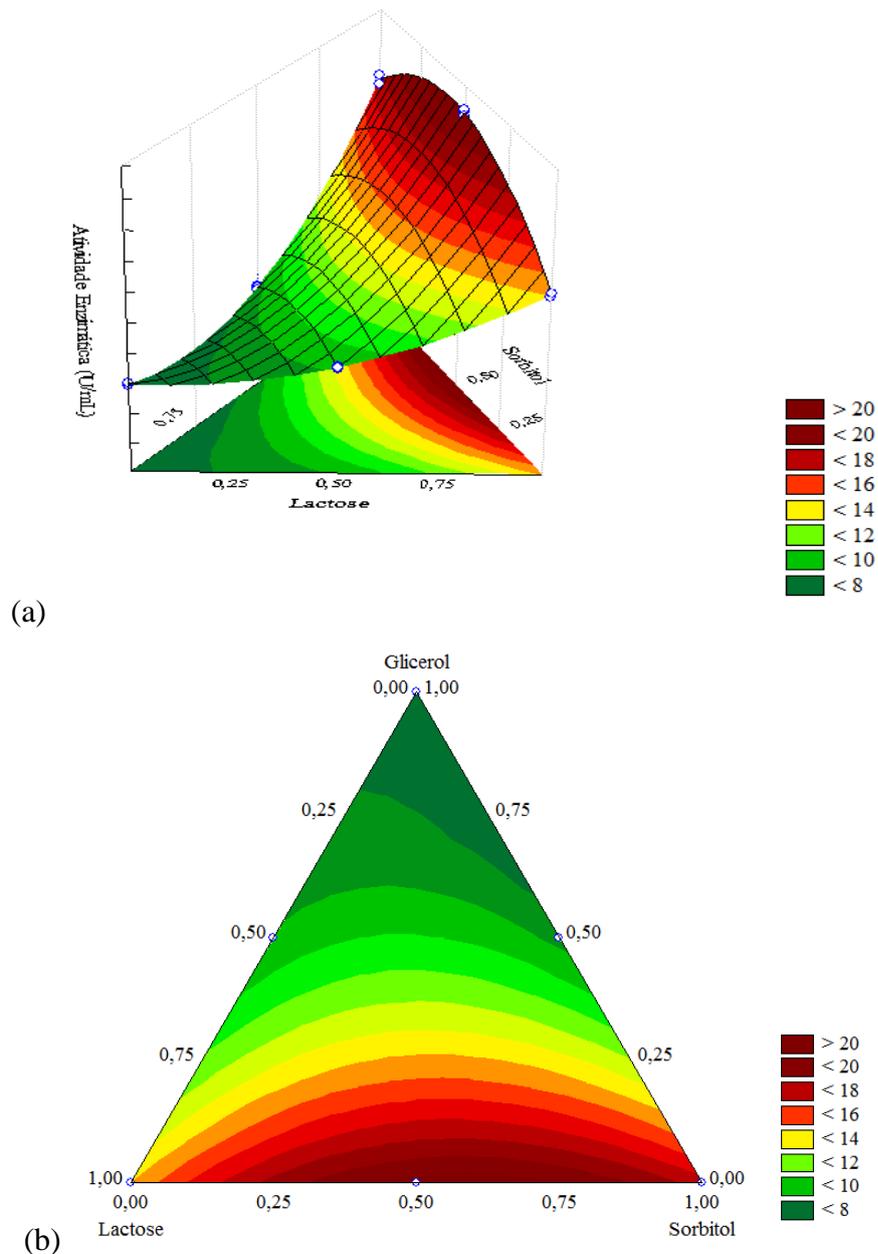


Figura 12. Superfície de resposta (a) e contorno (b) da atividade de lipase (U/mL) por *Candida viswanathii* utilizando lactose, sorbitol e glicerol.

A superfície de resposta fornece uma visão tridimensional que pode proporcionar uma imagem mais clara para atingir uma região ótima da superfície investigada. A curva de contorno fornece uma visão bidimensional onde todos os pontos, que têm a mesma resposta, são conectados para produzir linhas de contorno de respostas (DIAS et al., 2015).

O perfil da produção de lipase apresentou um padrão curvilíneo, sendo observados maiores valores com a mistura de lactose e sorbitol ao meio de cultura (Figura 12). O uso de

glicerol juntamente com lactose ou com sorbitol afetou negativamente na produção. Percebe-se que, neste estudo, a lactose e o sorbitol podem ser considerados adjuntos ao meio para produção de lipase por *Candida viswanathii*. Dalmau et al. (2000) observaram alto crescimento celular com meio suplementados com glicerol e sorbitol separadamente. Porém, sem atividade enzimática por *Candida rugosa*.

Boonchaidung e Papone (2013) estudaram o efeito de fontes de carbono e nitrogênio, de levedura isolada de solo, e obtiveram a terceira maior produção (aproximadamente 0,9 U/mL) com meio suplementado com lactose quando comparadas as outras fontes de carbono. A produção de lipase por *Candida rugosa* obteve a produção de 5,58 U/mL com extrato de levedura e peptona no meio com azeite, sendo que a atividade lipase mínima (2,81 U/mL) foi observada com triptona e lactose (FADILOGLU e ERKMEN, 2002).

O gráfico do perfil dos valores otimizados, da desejabilidade e dos valores das três fontes de carbonos testadas são mostrados na Figura 13.

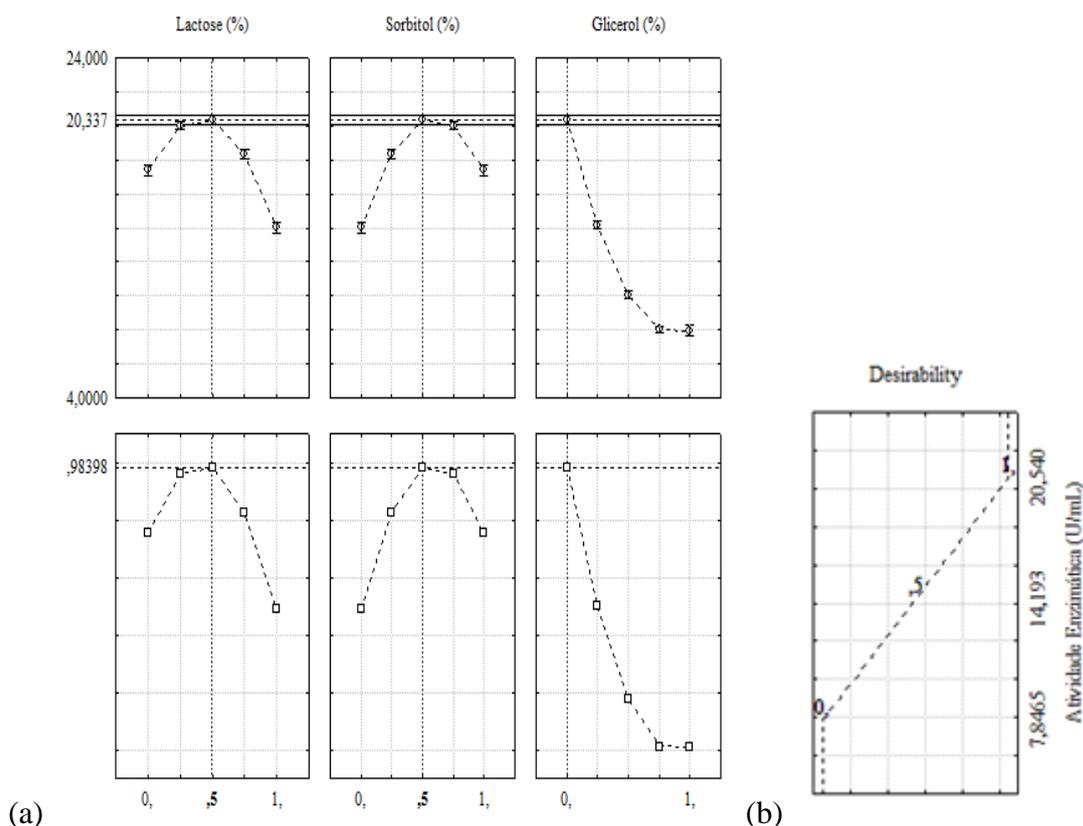


Figura 13. Perfil dos valores otimizados (a) e perfil de desejabilidade (b) para produção de lipase por *Candida viswanathii*.

Na Figura 13 (a) encontram-se os valores desejáveis para as fontes de carbono referente ao valor ótimo de atividade enzimática. A linha horizontal revela o valor ótimo da resposta avaliada e a linha vertical indica as concentrações de lactose, sorbitol e glicerol para que se tenha a melhor produção de lipase. Na Figura 13 (b) é mostrado o perfil da desejabilidade da atividade enzimática. Percebe-se que a produção de lipase seria maximizada utilizando 0,5% de lactose e 0,5% de sorbitol, obtendo 20,54 U/mL. Dessa forma, nas mesmas condições, o valor observado de produção de lipase, obtido por meio do modelo, foi de 20,34 U/mL. Esse valor é semelhante ao valor desejável (20,54 U/mL) apresentado na figura 13 (b).

