
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia lata*
LBBIO-BL02, SUA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E APLICAÇÃO
EM REAÇÕES DE BIOCATÁLISE DE INTERESSE
FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL**

BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO-
BL02, SUA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E APLICAÇÃO EM
REAÇÕES DE BIOCATÁLISE DE INTERESSE FARMACOLÓGICO E
INDÚSTRIAL

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Orientadora: Dr.^a Valéria Marta Gomes do Nascimento

Rio Claro
2017

547.758 Oliveira, Bruno Henrique de
O48p Produção e ourificação da lipase de Burkholderia lata
LBBIO-BL02, sua caracterização cinética e aplicação em
reações de biocatálise de interesse farmacológico e industrial /
Bruno Henrique de Oliveira. - Rio Claro, 2017
206 f. : il., figs., gráfs., tabs.

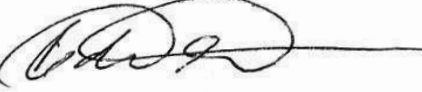
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Valéria Marta Gomes do Nascimento

1. Enzimas. 2. Lipase microbiana. 3. Purificação em passo
único. 4. Biocatálise industrial. 5. Galactolipase. 6. Oleil
oleato. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS.

Aos 17 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 14:00 horas, no(a) Mini Anfiteat CEDAD- Campus de Assis, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP-Câmpus de Assis, Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO do(a) Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - SP, Profa. Dra CINTIA REGINA RODRIGUES CARIGNATTO do(a) Bioquímica, Biotecnologia e Química / Universidade Paulista, Profa. Dra. ANELI DE MELO BARBOSA do(a) Departamento de Bioquímica / Universidade Estadual de Londrina - PR, Prof. Dr. JONAS CONTIERO do(a) Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA, intitulada **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE Burkholderia lata LBBIO-BL02, SUA CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E APLICAÇÃO EM REAÇÕES DE BIOCATÁLISE DE INTERESSE FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO


Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO


Profa. Dra CINTIA REGINA RODRIGUES CARIGNATTO


Profa. Dra. ANELI DE MELO BARBOSA


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Dedico à minha família, pelo exemplo, apoio incondicional, amizade e o carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Valéria Marta Gomes do Nascimento, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de realizar esse trabalho e principalmente pela orientação e amizade.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Sérgio Maluco Moraes, técnico do LBBIO, ao Gilberto Millani e ao Allan Chiea técnicos do Depto. de Ciências Biológicas, pelas ajudas nas ideias mirabolantes.

Aos amigos do LBBIO, pelo trabalho realizado em conjunto e pelos momentos de descontração. Aos que já seguiram seu caminho e aos que chegaram durante a caminhada. Agradecimento especial aos que participaram diretamente deste trabalho: Luiz Edson, Rachid, Ernani, Herina, Antônio Assay e Priscila Tamashiro.

Aos amigos que fiz em Montpellier. Ao Dr. Pierre Villeneuve e toda sua maravilhosa equipe, por terem me acolhido durante o estágio no CIRAD (França), fazendo com que me sentisse em casa e compartilhando suas experiências e seus conhecimentos. Clara Lachgar, Mariana Ruesgas, Bruno Barea, Karim Chelbi, Maeva Subileau, Nathalie Barouh, Erwann Durand, Ruba Nasri, Charlotte Deyrieux, Claire Bourlieu, Paul Alain, Valentin Valero e um agradecimento especial ao Dr. Jérôme Lecomte e ao doutorando Oscar Laguna, pela amizade e por dividirem seu tempo e seu conhecimento. Agradeço também ao Dr. Frédéric Carrière pela ajuda durante experimentos com seu grupo de pesquisa no EIPL em Marselha.

Aos meus amigos Alessandro M. Rosa, Silvia Rosa, Angélica R. Ferreira, André L. Ferreira, Salvano N. do Vale, Érica Passarelli, Ivan Nascimento entre outros, pelos momentos agradáveis e descontraídos que passamos e pelo apoio mesmo sem entender nada da minha pesquisa.

À Thaís Nascimento do Vale, que me acompanhou durante minha vida acadêmica com muita compreensão e carinho, que embarcou nas aventuras mesmo que de olhos vendados.

Ao meu pai Paulo de Oliveira, à minha mãe Célia Maria da Silva Oliveira e ao meu irmão Paulo Cesar de Oliveira pelo incentivo, amor e atenção dedicados em todos os momentos. Sem eles absolutamente nada disso valeria a pena.

*"A descoberta consiste em ver o que todos
viram e em pensar no que ninguém pensou."*

Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt (1893-1986)

RESUMO

Com o desenvolvimento de uma metodologia de purificação não convencional de passo único (“MPU”) obteve-se um fator de purificação de 46,5 vezes e recuperação de 53%, observando-se banda única de 32 kDa na eletroforese SDS-PAGE. A enzima purificada apresentou atividade frente a ácidos graxos com cadeias entre 8 e 20 carbonos, destacando-se a seletividade para os ácidos palmítico (16:0) e oleico (18:1). A lipase apresentou ligeira regiosseletividade para as posições externas *sn*-1 e *sn*-3 (ésteres primários) do triacilglicerol. A cinética da reação demonstrou que a enzima segue uma cinética de Michaelis-Menten, com valor de K_m de 22 mmol e V_{max} de 12,7 mmol/min/mg. O valor de k_{cat} foi de 225 s⁻¹ e a eficiência catalítica de 10⁴ mol⁻¹.s⁻¹. A temperatura para atividade máxima foi de 55 °C, sendo razoavelmente estável a 60 °C, mantendo 60% da atividade após 1 h. A atividade máxima foi obtida na faixa de pH entre 4 e 9, mantendo 100% da atividade inicial após incubação por 1 h na faixa de pH entre 2,2 e 10,0. A estabilidade em solventes orgânicos foi estudada por incubação da enzima em solventes miscíveis e imiscíveis em água. A enzima manteve 100% da atividade inicial em tolueno, n-hexano e n-heptano e apresentou estabilidade de 78%, 76% e 90% quando incubada com 50% (v/v) de metanol, etanol e isopropanol. Com relação às aplicações em reações de interesse industrial, a lipase de *B. lata* apresentou comportamento predominantemente de hidrolase (90%) em detrimento a ação de aciltransferase. Para a síntese de ésteres de aroma produz o éster caprilato de isoamila com 45% de rendimento (24 h e 50 °C em n-hexano). Para a síntese de um éster de cera (oleil oleato, C36), apresentou 87% de rendimento (30 h, 55 °C). A obtenção de ácidos graxos epoxidados alcançou rendimento de 44,4% em reação quimio-enzimática de epoxidação do oleato de metila (48 h, 40 °C e 10% (v/v) de H₂O₂). A atividade frente a galactolipídeos de espinafre *in situ* atingiu 2700 U/mg. Em ambientes gástricos simulados apresentou alta atividade e estabilidade em presença de proteases (pepsina e tripsina) em condições de baixo pH, além de demonstrar surpreendente ativação na presença de altas concentrações de sais biliares (NaTDC).

Palavras-chave: Lipase. *Burkholderia lata*. Purificação em passo único. Biocatálise industrial.

ABSTRACT

With the development of a non-conventional one-step purification methodology, was obtained a purification factor of 46.5 and recovery of 53%, noting single band of 32 kDa in SDS-PAGE. The purified enzyme showed activity against fatty acids with chains from 8 to 20 carbons, highlighting the preference for palmitic (16:0) and oleic acids (18:1). The lipase showed slight regioselectivity for external positions *sn*-1 and *sn*-3 (primary esters). The reaction kinetics showed that the enzyme follows a Michaelis-Menten model with K_m value of 22 mmol and V_{max} of 12.7 mmol/min/mg. The k_{cat} value was 225 s⁻¹ and the catalytic efficiency was 10⁴ mol⁻¹.s⁻¹. The temperature for maximum activity was 55 °C, and reasonably stable at 60 °C, keeping 60% of activity after 1 h. The maximum activity was obtained at pH values between 4 and 9, maintaining 100% of the initial activity after 1 h incubation in a pH range from 2.2 to 10.0. Stability in organic solvents was studied by incubating the enzyme in miscible and immiscible solvents. The enzyme retained 100% activity in toluene, n-hexane and n-heptane and was 78%, 76% and 90% stable when incubated with 50% (v/v) methanol, ethanol and isopropanol, respectively. Regarding the applications in industrial interest reactions, *B. lata* lipase presented predominantly hydrolase behavior (90%) over acyltransferase action. For the flavor esters synthesis, the isoamyl caprylate ester is produced with 45% yield (24 h and 50 °C). For a wax ester synthesis (oleyl oleate, C36) showed 87% yield (30 h, 55 °C). The epoxidized fatty acids obtainment reached 44.4% yield in methyl oleate chemo-enzymatic epoxidation (48h, 40 °C and 10% (v/v) H₂O₂). The activity against spinach galactolipids *in situ* reached 2700 U/mg. In simulated gastric environment showed high activity and stability in the presence of proteases (pepsin and trypsin) in low pH conditions, besides demonstrating surprising activation in the presence of high concentrations of bile salts (NaTDC).

Keywords: Lipase. *Burkholderia lata*. One-step purification. Industrial biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Mercado mundial de enzimas com valores de 2013 a 2015 e previsão até 2024. Valores em Bilhões de dólares americanos (US\$). Adaptado de Global Market Insights (2016)	2
Figura 2.1 - Tríade catalítica de lipases formada por uma serina, uma histidina e um resíduo ácido (aspártico ou glutâmico)	5
Figura 2.2 - Modelo estrutural da lipase de <i>Burkholderia (Pseudomonas) cepacia</i> complexada ao ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-phenilpropil éster. Fonte: Protein Data Bank.	6
Figura 2.3 - Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. A tríade catalítica e a água são visualizadas em preto, os resíduos do espaço oxianiônico em azul e o substrato em vermelho. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono susceptível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre. Modificado de Jaeger <i>et al.</i> (1994).	7
Figura 2.4 - Balança comercial referente à importação (A) e exportação (B) de enzimas no Brasil no período de 1995 a 2014. Valores em milhões de dólares americanos (US\$). Fonte: (THE ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2016).....	28
Fig. 1. Three-dimensional response surface (A) and contour (B) plots of lipase activity (U/mL) obtained by submerged fermentation of <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL2 on medium with various concentrations of chicken fat (X ₁) and ammonium phosphate (X ₂).....	67
Fig 2. Influence of ammonium phosphate concentration as N source on the production of lipase by <i>Burkholderia lata</i> in SmF. Culture conditions: 12.5 mL/L of chicken fat; 180 rpm, 30 °C, 72 h.....	68
Fig 3. Lipase production by <i>B. lata</i> and cell growth in culture medium with different initial pHs. The initial ln cell number added to fermentation was 18. Culture medium containing 1.25 mL/L of chicken fat and 15 g/L of ammonium phosphate. Control fermentation without pH adjust was in pH 6.4. Culture conditions: 180 rpm, 30 °C and 72 h. Test conditions: citrate-phosphate buffer 0.05 mol/L pH 7.0, 55 °C. Assays carried out in triplicate.	69

Fig 4. Effect of temperature on the stability (A) and activity (B) of *B. lata* lipase. Test conditions: temperature between 20 and 90 °C, phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0. Assays carried out in triplicate. All activities was calculated relative to the activity measured in the standard temperature of 55 °C (542.76 U/mL, 100%). Effect of pH on the stability (C) and activity (D) of *B. lata* lipase at different pHs. Test conditions: 37 °C. Residual activity in the stability tests after 1 h of incubation at 25 °C. Buffers used in the two assays (0.05 mol/L): Glycine-HCl pH 2.2 to 3.0 (■), citrate-phosphate pH 3.0 to 7.0 (●), KH₂PO₄-NaOH pH 6.0 to 8.0 (▲), Tris-HCl pH 8.0 and 9.0 (□) and Glycine-NaOH pH 9 and 10 (○). The activities were compared with the activity determined in phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0 without prior incubation (100%, 250 U/mL). Assays carried out in triplicate. 72

Fig S1. FTIR absorption spectra of Celite 545 (gray), free lipase (red) and immobilized lipase on Celite (blue). 75

Figura 6.1 - Cinética de crescimento (■) e produção de lipase (▲) por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em frascos agitados. Condições de cultivo: meio de cultura otimizado (óleo de frango 12,5 mL/L e fosfato de amônio 15 g/L), agitação orbital de 180 rpm, pH 8,0 e 35 °C, atividade lipolítica acompanhada pelo método do *p*NPP. Experimentos realizados em triplicata. 85

Figura 6.2 - Cinética de crescimento (■), atividade volumétrica (▲) e específica (●) por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em fermentador de 7,5 L. Condições de cultivo: meio de cultura otimizado (óleo de frango 12,5 mL/L e fosfato de amônio 15 g/L), pH 8,0 e 35 °C, taxa de fluxo de ar 1,5 vvm e taxa de agitação de 300 rpm. Atividade lipolítica acompanhada pelo método do *p*NPP. 87

Figura 7.1 - Perfil de eluição do extrato precipitado de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 na coluna de Sephadex G-75. A) Injeção do extrato precipitado; B) Injeção do sobrenadante de cultura. Atividade lipolítica (●). Absorbância a 280 nm (■). Condições: tampão tris 0,02 mol/L, pH 7,0 com NaCl 0,15 mol/L; fluxo de 0,2 mL/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL..... 92

Figura 7.2 - Eletroforese SDS-PAGE da amostra eluída da coluna de permeação em gel Sephadex G-75. Linha 1: sobrenadante de cultura; linha 2: extrato precipitado; linha 3: Sephadex G-75. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.... 93

Figura 7.3 - Etapas do tratamento do extrato precipitado com isopropanol e filtração para clarificação e rompimento de agregados.	96
Figura 7.4 - Tratamento do extrato precipitado de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL-02 (A) com isopropanol 10% (B) e 30% (C).....	97
Figura 7.5 - Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex. Aplicação do extrato precipitado clarificado e eluição com tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,01 mol/L. A fração ligada foi eluída por tampão contendo NaCl 0,1 mol/L (linha tracejada). Atividade lipolítica (●). Absorbância a 280 nm (■). Condições: fluxo de 0,2 mL/min; injeção de amostra de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.	102
Figura 7.6 - Eletroforese SDS-PAGE. Linha 1: extrato precipitado clarificado com isopropanol 30%; linha 2: frações eluídas da DEAE-Sephadex com NaCl 0,1 mol/L. A seta indica a banda da enzima. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.....	103
Figura 7.7 - Eletroforese SDS-PAGE. A) Linha 1: marcadores moleculares; linha 2: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 100 µg de proteína; linha 3: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 45 µg de proteína. Revelação por Coomassie Blue. B) Linha 1: Sobrenadante de cultura; linha 2: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.	105
Figura 7.8 - Eletroforeses SDS-PAGE comparando a purificação da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 utilizando: A) Sephadex-G75, B) DEAE-Sephadex e C) “MPU”. Linhas 1: sobrenadante de cultura, linhas 2: extrato purificado de acordo com o método indicado pela letra. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.	107
Figura 8.1 - Efeito da temperatura na atividade lipolítica da lipase bruta (A) e pura (B) de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Condições do ensaio: temperatura entre 20 e 90 °C, tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 0,1 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida à 55 °C (100%)......	109
Figura 8.2 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta (A) e pura (B) de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Condição de ensaio: temperatura entre 20 e 90 °C, pH 7,0 por 1 h. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em	

relação à atividade medida na temperatura padrão de 55 °C sem pré-incubação (100%)..... 110

Figura 8.3 - A) Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima bruta de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. B) Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima purificada de *B. lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, 0,1 mg/mL de proteínas. C) Estabilidade ao pH da atividade lipolítica da enzima bruta de *B. lata* LBBIO-BL01. D) Estabilidade ao pH da atividade lipolítica da enzima purificada de *B. lata* LBBIO-BL01. Atividade residual após 1 h de incubação a 25 °C, tampões utilizados nos ensaios (0,02 mol/L): Glicina-HCl pH 2,2 a 3,0 (■), Citrato-Fosfato pH 3,0 a 7,0 (●), KH₂PO₄-NaOH pH 6,0 a 8,0 (▲), Fosfato pH 7,0 a 8,0 (▼), Tris-HCl pH 8,0 a 9,0 (◄) e Glicina-NaOH pH 9,0 a 10,0 (►). As atividades foram comparadas com a atividade determinada em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,0 sem pré incubação. Ensaios realizados em triplicata..... 111

Figura 8.4 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos de origem vegetal. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata. 116

Figura 8.5 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos de origem animal. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata. 118

Figura 8.6 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos sintéticos. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Reagentes SIGMA-ALDRICH. Ensaios realizados em triplicata..... 119

Figura 8.7 - Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. A) Gráfico de Michaelis-Menten. B) Gráfico de Lineweaver–Burk. C) Gráfico de Hanes-Woolf. D) Gráfico de Eadie-Hofstee. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 0,03 mg/mL, concentração de trioleína: 10-250 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata. 123

Figura 8.8 - Hidrólise de oleato de metila utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes proporções de substrato x produto: A) Relação inicial de substrato/produto 100:0. B) Relação inicial de substrato/produto 75:25. C) Relação inicial

de substrato/produto 50:50. D) Relação inicial de substrato/produto 75:25. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaio realizado em triplicata. 128

Figura 8.9 - Hidrólise de trioleína utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes proporções de substrato x produto: A) Relação inicial de substrato/produto 100:0. B) Relação inicial de substrato/produto 75:25. C) Relação inicial de substrato/produto 50:50. D) Relação inicial de substrato/produto 75:25. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaio realizado em triplicata. 129

Figura 8.10 - Hidrólise utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02: A) Oleato de metila como substrato e adição de enzima extra (1 mg/mL) em 18 h (linha vermelha). B) Trioleína como substrato e adição de enzima extra (1 mg/mL) em 18 h (linha vermelha). C) Oleato de metila como substrato e adição de substrato extra (100 mmol/L) em 18 h (linha azul). D) Trioleína como substrato e adição de substrato extra (100 mmol/L) em 18 h (linha azul). Condições de ensaio: 55 °C, concentração inicial de substrato: 100 mmol/L, concentração inicial de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaio realizado em triplicata. 130

Figura 8.11 - Hidrólise de oleato de metila utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 com adição de diferentes concentrações de CaCl₂: A) Adição de CaCl₂ de 0 a 25 mmol/L. B) Adição de CaCl₂ de 30 a 50 mmol/L. Condições de ensaio: 55 °C, concentração inicial de substrato: 100 mmol/L, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. A concentração de AGL foi mensurada por HPTLC. Ensaio realizado em triplicata. 133

Figura 8.12 - Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipases. Na linha de cima ação de uma lipase não específica, com hidrólise dos ácidos graxos nas três posições (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3), com a formação de DAG-1,2, DAG-2,3 e DAG-1,3. Na linha de baixo exemplo de uma lipase *sn*-1,3 específica, com hidrólise dos ácidos graxos presentes nas extremidades da molécula, com a formação de DAG-1,2 e DAG-2,3. Na figura, os ácidos graxos livres resultantes da hidrólise foram omitidos. 134

Figura 8.13 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos saturados catalisada pela lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. 139

Figura 8.14 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos insaturados catalisada pela lipase pura de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0.....	140
Figura 8.15 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos saturados e insaturados catalisada pela lipase pura de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0.....	141
Figura 9.1 – Reação de Aciltransferase (Transesterificação) do Estearato de Etila em Estearato de Metila catalisada por lipases.	148
Figura 9.2 - Efeito da concentração de metanol na razão de transesterificação/hidrólise do estearato de etila (C18EE) em emulsão aquosa pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Condições do ensaio: 50 °C, emulsão de estearato de etila (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato-fosfato 50 mmol/L pH 8,0, 4 horas de reação. Experimentos realizados em triplicata.	149
Figura 9.3 – Concentração de estearato de metila e ácido esteárico como produtos das reações de transesterificação e hidrólise do estearato de etila pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 durante o período de 24 h. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de estearato de etila (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato-fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.	149
Figura 9.4 - Reação de esterificação metílica do ácido oleico em oleato de metila catalisada por lipases.	151
Figura 9.5 - Reação de esterificação do ácido oleico em emulsão aquosa pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de metanol. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de ácido oleico (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.	151
Figura 9.6 - Reação de transesterificação da trioleína em emulsão aquosa pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de metanol. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de trioleína (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.	152
Figura 9.7 - Reação de esterificação do ácido oleico em emulsão aquosa pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 utilizando diferentes álcoois (9 mol/L). Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de ácido oleico (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.	153

Figura 9.8 - Efeito da temperatura na reação de síntese de caprilato de isoamila por esterificação utilizando lipase de <i>B. lata</i> LBBIO-BL02. Razão molar ácido/álcool 1:1, 24 h, 180 rpm e n-Hexano como co-solvente. Experimentos realizados em triplicata.....	155
Figura 9.9 - Molécula de oleil oleato, formada a partir de uma ligação éster (em destaque) entre um ácido oleico (18:1) e um álcool oleílico (18:1).....	157
Figura 9.10 - Reação de esterificação do ácido oleico com álcool oleílico pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 utilizando diferentes razões molares álcool:ácido graxo: 1:2 (■), 1:1 (●) e 3:1 (▲). Condições do ensaio: 55 °C, ambiente orgânico n-Hexano, ácido oleico (100 mmol/L). Experimentos realizados em triplicata.	158
Figura 9.11 - Reação de perhidrólise do ácido oleico com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) pela ação de uma lipase resultando em perácido graxo.	159
Figura 9.12 - Reações de epoxidação do éster oleato de metila catalisadas por lipases de <i>Candida antarctica</i> CAL-B (Novozyme 435) (A), <i>Burkholderia cepacia</i> (Amano PS) (B) e <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 (C). Condições do ensaio: Oleato de metila 200 mmol/L; adição de enzima a 3% (m/m); H ₂ O ₂ a 5% (v/v), 40 °C e 300 rpm. Produtos de reação: Oleato de metila (▼), ácido oleico (●), oleato de metila epóxi (▲) e ácido esteárico epóxi (■). Experimentos realizados em triplicata.....	161
Figura 9.13 - Reações de epoxidação do éster oleato de metila catalisadas pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de H ₂ O ₂ (v/v): 2,5% (■), 5,0% (●), 10,0% (▲) e 20,0% (▼). Condições do ensaio Oleato de metila 200 mmol/L; adição de enzima a 3% (m/m); 40 °C e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.....	163
Figura 9.14 - Reações de hidrólise de galactolipídeos (MGDG) catalisada por enzima com ação de galactolipase resultando em ácido graxo livre e monogalactosilmonoacilglicerol (MGMG).	165
Figura 9.15 - Hidrólise e alcoólise de galactolipídeos naturais de espinafre (MGDG e DGDG) pela lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02. Linhas: 1: reação sem adição de enzima (Branco); 2: reação de hidrólise; 3: metanólise com 1 mol/L de álcool; 4: metanólise com 3 mol/L de álcool. As reações de lipólise dos galactolipídeos foram seguidas por extração dos lipídios e a sua separação em placas de HPTLC em sílica utilizando migração dupla: 30 mm em Hexano/DEE/ác. fosfórico (60:40:1, v/v/v) e 60 mm em Hexano. Condições do ensaio: 55 °C, pH 8,0 e 250 rpm por 10 min.....	166

Figura 9.16 - Atividade da lipase purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em concentrações crescentes de pepsina durante hidrólise de trioleína em Fluido Gástrico Simulado (FGS). Concentração de pepsina: (●) 0 U/mL (Controle); (◆) 1000 U/mL; (■) 2000 U/mL; (▼) 4000 U/mL; (●) 8000 U/mL. Condições do ensaio: trioleína 10% (m/v); lipase purificada a 0,5% (m/v); 37 °C, pH 4,0 e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.	170
Figura 9.17 - Estabilidade da lipase purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em presença de Pepsina (2800 U/mL) em diferentes valores de pH. Condições do ensaio: lipase a 0,5% (m/v); 37 °C. Incubação em presença de Pepsina por 2 horas. Experimentos realizados em triplicata.	171
Figura 9.18 - Atividade da lipase purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em concentrações crescentes de tripsina e sais biliares (Taurodeoxicolato de sódio - NaTDC) durante hidrólise de trioleína em Fluido Duodenal Simulado (FDS). Concentração de tripsina: (▲) 0 U/mL com 0 mmol/L de NaTDC (Controle); (■) 94 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (▲) 188 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (▼) 376 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (●) 94 U/mL com 8 mmol/L de NaTDC e (●) 94 U/mL com 16 mmol/L de NaTDC. Condições do ensaio: trioleína 5% (m/v); lipase a 0,5% (m/v); 37 °C, pH 6,0 e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.	172
Figura 9.19 - Atividade da lipase purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em diferentes valores de pH na presença de sais biliares (NaTDC 0,5 mmol/L). Condições do ensaio: lipase a 0,5% (m/v); NaCl 150 mmol/L; CaCl ₂ 1,4 mmol/L; 37 °C. Mensuração da atividade por pH-Stat. Experimentos realizados em triplicata.....	174

LISTA DE TABELAS

Table 1. Influence of different oils and fat as carbon sources on lipase production by <i>B. lata</i> in SmF.....	63
Table 2: Fractional design matrix (factorial 2^{6-2}) containing four repetitions at the central point for the production of lipase by <i>B. lata</i> LBBIO-BL02 in SmF.....	64
Table 3. Analysis of variance obtained for the 2^{6-2} fractional design with different N sources. Chicken fat was used as carbon source at 30 °C and 180 rpm.....	65
Table 4. CCD matrix (factorial 2^2) containing four repetitions at the central point for the production of lipase by <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL2 in SmF.....	66
Table 5. Analysis of variance obtained for the 2^2 CCD with chicken fat (X_1) and ammonium sulfate (X_2).....	67
Table 6. Lipase production by <i>B. lata</i> and cell growth in fermentations performed at different temperatures. The initial ln cell number added to fermentation was 18. Culture medium containing 1.25 mL/L of chicken fat and 15 g/L of ammonium phosphate. Culture conditions: 180 rpm, pH 8.0.	71
Table 7. <i>Burkholderia lata</i> lipase activity on different substrates.	73
Table 8. Study of stability <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 lipase from different organic solvents and concentrations.	76
Tabela 6.1 - Produção e produtividade de lipase produzida por <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 por fermentação em frascos agitados e fermentador 7,5 L.....	88
Tabela 7.1 - Análise do extrato precipitado de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 por permeação em gel.	90
Tabela 7.2 - Tratamento do sobrenadante de cultura com Sulfato de Amônio a 80% ..	95
Tabela 7.3 - Tratamento do extrato precipitado de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL-02 com diferentes concentrações de isopropanol.	97
Tabela 7.4 - Ensaios de adsorção e dessorção controladas da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em Celite® 545.....	100
Tabela 7.5 - Purificação da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex.....	102

Tabela 7.6 - Purificação da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em um passo por método não convencional utilizando “MPU”	104
Tabela 8.1 - Atividade da lipase bruta e purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 frente a diferentes substratos, naturais e sintéticos.	114
Tabela 8.2 - Parâmetros cinéticos da lipase extracelular purificada de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02	122
Tabela 8.3 - Proporção de regiodistribuição de DAGs após hidrólise parcial de trioleína catalisada pelas lipases bruta e pura de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 e lipase comercial de <i>Candida rugosa</i> (para comparação) após 0 (controle), 5, 15 e 30 minutos.	135
Tabela 8.4 - Proporção de regiodistribuição de DAGs após hidrólise parcial de óleos vegetais catalisada pelas lipases bruta e pura de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 e lipase comercial de <i>C. rugosa</i> (para comparação) após 0 (controle), 5, 15 e 30 minutos. Dados do tempo 0 h são a proporção inicial de DAG das amostras de óleo.	137
Tabela 8.5 - Estabilidade da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 em solventes orgânicos polares e apolares	143
Tabela 9.1 - Rendimentos das reações de síntese de ésteres de cadeia curta com lipase de <i>B. lata</i> LBBIO-BL02.	155
Tabela 9.2 - Atividade específica (U/mg) de lipases sobre triacilglicerol (tributirina, 4:0) e galactolipídeos (MGDG e DGDG) em comparação com a lipase deste estudo de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02	167
Tabela 9.3 - Atividade da lipase de <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 na presença de diferentes concentrações de Taurodeoxicolato de Sódio utilizando pH-Stat.	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AG** – Ácido Graxo
- AGL** – Ácido Graxo Livre
- ANOVA** – Análise de Variância
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- a_w** – Atividade termodinâmica da água
- BRENDA** – *Braunschweig Enzyme Database*
- C** – Carbono
- CALB** – Lipase B de *Candida antarctica*
- CCD** – Cromatografia de Camada Delgada
- CHI** – Cromatografia de Interação Hidrofóbica
- CIRAD** – *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*
- CM** – Carboximetil
- CNRS** – *Centre National de la Recherche Scientifique*
- DAG** – Diacilglicerol
- DCCR** – Delineamento Composto Central Rotacional
- DEAE** – Dietilaminoetil
- DGDG** – Digalactosildiacilglicerol
- DHA** – Ácido Docosaheptaenoico
- DPA** – Ácido Eicosapentaenoico
- E.C.** – *Enzyme Commission*
- EIPL** – *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse*
- FAME** – *Fatty Acids Methyl Esters*
- FAT** – Fundação André Tosello
- FC** – Fibrose Cística
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FDS** – Fluido Duodenal Simulado
- FES** – Fermentação em Estado Sólido
- FGS** – Fluido Gástrico Simulado
- FOLCH** – Solução de clorofórmio: metanol (2:1, v/v)
- FP** – Fator de Purificação
- FSM** – Fermentação Submersa

g/L – Gramas por litro
GC – Cromatografia Gasosa
HPTLC – *High Performance Thin Layer Chromatography*
IPE – Insuficiência Pancreática Exócrina
kDa – Quilodalton.
LB – Luria Bertani
LBBIO – Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos
Log P – Logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água.
LPL – Lipoproteína lipase
m/m – massa/massa
m/v – massa/volume
MAG – Monoacilglicerol
MGDG – Monogalactosildiacilglicerol
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
N – Nitrogênio
NaTDC – Taurodeoxicolato de Sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
PB – Plackett-Burman
pNP – *p*-Nitrofenol
pNPP – Palmitato de *p*-Nitrofenila
PUFA – *Poli Unsaturated Fatty Acids*
PVA – Álcool Polivinílico
rpm – Rotação por minuto
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio
TAG – Triacilglicerol
TC18 – Trioleína
TC4 – Tributirina
TC8 – Tricaprilina
Tris – Tris Hidroximetil Aminometano
US\$ – Dólares americanos
USDA – *United States Department of Agriculture*
UV – Ultravioleta
v/v – volume/volume

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Lipases	4
2.2. Fontes de obtenção de lipases	8
2.2.1. Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	9
2.3. Produção de lipases.....	11
2.3.1. O uso de ferramentas estatísticas para otimizar a produção de lipases	13
2.4. Purificação de lipases.....	14
2.5. Características bioquímicas de lipases.....	16
2.6. Lipases e as biocatálises	18
2.7. Aplicações biotecnológicas de interesse industrial das lipases	20
2.7.1. Indústria de alimentos e produtos lácteos.....	21
2.7.2. Indústria de detergentes	22
2.7.3. Indústria farmacêutica	23
2.7.4. Utilização de lipases como agentes terapêuticos.....	24
2.7.5. Outras aplicações.....	29
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	32
4.2. PRODUÇÃO DA ENZIMA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	32
4.2.1. Fermentação submersa sob agitação orbital	32

4.2.2.	Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por <i>B. lata</i> LBBIO-BL02.....	33
4.2.3.	Efeito da temperatura e pH inicial na produção da lipase por <i>B. lata</i> LBBIO-BL02 em fermentação submersa.....	34
4.2.4.	Fermentação submersa em biorreator de 7,5 litros.....	35
4.2.5.	Esterilização dos meios e equipamentos	35
4.3.	ENSAIOS DE PRÉ-PURIFICAÇÃO	35
4.3.1.	Precipitação com sulfato de amônio.....	36
4.3.2.	Precipitação parcial utilizando isopropanol.....	36
4.4.	MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO	37
4.4.1.	Cromatografia de permeação em gel	37
4.4.2.	Purificação parcial utilizando Celite® 545	37
4.4.3.	Cromatografia de troca iônica	38
4.4.4.	Purificação em um passo utilizando “Metodologia de Passo Único” (MPU).....	38
4.4.5.	Eletroforese SDS-PAGE	38
4.5.	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DA LIPASE DE <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02.....	39
4.5.1.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade	39
4.5.2.	Efeito do pH na atividade e estabilidade	39
4.5.3.	Hidrólise de diferentes substratos.....	40
4.5.4.	Efeito da concentração de substrato na atividade.....	40
4.5.5.	Efeito da concentração de produto na atividade.....	40
4.5.6.	Hidrólise parcial de lipídios e ésteres	41
4.5.7.	Determinação da regiosseletividade da lipase de <i>B. lata</i> LBBIO-BL02	41
4.5.8.	Determinação da tiposseletividade da lipase de <i>B. lata</i> LBBIO-BL02	42
4.5.9.	Estabilidade em solventes orgânicos	42
4.6.	APLICAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 EM DIFERENTES PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	43
4.6.1.	Reações de esterificação e transesterificação em ambiente aquoso	43
4.6.2.	Obtenção de ésteres de aroma via esterificação enzimática de ácidos graxos em ambiente orgânico	43
4.6.3.	Epoxidação quimo enzimática de ácidos graxos	44
4.6.4.	Atividade de galactolipase <i>in situ</i>	45
4.6.5.	Simulação de fluido gástrico	45
4.6.6.	Simulação de fluido intestinal	46

4.7.	MÉTODOS ANALÍTICOS	46
4.7.1.	Determinação da atividade lipolítica em meio aquoso.	46
4.7.2.	Determinação de proteínas	49
4.7.3.	Determinação de ácidos graxos livres	49
4.7.4.	Análise de classe de lipídios por cromatografia em camada delgada (CCD)	49
4.7.5.	Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa (GC)	50
4.8.	ANÁLISE DOS RESULTADOS	51
4.8.1.	Análise estatística	51
5.	RESULTADOS	52
6.	INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO I – “PRODUÇÃO”	52
6.1.	OVERPRODUCTION AND PROPERTIES OF LIPASE BY A WILD STRAIN OF <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 USING CHIKEN FAT	53
6.2.	PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO BIORREATOR	85
6.2.1.	Cinética de crescimento e produção de lipase pela cepa <i>Burkholderia lata</i> LBBIO-BL02	85
6.2.2.	Produção da enzima por fermentação submersa em biorreator de bancada (7,5 litros)	86
7.	INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO II – “PURIFICAÇÃO”	89
7.1.	ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO	89
7.1.1.	Análise do sobrenadante de cultura e do extrato precipitado por permeação em gel	89
7.1.2.	Ensaio para clarificação do extrato precipitado e desagregação da enzima	94
7.1.3.	Ensaio para clarificação	95
7.2.	ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia lata</i> LBBIO- BL02	98
7.2.1.	Purificação por adsorção e dessorção seletiva em Celite® 545	98
7.2.2.	Purificação por cromatografia de troca iônica	101
7.2.3.	Purificação por método não convencional de passo único utilizando Metodologia de Passo Único (“MPU”)	103
8.	INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO III – “CARACTERIZAÇÃO”	107
8.1.	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade	108
8.2.	Efeito do pH na atividade e estabilidade	110

8.3.	Hidrólise de diferentes substratos	112
8.4.	Efeito da concentração de substrato.....	120
8.5.	Inibição da atividade lipolítica por liberação de produto.....	126
8.6.	Regiosseletividade	133
8.7.	Tiposseletividade	138
8.8.	Estabilidade em solventes orgânicos.	141
9.	INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO IV – “POTENCIAL DE BIOCATÁLISE EM REAÇÕES DE INTERESSE FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL”	146
9.1.	Aciltransferase em ambiente aquoso (transesterificação).....	147
9.2.	Obtenção de ésteres de cadeia longa via esterificação em ambiente aquoso.....	150
9.3.	Obtenção de ésteres de aroma de cadeia curta via esterificação em ambiente orgânico	154
9.4.	Síntese de oleil oleato em ambiente orgânico.....	156
9.5.	Epoxidação quimio-enzimática.....	159
9.6.	Galactolipase.....	164
9.7.	Ambientes digestivos simulados.....	168
10.	CONCLUSÕES	177
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184

1. INTRODUÇÃO

Com o constante desenvolvimento de novas técnicas, diminuição dos custos e o crescimento da biotecnologia de biocatalisadores enzimáticos, os catalisadores químicos vêm sendo substituídos em um grau significativo. Fatores como alta seletividade, especificidade, capacidade de agir em condições brandas e efeito residual nulo fazem com que as enzimas sejam cada vez mais procuradas como catalisadores para uma infinidade de reações. A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área estão normalmente entre os prioritários e englobam grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta.

A realidade brasileira, entretanto, é outra. De um lado, a tecnologia de produção e de aplicações de enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisa no Brasil e, portanto, tanto a tecnologia de produção como a de aplicação das enzimas é importada de outros países, com a participação brasileira limitada ao consumo dos seus produtos. Por outro lado, os equipamentos envolvidos na produção e purificação de enzimas, seja em escala laboratorial ou em escala semi-piloto, são de alto custo, pois envolvem fermentadores, equipamentos para purificação, normalmente cromatógrafos, além de equipamentos para análise, sem contar o custo dos reagentes, meios de cultura e substratos para determinação das atividades enzimáticas. Os altos custos envolvidos fazem com que poucos grupos de pesquisa brasileiros sejam competitivos na área de tecnologia enzimática, especialmente na relacionada com as enzimas de interesse deste trabalho: as lipases.

Pelo menos 75% de todas as enzimas utilizadas industrialmente são hidrolases na natureza e destas, 90% são produzidas por micro-organismos através de processos

fermentativos. Depois das carboidrases e proteases, as lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3), pertencentes à superfamília das serino-hidrolases, constituem o terceiro maior grupo em vendas no mundo (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016). As lipases constituem um dos maiores mercados de crescimento no setor de enzimas devido às suas vantagens industriais. Nas indústrias de alimentos e não alimentares, as lipases são utilizadas com a função de potencializadores de vida de prateleira, aromatizantes, espessantes, agentes de limpeza, entre outros. Lipases também são de grande importância em formulações de alimentos para animais e, além disso, as lipases são usadas para fins farmacêuticos, médicos e de diagnóstico (ZHU *et al.*, 2013).

Lipases são biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, desta forma o mercado global dessas enzimas está projetado para alcançar US\$ 590,5 milhões em 2020, um crescimento de 6,5% entre 2015 e 2020 (Figura 1.1) (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016).

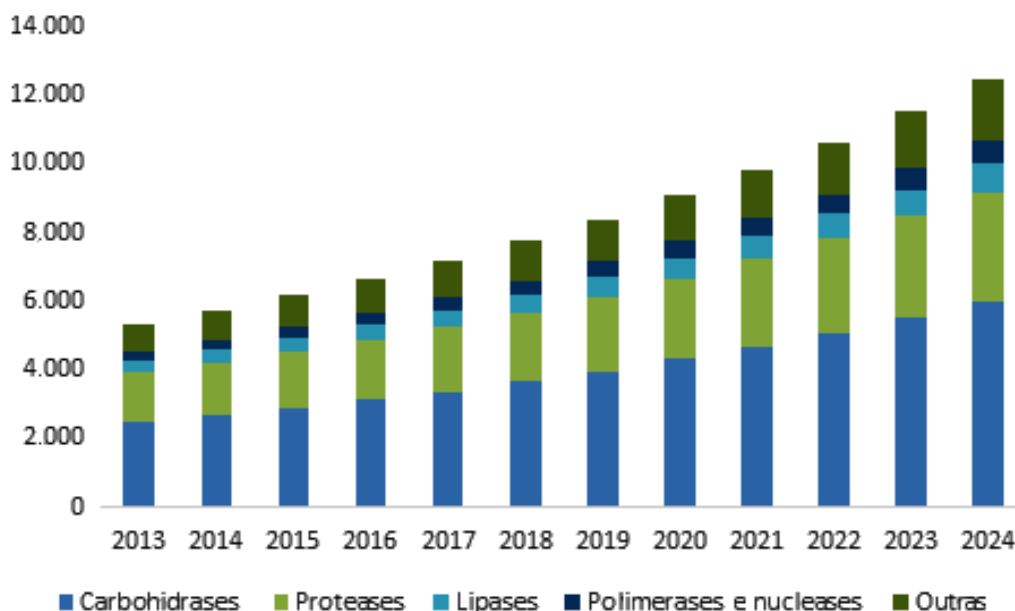


Figura 1.1 - Mercado mundial de enzimas com valores de 2013 a 2015 e previsão até 2024. Valores em Bilhões de dólares americanos (US\$). Adaptado de Global Market Insights (2016)

Apesar do crescimento da procura mundial por enzimas, apenas cerca de 200 de 4000 tipos de enzimas estão disponíveis comercialmente no mercado global. Destas 200 enzimas, apenas cerca de 20 tipos são produzidos em massa. As várias dificuldades que impedem a industrialização de enzimas são: (i) atualmente é difícil encontrar enzimas com alto rendimento, alta atividade, e alta estabilidade; (ii) as enzimas utilizadas para fins de medicamentos e alimentos devem passar por várias fases de ensaios clínicos e aprovação de órgãos do governo, por exemplo, *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil, um processo demorado e caro; e (iii) enzimas para outros fins, tais como detergentes, exigem testes rigorosos e aprovação pelos setores do governo por lidar com a segurança ambiental (TAN *et al.*, 2015).

Apesar de todas as vantagens citadas sobre a utilização de lipases em comparação com processos químicos, ainda existem problemas e desafios a serem resolvidos no desenvolvimento de processos de aplicações destas enzimas, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção e de purificação das enzimas (quando requerida) torna os processos enzimáticos mais caros do que os processos químicos convencionais. Além disso, a existência de enzimas com propriedades requeridas no processo, como alta atividade e estabilidade em condições consideradas não-naturais (meios aquo-restritos e altas temperaturas, por exemplo), é sempre limitada.

O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo com menos de 1% do total mundial (16º com US\$ 45 milhões anuais), revela grande potencial devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e de celulose, além de sua grande vantagem em biodiversidade. A redução do custo de produção de enzimas pode ser favorecida pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como óleos não alimentícios e de resíduos, farelos

de trigo e soja e ao desenvolvimento de estudos de novos micro-organismos produtores de enzimas de interesse com alto rendimento

Este trabalho trata da produção de lipases pela cepa bacteriana *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 via fermentação submersa em frascos agitados e biorreator de bancada. Também foi estudada a sua purificação por métodos cromatográficos e não convencional de passo único, a caracterização cinética e bioquímica da enzima e estudos para aplicação desta lipase em processos biotecnológicos de interesse farmacêutico e industrial. Assim, este estudo contribui para o desenvolvimento do conhecimento em área de importância significativa dentro da biotecnologia, a tecnologia enzimática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipases

As lipases (E.C.3.1.1.3) têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases (GHALY *et al.*, 2010; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011; JAEGER; EGGERT, 2002; MAHADIK *et al.*, 2002; SAXENA *et al.*, 2003).

De maneira geral, as lipases apresentam atividade ótima na faixa entre 30 e 40 °C e embora suas características de termoestabilidade variem consideravelmente em função da

origem, as enzimas de origem microbiana são, normalmente, as mais estáveis; atuam em ampla faixa de pH apresentando uma alta atividade na faixa de pH entre 5 e 9, com um máximo situado entre 6 e 8; não requerem cofatores; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; VILLENEUVE *et al.*, 2000). A versatilidade destas enzimas sugere que sua cadeia polipeptídica seja flexível e possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e previsão de interações estereoquímicas enzima/substrato (BEN SALAH *et al.*, 2001; TOMIĆ *et al.*, 2004). Os sítios catalíticos das lipases são formados por uma serina, uma histidina e um resíduo ácido (aspártico ou glutâmico), compondo a denominada tríade catalítica (Figura 2.1) (BRADY *et al.*, 1990).

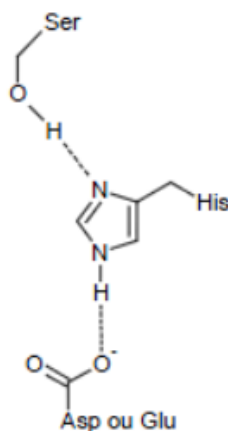


Figura 2.1 - Tríade catalítica de lipases formada por uma serina, uma histidina e um resíduo ácido (aspártico ou glutâmico)

As lipases exibem um fenômeno denominado ativação interfacial, no qual a ativação da enzima ocorre durante o contato com a interface água-óleo de uma mistura (CAJAL *et al.*, 2000; MATEO *et al.*, 2007). Muitas das lipases de estrutura conhecida apresentam em sua estrutura uma cadeia denominada *lid* ou “tampa” hidrofóbica. Nestas lipases, a cadeia na qual está inserida a histidina da tríade catalítica prolonga-se sobre o núcleo central de fitas

β e sobre o sítio catalítico, cobrindo o sítio como uma tampa (DEREWENDA *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1997). O fenômeno da ativação interfacial foi descrito por Holwerda, Verdake e De Willigen (1936) e Schønheyder e Volqvartz (1945). Medindo a atividade da lipase pancreática frente a tricaproína, os autores observaram que a hidrólise era enormemente aumentada quando a concentração do substrato excedia o limite de solubilidade.

Estruturas tridimensionais de algumas lipases bacterianas foram determinadas e encontram-se depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Entre elas estão as lipases de *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*, *Pseudomonas glumae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus cereus*. A Figura 2.2 mostra o modelo estrutural de uma lipase bacteriana.

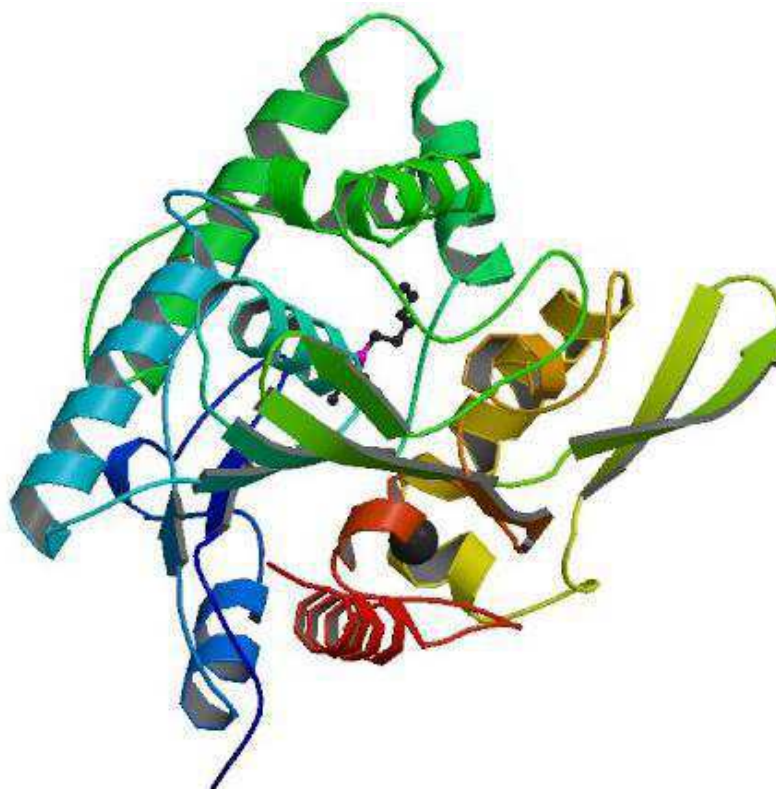


Figura 2.2 - Modelo estrutural da lipase de *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* complexada ao ácido hexilfosfônico (R)-2-metil-3-fenilpropil éster. Fonte: Protein Data Bank.

O mecanismo geral de catálise da lipase está ilustrado na Figura 2.3. Primeiramente, a serina é ativada por desprotonação, mecanismo pelo qual os resíduos de histidina e aspartato são requeridos. O grupo hidroxila do resíduo de serina ataca o carbono do grupo carbonila do substrato formando um intermediário de enzima acilado. Um tetraedro intermediário acil-enzima é formado durante o estado de transição do substrato, sendo o mesmo estabilizado na cavidade oxianiônica. Posteriormente, a desacilação é controlada pela eletronegatividade das moléculas da interface. Neste processo, um nucleófilo interage com composto intermediário proporcionando o desligamento da enzima e liberação do produto, regenerando-se o sítio ativo (REIS *et al.*, 2009).

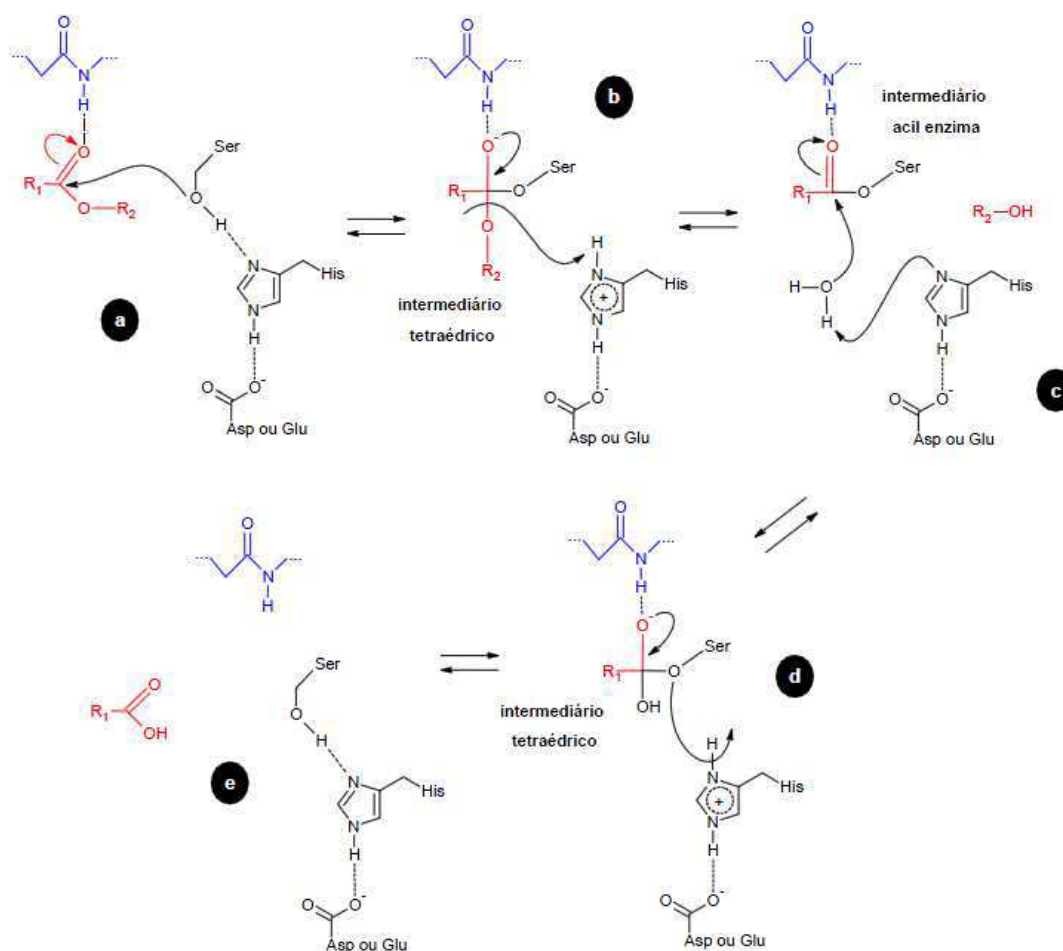


Figura 2.3 - Mecanismo de reação de hidrólise de ligações éster catalisada por esterases e lipases. A tríade catalítica e a água são visualizadas em preto, os resíduos do espaço oxianiônico em azul e o substrato em vermelho. (a) Ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono susceptível da ligação éster; (b) intermediário tetraédrico; (c) intermediário acil-enzima e ataque nucleofílico da água; (d) intermediário tetraédrico; (e) enzima livre. Modificado de Jaeger *et al.* (1994).

Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reação de hidrólise, com concomitante consumo de moléculas de água (Figura 2.3). Porém, as lipases também podem catalisar a reação inversa, ou seja, a formação de ésteres a partir de um álcool (como o glicerol) e um ácido carboxílico (como os ácidos graxos) com a liberação de moléculas de água, em um processo conhecido como esterificação. Estes dois processos básicos de hidrólise e esterificação podem ser combinados em um padrão sequencial para dar origem a um grupo de reações denominadas de transesterificação que, dependendo do substrato inicial, pode ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (entre um éster e um álcool) ou interesterificação (entre dois ésteres), sem que ocorra formação ou consumo de água. Além de outros processos de síntese como a aminólise (síntese de amidas) e a lactonização (esterificação intramolecular).

2.2. Fontes de obtenção de lipases

As principais fontes de obtenção de lipases para a utilização em larga escala, incluindo as aplicações industriais, têm sido os micro-organismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias), embora estas sejam produzidas também por eucariotos superiores (plantas e animais) (JAEGER *et al.*, 1994). Atualmente a biodiversidade de lipases com origem biológica são: bactérias (45%), fungos (21%), animais (18%), plantas (11%) e algas (3%) (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011). Devido às suas diversas fontes produtoras, cada lipase apresenta propriedades e características únicas (SAXENA *et al.*, 2003).

Há mais de cem anos, o microbiologista Christiaan Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (JAEGER; EGGERT, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre a produção de lipases utilizando diversos micro-organismos. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas por plantas e animais, tornando a sua produção mais conveniente e segura. Hoje se

conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipases (KANMANI; ARAVIND; KUMARESAN, 2014).

Vários gêneros de bactérias foram documentados na literatura como produtores de lipases, sendo *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* os mais proeminentes. Entre *Bacillus* spp, lipases com tolerância térmica têm sido relatadas a partir de bactérias termófilas (KAMBOUROVA *et al.*, 2003). Várias espécies de *Pseudomonas* exibem atividades lipolíticas extracelulares, sendo a tolerância a solventes orgânicos a característica mais notável observada em algumas destas lipases (KOJIMA; SHIMIZU, 2003; KUMAR *et al.*, 2016). As lipases produzidas pelas cepas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, principalmente as incluídas ao complexo *Burkholderia cepacia*, apresentam uma elevada estabilidade em solventes orgânicos (GUPTA *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016), altas temperaturas (RATHI *et al.*, 2000), ampla faixa de pH (UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2015; YAO *et al.*, 2013) e têm sido amplamente utilizadas na indústria de detergentes e na resolução de misturas racêmicas (LI *et al.*, 2013).

2.2.1. Complexo *Burkholderia cepacia*

Dentre as bactérias produtoras de lipases, comercialmente estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomonas*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis (Amano). O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

O complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc) compreende um grupo de organismos estreitamente relacionados que são muito versáteis. Os organismos podem ser explorados para fins de biocontrole, biorremediação e promoção de crescimento de plantas, mas sua

capacidade como bactéria oportunista para causar infecções humanas, em particular em pacientes com fibrose cística (FC), dificultando seu uso nessas aplicações biotecnológicas (ONG *et al.*, 2016; VANLAERE *et al.*, 2009). A taxonomia do Bcc evoluiu muito nos últimos anos (ONG *et al.*, 2016). A bactéria que era anteriormente denominada *Pseudomonas cepacia* foi reclassificada como *Burkholderia cepacia* e, mais tarde, descobriu-se que diferentes espécies relacionadas eram classificadas erroneamente com o mesmo nome, formando o Complexo *Burkholderia cepacia*.

Até o final dos anos 2010, o Bcc consistia em nove espécies com nomes válidamente publicados (VANLAERE *et al.*, 2009), e atualmente, o Bcc inclui 21 espécies (ONG *et al.*, 2016). As espécies de Bcc compreendem micro-organismos fenotipicamente indistinguíveis com elevada similaridade genética (> 97,5%) que é determinada utilizando a sequenciação do rDNA 16S.

O Bcc é um importante grupo na atual pesquisa sobre biotecnologia. As lipases das cepas pertencentes ao Bcc apresentam capacidade de biocatálise em meios de solventes orgânicos e são utilizadas para produção de biocombustíveis, reações quirais para produtos farmacêuticos e resoluções racêmicas (BARON *et al.*, 2014; KAWAKAMI; ODA; TAKAHASHI, 2011; MOURE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017), tornando-as altamente atraentes para aplicações em setores industriais diversificados.

Neste trabalho foi utilizada a cepa de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, bactéria pertencente ao complexo *Burkholderia cepacia*. O gênero *Burkholderia* é composto por bacilos retos, Gram negativos e de metabolismo aeróbico. Desenvolvem-se a uma temperatura ótima de 35 a 37 °C, podendo ser encontradas em diferentes habitats, como solo, água, ou em associação com plantas, fungos, insetos e outros animais, incluindo seres humanos. A espécie *B. lata* foi descrita em 2009 (VANLAERE *et al.*, 2009), não é ainda

detalhadamente estudada na literatura como produtora de lipases (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

Apesar de pouco exploradas em escala industrial, várias lipases produzidas por vegetais foram purificadas e estudadas quanto às suas características bioquímicas e quanto a potenciais aplicações na biotransformação de lipídios. Dentre as enzimas lipolíticas vegetais estudadas estão triacilglicerol lipases, acilhidrolases não específicas como as fosfolipases A1, A2 e B, glicolipases, sulfolipases e monoacilglicerol lipases, além das fosfolipases C e D (MUKHERJEE, 1994). Entre as espécies mais estudadas estão *Ricinus communis* (mamona), *Vernonia*, *Pinus* (pinheiro), *Brassica napus* (colza), *Cuphea racemosa* (HELLYER; CHANDLER; BOSLEY, 1999), *Euphorbia characias* e *Euphorbia wulfenii* (MOUAIMINE *et al.*, 2016) e de sementes como *Jatropha curcas* (pinhão manso), *Oryza sativa* (arroz) e *Zea mays* (milho) (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010), entre outras.

As lipases humanas incluem a gástrica e a pancreática, que ajudam na digestão e assimilação de lipídios na dieta; e as lipases hepática, a lipoproteína lipase (LPL) e a lipase endotelial, que atuam no metabolismo de lipoproteínas. Estas enzimas têm sido largamente estudadas devido às implicações que sua estimulação ou inibição têm sobre a saúde humana, notadamente sobre problemas associados com a obesidade (MILED *et al.*, 2000).

2.3. Produção de lipases

Lipases microbianas são na sua maioria extracelulares e sua produção é muito influenciada pela composição do meio de cultura, além de fatores físico-químicos tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O fator mais importante para a produção de lipases tem sempre sido relatado como as fontes de carbono, uma vez que podem atuar como indutoras. Estas enzimas são geralmente produzidas na presença de um lipídio, como óleos ou outros indutores, tais como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis,

tensoativos, sais biliares e glicerol (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; KANMANI; ARAVIND; KUMARESAN, 2014; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Fontes de nitrogênio, tanto orgânicas quanto inorgânicas, e micronutrientes essenciais, também devem ser cuidadosamente consideradas para o crescimento do micro-organismo e produção da enzima. Estes requisitos nutricionais são fornecidos ao micro-organismo pela adição ao meio de cultivo de ureia, sulfato de amônio, nitrato de amônio ou componentes complexos como extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte e peptona, além de resíduos agroindustriais como farelos de soja e trigo, casca de arroz, torta de mamona, milhocina, entre outros (TREICHEL *et al.*, 2010). A produção de alta atividade enzimática durante o cultivo do micro-organismo é imperativo para a aplicação industrial de lipases.

Vários substratos já foram testados com este intuito, incluído uma grande variedade de resíduos. A exploração destes substratos oferece os benefícios individuais de compensar a poluição ambiental associada à sua disposição, também ajuda a conservar os recursos naturais, além de serem de custo bastante reduzido e não competirem com fontes de alimento.

Neste sentido, a gordura animal tem a vantagem de possuir uma grande disponibilidade e baixo custo, sendo um resíduo do processamento da carne de abate. A gordura de frango é um produto residual da indústria de processamento de aves (ARNAUD *et al.*, 2004) e pode ser de grande utilidade para a obtenção de bio-produtos com elevado valor agregado, como as enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 2013, 2014; OLIVEIRA; LIMA, 2014). O custo médio da gordura de fango é de US\$ 0,60/L (USDA ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2016), 80% mais baixo do que o azeite, o substrato mais utilizado para a produção de lipase a partir de micro-organismos (BENJAMIN; PANDEY, 2001; HATZINIKOLAOU *et al.*, 1996; LO *et al.*, 2012; LONG *et al.*, 1996). Até à data, além do nosso grupo de pesquisa, nenhum outro trabalho na literatura tem relatado o uso da gordura

de frango para induzir a produção de lipases. A utilização da gordura de frango pode representar uma economia importante na produção da enzima, já que a fonte de carbono representa cerca de 50% do custo do meio de produção (MUKESH *et al.*, 2012).

A produção de lipases tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (FSM) devido aos aspectos de engenharia já dominados e bem desenvolvidos; está associada ao crescimento microbiano e, conseqüentemente, às variações da composição e condições do cultivo. Além de manter maior homogeneidade do meio de cultura durante todo o processo fermentativo, possibilita transferência de calor mais eficiente e a facilidade de controlar parâmetros como pH, temperatura e oxigenação. Entretanto, a principal desvantagem está no maior custo do processo (CORADI *et al.*, 2012; MESSIAS *et al.*, 2011; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; TREICHEL *et al.*, 2010). Estas enzimas também podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), no qual são utilizados substratos insolúveis com baixas porcentagens de água em sua composição, e tem algumas vantagens sobre a FSM, tais como permitir maior utilização de resíduos agrícolas, exige menor gasto energético, fácil arejamento do meio e recuperação da enzima já mais concentrada pelo menor uso de água (CORADI *et al.*, 2013; SINGHANIA *et al.*, 2009; TOSCANO *et al.*, 2014; TREICHEL *et al.*, 2010).

2.3.1. O uso de ferramentas estatísticas para otimizar a produção de lipases

Os meios de produção têm sido tradicionalmente otimizados variando um fator de cada vez, o que se torna complicado quando um grande número de variáveis estão envolvidas no processo, além de não indicar os efeitos da interação das diferentes variáveis testadas. Isto levou à aplicação de ferramentas estatísticas na otimização dos meios de cultura. As variáveis significativas que influenciam a produção de lipases podem ser selecionadas através de um delineamento Plackett-Burman (PB) ou delineamento fracionado, e suas

concentrações ideais e efeitos de interação dessas variáveis são inferidas a partir da metodologia de superfície de resposta (MSR) (RODRIGUES, IEMMA, 2005).

Delineamentos compostos centrais, PB e MSR têm sido amplamente aplicados em estudos de otimização de meios de cultura para produção de enzimas (CONTESINI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012; LIU; LU; CHANG, 2006; LO *et al.*, 2012; SIFOUR *et al.*, 2010; TENG; XU, 2008; WOLSKI *et al.*, 2008). Essas otimizações estatísticas de parâmetros de processos resultaram em uma melhoria da produção da lipase e reforçam a viabilidade do aumento de escala de produção e, conseqüente, de comercialização da enzima.

2.4. Purificação de lipases

A recuperação de lipases a partir do meio de produção envolve, rotineiramente, um primeiro passo de ultrafiltração e/ou precipitação com sulfato de amônio, seguido por purificação até a homogeneidade em colunas cromatográficas de troca iônica, utilizando geralmente dietilaminoetil (DEAE) como trocador aniônico e carboximetil (CM) como trocador catiônico, ou ainda grupos trocadores fortes como trietilaminoetil, em colunas Mono Q ou Q-Sepharose (LIMA, 2004), e de filtração em gel (TAN *et al.*, 2015). A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) também está presente na maioria dos protocolos de purificação, sendo utilizadas colunas com agarose com grupos octila ou fenila (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Algumas alternativas, como a extração aquosa em duas fases e extração por micelas reversas têm sido utilizados para a recuperação da enzima (GAIKAIWARI; WAGH; KULKARNI, 2012). De modo geral, para purificar lipases microbianas, alcançando rendimentos de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, de 4 a 5 passos de purificação são necessários (BRÍGIDA *et al.*, 2014; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; SAXENA *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2015).

Os métodos de purificação de lipases são dependentes do micro-organismo produtor, dos meios e condições de cultivo e das características da enzima. Como resultado desta diversidade, não há processos de purificação de aplicação geral. Assim sendo, enzimas produzidas por cepas diferentes do mesmo micro-organismo podem apresentar propriedades distintas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; TAN *et al.*, 2015). Consequentemente, a definição das operações de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes, sendo obrigatório o estudo de técnicas de purificação individualizadas para cada lipase.

Desta maneira, o processo geral de purificação de proteínas pode ter, mesmo na melhor das hipóteses, um impacto econômico negativo no custo final do biocatalisador. O processo de *dowstream* de lipases, ou seja, a bioseparação e a recuperação do produto final, pode ser responsável por até 80% dos custos totais de produção. Dessa forma, muitos métodos tradicionais não são mais usados devido ao seu custo elevado, de vida curta e efeitos indesejáveis ao ambiente (VALETTI; BRASSESCO; PICÓ, 2016).

A fim de estabelecer um processo biotecnológico competitivo para a purificação de enzimas, alguns grupos de pesquisa buscam desenvolver metodologias não convencionais de separação de biomoléculas, como a utilização de micelas reversas (GAIKAIWARI; WAGH; KULKARNI, 2012), separação em duas fases utilizando polietilenoglicol e sais (JIN *et al.*, 2012), imunopurificação, utilização de polieletrólitos e a sua capacidade para formar complexos não-solúveis com proteínas (VALETTI; BRASSESCO; PICÓ, 2016), imobilização e resuspensão controladas (KAMBOUROVA *et al.*, 2003), entre outros. A busca por novas técnicas de bioseparação é um processo contínuo e na maioria das vezes individualizado, buscando sempre a melhor eficiência, com altas recuperações e baixo custo.

2.5. Características bioquímicas de lipases

Como já discutido, lipases de várias fontes têm sido isoladas e caracterizadas. De maneira geral, a massa molar de lipases bacterianas varia entre 25 e 60 kDa. A lipase de menor estrutura conhecida pertence à bactéria anaeróbica *Propionibacterium acidipropionici* que apresentou massa molecular entre 6,0 e 8,0 kDa (SARADA; JOSEPH, 1992). A exceção de massa molecular mais alta pode ser representada pelas lipases das bactérias psicrótróficas isoladas de sedimentos de mar profundo do oeste do Oceano Pacífico, *Psychrobacter* sp. wp37 e *Pseudoalteromonas* sp. wp27, com massas moleculares de 85 kDa (ZENG *et al.*, 2006). Lipases são aniônicas com o ponto isoelétrico variando entre 4,0 e 10,0 (LIMA, 2004).

Lipases são cataliticamente ativas apenas em determinados valores de pH, em função da sua origem e o estado de ionização dos aminoácidos nos seus sítios ativos. Resíduos básicos, ácidos e neutros podem estar incluídos nos sítios ativos das lipases e, portanto, os resíduos no local catalítico são ativos apenas em um estado de ionização particular. O pH ótimo para a maioria das lipases situa-se entre 7,0 e 9,0, embora algumas lipases possam ser encontradas como bastante ativas em uma vasta gama de valores de pH, de ácido a alcalino entre 4 e 10 (LIMA, 2004; ÖZTÜRK, 2001). Existem lipases que atuam em ampla faixa de pH, como a de *Staphylococcus epidermidis* (pH entre 2,0 e 10,0) (SIMONS *et al.*, 1998). Para a estabilidade, os resultados são diversos, provavelmente devido às diferenças quanto ao tempo e temperatura de incubação. Além de estabilidade na faixa básica, também verifica-se estabilidade em valores de pH fortemente ácidos (pH 2,0) a fortemente alcalinos (pH 12,0). São exemplos de lipases bacterianas estáveis em ampla faixa de pH as produzidas por *Bacillus megaterium* estável entre pH 4,0 e 12,0 (RUIZ *et al.*, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* LX1 estável entre pH 4,5 e 12,0 (JI *et al.*, 2010), *Pyrobaculum calidifontis* VA1

estável entre pH 3,0 e 9,0 (HOTTA *et al.*, 2002) e *Bacillus thermoleovorans* CCR11 estável entre pH 3,0 e 10,0 (CASTRO-OCHOA *et al.*, 2005; ESPINOSA-LUNA *et al.*, 2016).

A estabilidade térmica é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas de temperatura em torno de 50 °C ou superiores. Lipases oriundas de bactérias termofílicas tem papel importante na indústria devido à elevada estabilidade em altas temperaturas (JAEGER; REETZ, 1998). Lipases psicofílicas também merecem atenção, pois apresentam elevada atividade em temperaturas muito baixas, propriedade esta de grande importância na síntese de determinados intermediários orgânicos quirais termossensíveis (MESSIAS *et al.*, 2011).

Não existe um protocolo padrão para determinar a termoestabilidade de lipases, tornando difícil a comparação entre elas e o estabelecimento de regras gerais. O que se observa é que a estabilidade destas enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (LIMA, 2004; SALUM, 2010). Há alguns exemplos de lipases estáveis em temperaturas acima de 70 °C, como as lipases de *Pseudomonas cepacia* (SUGIHARA; TANI; TOMINAGA, 1991), da bactéria *Streptomyces coelicolor* (CÔTÉ; SHARECK, 2008) e *Pyrococcus furiosus* (BRANCO *et al.*, 2010); e acima dos 90 °C como a lipase de *Burkholderia* sp., com tempo de meia vida acima de 13 h a 90 °C (RATHI *et al.*, 2000) e a 100 °C como a carboxilesterase de *Pyrobaculum calidifontis* (HOTTA *et al.*, 2002).

As lipases possuem uma ampla especificidade e seletividade de substrato. Há uma diferença muito sensível entre especificidade e seletividade da enzima, sendo a especificidade de substrato a capacidade da enzima em converter eficientemente o substrato em produto. Esta natureza da enzima depende do tipo de aminoácidos presentes no sítio ativo e as interações eletrostáticas durante o estado de transição. Enquanto que a seletividade é a

capacidade da enzima em discriminar entre dois substratos. Isso depende da disposição e orientação dos aminoácidos no sítio ativo (GUPTA *et al.*, 2015; SCHMITT *et al.*, 2002).

A especificidade das lipases é um fator determinante para suas aplicações industriais. A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN, 1983). As lipases podem ser divididas em três grupos de acordo com as suas especificidades: i) quanto ao substrato: uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis; ii) posicional: lipases *sn*-1,3 específicas, lipases *sn*-1,2(2,3) específicas ou lipases não específicas, liberando ácidos graxos das três posições do TAG; iii) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato: seletividade por tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão; iv) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação de todos estes tipos citados (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; LIMA, 2004).

As características de enantiosseletividade e enantioespecificidade das lipases permitem a obtenção de produtos opticamente puros, como, por exemplo, a síntese de drogas enantio-puras, o que é extremamente vantajoso já que, em muitos casos, normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica (GÜLTEKIN *et al.*, 2004).

2.6. Lipases e as biocatálises

A maioria das reações orgânicas podem ser realizadas utilizando catalisadores químicos ou biocatalisadores. Uma das grandes vantagens do uso de enzimas em relação aos catalisadores químicos é a redução de gasto de energia e consequente diminuição do impacto ambiental, além da obtenção de produtos mais puros e de maior qualidade (KLIBANOV, 2001; PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005).

Entre os processos bioquímicos de maior interesse industrial estão as reações catalisadas pelas lipases, as quais representam cerca de 20% das biotransformações industriais realizadas atualmente (DAIHA *et al.*, 2015), há 20 anos essa parcela era inferior a 3% (CASTRO; ANDERSON, 1995).