A confirmação desses resultados foi realizada com uma fermentação com meio contendo 0,5% de lactose e 0,5% de sorbitol. A produção de lipase obtida foi de $20,41 \pm 0,48$ U/mL. Quando comparada a primeira fermentação (meio de Vogel, com 1% de azeite e 0,2% de extrato de levedura) com produção de 11,73 U/mL, percebe-se um aumento de 74% ao otimizar o meio de fermentação para a produção de lipase.

Salihu et al. (2011) conseguiram aumentar em cinco vezes a produção de lipase por *Candida cylindracea* ATCC 14830, utilizando 0,45% (p/v) de peptona, 0,63% (v/v) de Tween-80 e 2,2% (v/v) de inóculo. A produção de lipase máxima foi de 20,26 U/mL. Já Hasan-Beikdashti et al. (2012) analisaram a produção de uma lipase extracelular por *Stenotrophomonas maltophilia*, em meio contendo peptona, extrato de levedura, azeite e FeSO_4 e teve uma aumento de nove vezes após o estudo de otimização. Tamilarasan e Kumar (2011) conseguiram aumentar em três vezes a atividade lipolítica de *Bacillus sphaericus* MTCC 7542 em relação aos valores iniciais obtidos com o meio não otimizado.

Caracterização Parcial da Lipase Produzida

Efeito da temperatura e pH sobre a atividade enzimática

O efeito da temperatura e pH sobre a atividade enzimática é um parâmetro muito importante, pois alterações extremas no pH podem modificar a estrutura da enzima. E a temperatura quando se trata de processos que utilizam enzimas como biocatalizadores pode provocar a inativação térmica descartando sua aplicabilidade (MORAIS JUNIOR et al., 2016). Neste estudo, verificou-se a influência da temperatura e pH em um DCCR 2² com variações de pH (2,1 – 6,9) e temperatura (20 – 60°C) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2² para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa.

Ensaio	pH	T	pH	T	Atividade Relativa
1	-1	-1	2,8	26	10,5
2	1	-1	6,2	26	97,7
3	-1	1	2,8	54	0,2
4	1	1	6,2	54	83,0
5	-1,41	0	2,1	40	0,2
6	1,41	0	6,9	40	44,0
7	0	-1,41	4,5	20	95,8
8	0	1,41	4,5	60	13,7
9	0	0	4,5	40	100,0
10	0	0	4,5	40	99,0
11	0	0	4,5	40	99,5

Legenda: T, temperatura (°C); Atividade Relativa (%).

A lipase apresentou maior atividade em pH 4,5 e temperatura de 40°C. E as menores atividades em pH 2,1 e 2,8, apresentando valores menos de 1%. As duas variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo ao nível de 90% de confiança ($p < 0,10$) (Tabela 12). A significância estatística das análises foi confirmada pelo teste F (ANOVA). O valor do teste $F = 9,6$ para regressão foi maior que o $F_{\text{tab}}(4,6) = 3,18$ e a porcentagem de variação explicada pelo modelo ($R^2 = 86,54\%$) foi adequada. Portanto, o ajuste do modelo aos dados observados é satisfatório, logo pode ser usado para gerar a superfície de resposta.

Tabela 12. Coeficiente de regressão DCCR 2² para atividade ótima relativa da lipase por *Candida viswanathii*, função pH versus temperatura. $R^2 = 0,8525$.

Variáveis	Coefficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	99,50	12,20	8,16	0,0002
pH (L)	29,00	7,47	3,88	0,0082
pH (Q)	- 36,78	8,89	-4,09	0,0064
Temperatura (°C) (L)	-17,63	7,47	-2,36	0,0563
Temperatura (°C) (Q)	-20,01	8,89	-2,25	0,0654

As interações dos parâmetros estudados (Figura 14) indicam que a região ótima para máxima atividade relativa pode ser encontrada na faixa de combinações de pH 4,5 a 5,5 e temperatura entre 25 a 40°C. Essa metodologia fornece uma informação bem adequada pelo número de ensaios realizados. Obviamente uma condição de temperatura e pH foi fixada para a reação, contudo este resultado de faixa ótima das variáveis é muito interessante pois fornece informação sobre quanto robusto é o processo.

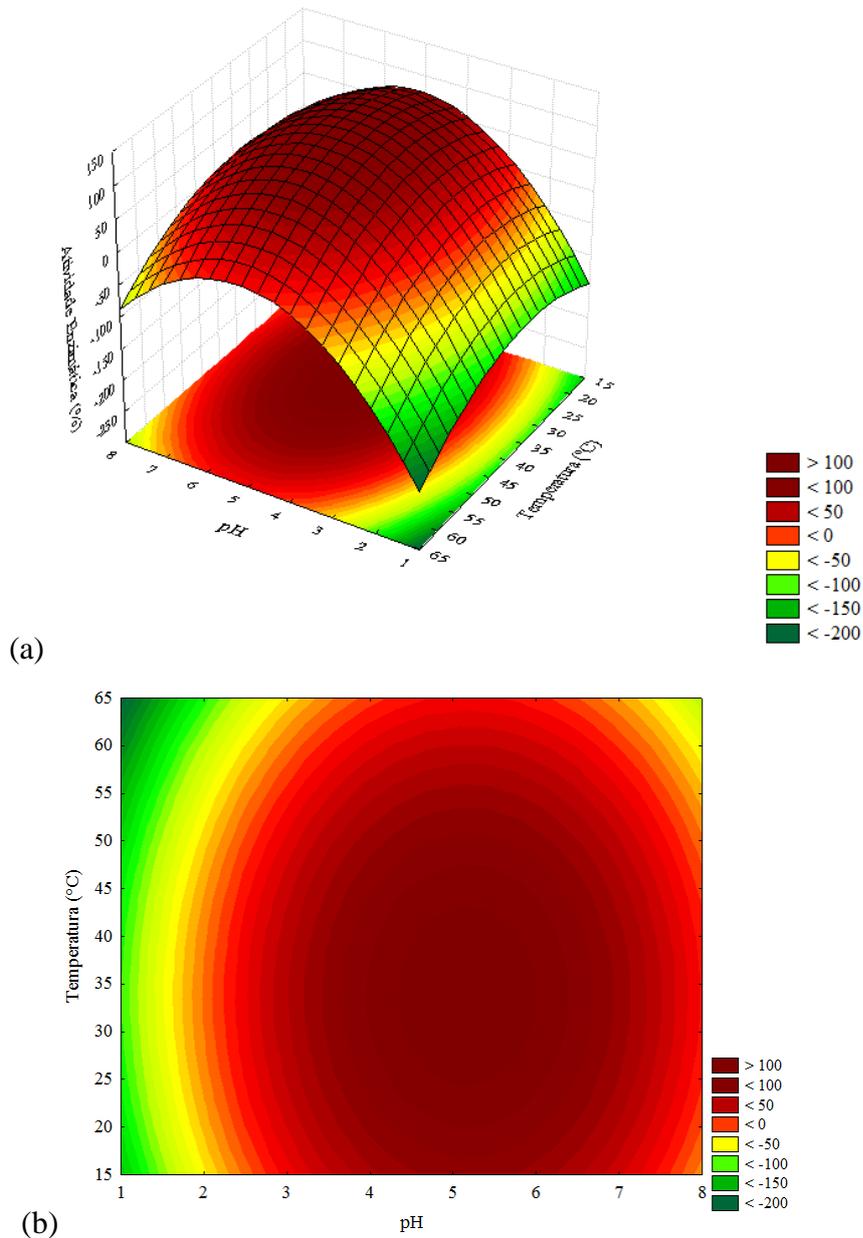


Figura 14. Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre atividade.

O valor predito para atividade em pH 5 e temperatura 40°C é de 152%, sendo o observado 145%, confirmando o pH e temperatura ótimos para atividade. Esse comportamento foi observado por Moraes Junior et al. (2016) que obtiveram atividade ótima em pH 7 e 5 e temperatura 40 °C para lipase de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum*, respectivamente. A lipase ácida pode abrir uma vasta gama de aplicações utilizando esta enzima como catalisadora (BUSSOMARA et al., 2010). Já Salihu et al. (2011) verificaram que lipase produzida por *Candida cylindracea* obteve atividade ótima em pH 8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo indicam que o meio mineral de Vogel foi melhor para a produção de lipase por *Candida viswanathii*, suplementado com fonte de óleo vegetal (azeite de oliva) e nitrogênio (extrato de levedura) com 36 horas de incubação.

Ao otimizar o meio de cultura por meio do design de misturas, observou que lactose e sorbitol podem ser considerados adjuntos para a produção de lipase. Com a metodologia de superfície de resposta, foi possível visualizar a máxima produção, que apresentou um aumento de 74% em relação ao primeiro ensaio, atingindo $20,41 \pm 0,48$ U/mL. A levedura *Candida viswanathii* é uma importante estirpe para a produção de lipase, quando utilizada em meio de Vogel suplementado com 1% de azeite de oliva, 0,2% de extrato de levedura, 0,5 % de lactose e 0,5% de sorbitol. A influência do pH e temperatura na atividade foi avaliada, mostrando o pH 5,0 e temperatura 40°C como ótimos para atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. F. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii* - Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2012.

ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Ann Microbiol**, vol. 2012.

BANSODE, S. R; RATHOD, V. K. An Investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2017.

BOONCHADUNG, T.; PAPONE, T. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by Isolated Lipase-Producing Soil Yeast. **Journal of Life Sciences and Technologies** Vol. 1, No. 3, 2013.

BUSSAMARA, R.; DALL'AGNOL, L.; SCHRANK, A.; FERNANDES, K.; VAINSTEIN, M. H. Optimal Conditions for Continuous Immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) Lipase by Adsorption in a Packed-Bed Reactor by Response Surface Methodology **Enzyme Research**. Vol 2012.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. 1º ed, editora E-papers.. Rio de Janeiro. 159 p. 2003.

COLIN, V. L.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **Journal of Basic Microbiology**, 50, 52–58, 2010.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; BENEDETTI, S.; LOSS, R. A.; LIMA, M.; REINEHR, C. O.; BERTOLINA, T. E.; COSTA, J. A.V. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 47, 461-467, 2016.

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

DIAS, F.F.G.; CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M.P.; SATO, H. H. Simplex centroid mixture design for improve lasparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2015.

EBRAHIMPOUR, A.; RAHMAN, R. N. Z.; CH'NG, D.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus sp.* strain ARM. **BMC Biotechnology**. 8:96, 2008.

FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. **Ann Microbiol** 65:1495–1503, 2015.

FABISZEWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; ZAMOJSKA, W. M.; LECKA FLORJANCZYK, E. B. Carbon Source Impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 Lipase Production. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Vol. 50, 2014.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. Anais da E.Z.A. Vol. XXXI, 1974.

FADIOGLU, S.; ERKMEN, O. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Turkish J. Eng. Env. Sci.** 26, 249 – 254, 2002.

GULATI, R. S.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; SHEBA, W. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry** 35, 459–464, 1999.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM. S., NANDHINIDEVI, G.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter sp.* AU07P. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

HASAN-BEIKDASHTI, M.; FOROOTANFAR, H.; SAFIARIAN, M.S.; AMERI, A.; GHAREMANI, M.H.; KHOSHAYAND, M.R.; FARAMARZI, M.A. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 43, 670–677, 2012.

KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; BUTT, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 878–882, 2006.

LIMA, B.F.; CORREIA, M. A. B.; SANTOS CORDEIRO,.; ANDRADE SILVA, N.R.; SÁ MUNIZ, M. C.; AMORIM, H. S.; LIMA, J. M. M.; ALVES DA SILVA, C.A. Seleção de meios de produção de lipase por *Aspergillus sp.* Resumos expandidos do I conicbio / II conabio / VI simcbio (v.2), Recife/PE, 2013.

LIU, C. H.; CHEN, C.Y.; WANG, Y. W.; CHANG, J. S. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia sp.* C20. **Biochemical Engineering Journal** 58– 59, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.

MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New Biotechnology**. Vol 27, 2010.

MAKRI, A.; FAKAS, S.; AGGELIS, G. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. **Bioresource Technology** 101, 2351–2358, 2010.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.**, 45, 426–431, 2009.

MORAIS JÚNIOR, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification** 123, 2016.

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**, Campina Grande, v.15, n.1, p.19-26, 2013.

- PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**. 2013.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by plackett-burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese journal of biotechnology**. vol 24, Issue 3, 2008.
- RAMANI, K.; JOHN KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry** 45, 1683–1691, 2010.
- RIFAAT, H. M. et al. Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, v. 5, n. 1, p. 39–53, 2010.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3ª Ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIMA, M. I.; SALLEHA, 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** 69, 2011.
- 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**, 1490-1498, 2012.
- SOARES JR, J.; MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, p. 2774-2778, 2008.
- TAMILARASAN, K.; KUMAR M. D. Optimization of medium components and operating conditions for the production of solvent-tolerant lipase by *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. **African Journal of Biotechnology**. vol. 10, 2011.
- 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** 39,459/465, 2003.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol.** 3:182–196, 2010.

ÜLKER, S. et al. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turk Journal of Biology**, v. 35, p. 543–550, 2011.

VACLAVICK, V. A. **Fundamentos de ciencia de los alimentos**. Editora Acribia S.A. Zaragoza. España. 1998.

VAN DEN BERG, J.D.J.; VERMIST, N. D.; CARLYLE, L.; HOLC~APEK, M.; BOON, J. J. Effects of traditional processing methods of linseed oil on the composition of its triacylglycerols. **J. Sep. Sci.** 27, 181–199, 2004.

VIDEIRA, V. A. Lipases produzidas por fungos derivados de ambiente marinho: otimização, purificação e caracterização bioquímica. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro - Rio Claro, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.

CAPÍTULO 3

Extração líquido-líquido de lipase produzida por *Candida viswanathii* utilizando PEG-4000 e fosfato de potássio

Resumo

Lipases (triacilglicerol acilhidrolase, E.C 3.1-1.3) são importantes em processos industriais e utilizadas em várias reações bioquímicas. Durante a fermentação para a produção de lipase, podem ser formados co-produtos que prejudicam o uso em processos industriais, necessitando de processos de purificação. Com isso, a partição da lipase de *Candida viswanathii* foi estudada em sistema aquoso bifásico (SAB) formado por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio, considerado um processo de baixo custo e fácil escalonamento. Foram testados PEG de diferentes pesos moleculares (1500, 4000, 6000). Dentre esses, o PEG 4000 foi o selecionado para testar a influência de temperatura (10 a 40°C) e pH (4,0 a 7,0). O maior coeficiente de partição (1,34) foi encontrado no ensaio a 40 °C e pH 7,0, bem como o maior balanço de atividade (50,73%). Na caracterização, a lipase não sofreu influência à faixa de temperatura de 19,95 – 60,00°C, obteve melhor atividade em pH 8,1 e elevada estabilidade em metanol e etanol, consideradas propriedades importantes para processos biotecnológicos.

Palavras-chave: *Candida viswanathii*; lipase; sistema aquoso bifásico; polietilenoglicol.

Abstract

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolase, E.C 3.1-1.3) are important in industrial processes and used in various biochemical reactions. During fermentation for the production of lipase, by-products can be formed which impair the use in industrial processes, needing purification processes. Thus, the lipase partition of *Candida viswanathii* was studied in a aqueous two-phase systems (ATPS) composed of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate, considered a process of low cost and easy programming. PEG of different molecular weights (1500, 4000, 6000) were tested. Among these, PEG 4000 was selected to test the influence of temperature (10 to 40 ° C) and pH (4,0 to 7,0). The top partition coefficient (1,34) was found in the test at 40 ° C and pH 7,0, as well as the top activity balance (50,73%). In the characterization, lipase didn't influence the temperature range of 19,95 – 60,00 ° C, got better activity at pH 8,1 and high stability in methanol and ethanol, are considered important properties for biotechnological processes.

Keywords: *Candida viswanathii*; lipase; aqueous two-phase systems; polyethylene glycol

INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol acil hidrolase, E.C 3.1-1.3) são produzidas por diferentes organismos, podendo ser intracelulares ou extracelulares. Estas enzimas são utilizadas em várias reações bioquímicas, como a hidrólise de triacilgliceróis, a esterificação entre ácidos graxos e álcool, transesterificação entre outras reações enzimáticas (BAYRAMOGLU e ARICA, 2008; ALI et al., 2016).

A produção de lipase em processos industriais envolve, principalmente, células microbianas em condições submersas. Durante o processo fermentativo são formados vários co-produtos oriundos do metabolismo microbiano que podem prejudicar o uso do caldo fermentado em processos industriais (BARBOSA et al., 2011). A recuperação e purificação de enzimas é uma etapa complexa do processo que deve ser extensivamente estudada com o objetivo de obter a máxima recuperação do produto com o menor custo operacional. Neste contexto, os métodos de baixa resolução têm ocupado grande espaço em vários processos de purificação de enzimas por apresentarem baixo custo e aumentado sua eficiência com o emprego de novos sistemas (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) são utilizados na recuperação e purificação de muitos produtos biológicos, incluindo proteínas, material genético, bionanopartículas, células e organelas (ANSEJO e ANDREWS, 2011). O SAB apresenta vantagens como o potencial de expansão, operação contínua, facilidade de integração do processo, baixa toxicidade de produtos químicos formadores de fase e biocompatibilidade (ANSEJO e ANDREWS, 2011). A partição da enzima nesse sistema depende do pH, da concentração e tipo de sal, da concentração e do peso molecular do polímero (BASSANI et al., 2007). A purificação de *Y. lipolytica* foi testada por Carvalho et al. (2016) e apresentou o sistema PEG 1500/fosfato de potássio, pH 6 a 4°C como o mais adequado. Barbosa et al. (2011) estudaram a purificação de lipase produzida por *Bacillus* e os resultados mostraram que a combinação mais adequada para a purificação da lipase foi com PEG 8000 g/mol e fosfato de potássio (20/18%) com adição de 6% de NaCl, a pH 6,0 e 4°C. Khayati e Alizadeh (2013) purificaram a lipase produzida por *Rhodotorula glutinis* e verificaram que o sistema PEG 4000 (17,5%)/oxalato de potássio (12,5%) foi o mais satisfatório. O objetivo deste trabalho foi investigar o uso de sistema aquoso bifásico formado por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio para a partição da lipase de *Candida viswanathii* produzida em condições submersas. A enzima

purificada foi bioquimicamente caracterizada quanto ao efeito de pH, temperatura e solventes sobre a atividade enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Separação por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