As principais reações catalisadas pelas lipases, além da hidrólise, são: esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (WU; JEISKELIINEN; LINKO, 1996). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (esterificação, síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. Do ponto de vista biotecnológico, a utilização de sistemas reacionais em solventes orgânicos apresenta muitas vantagens, como alta solubilidade dos substratos e produtos, reversão da reação hidrolítica e modificação da especificidade da enzima (KLIBANOV, 2001; YAO *et al.*, 2013; ZAKS; KLIBANOV, 1988), o que justifica a pesquisa sobre a utilização de enzimas em ambientes “aquo-restritos”. A princípio, a capacidade de catalisar reações em meio de solvente orgânico foi descrita como característica principalmente de lipases. Atualmente, diversas enzimas são utilizadas em escala industrial em reações sintéticas e de isomerização, como a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose, pela ação da xilose isomerase, que catalisa a isomerização de D-glucose a D-frutose; e a preparação de penicilina semi-sintética catalisada pela penicilina amidase (SCHMID *et al.*, 2002). Apesar das vantagens do emprego de sistemas não aquosos para biocatálises, as enzimas geralmente mostram baixa atividade catalítica nestes meios em comparação com soluções aquosas nativas. Portanto, ainda existem muitos problemas e desafios relacionados com a aplicação de enzimas em meio de solvente orgânico.

Os principais produtos obtidos por reações de síntese utilizando lipases são: isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, os quais são comumente empregados no setor farmacêutico, como, por exemplo, em formulação de cosméticos e

outros produtos de higiene. Os ésteres de carboidratos também são obtidos em reações de esterificação e são empregados na produção de aromas, de óleos essenciais e biocombustíveis (BADGUJAR; BHANAGE, 2014; GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016; JAEGER; EGGERT, 2002; KHAN; RATHOD, 2015; SASSO *et al.*, 2016; SVENDSEN *et al.*, 2012).

Além da capacidade natural das lipases "convencionais" em catalisar a síntese de ésteres diversos, um grupo de lipases/aciltransferases catalisa preferencialmente a alcoólise mesmo em meio aquoso (NEANG *et al.*, 2013). Esta propriedade particular torna as lipases ainda mais interessantes para o desenvolvimento de biocatalisadores industriais para a síntese de derivados lipídicos.

2.7. Aplicações biotecnológicas de interesse industrial das lipases

Em 1989 o mercado global de lipases era de cerca de US\$ 24 milhões, hoje está em torno de US\$ 555 milhões com projeção de alcançar US\$ 590 milhões em 2020 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016). Este crescimento deve-se à seleção de novas lipases, ao desenvolvimento de novas técnicas de produção e isolamento da enzima, bem como ao desenvolvimento de processos de biocatálise que se tornaram de grande interesse industrial, como discutido até aqui.

Lipases são um importante grupo de enzimas industrialmente valiosas devido à sua natureza versátil e são a escolha preferida para a química orgânica, área farmacêutica, biotecnológica e microbiológica. As aplicações industriais de lipases são revisadas várias vezes por muitos autores, no entanto, a literatura é tão grande que é difícil compreender tudo em um só lugar. Aqui é feito um breve relato das principais aplicações das lipases microbianas.

2.7.1. Indústria de alimentos e produtos lácteos

A maioria das enzimas utilizadas na indústria são para processamento de alimentos, principalmente para a modificação e degradação de biomateriais (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007). A maioria das lipases comerciais produzidas é utilizada para o desenvolvimento do sabor em produtos lácteos e processamento de outros alimentos, como carnes, legumes, frutas, alimentos cozidos e cerveja (NAGODAWITHANA; REED; STEVE, 1993). Nessas indústrias, as lipases com alta especificidade têm múltiplas utilizações, incluindo a modificação de óleos e gorduras, a síntese de ésteres de ácidos graxos, lipídios estruturais e lipídios de baixo teor calórico (GUPTA *et al.*, 2015).

Óleos e gorduras constituem um dos principais grupos alimentares da dieta humana e, portanto, alimentos com baixo teor de colesterol e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são desejáveis para torná-los mais saudáveis. A este respeito, mais de um milhão de toneladas de óleos e gorduras passam por tratamentos químicos de hidrólise, esterificação, acidólise, interesterificação e transesterificação com esta finalidade (RAY, 2012). Como já discutido, estes processos químicos requerem altas temperaturas e pressões e, muitas vezes, reações laterais introduzem impurezas ao produto. Entre todas as conversões lipolíticas, a esterificação e a interesterificação são amplamente utilizadas para formar produtos de alto valor agregado, tais como a produção de di- ou mono-gliceróis especiais contendo ácidos graxos especiais em sua composição, como o enriquecimento de óleos com PUFA e ácido oleico (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010); síntese de triacilgliceróis estruturais (RAY, 2012; TORCELLO-GÓMEZ *et al.*, 2011); e substitutos da manteiga de cacau e da gordura do leite humano (ZHAO; HUO, 2011; ZOU *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2012).

Quando livres, os ácidos graxos conferem sabor e aroma peculiares aos alimentos de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e seu grau de insaturação (KEAST; COSTANZO, 2015). São obtidos a partir da hidrólise enzimática parcial ou seletiva de óleos e gorduras presentes em diferentes alimentos. Assim, lipases e proteases têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de aromas em queijos e derivados, bebidas alcoólicas, achocolatados e sobremesas, pela hidrólise seletiva de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos que atuam como flavorizantes ou como precursores destes (JAEGER; REETZ; 1998). As lipases também têm sido empregadas na obtenção de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico e o ácido α -linolênico (MESSIAS *et al.*, 2011). Também são aplicadas na desacetilação da quitosana para a produção de oligossacarídeos (LEE; XIA; ZHANG, 2008) e na incorporação de antioxidantes em óleos (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2004).

Na indústria de panificação, há um foco crescente nas enzimas lipolíticas. As lipases e fosfolipases podem ser usadas para substituir ou complementar emulsificantes tradicionais na panificação, uma vez que as enzimas degradam os lipídios do trigo para produzir compostos mais polares com propriedades emulsificantes *in situ* (COLLAR *et al.*, 2000; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

2.7.2. Indústria de detergentes

Após o grande sucesso comercial de proteases como aditivos em detergentes, o setor industrial realizou grandes esforços para introduzir lipases como um segundo grupo de enzimas nestes produtos. Atualmente, enzimas são encontradas em toda formulação de detergentes nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (VERMA *et al.*, 2012). O uso de lipases como aditivos ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). A lipase de *Thermomyces* sp., é a mais importante lipase utilizada em detergentes (Lipolase,

Novozymes) (MESSIAS *et al.*, 2011; VERGER *et al.*, 2005). A atividade ótima em pH alcalino e temperaturas mais elevadas são características que tornam lipases como uma opção atraente para esta finalidade (LI *et al.*, 2014).

2.7.3. Indústria farmacêutica

As propriedades fundamentais de lipases exploradas neste setor são a estereoespecificidade e enantiosseletividade. Lipases estereosseletivas são utilizadas para sintetizar as moléculas bioativas, enquanto enzimas enantiosseletivas são usadas para purificar o respectivo enantiômero que manifesta a bioatividade (RAY, 2012). Por exemplo, o (S)-Ibuprofeno [Ácido (S)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanóico] pode inibir a síntese de prostaglandinas de maneira 160 vezes mais eficientemente do que a sua forma R. Esta resolução é um exemplo em que se pode utilizar lipases (CARVALHO; CONTESSINI; IKEGAKI, 2006; CHEN; TSAI, 2000). Subsequentemente, esforços têm sido realizados para obtenção de racematos opticamente puros através de síntese química assimétrica ou resolução enzimática. A resolução enzimática é preferida devido à sua alta enantiosseletividade, fácil separação dos subprodutos e taxa mais rápida de purificação quiral (MUSTER, 1992; PATEL; BANERJEE; SZARKA, 1995).

A produção de lactonas sintéticas por lipases constitui outra importante aplicação destas enzimas na indústria farmacêutica. Lactonas apresentam atividade citotóxica contra células de melanoma e de tumor de cólon e apresentam efeito inibitório sobre a síntese do colesterol (KOBAYASHI, 2006; XIA *et al.*, 2014).

Na indústria cosmética, uma ramificação da indústria farmacêutica, a utilização das enzimas vem se intensificando, não apenas na síntese de matérias-primas, mas também como ingredientes ativos nas formulações. Vários exemplos de síntese de fragrâncias utilizando lipase foram relatados, com (-)-mentol sendo o mais proeminente. Uma nova forma de isolar

ésteres de (-)-mentol enantiomericamente puros é através de uma etapa de transesterificação com (±)-mentol usando lipases de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (ATHAWALE; MANJREKAR; ATHAWALE, 2001) e *Thermomyces lanuginosus* (DE YAN; LI; WANG, 2015). O produto final metacrilato de metila foi subsequentemente polimerizado para ser usado como um perfume de liberação sustentada.

Lipases também podem ser utilizadas diretamente como agentes terapêuticos, no tratamento de insuficiência pancreática exócrina, cuja suplementação é feita com pancreatina (extraída de pâncreas suíno ou bovino) ou pancrelipase (maior nível de pureza e extraída somente de pâncreas suíno). Considerações detalhadas são feitas a seguir.

2.7.4. Utilização de lipases como agentes terapêuticos

O uso terapêutico de lipases remonta ao final do século XIX, quando preparações brutas de enzimas pancreáticas de origem suína já eram empregadas como auxiliares digestivos (CRUZ *et al.*, 2008).

Das doenças genéticas que, na maioria dos casos, levam a óbito ainda na infância, a Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum entre os indivíduos caucasianos, com uma incidência na Europa e EUA que oscila entre 1:2.000 e 1:8.000 nascidos vivos. As pessoas com FC desenvolvem doença pancreática, hepática, intestinal, canais deferentes e pulmonar (ROWE; MILLER; SORSCHER, 2005).

Aproximadamente 90% dos pacientes com FC sofrem de obstrução do ducto pancreático associado à insuficiência pancreática exócrina (IPE) (HEUBI *et al.*, 2016; MASCARENHAS, 2003; TAYLOR *et al.*, 2016). Má absorção de gordura é o mau funcionamento digestivo mais importante na IPE e está associada com dor abdominal, esteatorreia, flatulência, diarreia e déficits nutricionais e das vitaminas lipossolúveis A, D,

E e K. A má absorção provoca falhas no desenvolvimento e crescimento em crianças e perda de peso em adultos (BAKER, 2009; HEUBI *et al.*, 2016; WILSCHANSKI, 2015).

Suplementação de enzimas exógenas é o tratamento de escolha para a IPE e as enzimas pancreáticas têm sido utilizadas para o tratamento de FC desde a descrição da doença em 1938 (STEAD *et al.*, 1987; STERN *et al.*, 2000; SVENDSEN *et al.*, 2012). Tratamento de má absorção requer a entrega de atividade enzimática suficiente no lúmen duodenal simultaneamente com uma refeição. Para alcançar este objetivo, uma dose de 25.000 a 40.000 U/refeição de atividade de lipase pancreática é necessária para adultos (KELLER; LAYER, 2005; OOI *et al.*, 2016).

A digestão de lipídios no ser humano adulto é realizada por 3 lipases distintas, começa na boca, com a ação da lipase lingual, secretada pelas glândulas salivares, catalisando a reação de quebra dos TAG em DAG até o estômago. No estômago existe a secreção de uma lipase na mucosa fúndica do estômago, a lipase gástrica. Ela tem um pH ótimo de 3,0 a 6,0. Esta lipase, ao contrário de lipases alcalinas, não necessita de sais biliares ou colipase para atuar. As lipases ácidas da boca e estômago respondem por até 40% da hidrólise que ocorre durante a digestão de lipídios em adultos (ARMAND, 2007).

A quebra dos lipídios restantes continua no duodeno com a ação sinérgica de secreções biliares e pancreáticas (entre 30 e 75% de hidrólise dos TAG) (IQBAL; HUSSAIN, 2009; PHAN; TSO, 2001). A lipase pancreática, que exige a presença de colipase para promover a digestão de TAG na presença de sais biliares, é a principal enzima envolvida na digestão duodenal. Devido à especificidade *sn*-1,3 da lipase pancreática, há conversão de TAG para monoacilgliceróis 2 (MAG-2) e ácidos graxos livres que são solubilizados por sais biliares e, em seguida, absorvidos pelas células intestinais. Sua deficiência pode reduzir consideravelmente a capacidade de digerir e absorver lipídios, resultando na excreção de quantidades excessivas de gorduras nas fezes, a esteatorreia. Em

condições normais, a excreção fecal de gordura do homem é inferior a 6 g por dia (BERTON *et al.*, 2012; BOURLIEU *et al.*, 2015).

A lipase pancreática é uma enzima cuja suplementação pode ser benéfica nos casos da esteatorreia, má indigestão, doença celíaca, fibrose cística, diabetes tipo I ou II e doença de Crohn. Ensaios clínicos demonstraram que a suplementação com enzimas pancreáticas diminuiu a excreção de gordura fecal após 2 a 4 semanas de tratamento, controlando a esteatorreia e, principalmente, a desnutrição (BARTEL *et al.*, 2015; SAFDI *et al.*, 2006; WHITCOMB *et al.*, 2015; WHITCOMB; LOWE, 2007). Contudo, o tratamento com enzimas pancreáticas exógenas, administradas como comprimido de enzima convencional e formulações em cápsula, é complicado devido à degradação causada pelo meio ácido contendo pepsina do interior do estômago, não possuem a mesma regiosseletividade natural da lipase pancreática humana e são isoladas e purificadas de pâncreas suíno e bovino, dificultando sua obtenção, purificação, elevando os custos e diminuindo o rendimento (BAKER, 2009; HEUBI *et al.*, 2016). Outra limitação do uso de extrato de pâncreas é a ocorrência de distúrbios gastrintestinais e hiperuricosúria ou hiperuricemia devido ao seu alto conteúdo de purina (HEUBI *et al.*, 2016; KONSTAN *et al.*, 2013).

Desta maneira, lipases microbianas estáveis e ativas em pH ácido, regiosseletivas, resistentes à hidrólise por proteases digestivas e com atividade na presença de sais biliares, podem representar alternativas terapêuticas superiores e existem patentes sobre este assunto (PIRONTI; RONDA; BOLTRI, 2014; SCHULER; SCHULER, 2011; SVENDSEN *et al.*, 2012). Assim, podemos procurar lipases terapêuticas produzidas por micro-organismos, como os fungos e algumas bactérias, que são valorizados porque produzem enzimas extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio fermentativo.

Diversos requisitos devem ser considerados para o uso de enzimas com fins terapêuticos, dentre eles a baixa resposta imunológica, alta atividade e estabilidade em pH

fisiológico, baixa taxa de eliminação e independência de cofatores. Além disso, quando se utilizam micro-organismos como fonte destas moléculas, deve-se buscar cepas não patogênicas objetivando evitar a presença de toxinas (GURUNG *et al.*, 2013; NETO, 2001).

Enzimas especiais exigem alto nível de pureza em decorrência da sua aplicação, assim, uma sequência de processos de purificação é necessária até a obtenção final da enzima. Como o processo de purificação é sofisticado e de extrema complexidade, o custo desta etapa pode representar até 80% do custo do produto final (VALETTI; BRASSESCO; PICÓ, 2016).

No Brasil, as enzimas para uso terapêutico e/ou farmacêutico são predominantemente importadas enquanto que essa classe de enzimas produzidas aqui é exportada em uma quantidade muito menos expressiva. No período de 2005 a 2014 o Brasil importou o equivalente a US\$ 863,9 milhões com uma taxa média de crescimento anual de 21% e exportou US\$ 365,8 milhões com taxa de crescimento anual de 18% (THE ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2016), o que corresponde a 70% de importação. Na última década o crescimento do mercado de enzimas no Brasil obteve um crescimento vertical (Figura 2.4). Dentro destas, as enzimas terapêuticas são responsáveis por grande parte do mercado neste período, contando com uma importação de US\$ 112 milhões (20%), sendo que as indústrias brasileiras que mais importaram e exportaram enzimas foram as de diagnóstico e as farmacêuticas (THE ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2016).

A produção de Pancreatina, especificamente, deverá atingir 2.556 toneladas produzidas e comercializadas em 2016, com um aumento de 4% em relação ao nível do ano anterior. O tamanho do mercado global de pancreatina é estimado para crescer de US\$ 72,1 milhões em 2011 para US\$ 89,18 milhões em 2016, cerca de 24% de crescimento em apenas 5 anos (GEN CONSULTING COMPANY, 2016).

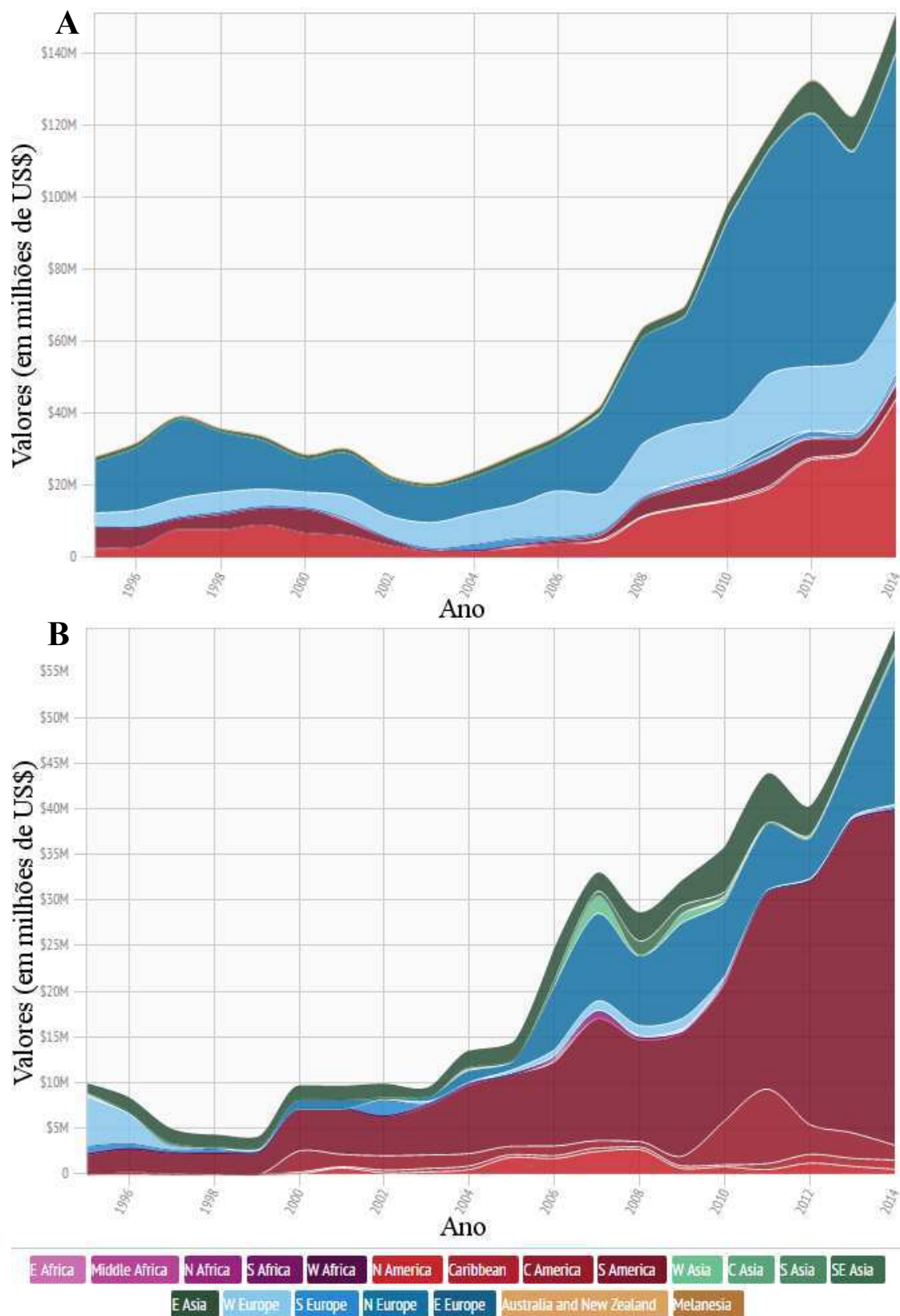


Figura 2.4 - Balança comercial referente à importação (A) e exportação (B) de enzimas no Brasil no período de 1995 a 2014. Valores em milhões de dólares americanos (US\$). Fonte: (THE ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY, 2016)

2.7.5. Outras aplicações

As possibilidades de aplicações das lipases na indústria oleoquímica são enormes. Pesquisas acerca da produção de biodiesel utilizando lipases através da transesterificação de triacilgliceróis com álcoois de cadeia curta tem crescido significativamente nos últimos anos. As lipases também têm sido testadas na produção de biodiesel por transesterificação a partir de diferentes óleos vegetais e metanol ou etanol (DUSSAN *et al.*, 2010; XIE; MA, 2010). O biodiesel é um monoalquil éster de ácidos graxos, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição parcial ou integral dos combustíveis fósseis, como, por exemplo, o diesel. O biodiesel apresenta baixa toxicidade, é isento de compostos aromáticos e possui propriedades semelhantes ao diesel comum, além de baixo risco de explosão e ação como ótimo lubrificante (COSTA NETO *et al.*, 2000).

Na indústria têxtil, as lipases são usadas para facilitar a remoção de lubrificantes, a fim de promover uma melhor absorção da tinta no tecido. As fibras sintéticas modificadas enzimaticamente são utilizadas para a produção de fios e tecidos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Nas indústrias de fabricação de couro são comumente utilizadas proteases e lipases. Essas enzimas têm sido utilizadas principalmente na etapa de desengraxe como alternativa aos tensoativos e solventes, não interferindo na estrutura do produto final apenas hidrolisando a gordura (DE SOUZA; GUTTERRES, 2012).

As lipases também são utilizadas na indústria de papel e celulose para remoção de triacilgliceróis e ceras, removendo componentes hidrofóbicos que causam problemas no processo de fabricação do papel (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; PANDEY *et al.*, 1999; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

Na área ambiental, as lipases podem ser aplicadas na remoção de óleos presentes nas águas residuais de fábricas, restaurantes ou residências, ou provenientes de indústrias de refinação de óleos que poluem solos e água. A aplicação de micro-organismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo também é sugerida como uma alternativa de biorremediação (BALAJI; ARULAZHAGAN; EBENEZER, 2014; JAEGER; EGGERT, 2002; VERMA *et al.*, 2012).

Os custos para o emprego de lipases em indústrias ainda é elevado, sendo que estas enzimas devem ser ativas e estáveis em pH, temperatura, solventes e condições específicas otimizadas para cada processo. Uma opção para diminuir os custos está no uso de lipases imobilizadas, que dependerá do desenvolvimento de técnicas e materiais apropriados, mantendo as propriedades cinéticas específicas destas enzimas. Outras alternativas estariam vinculadas ao isolamento e seleção de cepas microbianas selvagens, dada a vasta biodiversidade existente, principalmente no Brasil, que certamente fornecerá micro-organismos que possuam lipases com as características desejadas para uso nos diversos processos biotecnológicos. Além do desenvolvimento de novas técnicas para produção (*upstream*) e purificação (*dowstream*) de enzimas que sejam mais rápidas, eficientes e, principalemnte, com custo reduzido.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar a lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, visando a sua utilização em processos de biocatálise de interesse industrial.

Este objetivo geral foi desenvolvido por meio de várias etapas, que compõem os objetivos específicos deste trabalho, a saber:

- Produzir o extrato enzimático por fermentação submersa em meio de cultura otimizado, utilizando frascos agitados e biorreator;
- Desenvolver e otimizar protocolos de purificação, utilizando-se de técnicas cromatográficas de filtração em gel e de interação hidrofóbica e metodologia inovadora não convencional;
- Caracterizar a cinética e a bioquímica da lipase produzida por *B. lata* LBBIO-BL02, pela determinação das constantes cinéticas, da estabilidade e da massa molar, tanto no extrato precipitado como na enzima purificada;
- Determinar a régio- e a enantiosseletividade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 e sua atividade frente a diferentes substratos, naturais e sintéticos;
- Avaliar o potencial de aplicação da lipase de *B. lata* em biocatálise, verificando sua estabilidade frente a solventes orgânicos hidrofílicos e hidrofóbicos;
- Avaliar a aplicação da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 em processos de biocatálise de interesse farmacêutico e industrial com experimentos específicos:
 - Obtenção de ésteres de aroma;
 - Obtenção de ácidos graxos epoxidados;
 - Atividade de aciltransferase em reações de esterificação e transesterificação em ambiente aquoso e orgânico;
 - Atividade de galactolipase *in situ*;
 - Auxiliar digestivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa aqui apresentada foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis. Parte dos experimentos específicos de caracterização e aplicação foram realizados em parceria com o Dr. Pierre Villeneuve e o Dr. Jérôme Lecomte no *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD) em Montpellier, França, e o Dr. Frédéric Carrière no *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse* (EIPL) no *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) em Marselha, França.

4.1. MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

A cepa bacteriana LBBIO-BL02 foi isolada em nosso laboratório em uma contaminação da cultura fúngica e identificada por métodos morfológicos e moleculares (16S rRNA) na Fundação André Tosello (FAT).

A bactéria, identificada como *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, foi repicada em meio LB (Luria Bertani), em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura, mantidos a 29 °C, sob agitação orbital de 180 rpm até atingir a ordem de 10^8 células/mL. Após crescimento, foi preparada uma suspensão de células com concentração de 10^8 cél/mL, adicionada de glicerol de modo a se obter uma suspensão a 20% de glicerol. Essa suspensão foi dividida em criotubos mantidos em ultra freezer a -80 °C.

4.2. PRODUÇÃO DA ENZIMA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

4.2.1. Fermentação submersa sob agitação orbital

O cultivo foi iniciado com o pré-inóculo da bactéria em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio LB com o tempo de incubação de cerca de 48 h (até a

ordem de 10^8 células/ml) a 30 °C e sob agitação orbital de 180 rpm. Foi transferido 1 mL da cultura para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de fermentação, os quais foram mantido sob as mesmas condições previamente descritas. O meio de fermentação padrão foi composto de K_2HPO_4 (1,0 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L); NaCl (0,38 g/L) e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01 g/L), com pH de 6,4. As fontes de C e N foram variadas de acordo com o ensaio. O crescimento bacteriano foi monitorado durante a fermentação por contagem de células em câmara de Neubauer.

Após os ensaios de fermentação a biomassa foi separada por centrifugação a 8.500 g (HANIL, Supra R22), por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para ensaios de determinação de atividade enzimática e concentração de proteínas.

4.2.2. Efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por

B. lata LBBIO-BL02

Para a indução da produção de lipase pela bactéria em fermentação submersa foram utilizados gordura de frango e óleos vegetais: oliva, milho, soja, crambe, dendê e linhaça (10,0 mL/L) como fontes lipídicas de carbono contendo diferentes composições de ácidos graxos (Tabela 8.1, p. 114).

Para estudar a influência de fontes de nitrogênio na produção da enzima foram analisadas seis diferentes fontes de N orgânico e inorgânico utilizando um delineamento experimental fracionado 2^{6-2} (Tabela 2, Capítulo I). As fontes de N estudadas foram extrato de levedura, ureia, sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de amônio e fosfato de amônio. Gordura de frango (10,0 mL/L) foi utilizada como fonte de carbono padrão neste ensaio. A Tabela 2 (Capítulo I) mostra os fatores independentes (X_i), níveis e valores experimentais codificados (-1, 0 e +1) e não-codificados (valores reais) das variáveis.

A influência das concentrações das fontes de carbono (X_1) e nitrogênio (X_2) na produção de lipases por *B. lata* LBBIO-BL02 via fermentação submersa foi avaliada em um delineamento experimental 2^2 com 11 experimentos contendo quatro repetições do ponto central e quatro pontos axiais (Tabela 3, Capítulo I). As variáveis independentes e seus níveis foram fonte de C (0,0-25,0, mL/L) e N (0,0-12,0, g/L) utilizando meio de cultura padrão a 30 °C e 180 rpm. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.).

A resposta das variáveis, Y (atividade lipolítica, U/mL), pode ser aproximada pela equação polinomial:

DCCR 2^2 :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

onde: Y é a resposta predita, β_0 é o intercepto, β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente, e x_i e x_j representam as variáveis independentes.

A significância estatística do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA) e teste de Fisher (teste F). A qualidade da equação do modelo gerado foi avaliada estatisticamente pelo coeficiente R^2 . A equação polinomial ajustada foi então expressa na forma de gráficos de contorno tridimensionais, para ilustrar a relação entre as respostas e os níveis experimentais de cada variável independente

4.2.3. Efeito da temperatura e pH inicial na produção da lipase por *B. lata* LBBIO-BL02 em fermentação submersa

O efeito do pH inicial na produção da enzima foi avaliado em ensaios univariados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio padrão em diferentes valores de pH inicial (pH 3 a 12). O pH do meio foi ajustado ao valor desejado usando NaOH 1 mol/L ou HCl 1 mol/L antes do processo de esterilização.

Temperaturas de fermentação variando de 30 a 45 °C foram testadas em relação ao seu efeito na produção da enzima em dois diferentes tempos, 48 e 72 h de fermentação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata independentes.

4.2.4. Fermentação submersa em biorreator de 7,5 litros

Após os ensaios de otimização em frascos agitados, foram realizados ensaios de produção da enzima em fermentador de 7,5 L (TECBIO-TECNAL Piracicaba, SP) para validação e ensaio de aumento de escala de produção. Foram utilizados 4,0 L de meio de fermentação e 40 mL de inóculo (10^8 células/mL).

O inóculo foi preparado como descrito no item 4.1. A temperatura de produção foi mantida a 35 °C, a taxa de fluxo de ar foi de 1,5 vvm e a taxa de agitação de 300 rpm. Os dados de oxigênio dissolvido, temperatura, rotação, nível e pressão no interior do vaso de reação foram coletados a cada 30 segundos durante a produção da enzima. Além desses dados, foram coletadas 12 amostras ao longo das 96 h de produção, nas quais pH, biomassa, atividade enzimática e concentração de proteínas foram avaliados.

4.2.5. Esterilização dos meios e equipamentos

A fim de garantir condições estéreis de crescimento do micro-organismo, os meios sólidos de propagação, de crescimento e de produção, bem como, todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 min.

4.3. ENSAIOS DE PRÉ-PURIFICAÇÃO

O sobrenadante de cultura e o extrato precipitado podem apresentar forte turvação, o que impede a purificação direta por métodos cromatográficos. Com o objetivo de clarificar o extrato precipitado foram realizados ensaios de precipitação com sulfato de amônio com a

finalidade de remover lipopolissacarídeos, uma vez que estas macromoléculas extracelulares podem ser produzidas por bactérias e provocar turvação no meio de cultivo (GALANOS *et al.*, 1971; STUER; JAEGER; WINKLER, 1986).

4.3.1. Precipitação com sulfato de amônio

Foram realizados ensaios de precipitação com sulfato de amônio (80% de saturação) com a finalidade de clarificar o sobrenadante de cultura.

Sulfato de amônio foi adicionado até a saturação desejada (80% de saturação - 565 g/L), com agitação branda a 4 °C. A solução foi mantida a 4 °C por 12 h sob agitação branda, sendo depois centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em um volume mínimo de tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

Esta suspensão foi dialisada contra este mesmo tampão a 4 °C, por 6 h, com duas trocas. Após a diálise, o precipitado foi ressuspensionado e armazenado a 4 °C com adição de azida sódica 0,02 % (m/v) para os estudos seguintes.

4.3.2. Precipitação parcial utilizando isopropanol

O extrato precipitado foi tratado com utilizando diferentes concentrações de isopropanol (10-50%) visando a sua clarificação e o rompimento dos agregados, baseando-se no estudo de Rúa *et al.* (1997).

O extrato precipitado foi centrifugado a 5.000 g por 20 min. A 3,5 mL do sobrenadante adicionou-se 1,5 mL de solução de isopropanol em banho de gelo e em seguida, a mistura foi filtrada em membranas de 0,45 ou 0,22 µm. A atividade enzimática foi determinada no filtrado.

Para as medidas de atividade, as diluições necessárias foram realizadas em tampão citrato-fosfato 0,02 mol/L pH 7,0.

4.4. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

4.4.1. Cromatografia de permeação em gel

Os ensaios de cromatografia de permeação em gel foram realizados em coluna empacotada manualmente com o gel Sephadex G75, composto por ligações inter cruzadas de dextranas e a faixa de fracionamento está entre 3000-80,000 Da. O fluxo foi de 0,4 mL/min e a eluição realizada com tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0 contendo NaCl 0,15 mol/L, sendo coletadas frações de 1 mL. As colunas possuíam 35 cm de comprimento e 0,72 cm de diâmetro resultando em um volume de trabalho de 25 mL,

Todas as frações foram analisadas quanto à atividade lipolítica e absorbância a 280 nm. As frações com atividade lipolítica foram reunidas e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (seção 4.4.5).

4.4.2. Purificação parcial utilizando Celite® 545

Com o objetivo de se obter uma purificação parcial do extrato precipitado, foram realizados ensaios de adsorção e dessorção controladas. Para adsorção seletiva da enzima foi utilizado 1 mL de sobrenadante de cultura para cada grama de Celite® 545. Foram testadas diferentes concentrações de isopropanol como agente de adsorção (60-100% (v/v) em tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 7,0) a 4 °C (10 mL) por 2 min sob agitação branda.

A lipase adsorvida foi coletada por filtração e lavada duas vezes com n-hexano para remover impurezas. Após secagem foram testadas diferentes soluções de dessorção: água deionizada; tampão fosfato 0,05 mol/L (pH 5,0-9,0); Triton X-100 0,5% (m/v) em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7,0; isopropanol 10% (v/v); sulfato de amônio 0,5 mol/L. As soluções foram deixadas em contato com a enzima adsorvida em Celite por 5 min, 4 °C sob agitação branda. A Celite foi separada por filtração e o sobrenadante utilizado para investigação de atividade enzimática e concentração de proteínas.

4.4.3. Cromatografia de troca iônica

Os ensaios de cromatografia de permeação em gel foram realizados em coluna empacotada manualmente com o gel DEAE-Sephadex, contendo Dietilaminoetil ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) que se comporta como uma base fraca e matriz formada de dextrana. O fluxo foi de 0,2 mL/min e a eluição foi realizada com tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,01 mol/L pH 8,0, a fração ligada foi eluída pelo mesmo tampão contendo NaCl 0,1 mol/L, sendo coletadas frações de 1 mL.

Todas as frações foram analisadas quanto à atividade lipolítica e absorbância a 280 nm. As frações com atividade lipolítica foram reunidas e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE (seção 4.4.5).

4.4.4. Purificação em um passo utilizando “Metodologia de Passo Único” (MPU)

Foram realizados ensaios de purificação utilizando MPU, de apenas um passo, com reagentes de baixo custo. Devido a processos de proteção de inovação este protocolo será omitido da tese, sendo apresentados apenas seus resultados. O método foi testado na purificação da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, foco deste trabalho, e na purificação da lipase do fungo filamentoso *Botryosphaeria ribis* EC-01, para confirmação e validação da eficiência de método como processo geral de purificação de lipases.

4.4.5. Eletroforese SDS-PAGE

Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo SDS foi realizada de acordo com Laemmli (1970). As amostras dialisadas foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,5 mol/L pH 6,8, contendo 10% (m/v) de SDS, 10% (v/v) de glicerol, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol e 0,05% (m/v) de azul de bromofenol. Os géis foram preparados com 12% (m/v) de poliacrilamida.

Foram utilizadas como marcadores de massa molar as seguintes proteínas: fosforilase (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). O gel foi corado com nitrato de prata segundo o método descrito por Blum, Beier e Gross (1987).