Os sistemas aquosos bifásicos foram formados a partir de soluções estoques de PEG (50% p/p) e tampão fosfato de potássio (30% p/p; pH 7) preparado com uma mistura de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) na proporção de 1:1,82, para que fosse atingido o pH 7 (ZUNIGA, 2000). Os SAB foram formados em sistema 18% de PEG e 18% de fosfato, variando o peso molecular do PEG (1500, 4000 e 6000). As soluções estoque foram mantidas em geladeira a 4°C. As concentrações desejadas foram obtidas em tubos graduados de 15 mL, pesando as massas dos componentes provenientes das soluções-estoque. O extrato bruto enzimático foi adicionado por último sendo este 4% do volume total do sistema (10 g). Os frascos foram vedados com parafilme e agitados em Vortex (Modelo QL-901) por 5 minutos e deixados em repouso por 12 horas a 25°C para completa separação das fases. O volume das fases Superior e Inferior foram anotados e as alíquotas (2 mL) de cada fase foram coletadas com o auxílio de seringas esterilizadas descartáveis de 5 mL. Um esquema ilustrando o sistema aquoso bifásico para a separação de lipase de *C. viswanathii* é apresentado na Figura 15.

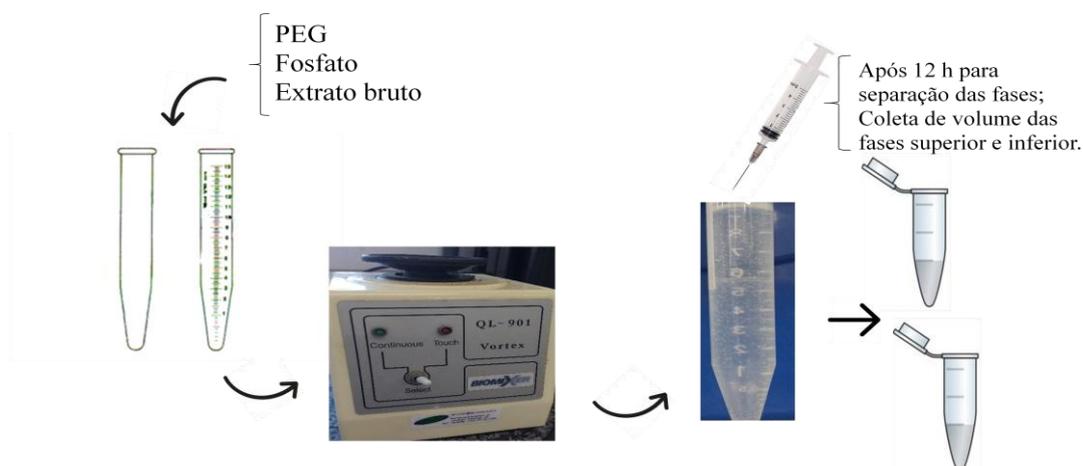


Figura 15. Esquema do procedimento experimental da partição a partir de extrato bruto de *C. viswanathii* em sistema aquoso bifásico PEG/Fosfato.

Métodos Analíticos

Determinação de proteína

A análise de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford modificado (SEDMAK e GROSSBERG, 1977), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

Determinação da Atividade Enzimática

As alíquotas das fases de separação e o extrato bruto foram submetidos à análise da atividade de lipase, utilizando-se palmitato de p-nitrofenila (p-NPP) como substrato. O p-NPP foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) e então diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 4,0 contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do p-nitrofenol. Após pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL da amostra. A reação foi interrompida em diferentes intervalos com choque térmico (90 °C, 1 min), seguido da adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm [coeficiente de extinção molar p-nitrofenol (pNP): $1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Controles foram preparados sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por min por mL.

Foram avaliadas as respostas para os ensaios realizados:

U_{sup}: U. mL⁻¹ na fase superior x volume da fase superior (mL);

$$U_{sup} = U_{sup} \times V_{sup} \quad (\text{equação 1})$$

U_{inf}: U. mL⁻¹ da fase inferior x volume da fase inferior (mL);

$$U_{inf} = U_{inf} \times V_{inf} \quad (\text{equação 2})$$

Recuperação da enzima na fase superior (% RecSup):

$$\% \text{RecSup} = \left(\frac{U_{sup}}{U_i} \right) * 100 \quad (\text{equação 3})$$

Onde, U_i: Unidade de lipase do extrato bruto enzimático.

Recuperação da enzima na fase Inferior (% RecInf):

$$\%RecInf = \left(\frac{U_{inf}}{U_i} \right) * 100 \quad (\text{equação 4})$$

Balanco de atividades (% ABlip):

$$\%ABlip = \left(\frac{U_{Sup} + U_{inf}}{U_i} \right) * 100 \quad (\text{equação 5})$$

Coefficiente de partição (K): (relação Concentração de proteína inferior/ Concentração de proteína superior);

$$K = C_{sup}/C_{inf} (\text{equação 6})$$

Atividade Específica (Ae): Atividade enzimática de cada ensaio/ Proteínas de cada ensaio;

$$Ae = \left(\frac{U.mL^{-1}delipase}{mg.mL^{-1}deprotínatotal} \right) * 100 \quad (\text{equação 7})$$

Fator de purificação (FP) foi determinado pela equação: Atividade específica do ensaio / Atividade específica do extrato bruto

$$FP = \frac{Ae_{doensaio}}{Ae_{doextratobruato}} (\text{equação 8})$$

Planejamento fatorial para o processo de partição da lipase em sistema PEG4000/Fosfato

Posteriormente a definição de PEG de melhor peso molecular para a separação da enzima no SAB foi realizado um ensaio por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR), ou seja, um 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Foram utilizadas as variáveis temperatura e pH. Os valores reais e codificados podem ser observados na Tabela 13. O programa STATISTICA Trial[®] foi utilizado a fim de analisar estatisticamente as respostas do experimento.

Tabela 13. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2^2 para separação da lipase de *Candida viswanathii*.

	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura °C	10,0	14,4	25,0	35,6	40,0
pH	4,0	4,4	5,5	6,6	7,0

Caracterização bioquímica da lipase purificada

Efeito do pH e temperatura sobre a atividade

Para determinação do efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima parcialmente purificada foi realizado um planejamento DCCR 2² (Tabela 14). Os ensaios foram realizados em tampão McIlvaine com pH de 1,9 a 8,1. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para a diluição das amostras. A atividade foi determinada nas temperaturas de 20 a 60°C, conforme descrito anteriormente.

Tabela 14. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2² para determinação de pH e temperatura ótimos da lipase parcialmente purificada.

	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	1,9	2,8	5	7,2	8,1
Temperatura °C	20	26	40	54	60

Estabilidade em solventes orgânicos

A estabilidade da enzima purificada foi realizada utilizando solventes orgânicos após a incubação a 28 °C, por 1 h, sob agitação orbital de 150 rpm em frascos hermeticamente fechados contendo 0,2 mL de solvente, 0,5 mL da enzima purificada e 0,3mL de tampão McIlvaine (pH 8,1). Os solventes avaliados foram glicerol, DMSO, álcool metílico, etanol, acetona, 1-propanol, hexano. A dosagem da atividade da lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 8,1 a 40 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Separação por Sistemas Aquosos Bifásicos

O sistema composto por PEG e sal, entre todos os tipos de SAB, tem sido frequentemente utilizado para purificação de lipases microbianas (KHAYATI e ALIZADEH, 2013; DUARTE et al., 2015; MAZZEU et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). A fase superior é composta pelo polímero e a fase inferior é predominantemente composta por sal (CARVALHO et al., 2016). A purificação da lipase produzida por *C. viswanathii* foi realizada em sistema aquoso bifásico PEG/Fosfato baseado nos diagramas de fase descritos por Ansejo

e Andrews (2011). O extrato bruto enzimático utilizado para a purificação apresentou atividade de 20,0 U/mL. Em cada ensaio foi utilizado 0,4g desse extrato contendo 8,14 U/mL. A partição da lipase foi avaliada nas fases superiores e inferiores (Tabela 15). O maior coeficiente de partição (1,70) foi encontrado no sistema PEG 4000/Fosfato, bem como o maior balanço de atividades (30,58%), lipase recuperada superior (13,41) e inferior (17,17%). Os sistemas com PEG 1500 e 6000 apresentaram balanço de atividades 14,78% e 14,98% respectivamente.

Tabela 15. Atividade enzimática na fase superior e inferior no sistema de separação aquoso bifásico PEG/Fosfato com diferentes pesos moleculares.