4.5. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DA LIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

As características da enzima foram estudadas tanto com a enzima bruta quanto com a lipase previamente purificada, com a finalidade de conhecer as propriedades bioquímicas da enzima e características que possam indicar um uso industrial.

4.5.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

Para determinar o efeito da temperatura sobre a lipase a atividade enzimática foi determinada em temperaturas entre 20 e 90 °C. A estabilidade à temperatura foi determinada através da incubação da enzima em temperaturas entre 20 e 90 °C por 1 h, na ausência do substrato. A atividade lipolítica residual foi determinada a 55 °C.

4.5.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade

Para determinar o efeito do pH na atividade lipolítica os ensaios foram realizados variando-se o pH do meio reacional entre pH 2,3 e 10,0. A reação foi realizada com meio reacional pré-equilibrado a 55 °C.

A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação da enzima em tampões com valores de pH entre 2,3 a 10,0 por 1 h a 22 °C. Após a incubação, a atividade residual foi determinada usando tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,0.

4.5.3. Hidrólise de diferentes substratos

A capacidade hidrolítica da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 frente a diferentes substratos foi observada frente a lipídios modelo: Trioleína (TC18) e Tributirina (TC4); óleos vegetais: Oliva, Soja, Girassol, Linhaça, Crambe, Canola, Óleo de Soja de Fritura, Dendê, Milho e Margarina (Claybom[®]); e gorduras animais: Frango, Porco, Peixe, Manteiga e Creme de Leite. Os substratos utilizados contêm diversificada composição de ácidos graxos (Tabela 8.2)

4.5.4. Efeito da concentração de substrato na atividade

Na determinação do efeito da concentração de substrato sobre as constantes cinéticas, K_m (mmol) e V_{max} (mmol/min), a enzima foi incubada com concentrações de trioleína entre 10 e 250 mmol/L por 30 min.

4.5.5. Efeito da concentração de produto na atividade

Para a determinação do efeito da concentração de produto (ácido oleico) sobre a atividade da lipase, foram utilizados como substrato a trioleína, que resulta em diferentes produtos intermediários, e o oleato de metila, resultando em apenas dois produtos. A enzima purificada (1 mg/mL) foi incubada em diferentes concentrações de produto x substrato (100-0, 100-25, 100-50, 100-75, 100-100, 100-150, 100-200, 75-25, 50-50 e 25-75, em mmol/L) a 55° C, pH 8.0 com retiradas de amostras até 24 h. Os produtos da reação foram acompanhados por HPTLC (4.7.4).

Para confirmação dos resultados os mesmos ensaios foram realizados com adição de cloreto de cálcio de 0 a 50 mmol/L. O método se baseia na precipitação como sal de cálcio dos ácidos graxos liberados pela hidrólise dos substratos, evitando a possível inibição da enzima pela presença do produto em solução.

4.5.6. Hidrólise parcial de lipídios e ésteres

Para a hidrólise de lipídios, uma emulsão de trioleína (triacilglicerol padrão) ou óleos vegetais (oliva, soja, girassol e canola; 100 mmol/L cada) foi preparada em álcool polivinílico (PVA; 20 g/L) por sonicação (Branson Sonifier 250).

Para a hidrólise dos TAG, a reação foi iniciada pela adição de 100 µL da emulsão do TAG e 900 µL da lipase de *B. lata* suspendida em tampão Tris-HCl 0,05mol/L pH 8,0 (10 mg/mL). A reação foi realizada a 55 °C por 0, 5, 15 e 30 minutos e interrompida pela adição de 150 µL de uma solução de etanol:ácido sulfúrico (100:0,8; v/v). Os compostos lipídicos foram extraídos com 2 mL de hexano e as amostras armazenadas a -20 °C.

Para as hidrólises dos ésteres metílicos (Fatty Acids Methyl Esters – FAMES), uma mistura equimolar de sete FAMES saturados (8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0 e 20:0; 1,6 mmol cada em 1 mL de meio de reação), três FAMES insaturados (18:1, 18:2 e 18:3; 3,3 mmol cada em 1 mL de meio de reação) e uma mistura dos dois grupos de FAMES, saturados e insaturados, (1,1 mmol cada em 1 mL de meio de reação) foi utilizada como substratos emulsificados em PVA (20 g/L).

4.5.7. Determinação da regiosseletividade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02

A regiosseletividade da lipase foi determinada através da análise da relação entre a soma das concentrações de 1,2-DAG e 2,3-DAG em relação à de 1,3-DAG após a hidrólise parcial da trioleína (TAG modelo) e TAG heterogêneos de óleos vegetais (oliva, soja, girassol e canola). A hidrólise parcial foi realizada em triplicada por 0, 5, 15 e 30 min a 55 °C, utilizando lipase bruta e pura de *B. lata* LBBIO-BL02.

4.5.8. Determinação da tiposseletividade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02

A tiposseletividade da enzima foi determinada por reações multicompetitivas de acordo com Rangheard *et al.* (1989). Neste ensaio, uma maior concentração (%) de um determinado ácido graxo liberado indica uma maior atividade lipolítica em seu éster respectivo. Ésteres metílicos de AG saturados (cadeia carbônica de 8:0 a 18:0) foram utilizados para determinar a tiposseletividade em relação ao tamanho da cadeia, enquanto ésteres metílicos de AG 18C insaturados foram usados para determinar a tiposseletividade em relação ao número de insaturações. As bandas observadas nas placas de CCD contendo AG livres foram raspadas e transferidas para frascos de fundo Redondo de 50 mL para metilação resultando em ésteres metílicos submetidos à análise por Cromatografia Gasosa (GC).

4.5.9. Estabilidade em solventes orgânicos

Para determinar a estabilidade da lipase em acetona, etanol, metanol e isopropanol, a enzima foi incubada (1 h, 30 °C) em diferentes concentrações de solventes (25, 50, 80 e 100%, v/v). No caso dos solventes imiscíveis em água, caso do butanol, álcool isoamílico, octanol, tolueno, hexano, isooctano e heptano, a enzima foi adsorvida em papel de filtro 1 cm² e incubada na presença de cada solvente (1 h, 30 °C). Em seguida, o papel de filtro foi transferido para tubos com 1 mL de tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0 para eluição da enzima.

4.6. APLICAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 EM DIFERENTES PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

4.6.1. Reações de esterificação e transesterificação em ambiente aquoso

Os experimentos foram realizados como descrito por Vaysse *et al.* (2002), com modificações. Os substratos lipídicos (oleato de etila, ácido oleico ou trioleína) foram preparados como emulsões que consistem de 100 mmol/L de lipídios em uma solução aquosa de álcool polivinílico (20 g/L) emulsionados por ultrassom (Branson Sonifier 250). Para as reações (volume total de 1 mL), 100 µL de substrato em emulsão foram adicionados a 800 µL de tampão citrato-fosfato 50 mmol/L pH 8,0, contendo, eventualmente, os álcoois utilizados para os ensaios de esterificação e transesterificação de 0,5 a 15 mol/L. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de solução de enzima a 20 mg/mL com o mesmo tampão.

As reações foram realizadas a 50 °C por até 24 h (retiradas de amostras com 0, 10, 30, 60, 120, 240, 1080 e 1440 min) e interrompidas pela adição de 950 µL de uma mistura etanol/ácido sulfúrico (100:0,8, v/v). Após a adição de 50 µL de padrões internos (solução etanólica de ácido pentadecanóico (C15) e os seus ésteres de etila e metila, 1 µmol cada), os lipídios foram extraídos com 1 mL de hexano. Ésteres e ácidos graxos livres foram então analisados por cromatografia gasosa (GC). As curvas de calibração foram realizadas utilizando emulsões de monoésteres preparados de acordo com o mesmo protocolo, sem adição da enzima e álcool e os rendimentos das reações foram expressos em % de conversão de ésteres.

4.6.2. Obtenção de ésteres de aroma via esterificação enzimática de ácidos graxos em ambiente orgânico

As reações de esterificação foram realizadas em frascos de 30 mL, contendo 500 mmol de ácido capríco (6:0) ou ácido caprílico (8:0), 200 mmol de álcool etílico ou

isoamílico e 200 U de enzima liofilizada em meio reacional contendo n-hexano como co-solvente para completar 5 mL de meio reacional. A reação foi mantida a 40 °C por 24 h em shaker orbital a 180 rpm. Os ácidos graxos residuais foram quantificados pelo método de Lowry e Tinsley (1976) e os rendimentos das reações foram expressos em % de conversão dos ácidos graxos.

4.6.3. Epoxidação quimo enzimática de ácidos graxos

Para a reação de epoxidação padrão, o éster oleato de metila, 200 mmol em 10 mL de tampão de fosfato pH 5,3 e 50 mmol/L, foi utilizado como substrato para seguir a formação de produtos epoxidados em diferentes concentrações de H₂O₂ (de 0 a 20%, v/v) com adição de 3%, (m/v) de lipase. Para a mais elevada concentração de H₂O₂ (20%) a adição foi realizada em 10 passos de 2%, cada um com duas horas de intervalo, para diminuir a degradação da enzima pela ação do peróxido. A reação foi seguida por 48 horas a 40 °C e 300 rpm. Em seguida, os produtos de reação foram extraídos com 5 ml de Hexano e a fase orgânica seca com a adição de Na₂SO₄. Os produtos da reação foram analisados por HPTLC (seção 4.7.4) e os rendimentos foram expressos em % de conversão dos ácidos graxos.

O procedimento para a epoxidação de ácido insaturado livre (ácido oleico 18:1^{Δ9}) e óleo vegetal (óleo de soja) é muito semelhante. O óleo de soja (60 mmol, com 240 mmol C=C) e o ácido oleico livre (200 mmol) foram adicionados em 10 mL de tampão de fosfato pH 5,3 e 50 mmol/L. Após a adição de 0,30 mg de lipase, foram adicionados 10% de H₂O₂. O procedimento de tratamento é análogo ao da epoxidação do FAME.

Para todos os ensaios foram também utilizadas as lipases de *Candida antarctica* B (CAL-B) como controle positivo, e de *Burkholderia cepacia* (Amano PS) por ser uma enzima produzida por uma cepa filogeneticamente muito próxima a da *B. lata* LBBIO-BL02.

4.6.4. Atividade de galactolipase *in situ*

Para a mensuração da atividade de galactolipase do extrato purificado de *B. lata* LBBIO-BL02 foram utilizadas folhas de espinafre (*Spinacia oleracea*) previamente fervidas por 5 min de modo a inativar as enzimas lipolíticas endógenas, cortadas em pedaços de 1-2 mm e liofilizadas.

Os ensaios de hidrólise dos galactolipídeos foram realizados em frascos de vidro de 30 mL contendo 100 mg de folhas pré-tratadas e 9 mL de tampão Tris (pH 8,0, Tris 50 mmol/L, NaCl 150 mmol) com a adição de 1 mL de solução enzimática (5 mg/mL) em mesmo tampão e foram incubadas a 55 ± 1 °C, sob agitação orbital (250 rpm) durante 30 minutos (AMARA *et al.*, 2013). Utilizando o mesmo protocolo também foi realizado ensaio de transesterificação dos galactolipídeos, utilizando uma solução tampão Tris com adição de metanol a 1 e 3 mol/L.

Após o tempo de reação, uma amostra de 500 µL foi retirada de cada tubo adicionada de 3,5 mL de FOLCH (CHCl₃:CH₃OH, 2:1, v/v), agitada em vortex por 1 min e centrifugada por 5 min a 4000 rpm. A fase orgânica foi coletada e adicionada ao tubo de ensaio, seca com MgSO₄, filtrada (0,45 µm) e evaporada sob uma corrente de N₂. Finalmente, o extrato seco foi dissolvido em 3 mL de CHCl₃-CH₃OH (2:1, v/v) e analisado por HPTLC (seção 4.7.4).

Em cada caso, os experimentos foram realizados em triplicata utilizando controles sem enzima, a fim de verificar a inativação das enzimas endógenas nas folhas através da ausência de ácidos graxos livres e/ou a formação de ésteres.

4.6.5. Simulação de fluido gástrico

A atividade e estabilidade da enzima purificada foi verificada em fluido gástrico simulado (FGS). O FGS foi preparado com NaCl (75 mmol/L), lecitina de soja (17 mmol/L), CaCl₂ (0,15 mmol/L), glicerol (120 mmol/L), HCl para ajustar pH até 4,0 e pepsina (Sigma,

derivada do revestimento de estômago de porco, 700 U/mg) de 1000 a 8000 U/mL utilizando trioleína, tributirina ou tricaprilina como substratos (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007). A enzima (0,5 mg/mL) ficou incubada a 250 rpm e 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os ácidos graxos liberados foram calculados contra um branco sem enzima por titulação manual, cromatografia de camada delgada de alta eficiência (HPTLC) e pH-Stat.

4.6.6. Simulação de fluído intestinal

A atividade e estabilidade da enzima purificada também foram verificadas em fluído duodenal simulado (FDS) presente no duodeno proximal. O FDS foi composto de lecitina de soja (4 mmol/L), glicerol (60 mmol/L), tripsina de 94 a 376 U/mL, sal biliar taurodeoxicolato de sódio (NaTDC, SIGMA-ALDRICH) de 4 a 16 mmol/L em diferentes valores de pH utilizando trioleína, tributirina ou tricaprilina como substratos (PORTER; TREVASKIS; CHARMAN, 2007). A enzima (0,5 mg/mL) ficou incubada a 250 rpm e 37 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e os ácidos graxos liberados foram calculados contra um branco sem enzima por titulação manual, cromatografia de camada delgada de alta eficiência (HPTLC) e pH-Stat.

4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1. Determinação da atividade lipolítica em meio aquoso.

a Método da hidrólise do *p*NPP

O método de hidrólise do *p*NPP, substrato sintético, foi utilizado nas etapas de produção e purificação da enzima.

O método baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso contendo surfactante Triton X-100 (LIMA, 2004; WINKLER; STUCKMANN,

1979). A liberação do *p*-nitrofenol, de coloração amarela é seguida em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 mmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($8,777 \times 10^3$ mol.L/cm.min) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida em tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L pH 7,0 (LIMA, 2004).

Soluções Utilizadas:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol (3 mg/ml).
- Solução B: 2 g de Triton X-100 em 450 mL tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

Procedimento:

A 10 mL da solução B equilibrada a 55 °C é misturado 1 mL da solução A, lentamente e sob contínua agitação. A mistura é feita imediatamente antes da determinação da atividade, pois o substrato é instável quando em meio aquoso. Desta solução são colocados 0,9 mL em cubeta, estabilizada a temperatura de 55 °C, sendo adicionada a solução de enzima (0,1 mL) ou de tampão, quando se prepara o branco. A reação é feita em cubeta de 1,0 mL e a leitura feita sempre contra um branco contendo o substrato e o tampão sem a enzima, a 55 °C e pH 7,0.

Como protocolo padrão, as leituras de absorbância foram feitas após 1 min de reação. Alterações no tempo de leitura são indicadas na descrição do experimento, quando for o caso.

b Método titulométrico manual

O método titulométrico foi utilizado nos ensaios de determinação dos parâmetros cinéticos e de estabilidade da enzima.

Ensaio de atividade frente a diferentes triacilgliceróis foram realizados utilizando trioleína e tributirina como substratos. A determinação da atividade de lipases por titulometria é baseada no método proposto por Stuer *et al.* (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis. O meio reacional constitui de 0,2 mol/L de substrato, 6% (m/v) de Triton X-100 e 74% (v/v) de tampão tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,0. Adiciona-se 1 mL de enzima a 5 mL de meio de reação e incuba-se por 30 min a 55 °C, sob agitação intensa (300 rpm). Após a incubação, 16 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol são adicionados e esta solução é titulada com NaOH 0,1 mol/L.

c Método titulométrico usando pH-Stat

A atividade da lipase em ambientes gástricos simulados foi determinada potenciométricamente por titulação automática dos ácidos graxos livres liberados a partir de uma emulsão de TAG (triacilglicerol) agitada mecanicamente, usando NaOH 0,1 mol/L e um dispositivo de pH-Stat (TTT 80 Radiometer, Copenhaga). Cada ensaio com TAG de cadeia curta (tributirina, TC4) ou TAG de cadeia média (tricaprilina, TC8) foi realizada em um recipiente termostatizado (37 ° C) contendo 0,5 mL de TAG e 14,5 mL de uma solução contendo 150 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de CaCl₂ e diferentes concentrações de NaTDC quando necessário. Os TAGs foram emulsionados por meio de agitação mecânica. Foram efetuadas correções para se levar em consideração a ionização parcial dos ácidos butírico e octanóico que ocorre a níveis de pH inferiores a 6,0. O azeite de oliva foi usado para testar a atividade da lipase em TAGs de cadeia longa. A atividade nos TAGs de cadeia curta e média foi determinada por titulação direta dos ácidos graxos livres, enquanto que a atividade

em TAGs de cadeia longa foi determinada através de titulação de retorno (ANDERSSON *et al.*, 1995). As atividades foram expressas em unidades internacionais (U) por mg de lipase. Um “U” corresponde a 1 μ mol de ácido graxo livre liberado por minuto.

4.7.2. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina. As frações eluídas de colunas cromatográficas nos ensaios de purificação foram analisadas por leitura direta em UV a 280 nm.

4.7.3. Determinação de ácidos graxos livres

Para determinação de ácidos graxos livres e acompanhar a reação de esterificação foi utilizado método de Lowry e Tinsley (1976), com modificação. Trata-se de um método colorimétrico que mede a coloração do complexo azul-esverdeado, a 715 nm, formado entre os íons Cobre II e os ácidos graxos livres, solúveis em fase orgânica.

A conversão em éster foi calculada a partir do consumo do ácido graxo do meio reacional. A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorbância através da curva de calibração feita com ácidos graxos (Capróico e Caprílico) (Fischer, grau HPLC) a 100 mmol/L nas mesmas condições do ensaio.

4.7.4. Análise de classe de lipídios por cromatografia em camada delgada (CCD)

Após hidrólise, os produtos da reação foram extraídos em hexano e separados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para os produtos da reação de hidrólise de TAGs, 5,0 μ L da fase de hexano foram aplicados (banda de 5 mm) em placas de sílica gel 60 (Merck) de HPTLC usando um aplicador automático ATS4 (CAMAG). A fase móvel

utilizada foi uma mistura de hexano:éter dietílico:ácido fórmico (70:30:1; v/v/v) em uma cuba de corrida automática ADC2 (CAMAG). As placas foram reveladas inserindo-as em uma solução contendo sulfato de cobre saturado:ácido fosfórico:metanol:água (50:40:25:390, v/v/v/v) e seguido de aquecimento a 180 °C por 7 min. As bandas foram quantificadas usando um TLC scanner 3 (CAMAG) a 325 nm.

Para os produtos da reação de hidrólise de FAMES, 300 µL da fase de hexano foram aplicados em placas de sílica gel 60 (Merck), usando aplicador automático Linomat 4 (CAMAG). As bandas contendo ácidos graxos livres derivados da hidrólise de FAMES foram raspadas das placas e armazenadas em frascos de 50 mL de fundo redondo para posterior estudo de tiposseletividade.

4.7.5. Análise de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa (GC)

A composição de ácidos graxos de óleos vegetais foi determinada usando um sistema de cromatografia gasosa (GC) Instruments PerfectFit GC series US 00036865 (USA) equipado com um injetor automático Split/splitless (HP 6890 Series Injector; USA), uma coluna capilar Supelcowax 10 (30 m×0,25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 µm; Supelco, USA) e um detector de ionização de chama (FID). As amostras foram preparadas em frascos de fundo redondo de 50 mL. Amostras de óleo vegetal (oliva, soja, girassol e canola; 30 mg) foram diluídas em 3 mL de metóxido de sódio 0,05 mol/L contendo fenolftaleína e deixadas em refluxo por 10 min. Três mL de metanol:cloreto de acetila (1:1, v/v) foram adicionados até descoloração completa da fenolftaleína. A mistura ficou novamente em refluxo por 10 min e resfriada até temperatura ambiente. Após adição de 10 mL de água destilada, a fase orgânica contendo ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi extraída em 6 mL de hexano, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. A fase de hexano contendo FAMES foi injetada diretamente (2,0 µL) no equipamento de GC. O gás

de corrida foi hélio (1,0 mL/min), razão de Split de 1:20. A temperatura da coluna foi programada como a seguir: 185 °C seguido de um gradiente de aquecimento de 4 °C/min até 225 °C mantidos por 5 min. As temperaturas do injetor e do FID foram de 250 e 270 °C, respectivamente. Os picos foram identificados baseados no tempo de retenção de padrões de FAMES comerciais (Sigma-Aldrich, France). O conteúdo de AG foi calculado por normalização interna e os resultados expressos como g/100 g de AG.

4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.8.1. Análise estatística

Os resultados obtidos em triplicata nos ensaios descritos neste trabalho foram analisados por comparação de médias dos valores obtidos através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), utilizando software estatístico Origin 8.0 (OriginLab Corp.).

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em 4 capítulos: “Produção”, “Purificação”, “Caracterização” e “Aplicação” da lipase produzida pela cepa selvagem de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02.

6. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO I – “PRODUÇÃO”

O capítulo I é apresentado em forma de artigo científico e está organizado conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Este capítulo traz uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além de suas conclusões.

Neste artigo, intitulado “*Overproduction and properties of lipase by a wild strain of Burkholderia lata LBBIO-BL02 using chicken fat*”, foram determinadas as melhores condições de produção da enzima utilizando meio fermentativo de baixo custo e apresenta os resultados iniciais de imobilização da enzima utilizando Celite 545. Este artigo está publicado no periódico *Annals of Microbiology*, n. 65, p. 865-877, 2014. Doi: 10.1007/s13213-014-0928-6.

Ao final do artigo são apresentados resultados de fermentação submersa em biorreator (6.2), estes dados ficaram de fora da publicação e complementam os resultados da mesma em sentido de aumento de escala de produção da enzima.

6.1. OVERPRODUCTION AND PROPERTIES OF LIPASE BY A WILD STRAIN OF *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 USING CHIKEN FAT

Bruno H. Oliveira^{1,2}, Rachid É. Santos¹, Luiz E.A. Loiola¹ and Valeria M.G.

Nascimento^{1,2*}

¹Faculdade de Ciências e Letras, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Assis, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Biotecnologia Industrial. CEP: 19806-900, Assis, SP, Brazil

²Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, Departamento de Bioquímica e Microbiologia. CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

* Corresponding author: Dr Valéria MG Nascimento, E-mail: valeria@assis.unesp.br

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Depto. de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus de Assis, Av. Dom Antônio, 2100, CEP 19806-900, Assis, SP – Brazil. Tel: +55 - 18 - 3302 5756

Abstract

In this work, we report the overproduction of lipases by a new wild strain of *Burkholderia lata* (LBBIO-BL02) in submerged fermentation to seek an economically attractive bioprocess. The best fermentation medium composition was containing chicken fat (12.5 mL/L) and ammonium phosphate (15 g/L) at 35 °C and pH 7.0, resulting in a lipase titer of 1137.82 U/mL and 2146.83 U/mg. The lipase characterization exhibited maximum activity at 55 °C and pH 7.0. The lipase retained 100, 93 and 85% of its maximum activity at 45, 50 and 60 °C, respectively, and 78, 82 and 100% at pH 2.2, 3 and 10, respectively. The enzyme was successfully immobilized on Celite by adsorption and showed a promising future for various organic syntheses because of its stability in organic solvents. All the results shows that *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 is a superior lipase-producing bacterium and its enzyme showed good potential for industrial and biotechnology application.

Keywords: Chicken Fat; Lipase; Overproduction; Bioprocess Design; Immobilization; Celite.

1. Introduction

The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) comprises a group of closely related organisms that occupies diverse ecological niches such as soil, water, animals, plants and humans. The Bcc strains can be used for multiple applications as bio control, bioprocess, bioremediation and plant-growth-promotion purposes, but their capacity as opportunistic bacteria to cause human infections hampers their use in these biotechnological applications (LIPUMA, 2010; VANLAERE *et al.*, 2009). The *Burkholderia lata* specie was differentiated of Bcc in 2009 (VANLAERE *et al.*, 2009). According to a recent research describing Bcc species that are involved in respiratory tract infection in cystic fibrosis the *B. lata* strains was not cited as a pathogen (LIPUMA, 2010). There is no records in the literature using this bacteria on biotechnology studies.

Bcc is an important group in the current research on biotechnology. Lipases from the Bcc strains shows biocatalysis capability in organic solvents media and are used to biofuel production, chiral reactions for pharmaceutical products and racemic resolutions (KAWAKAMI; ODA; TAKAHASHI, 2011; LI, X. *et al.*, 2013), which make them attractive for the applications in diversified industrial sectors. Despite, the industrial use of lipases is limited by the high cost of its production and the necessary purity grade according to its use. By this way, find a new strain with an overproducing lipase and the potential of using low-cost nutrients such as agro-industrial residues and inorganic salts in microbial fermentation for enzyme production is extremely important in dictating future uses of lipases.

Medium optimization for overproduction of the enzyme is an important step for its commercial usage and involves a number of physico-chemical parameters such as the composition of production medium, the carbon and nitrogen sources, minerals and trace metals, pH, temperature, aeration and inoculum age (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER *et al.*, 1994). One of the most critical factor in producing microbial lipases is the

choice of carbon sources as enzyme inducers. Compounds such as plant seed-oils (triacylglycerols), free fatty acids, surfactants, bile salts and glycerol have been included in the nutrient medium to increase levels of lipase activity (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Olive oil has frequently been cited as an inducer of Bcc lipases (BOEKEMA *et al.*, 2007), however, vegetable oils are regarded as expensive fermentation substrates, and are mainly used as a food stock.

Animal fat has the advantage of wide availability and low cost, and waste meat processing. Chicken fat is disposal of poultry processing industry (ARNAUD *et al.*, 2004) which has been used to produce biodiesel, however can also be used for obtaining bioproducts with high added value such as enzymes. The average cost of the disposal is of US\$0.55/L, against US\$3.15/L of olive oil (USDA ECONOMIC RESEARCH SERVICE, 2012).

The use of pure enzymes on biotechnology can be costly and its disposal after reaction is uneconomical. Furthermore, recovery of the reaction medium may be difficult. The development of immobilization techniques have been important for providing reuse of enzymes facilitate separation of products and increase stability in organic solvents (CHANG; YEN; SHIEH, 2007). As an inert support material, Celite[®] 545 consists of highly porous diatomaceous earth beads composed of more than 90% of silica (SiO₂) with a superficial area of 2.19 m²/g (SIGMA). Because their chemical inertness and interconnected pore structure (CHANG; YEN; SHIEH, 2007), Celite[®] 545 is very suitable for enzyme immobilization by physical adsorption. There is a growing interest in the use of Celite beads as immobilization support material to enhance reaction rates by providing a better distribution of the catalyst (CHANG; YEN; SHIEH, 2007; MATEO *et al.*, 2007), besides the economic advantages of enzyme reutilization.

The present study was started with the aim of developing an efficient and economic fermentation media for overproduction of lipase by a new Bcc specie *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Besides the production, this work evaluated the enzyme properties free and immobilized on Celite[®] 545.

2. Material and Methods

2.1. Strain identification

The bacterial strain LBBIO-BL02 was isolated in our laboratory in a fungal culture contamination and identified by morphological and molecular methods (16S RNA) at Fundação André Tosello (FAT).

2.2. Production of lipase in Submerged Fermentation (SmF)

The bacteria cultivation was started with pre-inoculum in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Luria-Bertani (LB) medium with incubation time of about 48 h (until the order of 10^8 cells/mL) at 30 °C and 180 rpm orbital shaking. After this time, 1 mL of the culture was passed to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of fermentation medium maintained under the same conditions. The standard fermentation medium was composed of K₂HPO₄ (1.0 g/L), MgSO₄·7H₂O (0.5 g/L), NaCl (0.38 g/L) and FeSO₄·7H₂O (0.01 g/L). The C and N sources varied according to the assay. Bacterial growth was monitored during the cultivation by counting cells in a Neubauer chamber.

2.3. The effect of different C and N sources

For lipase production by *B. lata* in SmF were evaluated with chicken fat or different oil sources: olive, corn, soybean, crambe, palm and linseed (10 mL/L).

To study the influence of N sources in the lipase production by *B. lata* were studied 6 different organic and inorganic N sources using a 2^{6-2} fractional design method (Table 2). The N sources evaluated were yeast extract, urea, ammonium sulfate, sodium nitrate, ammonium nitrate and ammonium phosphate. The chicken fat (10.0 mL/L) was used as carbon source. Table 2 shows the independent factors (X_i), levels and experimental design in terms of coded (-1, 0 and +1) and non-coded (actual value) variables.

The influence of the concentrations of the C (X_1) and N (X_2) source were investigated by a 2-level, 2-factor factorial design requiring 12 experiments with four central points and four axial points. The variables and their levels selected for lipase production were C (0.0-25.0 mL/L) an N source (0.0-12.0 g/L). Table 4 shows the independent factors (X_i), their levels and the experimental design in terms of the coded ($-\alpha$, -1, 0, 1 and $+\alpha$) and the non-coded (actual value) variables. The analyses were performed using STATISTICA 8.0 software (Statsoft Inc.) to calculate the main effects of the variables and their interactions, and to perform the analysis of variance (ANOVA).

The response of variables, Y (lipase activity, U/mL), may be approximated by the polynomial equations:

CCD 2^2 :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

where: Y is the predicted response; β_0 is the offset term; β_i the linear effect; β_{ii} the squared effect and β_{ij} the interaction effect.

2.4. Effect of the temperature and initial pH on lipase production

The effect of initial culture pH on lipase production was studied using univariate study in shake flasks at different initial pH values (pH 3 to 12). The pH of the medium was

adjusted to the desired value by using either 1 mol/L NaOH or 1 mol/L HCl prior to sterilization process.

Temperatures ranging from 30 to 45 °C were tested for their effect on lipase production by *B. lata* with 48 and 72 h of fermentation.

2.5. Enzyme biochemical characterization

To determine the pH effect on the lipase activity of the crude extract assays were performed varying the reaction medium pH between pH 2.3 and 10. The method had to be adapted as described below, because *p*-nitrophenol (*p*NP) does not absorb color below pH 6.0. The reaction was carried out in tubes with 4.5 mL of reaction medium pre-equilibrated at 37 °C. After adding 0.5 mL of enzyme solution, 0.1 mL aliquots were removed, added to 0.9 mL of phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0 and transferred to an ice bath. The activities were calculated based on the concentration of product in 1 min, using the molar extinction coefficient determined at pH 8.0.

The pH stability was determined by incubating crude extract in buffers with pH values from 2.3 to 10 for 1 h at room temperature. After incubation, residual activity was determined using phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0 by the standard method.

To determine the effect of temperature on the enzyme activity, the enzymatic reaction was carried out at temperatures between 20 and 90 °C, in phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0.

The temperature stability was determined by incubating the enzyme extract at temperatures between 20 and 70 °C, in the absence of substrate. Residual lipase activity was determined at 37 °C by standard method.

2.6. Immobilization by adsorption on Celite® 545 and stability in organic solvents

The immobilized enzyme on Celite® 545 was prepared as described by Chang et al. (CHANG; YEN; SHIEH, 2007) with modifications. In 5 g of support was added 5 mL of enzyme followed by addition of 50 mL of isopropanol at -10 °C. The mixture was homogenized under gentle agitation and immobilized lipase was collected by filtration and washed twice with n-hexane to remove non-adsorbed impurities and enzyme.

The FT-IR spectra of Celite-545, free lipase and Celite-545 adsorbed lipase were recorded on a Bruker Tensor 37 FTIR spectrometer using the potassium bromide pellet method. The pellets were prepared from a mixture of 200 mg potassium bromide, 3 mg of the samples, and 1.5 mg potassium ferricyanide as an internal standard. The acquisition conditions were: spectral width 4000 to 500 cm^{-1} , 32 accumulations, and 4 cm^{-1} resolution.

To determine the stability of lipolytic activity of free and immobilized enzyme in polar organic solvents, methanol, ethanol, isopropanol and acetone were used in different concentrations (25, 50, 75 and 100%, v/v) in incubation for 1 h at room temperature. The residual activity was determined according to the standard method.

2.6. Analytical Methods

2.6.1. Lipase activity determination

The hydrolysis of *p*NPP was used to follow the trials of fermentation and biochemical characterization. The lipase activity was measured by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) as first described by Winkler and Stuckmann (WINKLER; STUCKMANN, 1979). One unit of lipase activity is defined as the release of 1 mmol/min of *p*-nitrophenol (*p*NP). The molar extinction coefficient of *p*NP ($1.5 \times 10^4 \text{ mol/L} \times \text{cm}$) was used to correlate the concentration of product from the absorbance readings.

The lipase activity determination by titration was used for characterization of enzymatic activity against natural substrates and triacylglycerols of different chain sizes. The reaction medium consisted of 0.2 mol/L of substrate, 6% (w/v) of Triton X-100 and 74% (v/v) citrate-phosphate buffer 0.05 mol/L pH 7.0. Was add 1 mL of lipase to 5 mL of enzyme reaction medium and incubated for 30 min at 55 °C under strong agitation (300 rpm). After incubation, 16 mL of a 1:1 (v/v) mixture of acetone and ethanol was added and this solution was titrated with NaOH 0.1 mol/L. One unit of enzyme activity was equivalent to 1 mmol of fatty acid released per minute.

2.6.2. Protein concentration assay

Protein concentration was determined according to the procedure described by Bradford (BRADFORD, 1976), using BSA as a standard protein.

2.6.3. Gas chromatography (GC) analysis of fatty acids

The fatty acid derived from chicken fat were identified at Technology Laboratory of Animal Products (UNESP – Jaboticabal/SP) by GC using a Shimadzu 14B Gas Chromatograph connected to a OMEGAWAX250 capillary column (30 m x 0.25 mm x .25 µm). The injector and detector temperatures were set at 250 and 280 °C, respectively. The column temperature was initially maintained at 100 °C for 2 min, increased to 220°C at 4°C/min, and finally held at 300 °C for 25 min. A mix of fatty acids (SIGMA) was used as standard.

3. Results

3.1. Strain identification

Morphologically, the strain introduced in the form of large Gram-negative bacilli and the sequencing of the 16S RNA, allowed the identification of the strain as *Burkholderia lata*. The strain was deposited at culture collection of the Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP/Assis under LBBIO-BL02 code. This specie was differentiated of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) in 2009 (VANLAERE *et al.*, 2009) and there are no records in the literature of lipase production by this strain.

3.2. Production of lipase in submerged fermentation

3.2.1. The effect of different carbon sources

Throughout the study, the cultures with our *B. lata* LBBIO-BL02 strain had markedly high lipolytic activity, volumetric and specific, presenting unusual values in comparison with the literature. With the exception of fermentation with linseed oil, all other carbon sources produced lipase above 150 U/mL. Chicken fat showed the highest lipase activity (323 U/mL) and the highest specific activity (1619 U/mg) compared to other sources (Table 1). Specific activity above 1000 U/mg were also obtained with olive and corn oils.

Although chicken fat is an animal fat, the analysis of its fatty acids composition found high percentage of oleic, linoleic and linolenic acids (57%), similar to vegetable oils traditionally used in lipase production by microorganism. The contents of these fatty acids has been linked to induction of enzyme production, which may explain the good results obtained with chicken fat.

Beyond induces the increased production of the enzyme, chicken fat provided the best Production cost/Lipase activity rate, defined as best carbon source to stimulating lipase production by *Burkholderia lata* strain with high enzyme production at low cost (Table 1).

Moreover, it is interesting to note that Production cost/Lipase activity rate is even competitive with other carbon sources, such as corn, soybean, crambe and palm oils.

Table 1. Influence of different oils and fat as carbon sources on lipase production by *B. lata* in SmF.

Substrates	Lipase activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)	Fat Acids Composition (% w/v)				
			Oleic (Δ^9 18:1)	Linoleic ($\Delta^{9,12}$ 18:2)	Linolenic ($\Delta^{9,12,15}$ 18:3)	Erucic (Δ^{13} 22:1)	Palmitic (16:0)
Chicken fat	323.81 $\pm$ 43.17	1619.05	43	14	0.7	-	25
Corn oil	258.44 $\pm$ 19.21	1292.20	35	45	1	-	10
Soybean oil	207.66 $\pm$ 23.75	988.86	21	54	6	0.3	11
Olive oil	207.12 $\pm$ 34.08	1218.35	70	10	0.2	-	16
Palm oil (dendê)	202.35 $\pm$ 7.21	249.81	40	17	-	-	34
Crambe oil	187.10 $\pm$ 20.33	668.21	18	9	6	56	2
Linseed	8.23 $\pm$ 2.92	30.48	11	15	40	-	2

3.2.2. The effect of different N sources

To study the effect of different N sources, organic and inorganic, a fractional design 2^{6-2} was performed. In this study, the highest enzyme activities was found in experimental run 9 using sodium nitrate (X_4) and ammonium phosphate (X_6), with lipase activity of 373.0 U/mL and 4696.29 U/mg (Table 2). The specific activity obtained in this experiment has no precedent in the literature. Inorganic nitrogen sources were found to increase lipase synthesis by *B. lata* grown in the presence of chicken fat. From the analysis of the effects, it was possible to observe that only X_6 was significant to a confidence level of $p < 0.05$ with positive influence (Table 3). Therefore, ammonium phosphate was chosen for sequence of experiments. Besides being the N source to induce increased production of the enzyme, the salt ammonium phosphate is lower cost than organic sources, and its presence hinders subsequent stages of protein purification.

Table 2: Fractional design matrix (factorial 2^{6-2}) containing four repetitions at the central point for the production of lipase by *B. lata* LBBIO-BL02 in SmF.

Runs	Variables in coded levels						Response	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Y (U/mL)	Specific Activity (U/mg)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.47	13.74
2	1	-1	-1	-1	1	-1	6.08	138.34
3	-1	1	-1	-1	1	1	22.47	355.64
4	1	1	-1	-1	-1	1	59.33	933.29
5	-1	-1	1	-1	1	1	11.03	282.94
6	1	-1	1	-1	-1	1	28.83	190.35
7	-1	1	1	-1	-1	-1	5.92	50.74
8	1	1	1	-1	1	-1	5.08	629.73
9	-1	-1	-1	1	-1	1	373.00	4696.29
10	1	-1	-1	1	1	1	76.33	497.33
11	-1	1	-1	1	1	-1	2.91	582.00
12	1	1	-1	1	-1	-1	2.03	203.33
13	-1	-1	1	1	1	-1	2.54	100.36
14	1	-1	1	1	-1	-1	1.58	102.15
15	-1	1	1	1	-1	1	75.80	334.75
16	1	1	1	1	1	1	0.24	23.67
17	0	0	0	0	0	0	9.91	154.40
18	0	0	0	0	0	0	19.72	503.88
19	0	0	0	0	0	0	7.23	196.27
20	0	0	0	0	0	0	14.62	224.99
Factors	Real levels							
	-1	0	+1					
X ₁ Yeast extract (g/L)	0	1	2					
X ₂ Urea (g/L)	0	2,15	4,3					
X ₃ Ammonium sulfate (g/L)	0	4,7	9,4					
X ₄ Sodium nitrate (g/L)	0	6	12					
X ₅ Ammonium nitrate (g/L)	0	2,85	5,7					
X ₆ Ammonium phosphate (g/L)	0	3	6					

Table 3. Analysis of variance obtained for the 2^{6-2} fractional design with different N sources. Chicken fat was used as carbon source at 30 °C and 180 rpm.

Factor	Ss	Df	Ms	Fcalc	p-Value
X ₁	6187.2	1	6187.19	1.297699	0.275190
X ₂	6645.6	1	6645.56	1.393840	0.258909
X ₃	10588.1	1	10588.14	2.220754	0.160025
X ₄	9762.0	1	9762.03	2.047487	0.176055
X ₅	11039.8	1	11039.77	2.315481	0.152038
X₆	24057.5	1	24057.46	5.045808	0.042699
Residue	61981.5	13	4767.81		
Total	130261.7	19			

Ss: Sum of squares; df: degrees of freedom; Ms: mean square; $R^2 = 0.5242$; $R = 0.7240$; $F_{\text{tab}}(1; 13; 0.05) = 4.67$.

3.2.3. Carbon and nitrogen concentrations

The results show the importance of chicken fat and ammonium phosphate to produce lipase by *B. lata*. However, the concentration of these nutrients requires evaluation, and the possibility of interaction between them. Since conventional method (one factor at a time) used for optimization does not indicate the interactions between the significant components, statistical approach for optimizing the significant media components has been employed.

In the experimental design performed were obtained lipolytic activities ranging from 0.06 to 425.00 U/mL. The highest activity was observed in Experiment 8 (425.00 U/mL), which included the largest concentration of the nitrogen source (0, α^+). Table 4 describes the planning matrix, with its coded variables and the predicted and observed results.

Table 4. CCD matrix (factorial 2²) containing four repetitions at the central point for the production of lipase by *Burkholderia lata* LBBIO-BL2 in SmF.

Runs	Variables in coded levels		Response				
	X ₁	X ₂	Y (U/mL) - Predicted	Y (U/mL) - Observed	Specific Activity (U/mg)		
1	-1	-1	0.00	5.46	90.15		
2	-1	+1	257.54	297.00	1439.00		
3	+1	-1	68.31	42.96	196.03		
4	+1	+1	399.02	386.33	618.07		
5	- α	0	44.15	0.06	4.31		
6	+\alpha	0	207.11	237.00	632.19		
7	0	- α	11.96	13.83	26.52		
8	0	+\alpha	441.73	425.66	1781.97		
9	0	0	236.20	179.33	666.53		
10	0	0	236.20	169.00	908.93		
11	0	0	236.20	255.00	869.27		
12	0	0	236.20	341.67	1708.33		
Factors			Real levels				
			- α	-1	0	+1	+\alpha
X ₁ (Chicken fat, mL/L)			0.00	0.35	1.25	2.15	2.50
X ₂ (Ammonium phosphate, g/L)			0.00	1.75	6.00	10.15	12.00

$\alpha = 1.41$.

Considering the volumetric activity obtained in the experiments, based on the analysis of the effects, the interaction between X₁ (oil chicken) and X₂ (ammonium phosphate) was not significant at a confidence level of $p < 0.05$ (Table 5). However, the isolated variables has significant effects. Thus, the concentrations of C and N source have a positive influence on the response, increasing these variables will increase the value of enzyme activity, causing an average activity increase of 115.5 and 304.8 U/mL when passing level (-) to level (+), respectively.

Considering the specific activity obtained in the experiments, the concentration of ammonium phosphate has significant influence, providing an average increase of 1064 U/mg when passing from level (-) to the level (+). The concentration of the carbon source had no significant effect on specific activity.

Table 5. Analysis of variance obtained for the 2² CCD with chicken fat (X₁) and ammonium sulfate (X₂).

Factor	Ss	df	Ms	F _{calc}	p-Value
X ₁ (L)	26635.6	1	26635.6	6.29071	0.046020
X ₁ (Q)	19634.1	1	19634.1	4.63711	0.074755
X ₂ (L)	185259.0	1	185259.0	43.75384	0.000575
X ₂ (Q)	140.6	1	140.6	0.03321	0.861407
X ₁ x X ₂	671.5	1	671.5	0.15859	0.704239
Residue	25404.7	6	4234.1		
Total	257863.4	11			

Ss: Sum of squares; df: degrees of freedom; Ms: mean square; R² = 0.9015; R = 0.9495; F_{tab} (1; 6; 0.06) = 5.99.

The F test demonstrated that for the variables studied, F_{calc} > F_{tab} (Table 5) was meaningful, and the model was valid. Thus, an empirical mathematical model for lipase is possible (Equation 1).

$$Y(\text{U/mL}) = 236.21 + 57.78.(X_1) - 55.61.(X_1)^2 + 152.40.(X_2) - 4,70.(X_2)^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

The 3-D response surface and contour plots obtained for the model are shown in Figure 1 (A) and (B), respectively. As previously mentioned, when the concentrations of N source (X₂) increased, the enzymatic activity also increased; thus, the highest lipase activities were obtained at the highest concentrations of X₂ (ammonium phosphate).

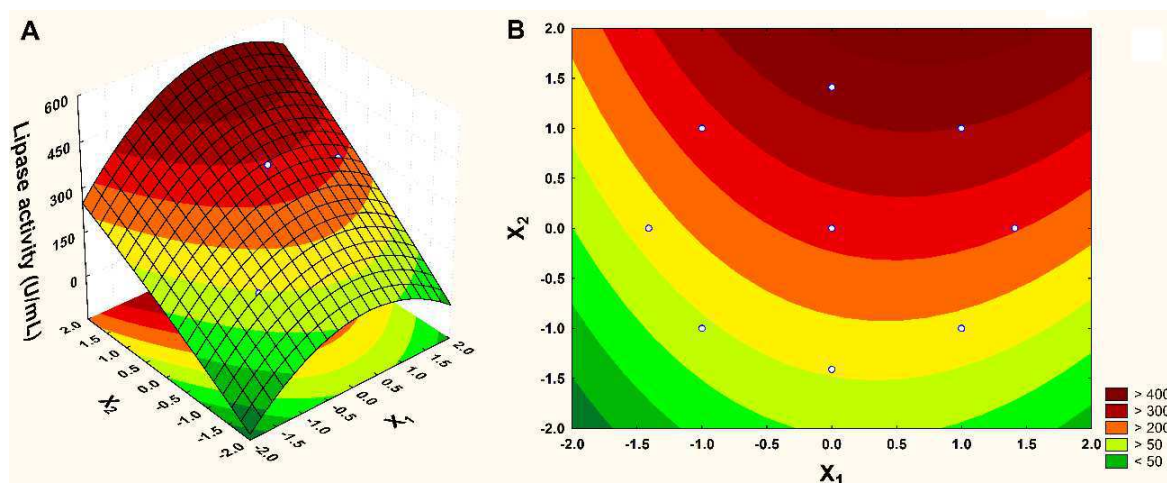


Fig. 1. Three-dimensional response surface (A) and contour (B) plots of lipase activity (U/mL) obtained by submerged fermentation of *Burkholderia lata* LBBIO-BL2 on medium with various concentrations of chicken fat (X₁) and ammonium phosphate (X₂).

It is possible to observe that this model is not conclusive, since the response surface does not have a region where the enzymatic activity is maximal but a growing response. To variable X_1 (chicken fat), it is possible to indicate the most suitable concentration to induce enzyme production (12.5 mL/L). However, for the variable X_2 , the results indicate that better production of the enzyme would occur at concentrations above 20 g/L. Whereas the concentration of C and N sources showed no interaction and the concentration of the most suitable carbon source was determined a univariate experiment was conducted to find the best concentration of ammonium phosphate.

Although the factorial design indicates that the lipase production would be favored by adding more than 20 g/L of ammonium phosphate to the culture medium, in the univariate study there was no significant increase in activity between 15 and 25 g/L, including marked decrease activity with 30 g/L of salt. Increasing N source up to 15 g/L the lipase production was maximum (183.77 U/mL and 1647.26 U/mg) (Figure 2).

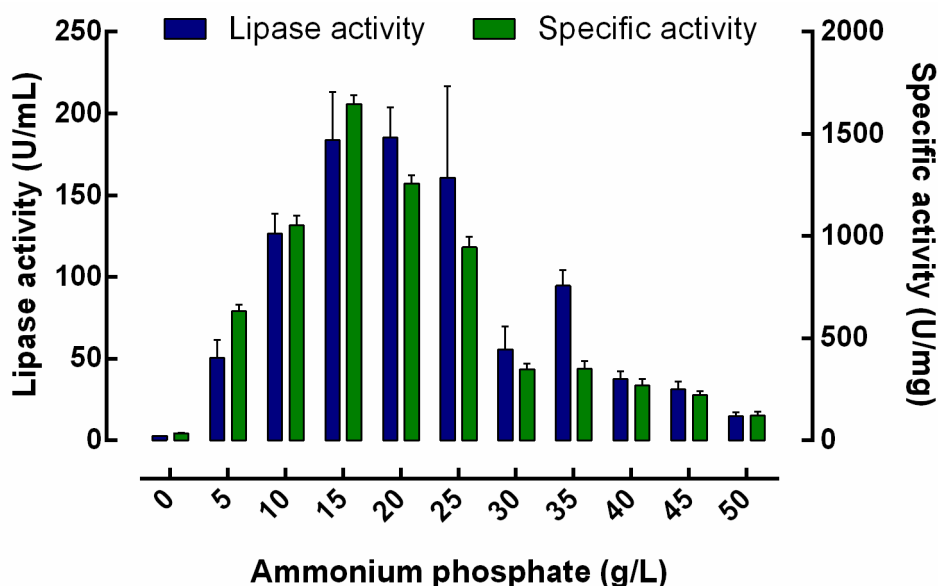


Fig 2. Influence of ammonium phosphate concentration as N source on the production of lipase by *Burkholderia lata* in SmF. Culture conditions: 12.5 mL/L of chicken fat; 180 rpm, 30 °C, 72 h.

3.2.4. Effect of the initial pH and the temperature on lipase production

To evaluate the effect of initial pH of the culture medium and the incubation temperature on lipase production by *B. lata*, fermentation was carried out at 12.5 mL/L of chicken fat, 15 g/L of ammonium phosphate and enzymatic activity was followed specially in two different conditions: pH 8 and 37 °C (standard conditions in fermentation experiments) and pH 7 and 55 °C (condition established after the characterization of the enzyme, described below).

The initial culture pH had prominent effects on the lipase production by *B. lata*. Initial pH of culture medium ranging from 7 to 9 promoted good lipase production with the initial pH of 8 showing the best lipase activity (Figure 3). In contrast, pH below 6 and above 9 on initial culture pH has drastic negative effects.

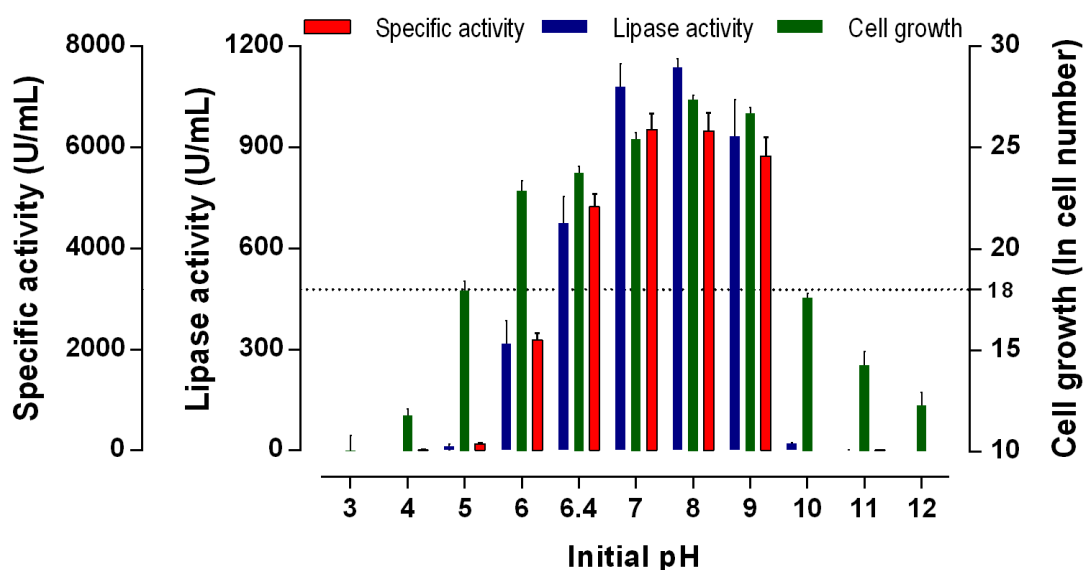


Fig 3. Lipase production by *B. lata* and cell growth in culture medium with different initial pHs. The initial ln cell number added to fermentation was 18. Culture medium containing 1.25 mL/L of chicken fat and 15 g/L of ammonium phosphate. Control fermentation without pH adjust was in pH 6.4. Culture conditions: 180 rpm, 30 °C and 72 h. Test conditions: citrate-phosphate buffer 0.05 mol/L pH 7.0, 55 °C. Assays carried out in triplicate.

The effect of initial pH of the culture medium is directly related to the microorganism growth. The highest enzyme activity was obtained exactly in fermentations where higher cell growth occurred. As a consequence of cell growth, beside enzymatic activity, acidification of the medium was also seen in all experiments. Cultures started at pH 7 had final pH of 5.06, while the pH experiments initiated in 8 and 9, finished with a pH around 6.5. It is interesting to notice how small differences in pH can also provide important effects on the metabolism of the microorganism. Comparing the cultures at pH 6 and the control (without correction, pH 6.43), there was double the activity in the control flask and lower acidification after 72 h of cultivation (pH 5.26 and 3.6 in the control flasks and adjusted at pH 6, respectively), although approximately the same cell growth.

At different temperature fermentation, considering the incubation time of 72 h, was observed that the culture temperature have an effect on the lipase production, with increased activity between 30 and 35 °C (Table 6). However, the experiment was also accompanied with 48 h of culture, and in this period it is evident the highest activity at 35 °C. The cell growth did not change between 48 and 72 h, suggesting that even at 48 h, the bacteria was already in the stationary phase of cell growth. Thus, the different activities obtained are probably due to metabolic changes caused by temperature.

Table 6. Lipase production by *B. lata* and cell growth in fermentations performed at different temperatures. The initial ln cell number added to fermentation was 18. Culture medium containing 1.25 mL/L of chicken fat and 15 g/L of ammonium phosphate. Culture conditions: 180 rpm, pH 8.0.

Time (h)	Temperature (°C)	Activity (U/mL; pH 7, 55 °C)	Activity (U/mL; pH 8, 37 °C)	Cell growth (ln)
48	30	630.38 ± 37.72	192.77 ± 14.62	24.73
	35	1124.91 ± 128.23	359.11 ± 32.26	26.13
	40	471.94 ± 178.03	240.74 ± 4.85	25.96
	45	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	8.87
72	30	1137.83 ± 25.15	323.65 ± 17.27	25.43
	35	997.81 ± 96.01	319.11 ± 57.56	26.41
	40	587.90 ± 24.01	171.56 ± 34.69	26.07
	45	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00

3.3. Kinetic characterization

To kinetic characterization studies the lipase was produced in basal culture media containing chicken fat (12.5 mL/L) and ammonium phosphate (15 g/L) at 30 °C, 180 rpm, pH 6.6 for 72 h resulting in an enzyme extract, 250 U/mL (standard method assay).

The effect of temperature on the enzyme activity in a range between 20 and 90 °C was evaluated (Figure 4 B). The highest activities were observed in the range of 55 °C (542.76 U/mL) at 65 °C (510.26 U/mL), but considerable activity was also observed at high temperatures with 138.92 U/mL at 85 °C (25.60% of the activity measured at 55 °C).

To determine the thermal stability of *B. lata* lipase, the enzyme extract was incubated at temperatures between 20 and 70 °C (Figure 4 A). It is observed that *B. lata* lipase, even after 60 min of incubation at 50 and 60 °C, held 93.3 and 85.4% of the initial activity. However, when the temperature increased to 70 °C, there was total loss of enzyme stability.

The effect of pH on *B. lata* lipase was investigated at pH values between 2.2 and 10. Higher activities were observed in the pH range between 4.0 and 9.0, with maximum activity at pH 7.0. Reasonable activities were obtained even at more acidic pH values; at pH 3.0 and 4.0 was observed 65.14 and 89.56% of relative activity, respectively (Figure 4 D).

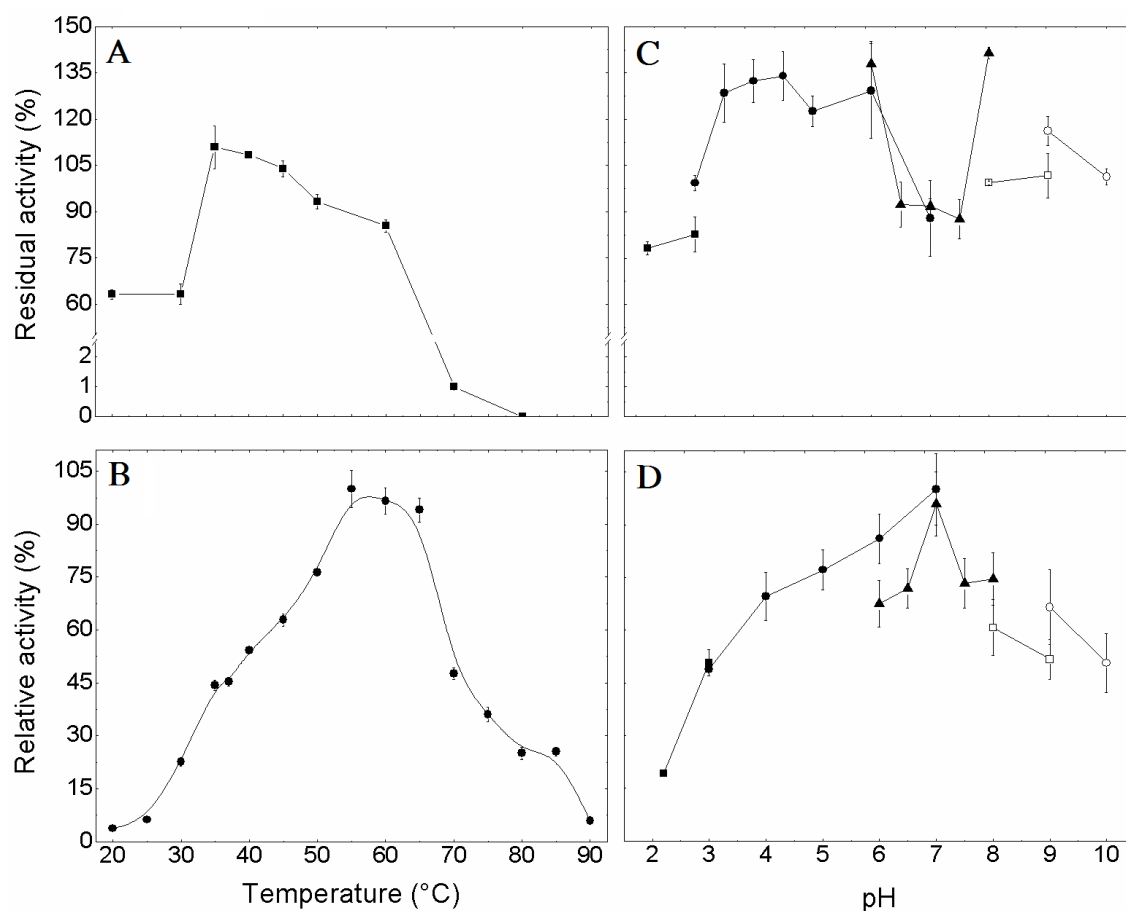


Fig 4. Effect of temperature on the stability (A) and activity (B) of *B. lata* lipase. Test conditions: temperature between 20 and 90 °C, phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0. Assays carried out in triplicate. All activities was calculated relative to the activity measured in the standard temperature of 55 °C (542.76 U/mL, 100%). Effect of pH on the stability (C) and activity (D) of *B. lata* lipase at different pHs. Test conditions: 37 °C. Residual activity in the stability tests after 1 h of incubation at 25 °C. Buffers used in the two assays (0.05 mol/L): Glycine-HCl pH 2.2 to 3.0 (■), citrate-phosphate pH 3.0 to 7.0 (●), KH_2PO_4 -NaOH pH 6.0 to 8.0 (▲), Tris-HCl pH 8.0 and 9.0 (□) and Glycine-NaOH pH 9 and 10 (○). The activities were compared with the activity determined in phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0 without prior incubation (100%, 250 U/mL). Assays carried out in triplicate.

The stability of the enzymatic activity of *B. lata* lipase at different pH values was investigated. The enzyme was stable at pH values between 3.0 and 10.0, after incubation for 1 h at 25 °C (Figure 4 C). Even at pH 2.2, the enzyme showed 78.20% residual activity. When in contact with the phosphate-citrate buffer pH 3.5 to 6.0 and KH_2PO_4 -NaOH buffer pH 6.0 and 8.0 there was an activation of the lipase in relation to the activity of the enzyme

not incubated. This effect has been reported for other lipases, but no mechanism has been proposed to explain this phenomenon.

3.4. Activity on different substrates

The *B. lata* lipase showed high hydrolysis activity against triacylglycerol of different chain sizes, synthetic and natural (Table 7). The triolein is the typical substrate for lipases and it is not hydrolyzed by esterases, thus the ability to hydrolyze this triacylglycerols indicates the presence of true lipases in the enzyme extract. This definition applies even considering that the rate of hydrolysis of triolein was lower than that of other short chain triglycerides such as tributyrin (4:0).

Using different natural substrates the *B. lata* lipase shows most hydrolysis active on linseed and soy oils and chicken fat which predominant fatty acids are linolenic, linoleic and oleic acid, respectively, as already shown in Table 1. Despite variations in degree of saturation in the fatty acids, they have the same size chain (18 carbons).

Table 7. *Burkholderia lata* lipase activity on different substrates.

Substrate	Lipase activity (U/mL)
<i>p</i> -Nitrophenyl palmitate (<i>p</i> NPP, 16:0)	445.18 ± 13.5
Triolein (Δ^9 18:1)	405.06 ± 11.3
Tributyrin (4:0)	581.46 ± 5.7
Linseed oil	470.19 ± 26.1
Chicken fat	378.92 ± 15.0
Soybean oil	346.26 ± 20.4
Corn oil	195.99 ± 25.9
Olive oil	120.85 ± 31.5
Crambe oil	117.59 ± 25.9

Test conditions: 55 °C, pH 7.0. Determinations in triplicates.

3.5. Lipase immobilization by adsorption on Celite® 545

After characterization of the enzyme, the crude extract was used in adsorption tests immobilization on Celite® 545. This support consists mainly of silica SiO₂ (91.5%) with an average particle size of 0.002 mm² (range 0.02-0.1 mm) measured in our laboratory. Celite also show permeability of 4.8 Darcies, a pore size of 17 microns and superficial area of 2.19 m²/g (manufacturer's data).

For immobilization tests was used enzyme extract with activity of 135.45 U/mL. To 5 g of the support was added equivalent to 1354.50 U of enzyme activity. After immobilization, was obtained an immobilized enzyme with 1041.47 U/g support, with exceptional yield of 768.89%, superior to those found in the literature (CHANG; YEN; SHIEH, 2007).

The immobilized enzyme, the Celite and the free lipase were analyzed by FT-IR to ascertain the nature of the enzyme/carrier interaction. The spectra of immobilized enzyme showed amide bands typical of lipases, but with less noise than free lipase, which can be explained by a possible selective attachment of the protein to the solid support providing a crude purification. The band at 1088 cm⁻¹ (siloxane group -Si-O-Si-) of the support remains predominant. No additional band in the spectrum for the immobilized derivative were observed indicating that there is no covalent bond between the enzyme and support, but physical adsorption (Figure S1).

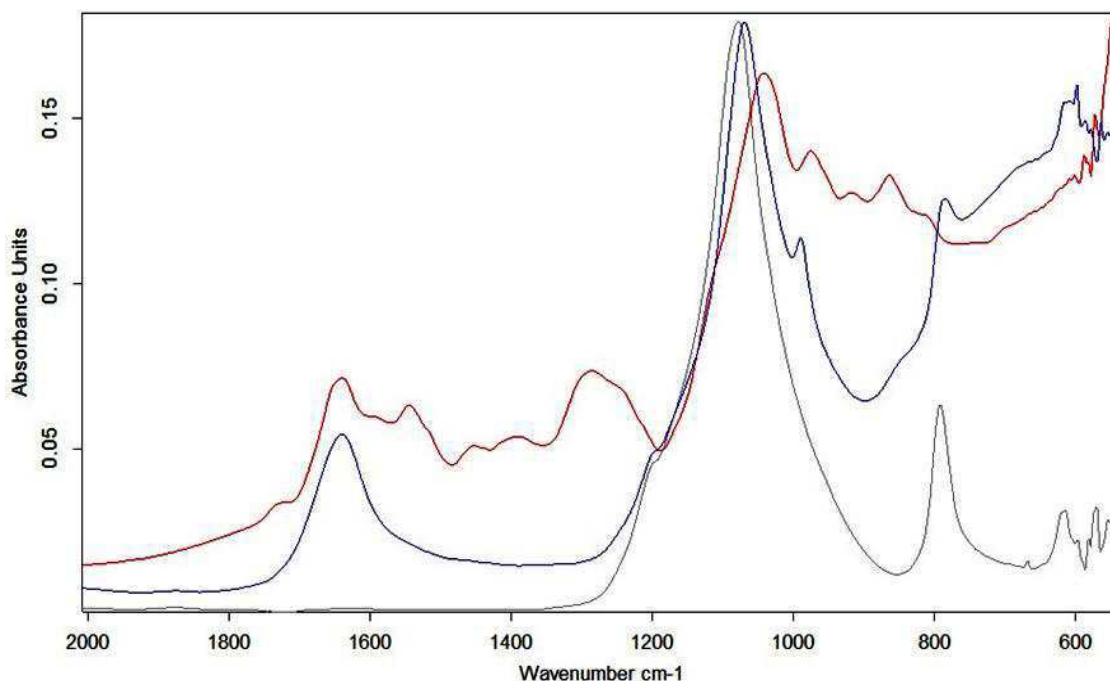


Fig S1. FTIR absorption spectra of Celite 545 (gray), free lipase (red) and immobilized lipase on Celite (blue).

The lipolytic activity of the immobilized enzyme using *p*NPP as substrate was followed by five subsequent cycles, washing the support with isopropanol between cycles. In this aqueous reaction environment, rapid desorption of the enzyme was observed. Decreases were observed in the activity of 34.5, 64.2, 84.3 and 95.4% between the second and fifth recycles.

However, for the enzyme application in catalysis, the reaction medium is generally composed of organic solvents, but lacking additional evaluation of the enzyme stability in this environment, free and immobilized. It can be observed great stability for both polar and nonpolar solvents, for nonpolar with emphasis on the n-hexane (Table 8). For free enzyme, better results were obtained in 50% ethanol, n-hexane, and heptane with residual activities of 178.38%, 256.96% and 261.54%, respectively. For the immobilized enzyme, n-hexane showed the highest activity when compared to the initial (115.40%).

Table 8. Study of stability *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 lipase from different organic solvents and concentrations.

	Log P	Dilution (%)	Free enzyme	Immobilized enzyme
			Residual activity (%)	Residual activity (%)
Control			100.0 ± 8.2	100.0 ± 2.5
Methanol	-0.73	25	86.5 ± 21.5	33.0 ± 5.3
		50	119.7 ± 5.3	28.2 ± 4.6
		75	50.7 ± 6.4	22.8 ± 5.8
		100	0.0 ± 0.0	36.9 ± 3.0
Ethanol	-0.24	25	105.2 ± 12.8	37.7 ± 3.1
		50	178.4 ± 7.8	16.7 ± 7.0
		75	98.8 ± 8.6	19.5 ± 6.3
		100	28.2 ± 8.4	48.5 ± 10.9
Iso-propanol	-0.28	25	162.7 ± 7.2	21.7 ± 0.6
		50	82.4 ± 39.5	19.9 ± 0.6
		75	91.5 ± 12.0	17.0 ± 0.5
		100	72.0 ± 7.9	10.3 ± 0.6
Acetone	-0.23	25	72.5 ± 9.8	36.7 ± 3.0
		50	70.5 ± 5.7	31.4 ± 0.7
		75	61.0 ± 3.2	26.8 ± 3.1
		100	72.3 ± 4.2	33.1 ± 1.8
Butanol	0.8	100	6.1 ± 3.3	21.4 ± 2.5
Iso-amyl	1.42	100	41.0 ± 0.0	28.4 ± 0.9
Octanol	2.8	100	41.4 ± 11.2	21.3 ± 2.4
Toluene	2.5	100	115.7 ± 45.7	42.1 ± 2.2
Hexane	3.5	100	257.0 ± 5.4	115.4 ± 3.0
Heptane	4	100	261.5 ± 8.2	59.5 ± 6.0
Octane	4.51	100	44.5 ± 1.6	65.6 ± 4.9

*The percentages values accompanying polar organic solvents correspond to the amount of solvent in phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0. Tests in triplicate. Log P: Solvent hydrophobicity measurement computed by the logarithm of partition coefficient of a given solvent in a octanol/water system standard. Hydrophilic solvents: $-2.5 < \log P < 0$.

4. Discussion

Most lipases are inducible enzymes and addition of oleic, linoleic and linolenic acids proved to enhance lipase production. Natural substrates of lipase are triglycerides of long chain, thereby triolein is used in most cases as a standard substrate (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). The selection of carbon source that is also an inducer of enzyme production for the content of long-chain fatty acids, but has also affordable cost, is one of the most common concerns in studies of lipase production by microorganisms.

In this sense, the results presented here have great interest for enzyme industries. In cultures of *B. lata* LBBIO-BL02 in this work was obtained high activity in comparison with the literature, using as carbon source chicken fat from disposal of the poultry industry. Although of animal source, chicken fat has high content of unsaturated long chain fatty acid (> 57%), 43% of oleic acid, justifying as good source for lipase production, as observed in other studies conducted by our group for lipase production by *Fusarium* sp. (GFC) (OLIVEIRA; LIMA, 2014). Besides our work, there is no report in the literature of lipase production using chicken oil. Olive oil is currently used as an inducer of lipases (BOEKEMA *et al.*, 2007), however increases the production cost by 7 times compared to chicken fat.

Chicken fat is a disposal of poultry industry together with the viscera, feathers and blood (ARNAUD *et al.*, 2004), contributing with the increase of waste released in nature. Use of this fatty material for enzyme production of high added value appears as an excellent alternative for the industry, with great appeal related to the preservation of the environment.

Apart from chicken fat, present production cost/Lipase production rate quite competitive the crambe and palm oils. The crambe (*Crambe abyssinica*) is a non-food oilseed, its oil is toxic for human or animal consumption and has exclusively industrial application. The *B. lata* lipase production in the EU, where the culture is already deployed, can be favored.

Palm oil is extracted from palm (*Elaeais guineensis*), cultivated in Brazilian northeastern and western coast of Africa, has food use, but limited to local customs. Considering that the oil is extracted in poor regions, their use for lipase production could represent, in addition to economic viability for bioprocess, increased income for the population.

Besides carbon source, the type of N source in the medium has great influences in lipase production by microorganism. Generally, organic N is preferred, such as tryptone,

peptone and yeast extract (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004), which have been used as nitrogen source for lipase production by various *Burkholderia* sp. (DALAL *et al.*, 2008; LAU *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2012). The cost of those sources is high compared to that of inorganic N salts (OLIVEIRA *et al.*, 2013), and its presence hinders subsequent stages of protein purification.

In this work the best N source was an inorganic salt (ammonium phosphate), reports in the literature show that the lipase production could be improved by inorganic nitrogen sources while the cell growth was influenced by organic ones (LIU *et al.*, 2012). The results indicated that the expensive organic N sources can be replaced by lower-cost inorganic N salts with gain of lipase activity. They are significant, considering the cost advantage and the ease of enzyme purification. Rathi *et al.* (2001) reported that ammonium phosphate not affected the lipase production by a *B. cepacia* strain significantly, however higher specific activity was observed.

The best pH of culture medium to have the maximum lipase production by *Burkholderia* isolates is reported to be around 7-9. Rathi *et al.* (2001) reported the *B. cepacia* preferred pH around 7.0 and 9.0, respectively, for optimal growth and lipase production, Lau *et al.* (2011) found the best pH to lipase production by *B. cenocepacia* ST8 was 9.0. Others microorganism, as *Bacillus coagulans* BTS-3 (KUMAR *et al.*, 2005) and *Pseudomonas* sp. MSI057 (KIRAN *et al.*, 2008) shown the best lipase production at pH 8.5 and 9.0, respectively. Hence, initial culture pH is an important factor which affects the lipase production and it varies with the types of microorganisms.