Ensaio	U Superior (U/mL)	U Inferior (U/mL)	Lipase Recuperada Superior (%)	Lipase Recuperada Inferior (%)	Balanço de Atividades BA (%)	Coefficiente de Partição K
PEG 1500	0,66	0,54	8,11	6,68	14,78	0,74
PEG 4000	1,09	1,40	13,41	17,17	30,58	1,70
PEG 6000	1,00	0,28	12,25	3,48	14,98	0,80

A afinidade de enzimas a PEG de baixo peso molecular, como é o caso do PEG 4000, está relacionada a interação polímero-proteína devido ao caráter hidrofóbico, pois quando a proteína possui uma grande área de superfície hidrofóbica exposta ao solvente, tem maior possibilidade de interagir com PEG (BASSANI et al., 2007). Khayati e Alizadeh (2013) estudaram a partição de lipase de *Rhodotorula glutinis* e o sistema PEG4000/oxalato de potássio foi o mais adequado, havendo uma redução no valor de K quando aumentaram o peso molecular de PEG para 8000. Duarte et al. (2015) avaliaram a partição da lipase de *Leucosporidium scottii* com sistemas PEG (1500, 4000 e 8000)/ Fosfato e a atividade de lipase nas fases inferiores não foi quantificada. Dessa forma o coeficiente de partição foi igual a zero.

Mazzeu et al. (2015) estudaram o efeito da massa molecular do PEG (1500, 4000 e 6000) sobre a partição da lipase de *Geotrichum candidum* em sistema PEG/Citrato de sódio e os resultados mostraram que a partição da lipase foi dependente da variação da massa molar de PEG e da composição das misturas das fases. Nos sistemas estudados, o comportamento da lipase mostrou-se mais influenciado pelo PEG 4000/Fosfato. Assim, com base nesses resultados, selecionou-se o sistema PEG4000/Fosfato para estudos de variações de temperatura e pH.

Delineamento experimental para o processo de partição da lipase em sistema PEG4000/Fosfato

A influência da temperatura e pH foi avaliada utilizando um DCCR 2². Os valores obtidos no delineamento experimental para U Superior, U Inferior, Lipase Recuperada Superior, Lipase Recuperada Inferior, Atividade específica Superior, Atividade específica Inferior, Fator Purificação Superior, Fator Purificação Inferior, Balanço de Atividades, Coeficiente de Partição são apresentados na Tabela 16. O ensaio 8 (40°C e pH 7) apresentou maior coeficiente de partição (1,34), maior fator purificação superior (3,19) e maior balanço de atividade (40,63%). O coeficiente de partição maior que um, indica que houve maior concentração de proteínas na fase superior (KHAYATI e ALIZADEH, 2013). Os ensaios 9, 10 e 11 em pH 5,5 e ensaio 3 em pH 6,6 também apresentaram maior concentração de proteínas na fase superior, pois o coeficiente de partição foram 1,06, 1,07, 1,08 e 1,01, respectivamente. O ensaio 7 em pH 4 obteve o menor balanço de atividade (15,70%). A purificação de lipase produzida por *Burkholderia cepacia* ocorreu em pH 6,0 e 8,0, utilizando PEG 1500 e 6000 e fosfato (PADILHA et al., 2012). A solubilidade das biomoléculas na fase rica em sal diminui com um aumento na concentração de sal, o que resulta em aumento da partição de biomoléculas para a fase rica em PEG (DUARTE et al., 2015).

Tabela 16. Matriz do planejamento DCCR 2² utilizada para avaliar o efeito das variáveis temperatura e pH na partição da lipase de *Candida viswanathii* em SAB.

Ensaio	T °C	pH	U Superior	U Inferior	Lipase Recuperada Superior	Lipase Recuperada Inferior	Atividade específica Superior	Atividade específica Inferior	Fator Purificação Superior	Fator Purificação Inferior	Balanco de Atividades	Coefficiente de Partição (K)
1	-1	-1	0,53	3,78	3,23	23,23	1,51	6,88	0,59	2,71	26,47	0,97
2	1	-1	0,47	3,70	2,90	22,74	1,82	8,00	0,72	3,15	25,64	0,84
3	-1	1	1,85	1,84	11,38	11,33	7,39	4,92	2,91	1,94	22,71	1,01
4	1	1	1,38	2,75	8,46	16,92	7,21	4,92	2,84	1,94	25,38	0,95
5	-1,41	0	1,26	2,57	7,71	15,81	6,51	7,85	2,56	3,09	23,52	0,72
6	1,41	0	1,49	1,96	9,16	12,06	5,25	4,26	2,07	1,68	21,21	1,05
7	0	-1,41	0,23	2,33	1,41	14,29	1,00	6,97	0,39	2,74	15,70	0,83
8	0	1,41	2,88	3,74	17,66	22,97	8,10	8,03	3,19	3,16	40,63	1,34
9	0	0	1,33	1,79	8,16	10,98	4,45	4,39	1,75	1,73	19,13	1,06
10	0	0	1,26	1,81	7,73	11,10	4,50	4,47	1,77	1,76	18,83	1,07
11	0	0	1,27	1,78	7,83	10,90	4,41	4,36	1,74	1,72	18,73	1,08

Legenda: T, temperatura (°C); Lipase recuperada superior e inferior (%); Atividade específica superior e inferior (U.mg⁻¹); Balanco de atividades (%).

Tabela 17. Coeficiente de regressão DCCR 2² para separação de lipase de *C. viswanathii* por SAB. Variável Resposta – Lipase recuperada na fase superior (%), R² = 0,8491.

Variáveis	Coefficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	7,78	0,55	14,16	0,0000
pH (L)	4,59	0,64	7,12	0,0001

De acordo com o delineamento experimental, o pH apresentou efeito significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) quando a resposta avaliada foi Lipase Recuperada na fase superior (%). A significância estatística da análise (Tabela 17) foi confirmada pelo teste F (ANOVA). Como o valor do teste $F_{1,9}$ (50,6) para regressão foi maior que o F_{tab} (5,12) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 84,91\%$) podendo dizer que o modelo se ajusta aos dados experimentais. Nestas condições, o experimento apresentou um modelo linear, não sendo possível gerar superfície de resposta, porque não houve influência da temperatura (Figura 16).

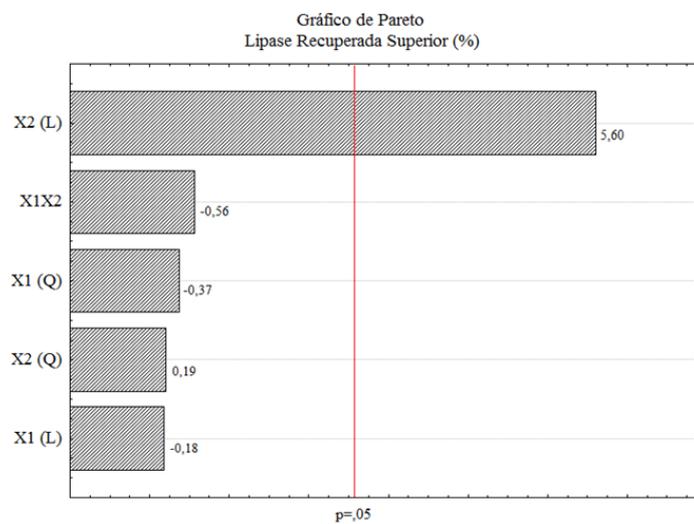


Figura 16. Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Lipase recuperada na fase superior. X1: temperatura ($^{\circ}\text{C}$); X2: pH

A resposta lipase recuperada na fase superior não sofreu influência da temperatura na faixa estudada de 10 a 40°C . Observa-se que o comportamento em relação a pH (Figura 17) é linear, ao aumentar o pH, maior foi a porcentagem de recuperação na fase superior.

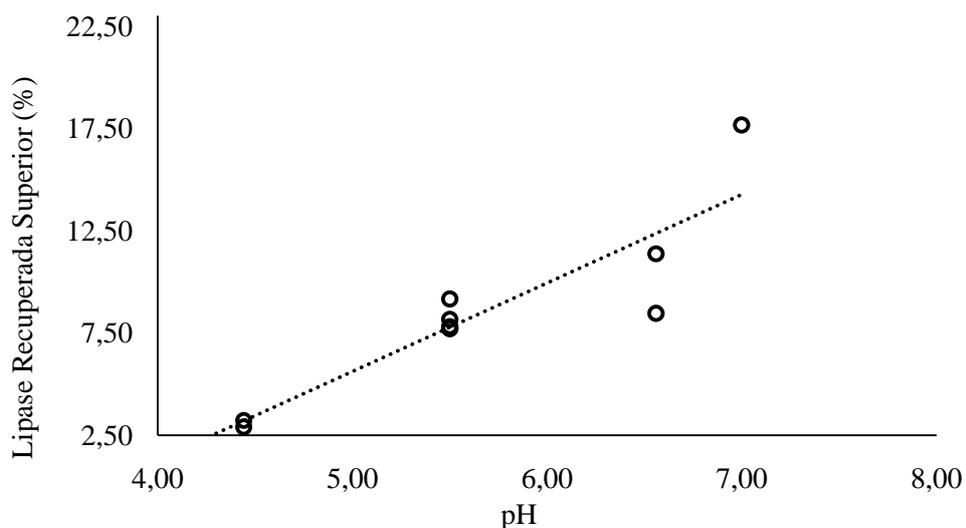


Figura 17. Comportamento linear de lipase recuperada superior (%) em relação ao pH.