The *B. lata* LBBIO-BL02 lipase activity and stability in the range of temperature of 37 to 65 °C may make it interesting for use in biocatalysis, as these characteristics are not common to lipases from mesophilic bacterial strains such as *B. lata*. Even after 1 h incubation at pH extreme acid 2.2 and alkaline 10.0, *B. lata* lipase remained active showing

residual activity of 78.20 and 101.36, respectively. The activity and stability shown by the *B. lata* lipase at acid pH are not common among lipases produced by bacteria, which are generally more stable and active at neutral or alkaline pH values.

Wang *et al.* (2009), studying *B. cepacia* lipase, reported maximum activity of the enzyme on *p*NPP at 30 °C and pH 9.0 while keeping only 44% residual activity after 60 min at 50 °C and has activity decrease of 50% at pH 5. To the other hand, Park *et al.* (2007) reported that lipase from *Burkholderia* sp. HY-10 exhibited highest *p*NPP hydrolysis at 60 °C and pH 8.5, but low stability at higher temperature (25% at 60 °C). Yang *et al.* (2007), using titrimetric assay, found the optimal temperature for *B. cepacia* G63 at 70 °C and pH 8.0, and kept stable at a temperature range of 40-70 °C. Liu *et al.* (2006) reported that the optimal reaction conditions of lipase from *Burkholderia* sp. C20 were pH 9.0 and 55 °C (titrimetric assay).

The results of activity and stability in a wide pH range (3.0 to 10.0) are also desirable in catalysis and are added to the good characteristics in terms of temperature by the *B. lata* lipase.

After pH and composition of the fermentation media studies, the enzymatic activity of the fermentation broth was 1137.82 U/mL with 0.53 mg/mL of protein, resulting in a specific activity of 2146.83 U/mg. In the literature, strains of *Burkholderia cepacia* (RATHI; SAXENA; GUPTA, 2001), *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609, *Burkholderia multivorans* V2 (DANDAVATE *et al.*, 2009) and other lipase producing bacteria, such as *P. aeruginosa* (JOSHI; KHARE, 2013) and *Bacillus sphaericus* MTCC 7526 (JOSEPH; RAMTEKE, 2012) producing, on average, 2 to 4 mg of protein per mL of fermentation extract, resulting in a specific activity of 51.0, 0.23, 1.76, 0.28 and 182.8 U/mg, respectively.

The overproduction lipase by *Yarrowia lipolytica* are well-studied during the last 10-15 years, the optimization of conditions for overproduction of lipase was done

(FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011). Pignède *et al.* (2000) using a genetically modified *Y. lipolytica* was able to produce 0.2 U/mL (titrimetric assay using olive oil). Our *B. lata* LBBIO-BL02 strain, using the same assay method was able to show activity of 120 U/mL. That demonstrate the advantage of *B. lata* LBBIO-BL02 wild strain in comparison to a traditional yeast producer.

Thus, the *B. lata* strain studied shows lipase production with higher volumetric and specific activity than reported in the literature for both synthetic substrates (*p*NPP) and triolein and natural oils, justifying the interest in this enzyme study.

The *B. lata* lipase was easily immobilized on Celite. Celite (diatomaceous earth) is one of the most popular carriers in immobilization of lipases due, mostly, for its affordable price, and it can be utilized both in adsorption and covalent attachment. Celite is hydrophilic, and its structure and properties can vary significantly as a function of production process. Several Celite types are commercially available and the pore size of Celite can vary from μm to mm, and the shape of the particles can be rods or beads. The shape and porosity greatly affects the adsorption of enzymes as well as the ability to retain water inside the pores. Many commercial lipase preparations are based on Celite powder, e.g. Amano lipase PS-D from *Burkholderia cepacia* (HARA, 2011).

With *B. lata* immobilized lipase was possible the use for up to 3 cycles of hydrolysis while maintaining 35% of the initial activity (1041.47 U/g). In cases of immobilization on Celite, the yields of hydrolysis recycles cited in the literature are low, with loss of up to 70% in the first recycle, due to the existing weak hydrophobic interaction between the enzyme/support on the adsorption (CHANG; YEN; SHIEH, 2007). The desorption may be increased in the presence of surfactant (Triton X-100) normally used in the preparation of emulsified substrates.

The use of lipases in biocatalysis, however, occurs especially in organic solvent medium due to the high solubility of the substrates and products, hydrolytic reverse reaction and modification of the enzyme specificity. In principle, the ability to catalyze reactions in organic solvent medium was been mainly described as characteristic of lipases (JAEGER *et al.*, 1994). Furthermore, the enzyme activity in these systems are typically much smaller than in aqueous solutions (PENCREAC'H; BARATTI, 2001). In an apparent paradox, the stability of the protein is lower in water miscible solvents ($-2.5 < \text{Log } P < 0$) than in hydrophobic solvents ($\text{log } P > 0$). The poor stability in hydrophilic solvents represent an issue for the use of lipases involving, for example, the esterification of sugars in the production of biosurfactants, since these reactions consists of polar solvents such as 2-methyl-2-butanol (SOULTANI; ENGASSER; GHOUL, 2001). Accordingly, the *B. lata* lipase presents unusual and very desirable characteristics, since their stability remained above 50% for all miscible solvents in concentrations of up to 75%. These results are similar to those obtained for *Burkholderia cepacia* G63, confirming the high stability in water miscible organic solvents of lipases produced by *Burkholderia* genus (YANG; GUO; YAN, 2007).

5. Conclusion

The findings of this work demonstrated overproducing lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. The bacterial isolate was found to be a producer of lipase with market potential, with high lipase activity obtained on a low-cost nutrient medium. The lipase activity obtained was 1137.82 U/mL and 2146.83 U/mg with desirable characteristics. Moreover, the use of chicken fat as an inducer for lipase production appears as an excellent alternative, with great appeal related to the environment. Lipase was successfully

immobilized on Celite by adsorption and showed a promising future as it allows easy immobilization with simple and inexpensive process.

Acknowledgements

B.H. Oliveira is grateful to CNPq for PhD scholarship.

6. References

- Arnaud E, Relkin P, Pina M, Collignan A (2004) Characterisation of chicken fat dry fractionation at the pilot scale. *Eur J Lipid Sci Technol* 106:591–598. doi: 10.1002/ejlt.200400946
- Boekema BKHL, Beselin A, Breuer M, et al. (2007) Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 73:3838–44. doi: 10.1128/AEM.00097-07
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54.
- Chang S-FS-W, Yen Y-H, Shieh C-J (2007) Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Appl Clay Sci* 37:67–73. doi: 10.1016/j.clay.2006.12.001
- Dalal S, Singh PK, Raghava S, et al. (2008) Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnol Appl Biochem* 51:23–31. doi: 10.1042/BA20070186
- Dandavate V, Jinjala J, Keharia H, Madamwar D (2009) Bioresource Technology Production , partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour Technol* 100:3374–3381. doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.011
- Gupta R, Gupta N, Rathi P (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763–81. doi: 10.1007/s00253-004-1568-8
- Hara P (2011) Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase: kinetic resolution in organic solvents, ionic liquids and in their mixtures. 72.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, et al. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15:29–63. doi: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x
- Joseph B, Ramteke PW (2012) Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Ann Microbiol* 63:363–370. doi: 10.1007/s13213-012-0483-y
- Joshi C, Khare SK (2013) Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled Jatropha seed cake. *Biocatal Agric Biotechnol* 2:32–37. doi: 10.1016/j.bcab.2012.08.006

- Kawakami K, Oda Y, Takahashi R (2011) Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropa oil. *Biotechnol Biofuels* 4:42. doi: 10.1186/1754-6834-4-42
- Kiran GS, Shanmughapriya S, Jayalakshmi J, et al. (2008) Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess Biosyst Eng* 31:483–92. doi: 10.1007/s00449-007-0186-0
- Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, et al. (2005) Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr Purif* 41:38–44. doi: 10.1016/j.pep.2004.12.010
- Lau HL, Ariff A, Woo KK, et al. (2011) Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African J Biotechnol* 10:7002–7009. doi: 10.5897/AJB11.213
- Li X, Liu T, Xu L, et al. (2013) Resolution of racemic ketoprofen in organic solvents by lipase from *Burkholderia cepacia* G63. *Biotechnol Bioprocess Eng* 17:1147–1155. doi: 10.1007/s12257-012-0279-8
- Liu C-H, Huang C-C, Wang Y-W, Chang J-S (2012) Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *J Taiwan Inst Chem Eng* 43:511–516. doi: 10.1016/j.jtice.2012.02.004
- Liu C-H, Lu W-B, Chang J-S (2006) Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochem* 41:1940–1944. doi: 10.1016/j.procbio.2006.04.013
- Lo C-F, Yu C-Y, Kuan I-C, Lee S-L (2012) Optimization of lipase production by *Burkholderia* sp. using response surface methodology. *Int J Mol Sci* 13:14889–97. doi: 10.3390/ijms131114889
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, et al. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40:1451–1463. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018
- Oliveira BH, Coradi GV, Attali-Angelis D, et al. (2013) Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). *Eur J Lipid Sci Technol* 115:1413–1425. doi: 10.1002/ejlt.201300087
- Oliveira BH (2012) Immobilization and partial characterization of lipases from *Fusarium* sp. by submerged fermentation. Universidade Estadual Paulista, Assis/SP, Brazil, p. 133.
- Park D-S, Oh H-W, Heo S-Y, et al. (2007) Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *J Microbiol* 45:409–17.
- Pencreac'h G, Baratti JC (2001) Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme Microb Technol* 28:473–479.
- Rathi P, Saxena R., Gupta R (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem* 37:187–192. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00200-X
- Soultani S, Engasser J-M, Ghoul M (2001) Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *J Mol Catal B Enzym* 11:725–731. doi: 10.1016/S1381-1177(00)00162-4
- USDA Economic Research Service. <http://www.ers.usda.gov/>. Accessed 20 Feb 2013.
- Vanlaere E, Baldwin A, Gevers D, et al. (2009) Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:102–11. doi: 10.1099/ijs.0.001123-0

- Wang H, Liu R, Lu F, et al. (2009) A novel alkaline and low-temperature lipase of *Burkholderia cepacia* isolated from Bohai in China for detergent formulation. *Ann Microbiol* 59:105–110.
- Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138:663–70.
- Yang J, Guo D, Yan Y (2007) Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *J Mol Catal B Enzym* 45:91–96. doi: 10.1016/j.molcatb.2006.12.007

6.2. PRODUÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO BIORREATOR

6.2.1. Cinética de crescimento e produção de lipase pela cepa *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

A enzima foi produzida por fermentação submersa em frascos agitados utilizando meio de cultura otimizado contendo gordura de frango (12,5 mL/L) e fosfato de amônio (15 g/L), tendo a atividade enzimática e crescimento celular investigados por 96 h (Figura 6.1). Durante a fermentação, observou-se que a produção da enzima ocorre lentamente durante as primeiras 48 h de cultivo, coincidindo com a duração da fase log do crescimento celular (412 U/mL). A partir deste ponto, entretanto, a atividade apresentou pequeno decréscimo com o decorrer da fermentação e fase estacionária com taxas de crescimento específico (μ) 0 a 20 h de $0,17\text{ h}^{-1}$, e de 20 a 96 h de $0,09\text{ h}^{-1}$.

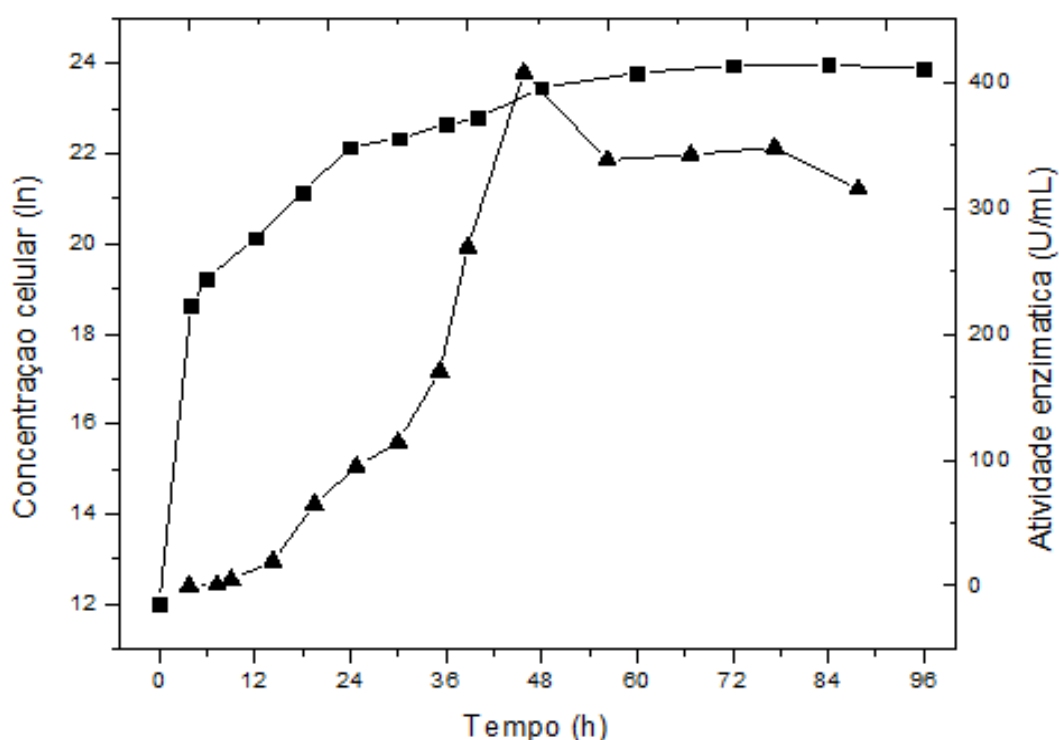


Figura 6.1 - Cinética de crescimento (■) e produção de lipase (▲) por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em frascos agitados. Condições de cultivo: meio de cultura otimizado (óleo de frango 12,5 mL/L e fosfato de amônio 15 g/L), agitação orbital de 180 rpm, pH 8,0 e 35 °C, atividade lipolítica acompanhada pelo método do *p*NPP. Experimentos realizados em triplicata.

Já nas primeiras 24 h não havia gotas de óleo visíveis nos frascos de cultivo e, com o progresso da fermentação, verificou-se turvação do meio, mesmo após a centrifugação a 10.000 g por 20 min. O problema da turvação pode ser devido à formação de emulsão pelos ácidos graxos liberados pela ação enzimática sobre triacilgliceróis do óleo de oliva ou pela presença de produtos metabólicos extracelulares, como lipopolissacarídeos, por exemplo (LIMA, 2004).

6.2.2. Produção da enzima por fermentação submersa em biorreator de bancada (7,5 litros)

A enzima foi produzida por fermentação submersa utilizando fermentador de bancada para aumento de escala de produção. A Figura 6.2 ilustra a variação de atividade volumétrica e específica bem como o crescimento celular durante a fermentação a 35 °C. A produção em fermentador apresentou pico de atividade em 72 h com 307,7 U/mL. Após 72 h a atividade sofreu queda até 100,9 U/mL. O perfil do pH mostrou uma queda de um valor inicial de 7,0 para um mínimo de cerca de 5,7, provavelmente devido à liberação de ácidos graxos como subprodutos no meio de cultura, e que ocorreu aproximadamente entre 72 e 96 h de fermentação.

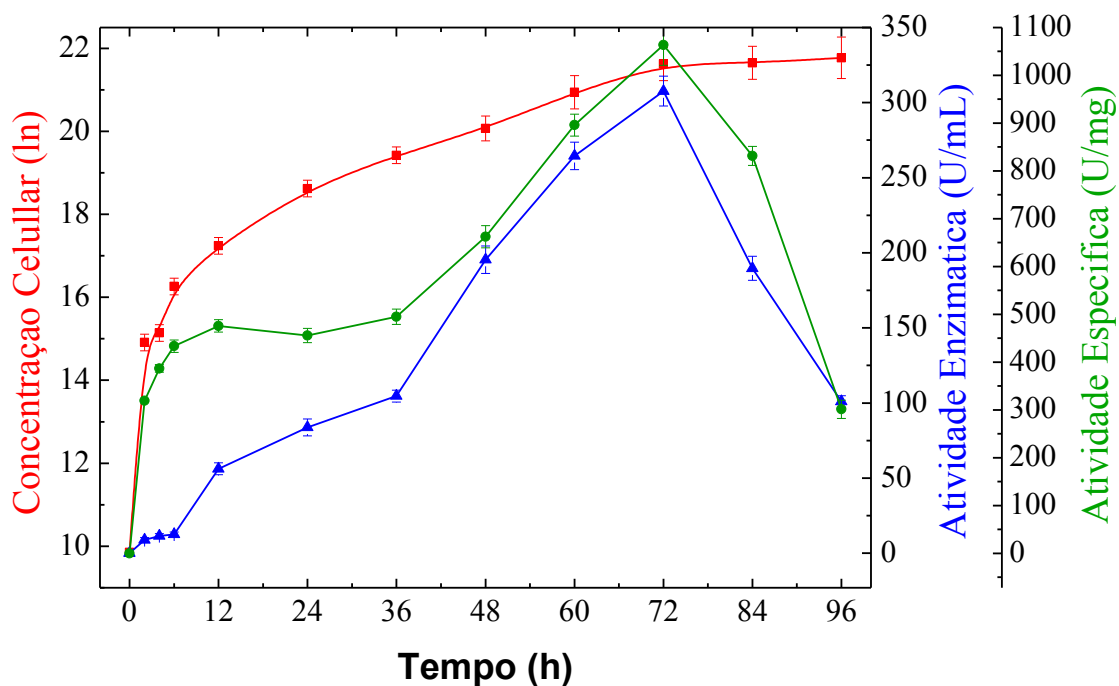


Figura 6.2 - Cinética de crescimento (■), atividade volumétrica (▲) e específica (●) por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em fermentador de 7,5 L. Condições de cultivo: meio de cultura otimizado (óleo de frango 12,5 mL/L e fosfato de amônio 15 g/L), pH 8,0 e 35 °C, taxa de fluxo de ar 1,5 vvm e taxa de agitação de 300 rpm. Atividade lipolítica acompanhada pelo método do pNPP.

O crescimento celular foi máximo também em 72 h com 21,62 (ln do número de células), apresentando crescimento celular final menor em comparação ao observado em frascos agitados, provavelmente devido a taxa de cisalhamento produzida pela agitação da hélice, porém com taxas de crescimento específico (μ) inicial de 0 a 24 h de $0,5 \text{ h}^{-1}$, muito superior à apresentada em frascos agitados ($0,17 \text{ h}^{-1}$), e de 24 a 96 h mais lenta de $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Houve menor produção de lipase em fermentador em relação aos frascos agitados e com tempo maior, com consequente diminuição da produtividade da enzima (Tabela 6.1), porém com ganho em termos de volume produzido com ainda considerável alta atividade enzimática.

Tabela 6.1 - Produção e produtividade de lipase produzida por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 por fermentação em frascos agitados e fermentador 7,5 L.

Processo	Atividade enzimática (U/mL)	Produtividade (U/L/h)
Frasco agitado (250 mL)	412,00	8583,33
Fermentador (7,5 L)	307,7	4273,61

Os resultados deste trabalho demonstraram a produção de lipase pela cepa de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em frascos agitados e biorreator de bancada. Este micro-organismo demonstra ser um produtor de lipase com potencial de mercado, como alta atividade enzimática obtida em meio fermentativo que contém nutrientes de baixo custo, como o fosfato de amônio e gordura de frango. Apesar da diminuição da produção e produtividade da enzima em biorreator, esta cepa demonstrou que pode ser utilizada para produção industrial de lipase com alta atividade (307,7 U/mL).

7. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO II – “PURIFICAÇÃO”

Esta etapa do trabalho teve como objetivo principal o estudo da purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, incluindo técnicas convencionais, tais como precipitação com sulfato de amônio, fracionamento, troca iônica, filtração em gel e cromatografia de afinidade, bem como novas técnicas, como adsorção em matriz porosa (Celite® 545), processos de membrana e ultrafiltração. Este trabalho traz a comparação de técnicas e apresenta a purificação em um único passo da lipase de *B. lata* por metodologia inovadora.

7.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE PURIFICAÇÃO

7.1.1. Análise do sobrenadante de cultura e do extrato precipitado por permeação em gel

Normalmente, micro-organismos secretam lipases no meio de fermentação. Após a remoção da biomassa e partículas insolúveis, por filtração ou centrifugação, o sobrenadante pode ser concentrado utilizando ultrafiltração, extração com solventes orgânicos ou precipitação. Aproximadamente 80% de todos os métodos de purificação utilizados incluem um passo de precipitação. Cerca de 60% dos procedimentos de purificação utilizam sulfato de amônio, 35% etanol, acetona ou um ácido (normalmente ácido clorídrico) para a precipitação da enzima utilizada (TAN *et al.*, 2015). Em processos de purificação simples, o passo de precipitação está normalmente dentre as primeiras fases de recuperação, seguido de uma separação cromatográfica. As técnicas de precipitação têm, normalmente, um rendimento elevado (87%) em comparação com métodos de cromatografia, que resultam em rendimentos inferiores de cerca de 60-70% (TAN *et al.*, 2015).

A cromatografia de permeação em gel baseia-se na separação de proteínas de acordo com a massa molecular e tem sido utilizada para a purificação de lipases microbianas

(DÜNHaupt; WAGNER, 1992; SAXENA *et al.*, 2003). Trabalhos anteriores mostraram que muitas vezes as lipases formam agregados de alta massa molar, que eluem no volume morto da coluna de permeação em gel, o que facilita a purificação posterior. A formação de agregados pode ocorrer devido à presença de lipídios ou à característica hidrofóbica que a estrutura protéica das lipases apresenta. Assim, o objetivo deste ensaio foi verificar se a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 apresentava a tendência de formar agregados, ou se já era produzida como um agregado de alta massa molar no meio de cultura.

O extrato precipitado, centrifugado duas vezes a 10.000g por 15 min, foi aplicado em coluna de permeação em gel Sephadex G-75. O perfil de eluição está apresentado na Figura 7.1 A. A atividade enzimática foi eluída logo após o volume morto da coluna ($V_0 = 11$ mL), indicando a presença de um agregado de alta massa molar (> 80 kDa). O fator de purificação observado foi de 8,6, conforme mostra a Tabela 7.1, mas com apenas 34,5% de recuperação. As frações com atividade lipolítica eluídas entre os volumes de 8 e 16 mL foram reunidas, concentradas e analisadas por eletroforese SDS-PAGE (Figura 7.2). As frações eluídas da coluna apresentaram uma quantidade significativamente menor de bandas quando comparadas ao sobrenadante de cultura e ao extrato precipitado, o que indicou uma purificação parcial neste passo cromatográfico na purificação da enzima.

Tabela 7.1 - Análise do extrato precipitado de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 por permeação em gel.

Etapas	Atividade total (U)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura	1291,60	139,49	0,3643	382,907	100,00	1,00
Extrato precipitado	2090,46	2090,46	2,5597	816,682	161,85	2,13
Sephadex G-75	446,38	78,55	0,0247	3278,214	34,56	8,56

Condições de ensaio: Coluna Sephadex G-75, tampão fosfato 0,02 mol/L pH 8,0 contendo NaCl 0,15 mol/L, fluxo de 0,4 mL/min. FP = Fator de Purificação.

O sobrenadante de cultura foi aplicado na mesma coluna (Figura 7.1 B) a fim de se verificar se a agregação era causada pelo tratamento com sulfato de amônio. Igualmente a atividade enzimática foi eluída no volume morto, indicando que a interação entre as estruturas protéicas já existia no meio de fermentação e não era devido à concentração das proteínas por precipitação com sulfato de amônio. É interessante notar que, comparando-se as Figuras 7.1 A e B, percebe-se a contribuição da precipitação com sulfato de amônio a 80% na diminuição parcial da concentração de outras proteínas. Existe um grande pico de absorbância a 280 nm entre os volumes de eluição de 20 e 30 mL na análise do sobrenadante de cultura (Figura 7.1 B), que diminui consideravelmente após a precipitação com sulfato de amônio (Figura 7.1 A). Porém, observando-se a eletroforese SDS-PAGE (Figura 7.2) não fica evidente a diminuição do número de bandas no extrato precipitado em comparação ao sobrenadante de cultura.

O baixo rendimento de recuperação da enzima após os ensaios de filtração com Sephadex G-75 pode ser devido à formação de agregados de alta massa molecular. Esta formação de agregados também impossibilitou a reutilização da coluna pelo entupimento do gel logo após a primeira passagem, dificultando a reprodutibilidade e eficácia do protocolo.

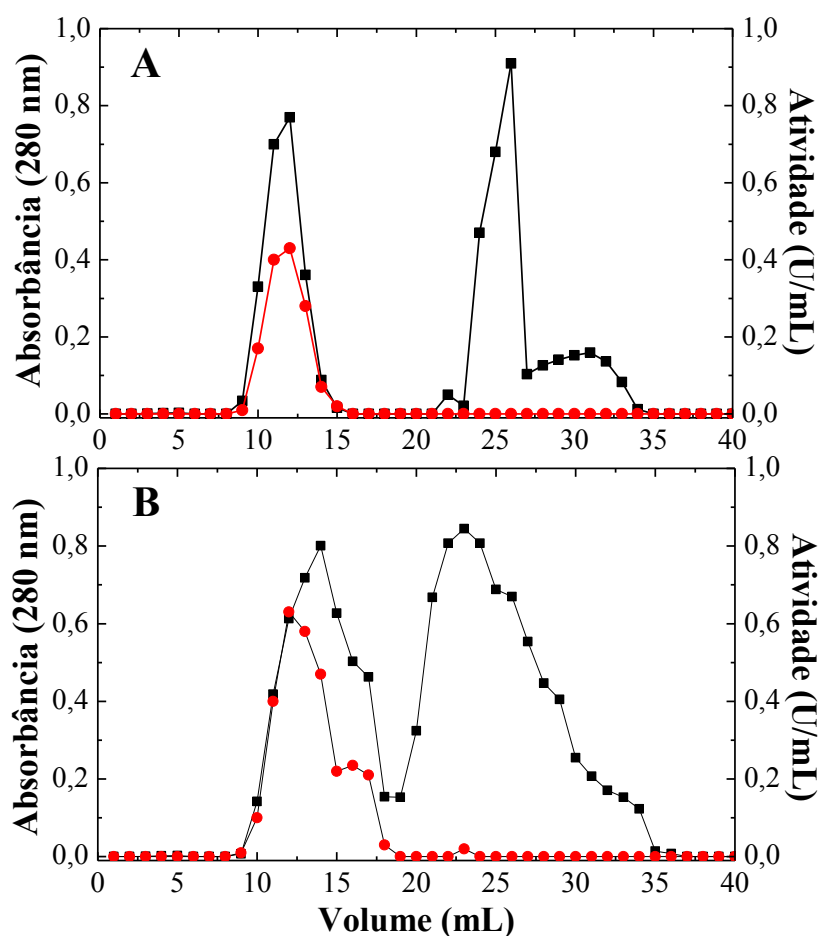


Figura 7.1 - Perfil de eluição do extrato precipitado de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 na coluna de Sephadex G-75. A) Injeção do extrato precipitado; B) Injeção do sobrenadante de cultura. Atividade lipolítica (●). Absorbância a 280 nm (■). Condições: tampão tris 0,02 mol/L, pH 7,0 com NaCl 0,15 mol/L; fluxo de 0,2 mL/min; injeção de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

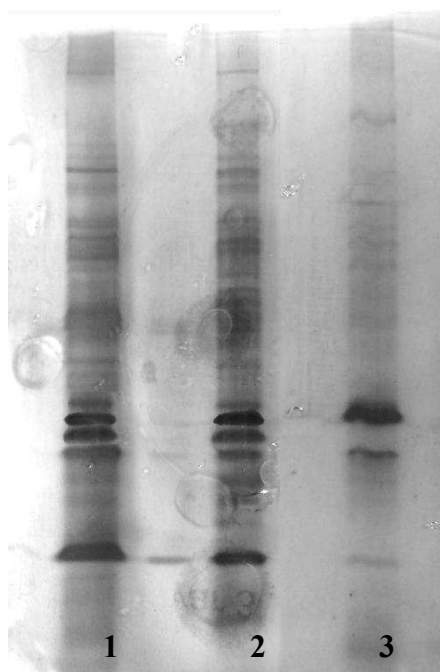


Figura 7.2 - Eletroforese SDS-PAGE da amostra eluída da coluna de permeação em gel Sephadex G-75. Linha 1: sobrenadante de cultura; linha 2: extrato precipitado; linha 3: Sephadex G-75. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

Muitas lipases extracelulares produzidas por micro-organismos possuem a tendência para formar agregados. Geralmente são as proteínas hidrofóbicas que possuem este comportamento, fator que depende fortemente do ambiente, condições de tratamento como solvente, pH, temperatura, concentração de sais e de agentes tensoativos (FINK, 1998; VELU *et al.*, 2012). Na literatura estão relatados vários exemplos de lipases que formam agregados, como as lipases produzidas por bactérias do gênero *Burkholderia*: *B. cepacia* (CESCUTTI *et al.*, 2006; HARA, 2011), *B. cenocepacia* ST8 (SHOW *et al.*, 2012) e *B. pseudomallei* (PARK; SHAFFER; BENNETT, 2009); lipases de *Pseudomonas*: *P. cepacia* (DÜNHaupt; WAGNER, 1992), *P. aeruginosa* (STUER; JAEGER; WINKLER, 1986), *P. stutzeri* PS59 (LI *et al.*, 2014), *P. fluorescens* (LIMA *et al.*, 2013) e *P. protegens* Pf-5 (ZHA *et al.*, 2014); lipases de *Bacillus*: *B. thermocatenuatus* (RÚA *et al.*, 1997; SCHLIEBEN; NIEFIND; SCHOMBURG, 2004; SCHMIDT-DANNERT *et al.*, 1994), *Bacillus* sp. THL027 (DHARMSTHITI; LUCHAI, 1999), *B. thermoleovorans* (LEE *et al.*, 2001), *B. subtilis* (ACHARYA; RAO, 2003); outros micro-organismos: *Penicillium*

citrinum (KRIEGER *et al.*, 1999), *Yarrowia lipolytica* (FICKERS; MARTY; NICAUD, 2011), *Aeromonas caviae* AU04 (VELU *et al.*, 2012), *Candida rugosa* (LIOU; MARANGONI; YADA, 1999; PERNAS *et al.*, 2001), entre outros.

A agregação pode ser devida a um alto conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na estrutura protéica da enzima (SUGIMURA *et al.*, 2000) ou à presença de materiais hidrofóbicos, tais como lipídios e lipopolissacarídeos, que estão no meio de fermentação (STUER; JAEGER; WINKLER, 1986). Isto é especialmente verdadeiro quando se utilizam lipídios como indutores no meio de cultura para produção de lipases (TAN *et al.*, 2015), como foi o caso deste trabalho. O rompimento destes agregados e a obtenção de enzimas puras têm sido um desafio e, para isto, diferentes metodologias têm sido empregadas, como o tratamento com detergentes (STUER; JAEGER; WINKLER, 1986), técnicas de extração líquido x líquido e cromatografias de interação hidrofóbica (SAXENA; SHEORAN; *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2015).

7.1.2. Ensaios para clarificação do extrato precipitado e desagregação da enzima

Mesmo após a precipitação com sulfato de amônio com 80% de saturação, o extrato precipitado também se apresentava extremamente turvo e, de acordo com as análises de permeação em gel apresentadas anteriormente, a enzima estava presente na forma de agregados de alta massa molar. A natureza dos agregados, desconhecida, pode ser constituído de material proteico e lipídico. Alguns autores especulam a possibilidade da interação de lipopolissacarídeos e lipases, ou lipídios residuais do meio de fermentação e lipases (DANDAVATE *et al.*, 2009; STUER; JAEGER; WINKLER, 1986). Devido à esta alta turbidez do sobrenadante de cultura, como citado anteriormente, mesmo após centrifugações a 10.000g por 30 min, o extrato precipitado passou por ensaio de clarificação e desagregação da enzima.

Com o objetivo de obter um extrato enzimático límpido e também para o rompimento dos agregados, diferentes testes foram realizados, como a precipitação com sulfato de amônio a 80% e tratamento com isopropanol 10-40 % (v/v). Em todos os testes a atividade enzimática foi acompanhada pela hidrólise do *p*NPP.

7.1.3. Ensaio para clarificação

a) Precipitação com sulfato de amônio

Para tentar clarificar o extrato sem perder atividade enzimática procedeu-se a precipitação do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio a 80% de saturação. Os resultados estão mostrados na Tabela 7.2.

Tabela 7.2 - Tratamento do sobrenadante de cultura com Sulfato de Amônio a 80%

Fração	Atividade (U total)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura	464324	473,8	0,3643	1300,58	100,00	1,00
Enzima deslipidada	398430	419,4	0,3529	1188,44	85,81	0,91
Extrato precipitado	514080	1512	0,2970	5090,91	110,72	3,91

FP: Fator de Purificação.

O precipitado desta etapa de clarificação do sobrenadante de cultura demonstrou uma leve ativação enzimática com 110% da atividade inicial e, após ressuspensão, apresentou-se tão turvo quanto o extrato inicial. Assim, a precipitação com sulfato de amônio não foi eficaz em diminuir a formação de agregados pela enzima. Porém, pode-se observar diminuição da concentração protéica, caracterizando uma pré-purificação.

b) Tratamento do extrato precipitado com Isopropanol

Dünhaupt *et al.* (1992) e Rúa *et al.* (1997) observaram o rompimento de agregados de lipase de *P. cepacia* e *B. thermocatenuatus* utilizando isopropanol 30 e 70% (v/v),

respectivamente. Desta forma, com o intuito de desagregar a enzima, separar os compostos hidrofóbicos e clarificar o extrato precipitado, a adição de isopropanol foi o método escolhido. As etapas do tratamento do extrato precipitado com isopropanol em diferentes concentrações (0-40%, v/v) estão apresentadas na Figura 7.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.3. As dosagens de atividade enzimática foram realizadas com o extrato diluído em tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,0 ou em isopropanol 0-40%.

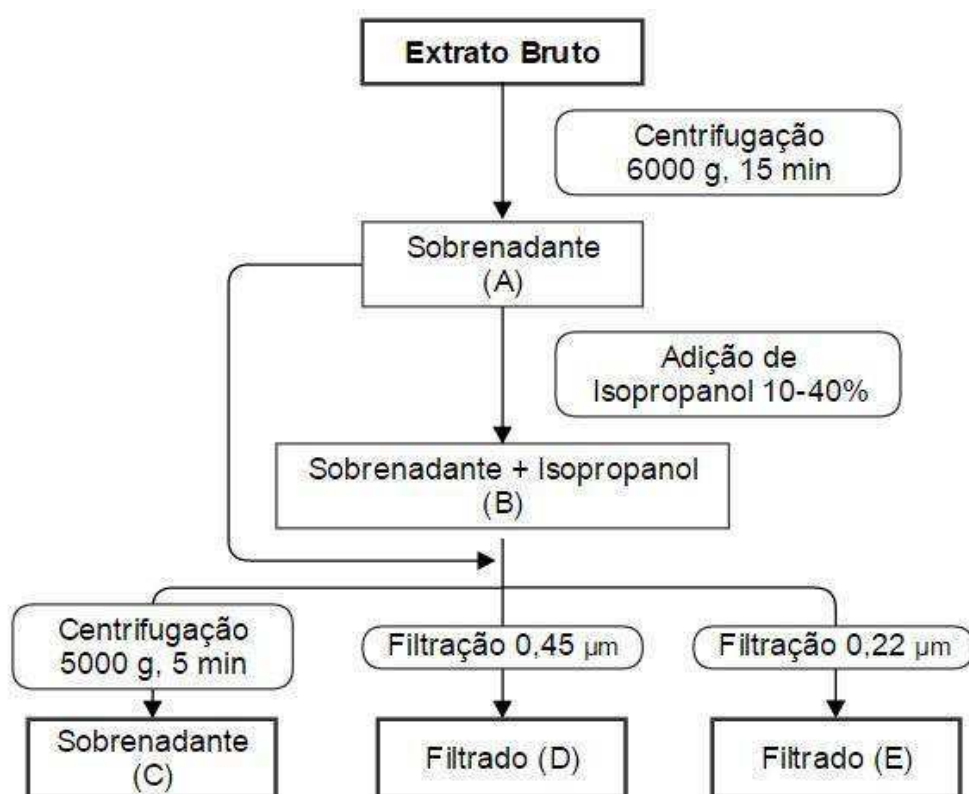


Figura 7.3 - Etapas do tratamento do extrato precipitado com isopropanol e filtração para clarificação e rompimento de agregados.