Para a atividade específica superior, a temperatura e o pH apresentaram efeito significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). O Diagrama de Pareto apresenta a influência das variáveis analisadas (Figura 18). O efeito significativo foi confirmado pelo teste F (ANOVA) (Tabela 18). Como o valor do teste $F_{2,8}$ (105,6) para regressão foi maior que o F_{tab} (4,46) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 96,35\%$) pode-se dizer que o modelo se ajusta aos dados experimentais sendo possível gerar superfície de resposta (Figura 19).

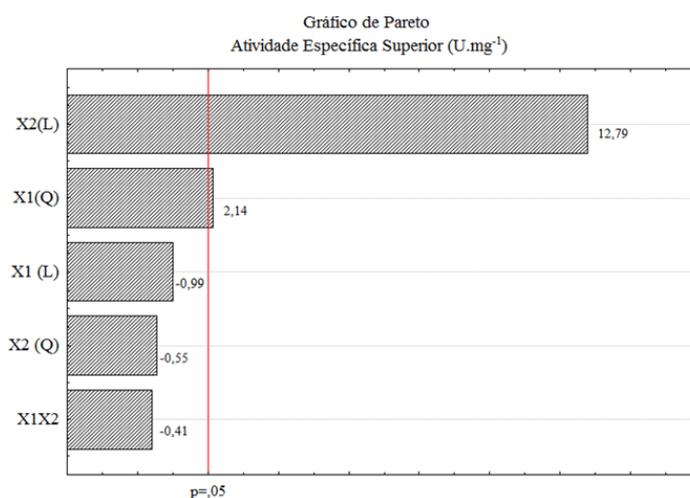


Figura 18. Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Atividade específica superior ($U.mg^{-1}$). X1: temperatura ($^{\circ}C$); X2: pH.

Tabela 18. Coeficiente de regressão DCCR 2² para separação de lipase de *C. viswanathii* por SAB. Variável Resposta – Atividade específica de lipase na fase superior, R² = 0,9635.

Variáveis	Coefficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	4,33	0,22	19,52	0,0000
Temperatura (Q)	0,57	0,21	2,69	0,0277
pH (L)	2,66	0,19	14,28	0,0000

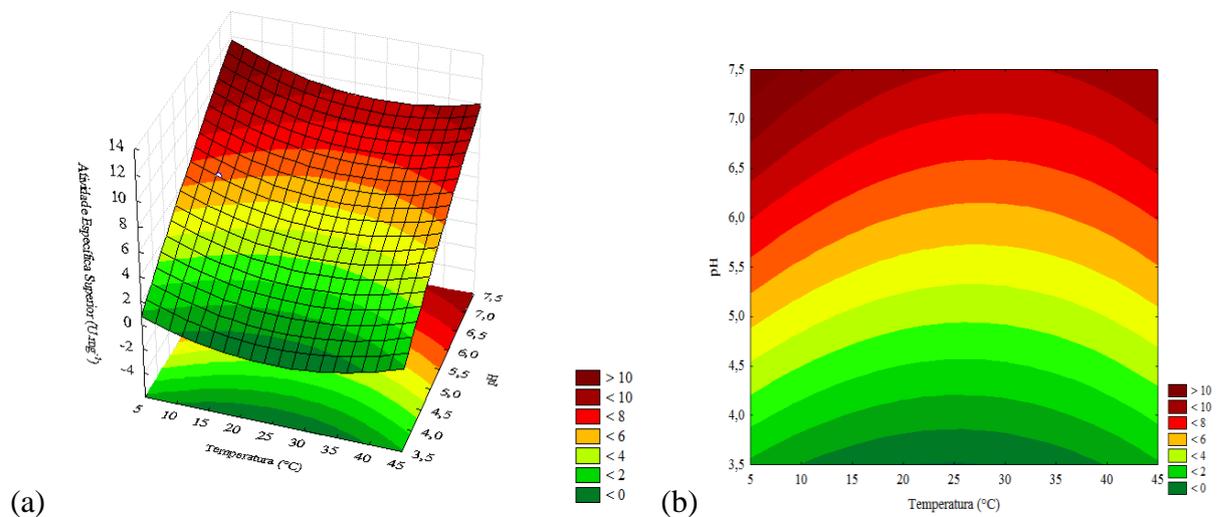


Figura 19. Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre a atividade específica superior da lipase produzida por *Candida viswanathii* por SAB.

Baseado nos resultados estatísticos, quando a variável resposta foi o fator purificação, também houve efeito significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) para a temperatura e pH (Figura 20). Confirmados pelo teste F (ANOVA), com o valor do teste $F_{2,8}$ (106,9) para regressão maior que o F_{tab} (5,12) e a porcentagem de variação explicada pelo modelo ($R^2 = 96,39\%$) adequado, pode-se dizer que o modelo se ajusta aos dados experimentais (Tabela 19). Uma superfície de resposta para este experimento foi gerada para melhor visualizar os resultados (Figura 21).

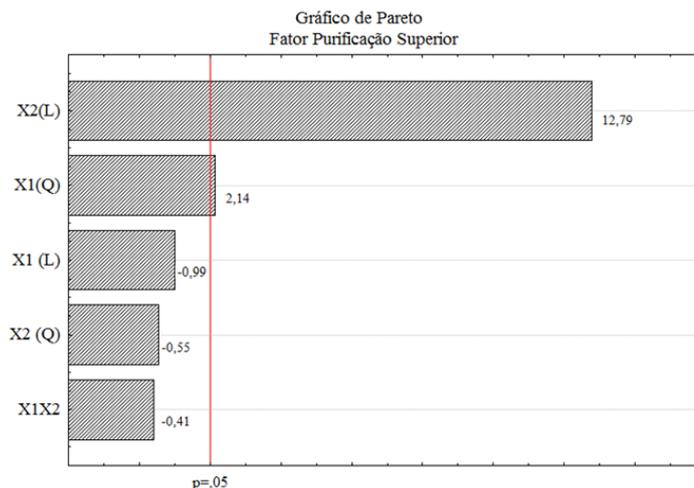


Figura 20. Diagrama de Pareto representando os efeitos da temperatura e pH na resposta Fator purificação superior. X1: temperatura (°C); X2: pH.

Tabela 19. Coeficiente de regressão DCCR 2^2 para separação de lipase de *C. viswanathii* por SAB. Variável Resposta – Fator purificação superior, $R^2 = 0,9639$.

Variáveis	Coefficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	1,70	0,09	19,61	0,0000
Temperatura (Q)	0,22	0,08	2,70	0,0269
pH (L)	1,05	0,07	14,37	0,0000

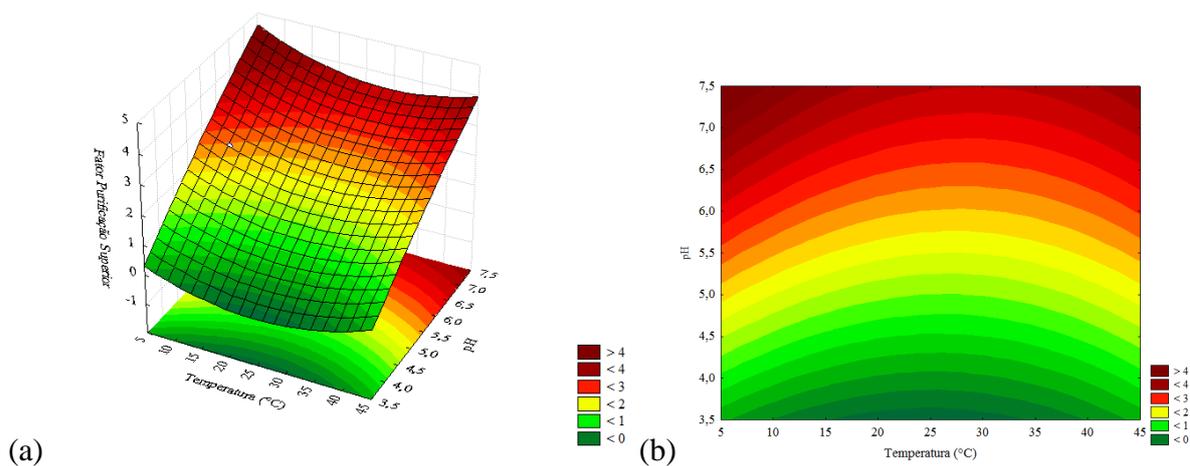


Figura 21. Superfície de resposta (a) e contorno (b) do efeito do pH e temperatura sobre o fator purificação superior da lipase produzida por *C. viswanathii* por SAB.