Com tratamentos com isopropanol a 10 e 20% houve aumento da atividade enzimática, provavelmente devido ao início da desagregação da enzima, porém sem clarificação total do extrato, como exemplificado na Figura 7.4. O mesmo foi evidenciado por Dünhaupt e Wagner (1992). Este efeito pode ser devido ao rompimento de agregados enzimáticos ou a um efeito sobre a própria estrutura protéica.

Tabela 7.3 - Tratamento do extrato precipitado de *Burkholderia lata* LBBIO-BL-02 com diferentes concentrações de isopropanol.

Etapas	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Atividade relativa (%)	FP
Extrato precipitado	947,60	0,2970	3190,46	100,00	1,00
Sobrenadante (A)	827,82	0,2063	4012,16	87,36	1,26
Sobrenadante (0,45 µm) - (D)	437,29	0,0334	13074,27	46,15	4,10
Sobrenadante (0,22 µm) - (E)	75,26	0,0071	10538,30	7,94	3,30
Isopropanol 10% - (B)	1035,92	0,1903	5443,46	109,32	1,71
Isopropanol 10% (0,22 µm) - (E)	56,44	0,0193	2917,73	5,96	0,91
Isopropanol 20% (B)	903,08	0,1870	4828,57	95,30	1,51
Isopropanol 20% (0,22 µm) - (E)	78,11	0,0402	1940,62	8,24	0,61
Isopropanol 30% (B)	494,30	0,1963	2518,16	52,16	0,79
Isopropanol 30% (0,45 µm) - (D)	229,19	0,0368	6221,89	24,19	1,95
Isopropanol 30% (0,22 µm) - (E)	133,41	0,0386	3460,35	14,08	1,08
Isopropanol 40% (B)	501,62	0,1893	2650,03	52,94	0,83
Isopropanol 40% (0,22 µm) - (E)	582,67	0,0843	6910,50	61,49	2,17

Experimentos realizados em triplicata. Atividade enzimática acompanhada pela hidrólise do *p*NPP. FP: Fator de Purificação.

Após o tratamento com isopropanol 30% o extrato obtido estava límpido (Figura 7.4), mas a recuperação de atividade foi de apenas 52%. Não foi observado ganho de rendimento ou purificação com nenhuma filtração dos sobrenadantes. Filtrações dos sobrenadantes tratados com maiores concentrações de isopropanol apresentaram maiores rendimentos, indicando também maior desagregação da enzima facilitando a filtração.

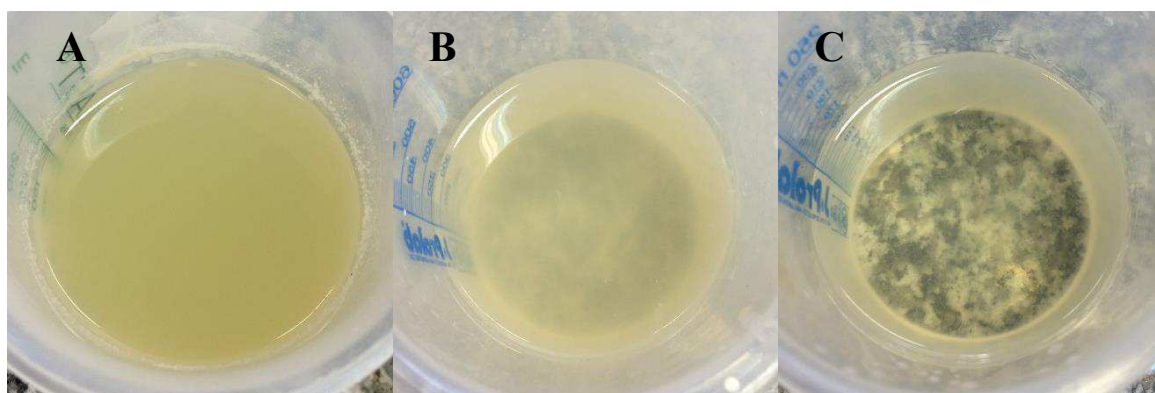


Figura 7.4 - Tratamento do extrato precipitado de *Burkholderia lata* LBBIO-BL-02 (A) com isopropanol 10% (B) e 30% (C).

7.2. ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

Baseando-se nos resultados obtidos nos testes de clarificação e ciente das características hidrofóbicas da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, três estratégias de purificação foram propostas. A primeira estratégia incluiu a precipitação do extrato precipitado com sulfato de amônio 80% e a utilização da característica apolar da enzima para ligá-la por adsorção seletiva em Celite® 545 utilizando isopropanol e tensoativo Triton X-100. A segunda estratégia incluiu a precipitação do sobrenadante de cultura com sulfato de amônio 80% e a aplicação do extrato precipitado em coluna de interação hidrofóbica DEAE-Sephadex com eluição com tampão Tris-HCl 0,01 mol/L pH 7,0 e NaCl 0,1 mol/L. A terceira estratégia utilizou o sobrenadante de cultura diretamente em um protocolo não convencional de apenas um passo. Este protocolo não está descrito neste trabalho por estar em processo de requerimento de patente.

7.2.1. Purificação por adsorção e dessorção seletiva em Celite® 545

Como já demonstrado na literatura (AKOVA; USTUN, 2000; CHANG; YEN; SHIEH, 2007; LIU. *et al.*, 2009; OLIVEIRA; LIMA, 2014), lipases podem ser facilmente adsorvidas em Celite®, principalmente devido ao forte caráter hidrofóbico destas enzimas que seria responsável pela formação dos agregados enzimáticos. Assim, com o objetivo de se obter uma purificação parcial do extrato enzimático, foram realizados ensaios de adsorção e dessorção controladas testando diferentes concentrações de isopropanol como agente de adsorção (60-100%, v/v) e Triton X-100 como agente de dessorção.

A adsorção de lipases em Celite pode ser feita misturando-se o suporte com a enzima em solução e posteriormente removendo a água por evaporação ou liofilização (BOSLEY; PEILOW, 2000). Uma alternativa, mais utilizada atualmente, é a precipitação da enzima nos

poros do suporte utilizando um solvente orgânico polar, como acetona e álcoois. Desta maneira, a utilização de isopropanol neste trabalho em diferentes concentrações (60-100%) visou estudar a melhor condição para a adsorção seletiva da lipase de *B. lata* LLBIO-BL02 e uma pré-purificação da enzima. Assim, o melhor resultado pôde ser observado em todos os ensaios com a adsorção da enzima utilizando isopropanol 90%, independentemente da solução utilizada para dessorção (Tabela 7.4), precipitando a enzima e favorecendo sua ligação ao suporte. Assim, a adsorção com isopropanol 90% foi utilizada nos ensaios utilizando diferentes valores de pH para dessorção.

A dessorção seletiva da enzima é igualmente importante para o objetivo de purificação parcial. Desta forma, diferentes soluções de dessorção foram avaliadas: água deionizada, diferentes valores de pH, sal (sulfato de amônio), tensoativo (Triton X-100) e isopropanol em baixa concentração (10%, v/v).

O melhor resultado de purificação parcial foi obtido com dessorção feita com tampão citrato-fosfato pH 7,0, com um fator de purificação de 7,6, porém com uma recuperação de apenas 4,3%. O grupo silanol (SiH_3OH) presente na superfície do suporte começa a dissociar-se em solução aquosa a um pH superior a 3 e dissocia-se completamente em pH superior a 8 (HSU; TSAI, 2001). Essa dissociação abre pontos para a adsorção da lipase ao suporte, assim, mudanças no pH poderiam alterar o grau de dissociação do grupo silanol proporcionando uma dessorção seletiva nas proteínas adsorvidas. Embora tenha ocorrido diferença significativa na dessorção da enzima em diferentes valores de pH, em nenhum ensaio a recuperação foi superior a 8% (Tabela 7.4).

Tabela 7.4 - Ensaio de adsorção e dessorção controladas da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em Celite® 545.

Etapas		Atividade (U total)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura		697,45	1,821	382,91	100,00	1,00
Sobrenadante de cultura deslipidado		688,36	1,765	390,07	98,70	1,02
Extrato precipitado		864,37	1,026	842,46	123,93	2,20
Sol. de adsorção - Isopropanol (v/v) ^a		Sol. de dessorção				
100%	Tampão pH 7 ^b	8,36	0,012	676,85	1,20	1,77
90%		30,01	0,010	2918,32	4,30	7,62
80%		34,79	0,013	2654,02	4,99	6,93
70%		21,74	0,020	1114,32	3,12	2,91
60%		3,07	0,007	411,55	0,44	1,08
100%	Triton X-100 0,5% (m/v) ^c	35,27	0,041	853,00	5,06	2,23
90%		109,65	0,109	1004,43	15,72	2,62
80%		86,75	0,106	821,38	12,44	2,14
70%		81,72	0,111	739,09	11,72	1,93
60%		15,88	0,037	429,13	2,28	1,12
90%	H ₂ O deionizada	92,55	0,048	1909,25	13,27	4,99
90%	Tampão pH 5 ^b	35,25	0,021	1686,41	5,05	4,40
90%	Tampão pH 6 ^b	30,22	0,019	1577,68	4,33	4,12
90%	Tampão pH 8 ^b	37,84	0,054	701,28	5,43	1,83
90%	Tampão pH 9 ^b	55,44	0,192	287,99	7,95	0,75
90%	Isopropanol 10% ^a	87,32	0,069	1256,62	12,52	3,28
90%	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 mol/L ^d	35,38	0,118	299,31	5,07	0,78
90%	Sem dessorção*	1475,33*	**	**	211,53	**

a: Solução de isopropanol em tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,05 mol/L. b: Tampão pH 5 ao 7 citrato-fosfato 0,05 mol/L, tampão pH 8 e 9 Tris-HCl 0,05 mol/L. c: Solução de Triton X-100 em tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,05 mol/L. d: Solução de (NH₄)₂SO₄ em tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,05 mol/L. *Atividade mensurada diretamente com a enzima imobilizada. **Concentração de proteína não possível de ser mensurada. FP: Fator de Purificação.

Em todos os ensaios de dessorção, com exceção do sulfato de amônio e tampão pH 9,0, foi observado um aumento no fator de purificação da enzima, indicando uma purificação parcial. Porém, comparando-se com o controle sem dessorção, em nenhum ensaio foi observada uma dessorção efetiva, com recuperação de atividade sempre inferior a 16% (Tabela 7.4). Nem mesmo a adição de tensoativo Triton X-100, descrito por Nikolić *et al.*

(2009) e Sugahara (2014) como eficiente para a dessorção de lipases, promoveu aumento na recuperação da enzima.

A Celite® tem sido um suporte para imobilização de lipases utilizado com sucesso por outros autores como Chang *et al.* (2007), que obteve a eficiência de 34% para a imobilização da lipase de *C. rugosa* e Liu *et al.* (2009), que obteve eficiência de 83% para a imobilização da lipase de *Burkholderia* sp. C20 com atividade de 273,5 U/g. Assim, a Celite® apresenta um bom potencial para a adsorção de lipases. Neste trabalho foi observado imobilização eficiente da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 com alto rendimento, porém, a utilização do suporte com o intuito de adsorção e dessorção seletiva não foi eficiente pela dificuldade no processo de dessorção. Outras formas poderiam ter sido testadas, porém utilizariam outros componentes e alguns necessitariam de grandes concentrações, dificultando a remoção dos mesmos em processos subsequentes.

7.2.2. Purificação por cromatografia de troca iônica

Como descrito anteriormente (7.1.3b), o tratamento do extrato precipitado com isopropanol resultou na sua clarificação. Além disso, o isopropanol tem sido citado na literatura por seu efeito de romper agregados de lipases (SUGIHARA *et al.*, 1992). Diante disso, uma segunda estratégia de purificação da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 foi proposta, utilizando isopropanol para tratamento do extrato precipitado e para eluição da coluna de troca iônica DEAE-Sephadex.

Após o cultivo, o sobrenadante de cultura foi centrifugado e precipitado com sulfato de amônio a 80%. Após nova centrifugação, ressuspensão em tampão e diálise, o extrato precipitado foi clarificado por adição de 30% (v/v) de isopropanol. O extrato precipitado clarificado foi aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex, a enzima foi eluída com tampão citrato-fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 e a fração ligada foi eluída pelo mesmo tampão

contendo NaCl 0,1 mol/L (Figura 7.5). Obteve-se fator de purificação de 11 vezes com atividade específica de 8238 U/mg, porém com uma recuperação de atividade de apenas 8,3% (Tabela 7.5). Mesmo altas concentrações de NaCl não foram eficazes em aumentar os índices de recuperação da enzima, demonstrando que a enzima não permaneceu iônica ligada à matriz. Devido à não total purificação do extrato enzimático, como pode ser visto pela análise em eletroforese (Figura 7.6) e, principalmente, à baixa recuperação da atividade, este experimento não foi levado adiante.

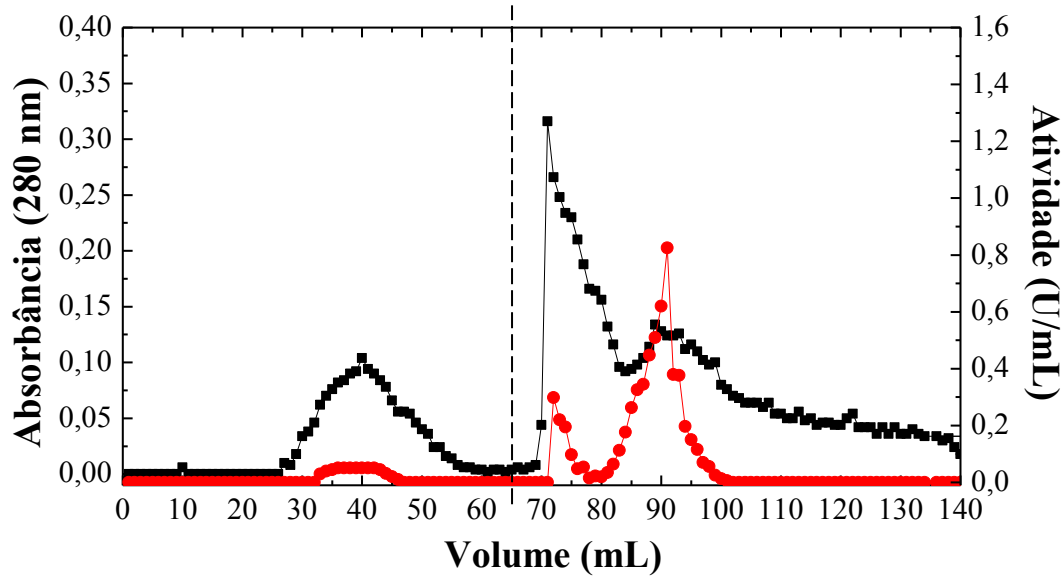


Figura 7.5 - Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex. Aplicação do extrato precipitado clarificado e eluição com tampão citrato-fosfato pH 7,0 0,01 mol/L. A fração ligada foi eluída por tampão contendo NaCl 0,1 mol/L (linha tracejada). Atividade lipolítica (●). Absorvância a 280 nm (■). Condições: fluxo de 0,2 mL/min; injeção de amostra de 1 mL; coleta de frações de 1 mL.

Tabela 7.5 - Purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephadex

Etapas	Atividade (U total)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura	2070	414	0,5640	734,043	100	1,00
Extrato precipitado	1927	1927	1,7280	1115,16	93,09	1,52
Extrato clarificado	1178	1178	1,6840	699,53	56,91	0,95
DEAE-Sephadex	173	17,3	0,0021	8238,10	8,358	11,22

FP: Fator de Purificação

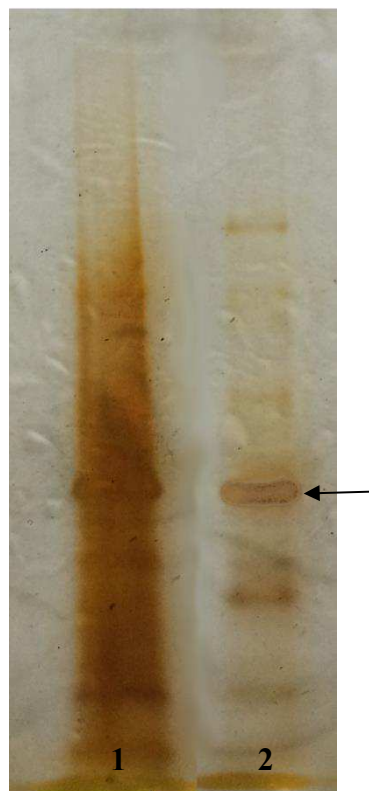


Figura 7.6 - Eletroforese SDS-PAGE. Linha 1: extrato precipitado clarificado com isopropanol 30%; linha 2: frações eluídas da DEAE-Sephadex com NaCl 0,1 mol/L. A seta indica a banda da enzima. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

7.2.3. Purificação por método não convencional de passo único utilizando Metodologia de Passo Único (“MPU”)

Após os ensaios preliminares de purificação pôde-se conhecer as características apolares formando agregados de alta massa molecular da proteína a ser purificada. Assim, um método não convencional de passo único foi desenvolvido, sendo capaz de purificar a enzima de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em pequenos (5 mL) e grandes volumes (500 mL), em solução, diretamente do sobrenadante de cultura deslipidado e sem a necessidade de colunas cromatográficas.

A precipitação com sulfato de amônio a 80%, embora tenha apresentado bons resultados de pré-purificação, não se faz necessária neste protocolo. Assim, este protocolo apresenta facilidade (passo único), baixo custo (reagente utilizado na “MPU” é encontrado

em abundância em todo o mundo), eficiência na recuperação da enzima e, devido a sua inovação, segue em processo de pedido de patente por seus autores.

A lipase purificada apresentou um fator de purificação de 46,5, atividade específica de 18.422 U/mg e recuperação de atividade de 53% (Tabela 7.6). A eletroforese SDS-PAGE indicou a presença de uma única banda de 32 kDa (Figura 7.7 A e B), que foi perto de muitas lipases conhecidas de *Burkholderia* sp. com pesos moleculares entre 29 e 35 kDa (DALAL *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2007; UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2015; WANG; YU; XU, 2009; YANG; GUO; YAN, 2007; YAO *et al.*, 2013). Este protocolo de purificação tem sido aplicado para a purificação de lipases produzidas por outros micro-organismos em nosso laboratório e tem se mostrado eficiente (dados não mostrados), ou seja, além de um método simples, barato e eficiente, também se mostra versátil para a purificação de lipases.

Tabela 7.6 - Purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em um passo por método não convencional utilizando “MPU”

Fração	Atividade total (U)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura	697,5	139,5	0,35200	396,31	100,00	1,00
“MPU”	375,7	375,7	0,00204	18422,12	53,86	46,48

FP: Fator de Purificação.

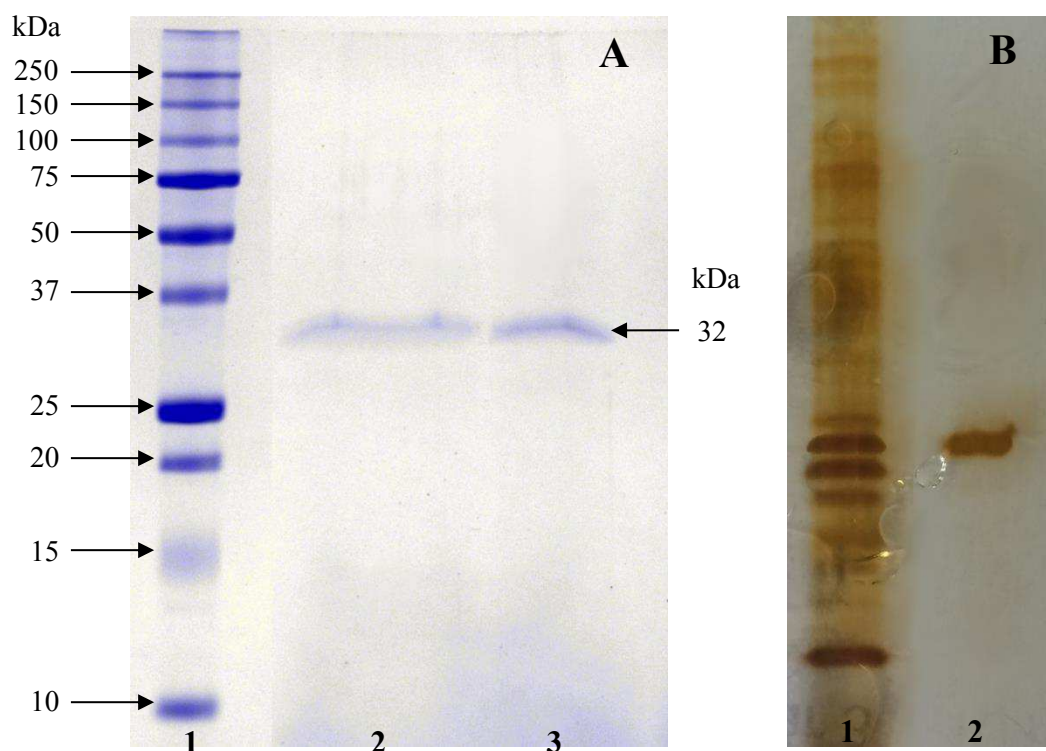


Figura 7.7 - Eletroforese SDS-PAGE. A) Linha 1: marcadores moleculares; linha 2: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 100 µg de proteína; linha 3: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 45 µg de proteína. Revelação por Coomassie Blue. B) Linha 1: Sobrenadante de cultura; linha 2: lipase purificada com “MPU”, aplicação de 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

Assim, a lipase extracelular de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 foi purificada até à homogeneidade por passo único utilizando a “MPU” com eficiência superior às metodologias tradicionais utilizando colunas cromatográficas (Figura 7.8).

Em comparação com a maioria das outras lipases purificadas, a purificação da lipase de *B. lata* foi bastante simples e com elevada recuperação. Ogino *et al.* (2000), purificando uma lipase de *P. aeruginosa* LST-03, descreve um processo de quatro etapas sucessivas com 12,6% de recuperação. Chaiyaso *et al.* (2012), também utilizando um protocolo de quatro etapas, incluindo uma cromatografia de troca iônica e uma cromatografia de permeação em gel, purificaram a lipase de *Burkholderia multivorans* PSU-AH130 com recuperação de 12,1%. Ungcharoenwiwat e Kittikun (2015) purificaram a lipase de *Burkholderia* sp. EQ3 com precipitação com acetona e mais dois passos cromatográficos obtendo uma purificação

de 70,9 vezes, porém com uma recuperação de apenas 7,6%. A lipase de *Burkholderia ambifaria* YCJ01 foi purificada com um fator de 24,2 e recuperação de 12,5%, utilizando cromatografia de troca aniônica e interação hidrofóbica (YAO *et al.*, 2013). A lipase extracelular de *Burkholderia ubonensis* SL-4 foi purificada por Q Sepharose Fast Flow (FF) e cromatografia de filtração em gel Superdex-75 com recuperação de 13,34% e uma purificação de 68,5 vezes, e a atividade específica final de 362,82 U/mg (YANG *et al.*, 2016). Park *et al.* (2007), utilizando processo de adsorção-dessorção em matriz de polipropileno de uma etapa, purificou a lipase de *Burkholderia* sp. HY-10 em 54,5 vezes com um rendimento de 30%. Rendimentos de purificação mais baixos, de 4,8% para a lipase de *B. cepacia* ATCC 25416 (WANG; YU; XU, 2009), 3,9% para a lipase de *Burkholderia* sp. GXU56 e 0,96% para a lipase de *B. multivorans* V2 (DANDAVATE *et al.*, 2009), também foram relatados. Rahman *et al.* (2005) conseguiram obter uma maior recuperação, de 52%, para a lipase de *Pseudomonas* sp. S5, mas empregando cromatografia de afinidade em combinação com cromatografia de troca iônica. Patel *et al.* (2014) descreveram a purificação da lipase de *Pseudomonas* sp. DMVR46 utilizando precipitação com acetona e cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) com um fator de purificação de 28,9 e recuperação de 29,7%. Jinwal *et al.* (2003) conseguiram uma purificação de 240 vezes com recuperação de 14,8% para a lipase de *Pseudomonas mendocina* PK-12CS utilizando precipitação com acetona e cromatografia de troca iônica.

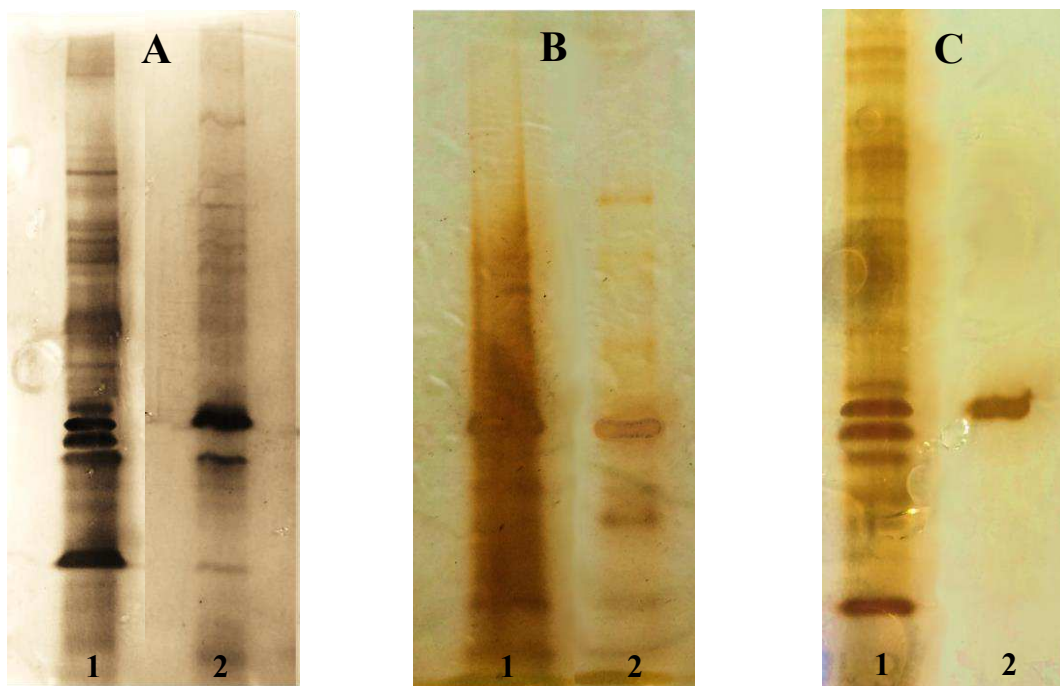


Figura 7.8 - Eletroforeses SDS-PAGE comparando a purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 utilizando: A) Sephadex-G75, B) DEAE-Sephadex e C) “MPU”. Linhas 1: sobrenadante de cultura, linhas 2: extrato purificado de acordo com o método indicado pela letra. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

É muito comum que processos de purificação de lipases exijam vários passos, incluindo um ou mais passos cromatográficos (TAN *et al.*, 2015). Assim, uma série de processos ou combinações de etapas de purificação acabam sendo necessários, elevando os custos e diminuindo o rendimento do processo global. Comparando-se todos estes exemplos da literatura, a purificação simples e com relativa alta recuperação é altamente promissora para a aplicação em larga escala para purificação de lipases.

8. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO III – “CARACTERIZAÇÃO”

As lipases são produzidas por vários micro-organismos, tanto eucariotos quanto procariotos, e também por plantas e animais. As propriedades cinéticas e as especificidades das lipases produzidas por diferentes organismos variam amplamente (SOBERÓN-CHAVEZ; PALMEROS, 1994). As lipases compõem a classe de enzimas mais amplamente

utilizadas na síntese orgânica (KAPOOR; GUPTA, 2012). A sua alta especificidade, associada a uma grande variedade de substratos possíveis, uma melhor estabilidade em meios contendo solventes orgânicos (em comparação com outras enzimas) são fatores que contribuem para este fim. As lipases também podem exibir estabilidade variada para condições extremas de pH, temperatura, líquidos iônicos e disponibilidade de água.

Conhecer estas características de uma enzima é de extrema importância para a compreensão de seu funcionamento catalítico e, principalmente, para dar o direcionamento correto para sua aplicação biotecnológica. Desta forma, diferentes experimentos foram realizados com a lipase produzida pela bactéria *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, em sua forma bruta (sobrenadante de cultura) e purificada (“MPU”), para posteriores estudos de aplicação biotecnológica de interesse industrial.

8.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

As Figuras 8.1 A e B mostram o efeito da temperatura, em uma faixa entre 20 e 90 °C, na atividade das lipases de *B. lata* bruta e pura, respectivamente. As maiores atividades foram observadas a 55 °C para as duas formas da enzima. Em temperaturas inferiores a 40 °C a enzima apresentou menos de 50% de sua atividade medida a 55 °C, mostrando grande influência da temperatura na atividade. Temperaturas superiores a 60 °C afetaram mais a atividade da lipase pura, com queda superior a 80% da atividade. Já a lipase bruta apresentou 25% de atividade a 80 e 85 °C e, mesmo a 90 °C, apresentou cerca de 5% da atividade. A atividade em temperaturas elevadas é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, como as lipases, uma vez que possam ser submetidas às condições típicas no setor, como reatores com temperaturas superiores à 50 °C (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), além de utilização de substratos com alto ponto de fusão (KLIBANOV, 2001), como lipídios e gorduras saturadas, substratos naturais de lipases.

Lipases produzidas pelo gênero *Burkholderia* apresentam a máxima atividade em temperaturas que variam de 30 a 60 °C (CHAIYASE *et al.*, 2012; DALAL *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2007; UNGCHAROENWIWAT; KITTIKUN, 2015; WANG *et al.*, 2009a; WANG *et al.*, 2009b; WEI *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2013). Entretanto, também são relatadas exceções a esta faixa de temperatura, é o caso das lipases de *Burkholderia cepacia* G63 (YANG *et al.*, 2007) e de *Burkholderia* sp. (formalmente *Pseudomonas* sp.) (RATHI *et al.*, 2000), que apresentam atividade máxima em 70 e 90 °C, respectivamente.

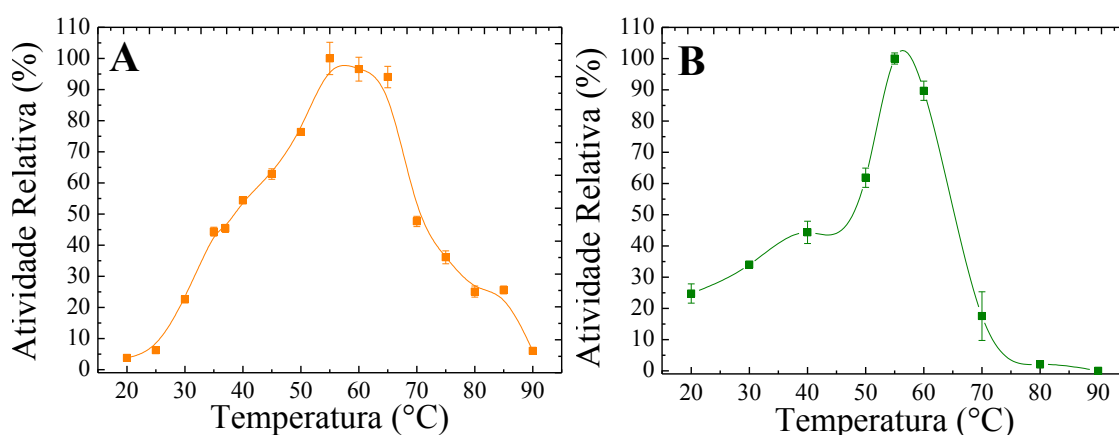


Figura 8.1 - Efeito da temperatura na atividade lipolítica da lipase bruta (A) e pura (B) de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições do ensaio: temperatura entre 20 e 90 °C, tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 7,0, concentração de proteína: 0,1 mg/mL. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida à 55 °C (100%).

Para determinar a estabilidade térmica da lipase de *B. lata*, as enzimas bruta e pura foram incubadas nas temperaturas de 20 a 90 °C por 60 minutos. As atividades residuais estão mostradas nas Figuras 8.2 A e B. Observa-se que as duas formas da enzima apresentam perfil de estabilidade térmica muito semelhantes, mantendo 65 e 60% da atividade inicial a 60 °C para a lipase bruta e pura, respectivamente. Porém, a lipase pura mostrou maior estabilidade em temperaturas elevadas, mantendo 24, 17 e 7% de atividade residual após 60 minutos incubada em 70, 80 e 90 °C, respectivamente.

A atividade e a estabilidade da lipase produzida por *B. lata* na faixa de temperatura de 50 a 60 °C podem torná-la interessante para aplicação em biocatálise. A termoestabilidade das lipases é uma das características requeridas para aplicação industrial, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C. Embora se tenha estudado a termoestabilidade de lipases, não há padronização das metodologias, tornando difícil a comparação e o estabelecimento de procedimentos gerais. Além disso, a estabilidade das enzimas varia entre os gêneros, as espécies e até entre isoformas produzidas por uma mesma cepa (SALUM, 2010). Muitas lipases do gênero *Burkholderia* são ativas à altas temperaturas (acima de 50 °C), colocando-as em destaque no âmbito de aplicação industrial. A cepa *Burkholderia cepacia* ATCC 25609 apresenta tempo de meia-vida de 46 min a 60 °C (DALAL *et al.*, 2008), a lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 mantém 72% de atividade residual após 1 h a 70 °C (WANG *et al.*, 2009). E há exemplo de lipase estável em temperaturas acima dos 80 °C, como a lipase de *Burkholderia* sp., com tempo de meia vida acima de 13 h a 90 °C (RATHI *et al.*, 2000).

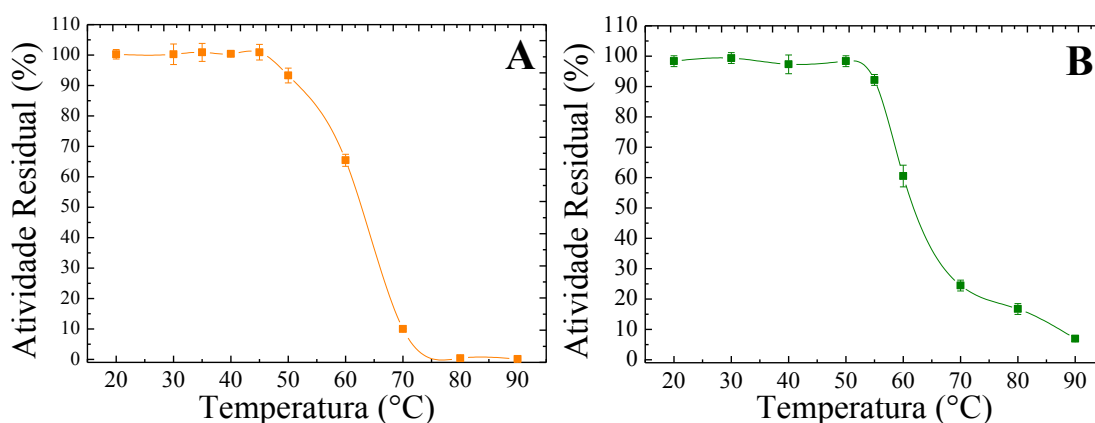


Figura 8.2 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta (A) e pura (B) de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condição de ensaio: temperatura entre 20 e 90 °C, pH 7,0 por 1 h. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 55 °C sem pré-incubação (100%).