As superfícies de resposta e contorno da atividade específica superior e fator purificação superior demonstraram um padrão curvilíneo, apresentando um decréscimo na

faixa temperatura acima de 30 °C (Figuras 19 e 21). Os maiores resultados de atividade específica superior (8,1 U.mg⁻¹) e FP superior (3,19) foram observados em pH 7. Em pH 4 apresentou menor atividade específica superior (1 U.mg⁻¹) e menor balanço de atividade (15,70%). A redução desses resultados pode ser relacionada à baixa estabilidade da lipase em valores de pH baixos (DUARTE et al., 2015). Algumas condições como composição da fase, interações eletrostáticas e hidrofóbicas podem influenciar o efeito da temperatura na partição de enzimas, além disso, as enzimas podem alterar a sua estrutura conformacional e assim, desnaturar (BARBOSA et al., 2011).

As proteínas com carga negativa geralmente preferem a fase superior em SAB, enquanto as com carga positiva normalmente preferem a fase inferior (BARBOSA et al., 2011; JIANG et al., 2015). Durante o SAB, o pH pode modificar a carga global líquida de proteínas. Os números de grupos químicos carregados na superfície da molécula de proteína está relacionado com o pH, resultando em modificações na estrutura da proteína e sua interação com polímeros (DUARTE et al., 2015), pois quanto maior o pH, menor a concentração de íons H⁺ prevalecendo a carga negativa. Em contrapartida, quanto menor o pH, maior concentração de íons H⁺ e a carga é positiva. Barbosa et al. (2011) avaliaram a partição da lipase de *Bacillus sp.* mostrando que a enzima apresentou caráter ácido com ponto isoelétrico próximo de 3. Enquanto o pH do sistema aumentava, a carga da superfície da lipase se tornava negativa, fazendo com que a partição da enzima na fase rica em sal diminuísse. Carvalho et al. (2016), não encontraram resultado significativo em pH 7 para partição de lipase de *Yarrowia lipolytica* em sistema PEG 1500/Fosfato.

Caracterização bioquímica da lipase purificada

Efeito do pH e temperatura na atividade da lipase

Para selecionar as melhores condições de reação enzimática, é necessário avaliar a influência de pH e temperatura. A influência de pH e temperatura foi avaliada utilizando planejamento DCCR 2² com variações de pH (1,9 – 8,1) e temperatura (20 – 60°C) (Tabela 20). A enzima apresentou 100% de atividade relativa em pH 8,1 e temperatura de 40°C. E as menores atividades em pH 1,9 (1%) e pH 2,8 (10%). Em pH 5 e 7,2 a atividade relativa variou de 57 a 76%. Lipases que são tolerantes alcalinas são desejáveis em formulações de detergentes, pois os detergentes à base de enzimas possuem uma capacidade de limpeza superior aos detergentes à base de substâncias químicas (SALIHU e ALAM, 2014).

Tabela 20. Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no DCCR 2^2 para determinação de pH e temperatura ótimos da atividade relativa da enzima purificada.

Ensaio	pH	T (°C)	pH	T (°C)	Atividade Relativa (%)
1	-1	-1	2,8	26	10
2	1	-1	7,2	26	59
3	-1	1	2,8	54	21
4	1	1	7,2	54	63
5	-1,41	0	1,9	40	1
6	1,41	0	8,1	40	100
7	0	-1,41	5	20	68
8	0	1,41	5	60	57
9	0	0	5	40	74
10	0	0	5	40	76
11	0	0	5	40	76

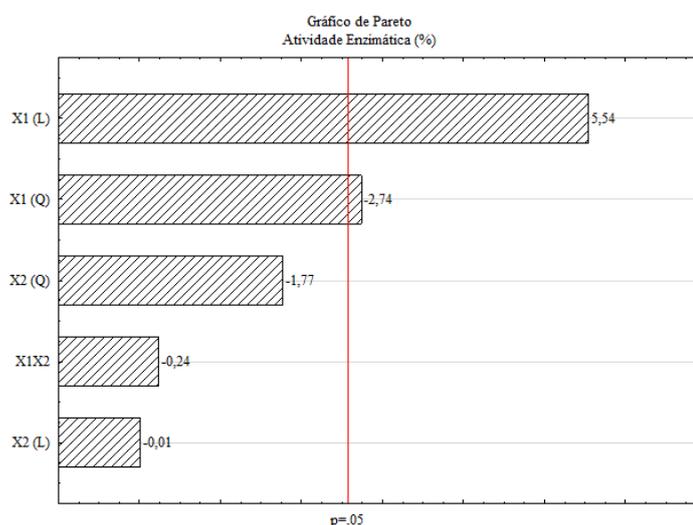


Figura 22. Diagrama de Pareto representando os efeitos das variáveis pH e temperatura sobre a atividade relativa (%). X1: pH; X2: temperatura (°C).

O pH apresentou efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,005$) (Figura 22). A significância estatística das análises foi confirmada pelo teste F (ANOVA). O valor do teste $F = 7,9$ para regressão foi maior que o $F_{\text{tab}(5,5)} = 5,05$ e a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi adequada ($R^2 = 88,71\%$). Portanto, o ajuste do modelo aos dados observados é satisfatório, porém, como não houve influência das duas variáveis, não se pode gerar superfície de resposta (Figura 23).

A atividade enzimática não sofreu influência na faixa de temperatura estudada (20 – 60°C), considerando que 60°C é uma faixa relativamente alta para a estabilidade de lipases. Por outro lado, altas temperaturas podem ser uma vantagem em processos biotecnológicos, pois permitem elevadas taxas de reação devido à redução da viscosidade do meio, e assim,

elevando os rendimentos no processo com aumento dos substratos e solubilidade dos produtos (CARVALHO et al., 2016).

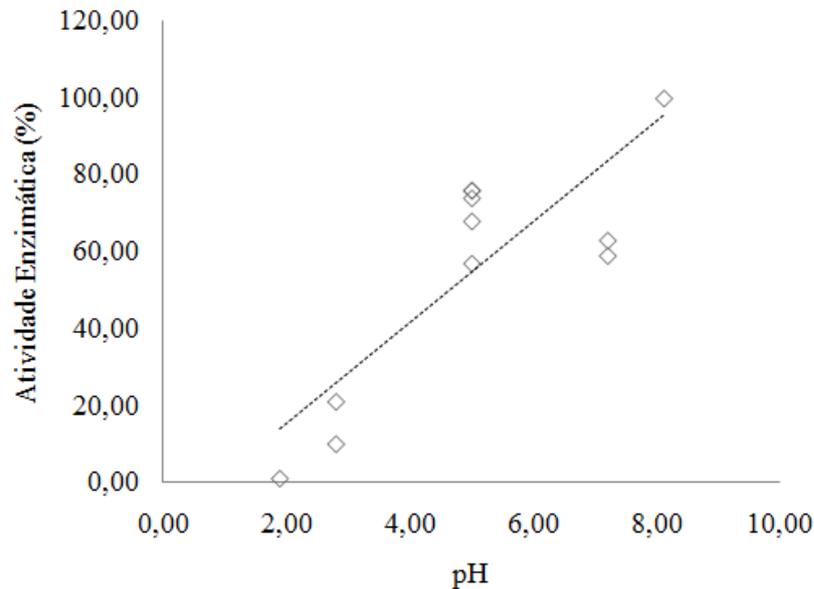


Figura 23. Comportamento linear da atividade relativa sobre o pH.

Almeida et al. (2013) observaram máxima atividade relativa (100%) em pH 3,5 para a lipase de *C. viswanathii* purificada por cromatografia de interação hidrofóbica. Em pH 7 houve uma redução (aproximadamente 60%). Estes resultados divergem dos apresentados nesse trabalho e podem estar relacionados com o polietilenoglicol utilizado para purificação da lipase. O PEG pode ser usado como modificador químico, que pode afetar a atividade, estabilidade e seletividade da enzima (SHARMA e KANWAR, 2014). O PEG pode ter aumentado a hidrofobicidade superficial da enzima, fortalecendo as interações hidrofóbicas entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, já que as interações hidrofóbicas são consideradas como um dos fatores mais importantes na estabilização da estrutura protéica. A ligação de PEG à superfície da lipase pode aumentar a sua estabilidade, envolvendo-a e protegendo-a (TALUKDER e SHIONG, 2015). Assim, nesse trabalho, a lipase alterou sua faixa de pH 4,5 (capítulo 2) para pH 8,1 após a purificação, podendo ser utilizada em aplicações em condições alcalinas, sendo importantes para utilização como aditivos em detergentes. Carvalho et al. (2016) observaram maior atividade enzimática em temperatura na faixa de 35 a 40°C e o pH ótimo da lipase purificada de *Y. lipolytica* entre 6 e 7, indicando uma natureza de neutralidade desses biocatalisadores. Gururaj et al. (2016) obtiveram melhor atividade enzimática a 50°C e pH 8 para atividade para a lipase de *Acinetobacter sp.* Li et al.

(2014) encontraram atividade ótima de lipase produzida por *Pseudomonas stutzeri* em pH 8,5 a 20°C, sendo esses fatores adequados para aplicação em detergentes.

Estabilidade em solventes orgânicos

O comportamento de lipases em diferentes solventes está relacionado com a sua eficiência nas reações sintéticas e hidrolíticas (GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). A presença de solventes pode permitir que a lipase mantenha sua flexibilidade e a conformação do sítio ativo aberta, facilitando, dessa maneira, a difusão do substrato e permitindo ao mesmo tempo movimentos do local ativo necessários para a reação prosseguir (YONG et al., 2016). A atividade das enzimas em solventes não depende somente das propriedades e da concentração dos solventes orgânicos, mas também da natureza da enzima (LI et al., 2014).

Na Tabela 21 são apresentados os resultados para o efeito dos solventes sobre a atividade da lipase e os valores para Log P. Os solventes são apresentados de acordo com sua hidrofobicidade (Log P), onde os valores negativos significam que o solvente é solúvel em água e valores positivos que são insolúveis (SANGSTER, 1989; ALMEIDA et al., 2013). Após o período de incubação, observou que a atividade relativa da enzima foi superior ao observado com o controle. As maiores atividades relativas foram observadas com etanol e metanol (357,0% e 338,0%, respectivamente). A produção de biodiesel é geralmente realizada por metilação de vários óleos e é muito importante que uma enzima seja estável em metanol (YOO et al., 2011). O nível intermediário foi observado com glicerol (288,0%). Hexano, 1-propanol, acetona e DMSO apresentaram os menores níveis de ativação da enzima após o período de incubação. A lipase produzida por *Haloarcula sp.* mostrou propriedades tolerantes a solventes orgânicos, como glicerol (112,1%) e hexano (116,9%). Sua aplicação na produção de biodiesel foi eficiente, podendo alcançar maiores valores ao otimizar o processo (LI e YU, 2014). Lipase produzida por *Ralstonia* apresentou atividade relativa em solventes orgânicos como etanol 119,19% e metanol 104,3%. Ao aplicarem a lipase para produção de biodiesel na presença de metanol e óleo de palma perceberam que a produção máxima foi em 12 horas, considerada altamente aplicável na produção comercial de biodiesel (YOO et al., 2011).

Tabela 21. Efeito dos solventes orgânicos sobre a atividade relativa da lipase.

Solventes	Log P*	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,0
Glicerol	-1,67	288,0
DMSO	-1,38	185,0
Metanol	-0,76	338,0
Etanol	-0,24	357,0
Acetona	-0,23	176,0
1-propanol	0,25	132,0
Hexano	3,5	107,0

*Log P: logaritmo do coeficiente de partição de um solvente particular entre n-octanol e água (SANGSTER, 1989).

Li et al. (2014) avaliaram o efeito de solventes na atividade de lipase de *Pseudomonas stutzeri* PS59 e a atividade relativa após 1 h de incubação na presença de álcool caprílico, glicerol e DMSO, foram 139,1%, 126% e 107,5%, respectivamente. Contudo a atividade de lipase diminuiu para 69% na presença de etanol e isopropanol não apresentou qualquer efeito sobre a atividade. Yong et al. (2016) observaram o efeito de etanol e isopropanol na atividade de lipase de *Botryococcus sudeticus* a atividade relativa foi 127% e 141%, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a extração líquido-líquido da lipase de *C.viswanathii* foi mais eficiente em sistema aquoso bifásico PEG 4000/Fosfato. O coeficiente de partição, fator purificação superior, balanço de atividade e lipase recuperada superior foram, respectivamente, 1,34, 1,58, 50,73% e aproximadamente 21%, em sistema realizado a 40 °C e pH 7. A caracterização parcial bioquímica revelou uma atividade ótima em pH 8,1 e que a lipase não sofreu influência na faixa de temperatura analisada 20 – 60°C. A elevada estabilidade em solventes orgânicos, como etanol e metanol sugere que pode ser usada em meios não aquosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, Z.; TIAN, L.; ZHAO, P.; ZHANG, B.; ALI, N.; KHAN, M.; ZHANG, Q. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 134, 129–135, 2016.

ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; CARMONA, E. C. Acid Lipase from *Candida viswanathii*: Production, Biochemical Properties, and Potential Application. **BioMed Research International**, 2013.

ASENJO, J.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, 1218. 8826– 8835. 2011.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; FRICKS, T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M.F.; LIMA, A. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3853– 3858, 2011.

BASSANI, G.; FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate–polyethyleneglycol aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 859, 222–228, 2007.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 55, 76–83, 2008.

CARVALHO, T.; FINOTELLI, P. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M.; AMARAL, P. F.F. Evaluating Aqueous Two-Phase Systems for *Yarrowia lipolytica* Extracellular Lipase Purification. **Process Biochemistry**, 2016.

DUARTE, A. W. F.; LOPES, A. M.; MOLINO, J.V. D.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Liquid–liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology** 156, 215–225, 2015.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Review: Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 68, 1–21, 2011.

GURURAJ, P.; RAMALINGAM, S.; NANDHINIDEVI, G.; GAUTAM, P. Process optimization for production and purification of a thermostable, organic solvent tolerant lipase from *Acinetobacter* sp. AU07P. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2016.

JIANG, B.; FENG, Z.; LIU, C.; XU, Y.; LI, D.; JI, G. Extraction and purification of wheat-esterase using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **J Food Sci Technol.** 52, 2015.

KHAYATI, G.; ALIZADEH, S. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Fluid Phase Equilibria**, 2013.

LI, X.; SHI, Y.; ZHANG, W.; DAI, Y.; ZHANG, H.; WANG, YUE.; WANG, H.; LU, F. A High-Detergent-Performance, Cold-Adapted Lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 Suitable for Detergent Formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014.

LI, X.; YU, H. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula sp.* G41 and its application for biodiesel production. *Folia Microbial*, 2014.

MAZZEU, C. J.; ZAPAROLI RAMOS, E.; CAVALCANTI, M. H. S.; HIRATA, D. B.; VIRTUOSO, L. S. Partitioning of *Geotrichum candidum* Lipase from fermentative crude extract by Aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Separation and Purification Technology**, 2015.

PADILHA, G. S.; SANTANA, J. C. C.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.55 n.1: pp. 7-19, Jan/Feb 2012.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, 1244, 1– 13, 2012.

SALIHU, A.; ALAM, Z. Solvent tolerant lipases: a review. **Process Biochemistry**, 2014.

SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physical Chemical.** vol. 18, no. 3, p. 1111, 1227, 1989.

SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, **Analytical Biochemistry**, vol. 79, p. 544–552, 1977.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Review article: Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, Volume 2014.

TALUKDER, M. R.; SHIONG, S. C. S. Stabilization of *Chromobacterium viscosum* lipase (CVL) against ultrasound inactivation by the pretreatment with polyethylene glycol (PEG). **Appl Biochem Biotechnol**, 2015.

YONG, S. K.; LIM, B. H.; SALEH, S.; TEY, L. Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 126, 99–105, 2016.

YOO, H.; SIMKHADA, J.; CHO, S.S.; PARK, D.H.; KIM, S.W.; SEONG, C.N.; YOO, J.C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology** 102, 6104–6111, 2011.

ZUNIGA, A. D. G. Sistemas aquosos polietilenoglicol-sal: separação de α -Lactoalbumina e β -Lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator de Graesser. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Nesse estudo foi possível avaliar diferentes composições de meio de cultivo, fontes de óleos vegetais e animais, nitrogênio e carbono para melhorar a produção de lipase de *Candida viswanathii*. O meio de Vogel suplementado com 1% de azeite de oliva, 0,2% de extrato de levedura, 0,5 % de lactose e 0,5% de sorbitol foi selecionado como o mais adequado para a produção de lipase. Por meio da metodologia de superfície de resposta foi possível otimizar a produção, obtendo um aumento de 74% comparado ao primeiro ensaio. A lactose e sorbitol, nesse estudo, podem ser consideradas fontes indutoras para a produção de lipase. O extrato bruto mostrou ótima atividade em pH 5,0 e temperatura 40°C.

A purificação da lipase de *Candida viswanathii* foi mais eficiente em sistema aquoso bifásico PEG 4000/Fosfato, realizado a 40°C e pH 7,0. A atividade máxima relativa foi obtida em pH 8,1 e não sofreu influência na faixa de temperatura de 20 a 60°C. Essas propriedades são importantes para aplicações em processos biotecnológicos e industriais. A lipase purificada apresentou elevada estabilidade em solventes como o metanol e etanol, indicando que pode ser usada em meios não aquosos. Após a purificação, a lipase alterou sua faixa de pH 5,0 para pH 8,1, podendo ser aplicada em condições alcalinas, que são importantes como aditivos em detergentes.

Novos estudos devem ser conduzidos, para o escalonamento da produção de lipase em biorreator com otimização dos parâmetros como aeração e agitação. A purificação da lipase por sistema aquoso bifásico, com a utilização de diferentes sais, como citrato, oxalato, e ainda diferentes composições dos sistemas também devem ser otimizados uma vez que os resultados apresentados no trabalho indicam que a purificação por esta metodologia pode ser muito viável para a obtenção de enzimas puras a baixo custo.