8.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade

O efeito do pH sobre a atividade das lipases bruta e purificada de *B. lata* foi investigado em valores de pH entre 2,2 e 10 (Figura 8.3 A e B). Foram verificadas altas

atividades em um amplo intervalo de pH, com atividade máxima em pH 7,0 para a enzima bruta e pH 8,0 para a enzima purificada. Em todos os valores de pH testados observou-se atividade residual acima de 75% e 99% para a enzima bruta e purificada, respectivamente. Para ambas as formas se observou uma ativação da atividade em relação à enzima não incubada. Este efeito tem sido relatado para outras lipases, mas nenhum mecanismo foi proposto para explicar este fenômeno (ALMEIDA; TAUKE-TORNISIELO; CARMONA, 2013; LIMA, 2004; ROMERO *et al.*, 2014).

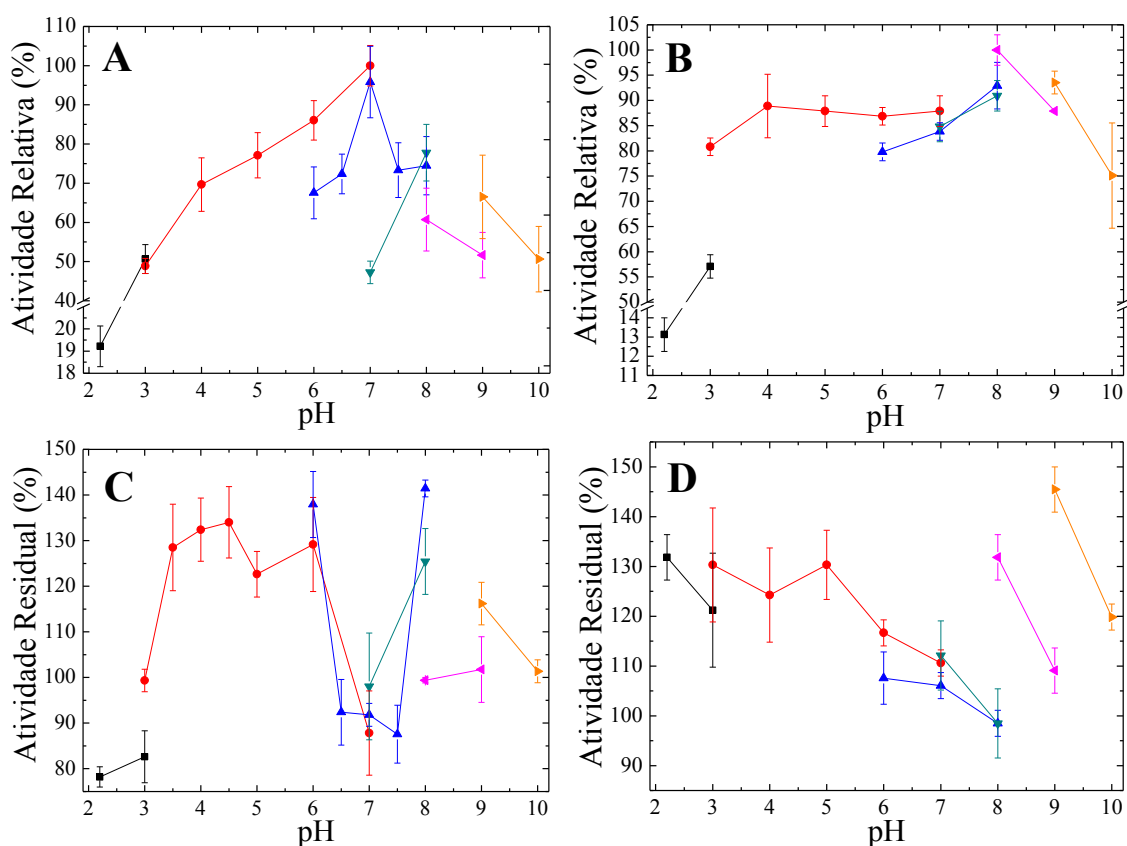


Figura 8.3 - A) Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima bruta de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. B) Efeito do pH na atividade lipolítica da enzima purificada de *B. lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, 0,1 mg/mL de proteínas. C) Estabilidade ao pH da atividade lipolítica da enzima bruta de *B. lata* LBBIO-BL01. D) Estabilidade ao pH da atividade lipolítica da enzima purificada de *B. lata* LBBIO-BL01. Atividade residual após 1 h de incubação a 25 °C, tampões utilizados nos ensaios (0,02 mol/L): Glicina-HCl pH 2,2 a 3,0 (■), Citrato-Fosfato pH 3,0 a 7,0 (●), KH_2PO_4 -NaOH pH 6,0 a 8,0 (▲), Fosfato pH 7,0 a 8,0 (▼), Tris-HCl pH 8,0 a 9,0 (◆) e Glicina-NaOH pH 9,0 a 10,0 (▶). As atividades foram comparadas com a atividade determinada em tampão Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,0 sem pré incubação. Ensaios realizados em triplicata.

A atividade e estabilidade mostrada pela lipase da bactéria *B. lata* em valores de pH ácidos não são encontradas em outras cepas do gênero *Burkholderia* e não são comuns entre lipases produzidas por bactérias em geral, as quais são comumente mais estáveis e ativas em valores neutros ou alcalinos de pH. Entretanto, há algumas exceções. No gênero *Burkholderia* as lipases produzidas por *Burkholderia ambifaria* YCJ01 (YAO *et al.*, 2013) e *Burkholderia* sp. EQ3 (UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2015) apresentam 70% e 62% de atividade residual após 1 h em pH 5,4 e 4, respectivamente. As lipases produzidas por *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus licheniformis* são estáveis a pH 3,0, mantendo 100% de atividade residual após 30 min de incubação (BRADDOO; SAXENA; GUPTA, 1999), a lipase de *Pseudomonas* sp., mantém 70% de atividade residual após 1 h em pH 3,0 (RATHI *et al.*, 2000) e a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* KM110 mantém 50% de atividade residual após 1 h em pH 3,0 (MOBARAK-QAMSARI; KASRA-KERMANSHAHI; MOOSAVI-NEJAD, 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho, ou seja, atividade e estabilidade numa faixa relativamente ampla de pH (3,0 a 10,0), também são desejáveis em biocatálise e somam-se às boas características frente à temperatura apresentadas pela lipase produzida por *B. lata* LBBIO-BL02.

8.3. Hidrólise de diferentes substratos

Os ensaios de hidrólise foram realizados utilizando tanto o extrato precipitado quanto a enzima purificada de *B. lata* LBBIO-BL02. Ambos experimentos foram realizados em triplicata, utilizando meio reacional sem enzima como controles negativos. Os dados de hidrólise para os diferentes substratos estão apresentados na Tabela 8.1.

O mais importante deste experimento foi notar que todos os triacilgliceróis testados, naturais e sintéticos com composição de ácidos graxos variada, foram hidrolisados pela

enzima de *B. lata*, confirmando que a enzima purificada apresenta um comportamento de lipase verdadeira.

Os substratos que apresentaram maiores atividades para a enzima bruta (óleo de linhaça, manteiga e óleo de frango) diferem dos substratos para a enzima purificada (óleos de linhaça, peixe e soja) com exceção do óleo de linhaça que foi o melhor substrato natural para ambas. O óleo de linhaça possui 40% de sua composição formada de ácido α -Linolênico (18:3 ^{$\Delta^9,12,15$}) e foi o substrato em que a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 apresentou a maior atividade enzimática em ambas as formas analisadas. Esta mudança de seletividade aos substratos fica clara ao observar a relação entre as atividades das enzimas bruta e purificada.

Tabela 8.1 - Atividade da lipase bruta e purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 frente a diferentes substratos, naturais e sintéticos.

Substratos	Sobrenadante de Cultura (U/mg)	Enzima Purificada (U/mg)	Relação Pura/Bruta	a 18:1 ^{Δ9}	b 18:2 ^{Δ9,12}	c 18:3 ^{Δ9,12,15}	d 22:1 ^{Δ13}	e 16:0	f 18:0	g 20:5 ^{Δ5,8,11} ,14,17	h 22:6 ^{Δ4,7,10,1} 3,16,19
pNPP	278,2 ± 9,0	14291,3 ± 324	51,36	-	-	-	-	100	-	-	-
Tributirina 97% (4:0)	363,4 ± 3,8	27571,5 ± 137	75,87	-	-	-	-	-	-	-	-
Trioleína 65%	253,2 ± 7,5	18623,8 ± 276	73,56	65	-	-	-	-	-	-	-
Trioleína 98%	237,6 ± 6,4	21771,5 ± 321	91,62	98	-	-	-	-	-	-	-
Manteiga ¹	276,4 ± 8,4	12444,4 ± 302	45,02	20,4	2	1,5	-	32,1	9,7	-	-
Creme de Leite ²	209,0 ± 9,0	10079,2 ± 324	48,23	22,8	1,6	0,7	-	30,6	12,2	-	-
Banha de Porco ¹	162,1 ± 6,4	8328,5 ± 374	51,37	40,4	12,4	2,2	-	22,4	15,3	-	-
Óleo de Soja de Fritura ³	188,3 ± 8,8	10393,9 ± 602	55,19	21	54	6	0,3	16	4,7	-	-
Óleo de Frango ³	236,8 ± 9,2	13246,5 ± 360	55,93	43	14	0,7	-	25	-	-	-
Óleo de Dendê ³	203,2 ± 11,2	11395,2 ± 407	56,06	40	17	-	-	34	-	-	-
Margarina ⁴	75,5 ± 4,6	4539,2 ± 321	60,10	13,5	14,3	-	-	5,5	5,1	-	-
Óleo de Milho ⁵	181,3 ± 7,8	11148,5 ± 297	61,48	35	45	1	-	10	3,33	-	-
Óleo de Soja ³	216,4 ± 7,3	13360,8 ± 489	61,74	21	54	6	0,3	16	4,7	-	-
Óleo de Linhaça ³	293,9 ± 7,8	19393,1 ± 626	65,99	11	15	40	-	2	-	-	-
Óleo de Oliva ³	122,5 ± 9,5	8173,9 ± 525	66,73	70	10	0,2	-	16	3,4	-	-
Óleo de Peixe ⁶	228,5 ± 12,3	15520,8 ± 586	67,94	10,6	1,3	0,2	-	15,5	3,6	16,3	10,6
Óleo de Crambe ⁵	73,5 ± 7,6	5863,1 ± 621	79,78	18	9	6	56	-	-	-	-
Óleo de Girassol ⁷	153,4 ± 4,3	12679,9 ± 468	82,64	16	71,4	-	-	6	5,9	-	-
Óleo de Canola ⁷	108,3 ± 4,5	9034,6 ± 321	83,39	60,85	20,8	-	-	5,4	2,7	-	-

Ácidos graxos: a) oleico; b) linoleico; c) α -linolênico; d) erúico; e) palmítico; f) esteárico; g) eicosapentaenoico (EPA); h) docosahexaenoico (DHA).

Fontes: 1) Bobe *et al.* (2007); 2) Månsson (2008); 3) Oliveira *et al.* (2014); 4) Cavendish *et al.* (2010), margarina Claybom®; 5) Oliveira *et al.* (2013); 6) Srigley e Rader (2014); 7) este trabalho. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

As atividades para a enzima purificada foram sempre proporcionalmente maiores quando hidrolisavam substratos com maiores concentrações de ácidos graxos insaturados e aumentaram em menor grau em substratos com predominância de ácidos graxos saturados. Os exemplos mais claros são os óleos de canola e girassol, que possuem os ácidos oleico (18:1; 60,8 e 16%, respectivamente) e linoleico (18:2; 20,8 e 71,4%, respectivamente) como seus principais constituintes, que aumentaram a atividade enzimática em 83 vezes em comparação com a manteiga e o creme de leite, com predominância de ácido palmítico (16:0; 32,1 e 30,6%, respectivamente), onde o aumento da atividade foi de 45 e 48 vezes, respectivamente.

Os substratos utilizados neste trabalho podem ser divididos em três grupos: origem vegetal, origem animal e sintéticos. Para os substratos de origem vegetal, a margarina (Claybom[®]), um lipídio modificado, merece destaque mesmo sendo o substrato com a menor taxa de hidrólise (Figura 8.4), pois é composta de uma variedade de gorduras vegetais e que, apesar de passar pela hidrogenação de parte de suas gorduras insaturadas e com até 7% de ácidos graxos trans (CAVENDISH *et al.*, 2010), ainda se mostrou capaz de ser identificada pelo sítio ativo da enzima proporcionando bons resultados de hidrólise.

Outro destaque é dado para o óleo de soja de fritura. O óleo quando utilizado no processo de fritura contínua, principalmente nas indústrias, pode sofrer hidrólise, oxidação, rancificação e polimerização da molécula do triacilglicerol (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004; FREIRE; MANCINI-FILHO; FERREIRA, 2013). O resultado é a formação de compostos secundários polares, os compostos polares totais; esses compostos possuem polaridade maior que a do triacilglicerol e não são voláteis (DEL RÉ; JORGE, 2006). Apesar de todas as transformações, a enzima foi capaz de realizar a hidrólise do óleo de soja usado com

queda de atividade em 22% para a enzima purificada (Figura 8.4) em relação ao óleo de soja refinado. Em termos de aplicabilidade, a enzima possui grande potencial para tratamento de resíduos em indústrias que utilizam o processo de fritura contínua ou transformação de descarte em produtos de alto valor agregado.

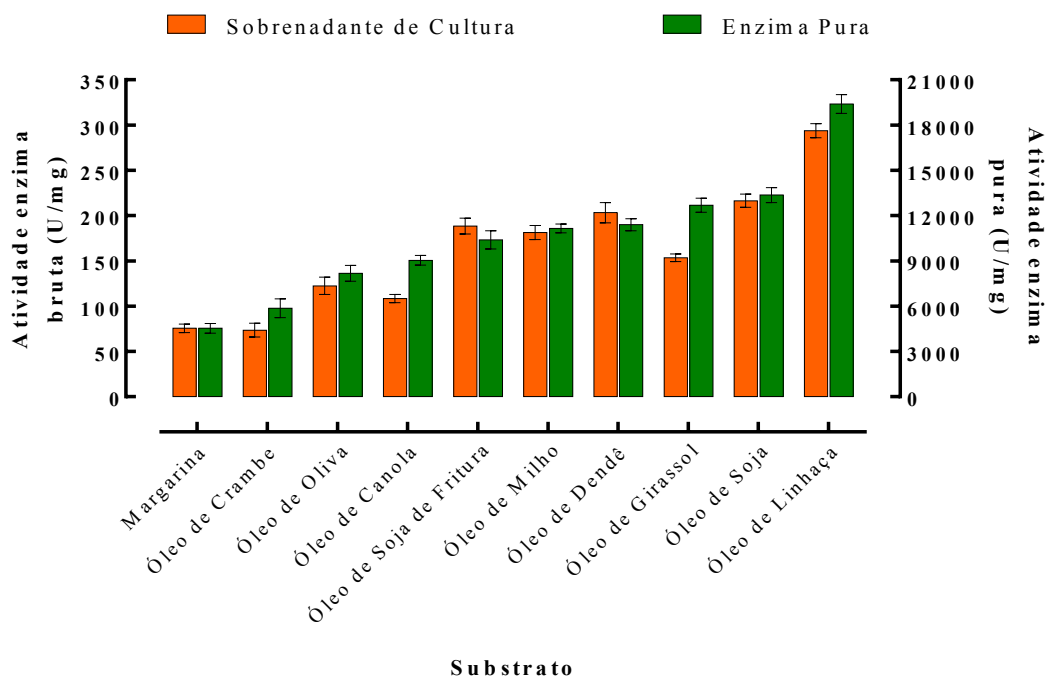


Figura 8.4 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos de origem vegetal. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

Para os substratos de origem animal, a partir da análise da Figura 8.5 é possível observar que os maiores aumentos de atividade específica foram para o óleo de peixe. Como já discutido anteriormente, o óleo de peixe é o substrato de origem animal com a maior porcentagem de ácidos graxos insaturados, seguido do óleo de frango. O óleo de peixe possui constituição diferente dos demais substratos, visto que sua composição é

feita de Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFA), como docosahexaenóico (DHA, 22:6^{A4,7,10,13,16,19}) e eicosapentaenóico (EPA 20:5^{A5,8,11,14,17}).

Kamal, Barrow e Rao (2015) realizaram um estudo computacional com o objetivo de encontrar micro-organismos que produzissem lipases com seletividade na hidrólise de ácidos graxos DHA e EPA, encontrados naturalmente em óleo de peixes. Dentre as lipases testadas, a lipase produzida por *B. cepacia* 1YS1 obteve o segundo melhor desempenho nos testes de afinidade/acoplagem entre receptor (lipase) e ligante (triacilglicerol). Os resultados dos testes foram demonstrados através da energia de ligação existente entre receptor e ligante, com a escala variando do mínimo de -3,4 kcal/mol ao máximo de -7,3 kcal/mol. Para o teste de afinidade, a lipase de *B. cepacia* 1YS1 obteve valor aproximado de -6,5 a -6,8 kcal/mol para todos os substratos testados. Este fato contribui para o entendimento da atuação da *B. lata* LBBIO-BL02 nas reações de hidrólise, mostrando a possibilidade de comportamento semelhante entre as lipases destas duas espécies tão próximas. Ainda segundo Kamal, Barrow e Rao (2015), o fato da lipase de *B. cepacia* 1YS1 hidrolisar substratos variados pode ser uma característica da evolução e da funcionalidade herdada das lipases naturais do ambiente, pois elas normalmente precisam atuar em uma grande variedade de triacilgliceróis encontrados na natureza, garantindo vantagem evolutiva à espécie.

O consumo de EPA e DHA por humanos traz vários benefícios, proporcionando a diminuição da pressão arterial e inflamações, diminuindo riscos de aterosclerose e doença isquêmica do coração. Entretanto, o corpo humano não é capaz de sintetizar esses ácidos, por isso eles devem ser obtidos através da ingestão de peixe ou na forma concentrada usada em suplementos alimentares (KRALOVEC; WANG; BARROW, 2010). Assim, a utilização de lipases para obtenção de PUFA, principalmente DHA e

EPA, mais assimiláveis através da hidrólise enzimática é uma boa alternativa ao modelo químico tradicional, pois o processo pode ocorrer em condições brandas sem a formação de subprodutos indesejáveis, já que o processo tradicional leva à oxidação parcial e polimerização dos ácidos graxos (KRALOVEC; WANG; BARROW, 2010; SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998). Em estudos apresentados mais adiante neste trabalho, a possibilidade de utilizar a enzima como aditivo digestivo amplia a possibilidade de hidrólise de substratos lipídicos diretamente no trato gastrointestinal.

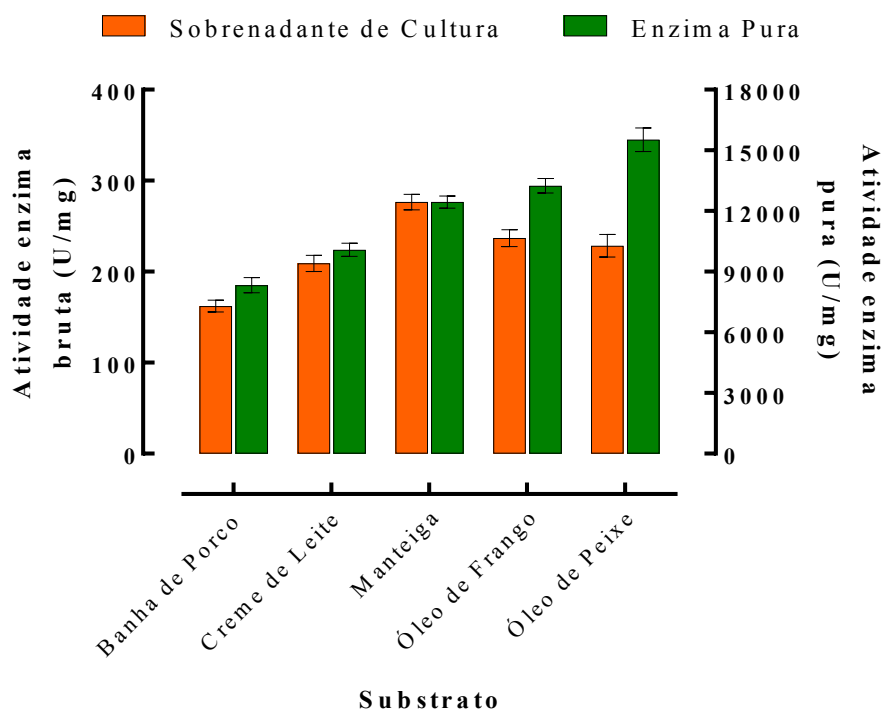


Figura 8.5 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos de origem animal. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

Os dados de hidrólise para os substratos sintéticos estão apresentados na Figura 8.6. Os substratos sintéticos possuem grande homogeneidade e por isso são importantes no objetivo de compreensão do comportamento catalítico e na descrição de lipases. A

diferenciação entre lipases e esterases se dá pela diferença de especificidade das duas enzimas. Os substratos naturais para as lipases são triacilgliceróis de cadeia longa, podendo atuar também em cadeias curtas, enquanto que as esterases atuam somente em cadeias curtas (SALAMEH; WIEGEL, 2007). Deve-se enfatizar ainda que a maioria das lipases pode hidrolisar os mesmos substratos das esterases, porém o inverso não é possível (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Assim, como mostrado na Figura 8.6, a enzima produzida pela cepa *B. lata* LBBIO-BL02 é uma lipase verdadeira, já que hidrolisa a trioleína 98 e 65% (18:1^{Δ9}), a maior atividade para a trioleína 98% se deve a menor concentração de ácidos graxos livres inibindo a atividade enzimática como discutido na seção 8.2. Esta definição de lipase verdadeira aplica-se mesmo considerando que a taxa de hidrólise da trioleína foi menor do que a de outros triglicerídeos de cadeia curta, como a tributirina 97% (TC4:0).

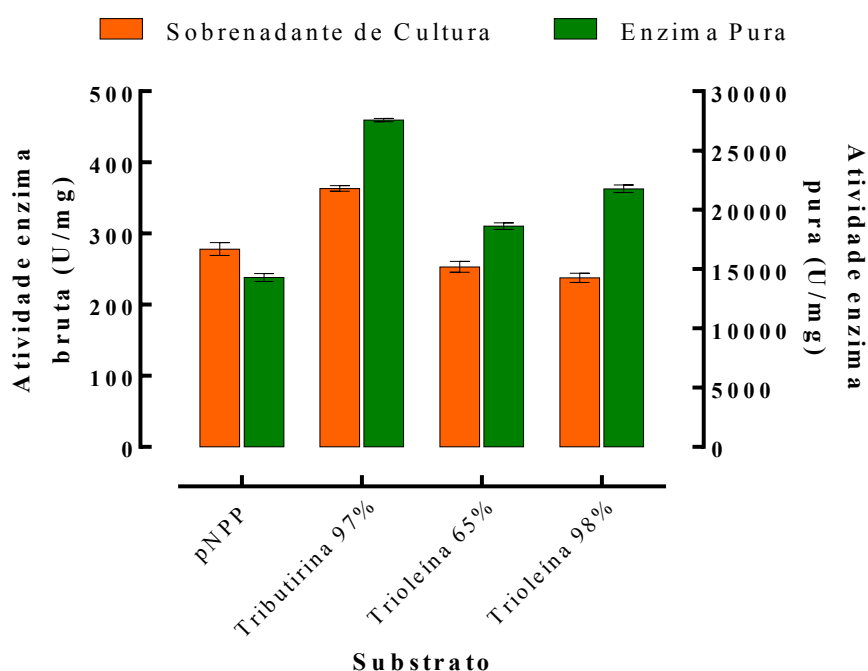


Figura 8.6 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 bruta e purificada (U/mg) frente a diferentes substratos sintéticos. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de substrato: 200 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Reagentes SIGMA-ALDRICH. Ensaios realizados em triplicata.

Até o momento, além dos trabalhos do nosso grupo de pesquisa não foram encontrados outros trabalhos com lipase de *Burkholderia lata* para comparação precisa dos resultados. Trabalhos com *B. cepacia* relatam maior atividade em óleos vegetais com maior quantidade de ácido oleico ($18:1^{\Delta 9}$) e linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$) em sua composição, assim como ocorreu com a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02. Dalal *et al.* (2008) estudaram a lipase alcalina de *B. cepacia* ATCC 25609 mostraram que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos óleos de oliva e linhaça, com valores de 25 e 12 U/mL, respectivamente.

Este estudo mostra a grande capacidade e versatilidade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 em hidrolisar de maneira eficiente diferentes substratos, abrindo um grande leque de possibilidades de aplicações explorando suas propriedades hidrolíticas. Neste ensaio, entretanto, não foi possível descrever a região e tiposeletividade da enzima, pois foram utilizados substratos naturais que são muito heterogêneos em sua constituição e posição dos ácidos graxos. Estas características serão descritas mais adiante.

8.4. Efeito da concentração de substrato

O efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática foi realizado mantendo-se a concentração de enzima constante (0,03 mg/mL) e variando-se a concentração de trioleína de 10 a 250 mmol/L (pH 7,0 e 55 °C). Observou-se que a atividade aumenta de acordo com o aumento da concentração do substrato, mas de maneira não linear (Figura 8.7 A).

Para tentar descrever o comportamento cinético da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, os dados foram analisados segundo a equação de Michaelis-Menten (Equação 1) e as suas constantes, K_m e V_{max} , foram determinadas. Esta equação é representada graficamente

plotando-se V_0 (atividade inicial) contra S (concentração de substrato) e descreve uma hipérbole retangular (Figura 8.7 A).

O valor de K_m (mmol) é a medida de dissociação do complexo enzima-substrato de forma que quanto menor for este valor mais rápido é a taxa de dissociação do complexo. Os valores de K_m de lipases podem variar amplamente, mas para a maioria das enzimas relevantes industrialmente o K_m varia entre 0,02 a 100 mmol/L. V_{max} (mmol/min/mg) indica a taxa máxima de reação, quando a enzima é totalmente saturada com o substrato. Os valores obtidos fornecem importantes informações sobre a interação da enzima e o substrato.

Os valores de K_m e V_{max} da lipase de *B. lata* foram determinados através das equações de Michaelis-Menten (Equação 1), Lineweaver-Burk (Equação 2), Hanes-Woolf (Equação 3) e Eadie-Hofstee (Equação 4). As equações foram ajustadas aos dados cinéticos obtidos com a lipase de *B. lata* e as representações gráficas estão apresentadas nas Figuras 8.7 A, B, C e D, respectivamente. O formato dos gráficos apresentados, como uma reta bem definida, mostra que os dados experimentais descrevem uma hipérbole retangular, comprovando o comportamento Michaeliano da lipase de *B. lata*. Os dados de V_{max} e K_m calculados estão apresentados na Tabela 8.2. A partir desses valores também foi calculado o número de renovação (K_{cat}) e a eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) para a enzima (Tabela 8.2).

Tabela 8.2 - Parâmetros cinéticos da lipase extracelular purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

Modelo	K _m (mmol)	V _{max} (mmol/min/mg)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (mol/L ⁻¹ s ⁻¹)	R ²
Michaelis-Menten	19,9914	11,933	212,15	1,06 x 10 ⁴	0,9851
Lineweaver-Burk	22,7195	12,833	228,15	1,00 x 10 ⁴	0,9975
Hanes-Woolf	21,2298	12,633	224,59	1,06 x 10 ⁴	0,9993
Eadie-Hofstee	22,2470	12,75	226,67	1,02 x 10 ⁴	0,9909

K_{cat} = V_{max}/E₀, onde: E₀ é a concentração inicial de enzima (9,375 x 10⁻⁷ mol/L). Experimento utilizando trioleína como substrato, concentração de enzima: 0,03 mg/mL, pH 7,0 e 55 °C.

Para a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 o valor de K_m foi de aproximadamente 22 mmol e V_{max} de 12,7 mmol/min/mg. Os valores de k_{cat} e eficiência catalítica para a enzima livre foram aproximadamente 225 s⁻¹ e de 10⁴ mol⁻¹.s⁻¹, respectivamente.

Equação de Michaelis-Menten (1)

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Equação de Lineweaver-Burk (2)

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Equação de Hanes-Woolf (3)

$$\frac{[S]}{V_0} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}$$

Equação de Eadie-Hofstee (4)

$$V_0 = -K_m \cdot \frac{V_0}{[S]} + V_{max}$$

Onde: V_0 = velocidade inicial da reação; $V_{\max}$ = velocidade máxima; $[S]$ = concentração de substrato; K_m = constante de Michaelis-Menten, a concentração de substrato que corresponde à metade da velocidade máxima.

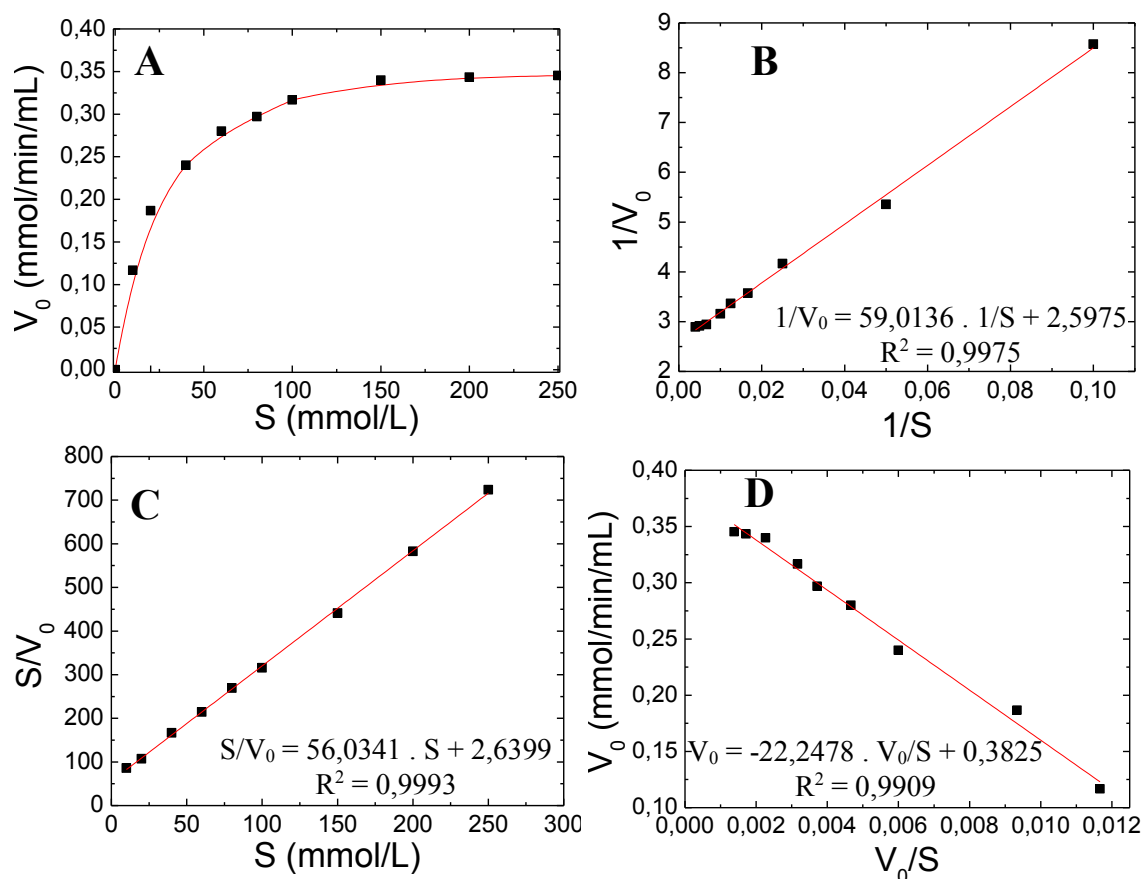


Figura 8.7 - Efeito da concentração do substrato na atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. A) Gráfico de Michaelis-Menten. B) Gráfico de Lineweaver-Burk. C) Gráfico de Hanes-Woolf. D) Gráfico de Eadie-Hofstee. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 0,03 mg/mL, concentração de trioleína: 10-250 mmol/L, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0. Ensaios realizados em triplicata.

Sabe-se que uma enzima com um maior valor de K_m tem menor afinidade para um substrato, e que a razão k_{cat}/K_m para a hidrólise de um substrato avalia a especificidade da enzima (DIXON; WEBB, 1979). A lipase produzida pela *B. lata* LBBIO-BL02 possui valores de K_m e $V_{\max}$ superiores aos encontrados na literatura para lipases produzidas pelo gênero *Burkholderia* sp.

Os valores de K_m e V_{max} para a lipase de *Burkholderia* sp. ZYB002 foram de 0,37 mmol/L e 0,139 mmol/min/mg, respectivamente, utilizando *p*-Nitrofenil Miristato (C14) (SHU *et al.*, 2016). Dalal *et al.* (2008) descreveram um V_{max} e K_m da enzima de *B. cepacia* A.T.C.C. 25609 de 7,950 mmol/min/mg e 16,6 mmol/L, respectivamente, utilizando tributirina (TC4) como substrato. A lipase de *Burkholderia* sp. GXU56, utilizando *p*-Nitrofenil Butirato (C4), apresentou K_m e V_{max} de 0,038 mmol/L e 0,029 mmol/min/mL, respectivamente (WEI; SHI; WU, 2008). Jin *et al.* (2012), estudando uma lipase de *Burkholderia anthina* NT15, reportaram valores de K_m , V_{max} e k_{cat} de 0,10 mmol/L, 0,430 mmol/min/mg e 210 s⁻¹, respectivamente, utilizando *p*-Nitrofenil Butirato (C4) como substrato. A lipase parcialmente purificada de *Burkholderia multivorans* V2, utilizando *p*NPP (C16) como substrato, apresenta valores de K_m e V_{max} de 1,56 mmol/L e 5,62 μ mol/min/mg, respectivamente (DANDAVATE *et al.*, 2009). Utilizando o mesmo substrato, Chaiyaso *et al.* (2012) obtiveram K_m e V_{max} de 1,6 mmol/L e 1 mmol/min/mg, respectivamente, com a lipase de *B. multivorans* PSU-AH130. A lipase recombinante pTYB12-lip de *B. cepacia* expressa em *Escherichia coli* ER2566 apresentou V_{max} e K_m , com *p*NPP (C16) como substrato, de 0,434 mmol/min/mg e 12 mmol/L, respectivamente. Já para uma lipase *P. cepacia*, foram relatados valores de K_m e V_{max} de 12 mmol/L e 30 mmol/min/mg, respectivamente, quando o substrato foi *p*NPP (PENCREAC'H; LEULLIER; BARATTI, 1997). A lipase de *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 teve um V_{max} e K_m de 0,64 mmol/min/mg e 29 mmol/L, respectivamente, com *p*NPP como substrato (CHAKRABORTY; RAJ, 2008).

Assim, pode-se observar que a lipase de *B. lata* LBBIO possui um alto valor de K_m (22 mmol) para a hidrólise da trioleína, sugerindo baixa afinidade da enzima com este substrato. Por outro lado a enzima apresentou alto valor para V_{max} (12,7 mmol/min/mg),

como já descrito por (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Alto valor de $V_{\max}$ indica grande tendência do complexo E*S se dissociar em produto.

O número de renovação (k_{cat}) observado, de 220 s^{-1} , é um dos maiores valores registrados no site BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) (“BRENDA - 3.1.1.3: triacylglycerol lipase”) (Tabela 8.2). O k_{cat} representa o número de vezes que cada sítio ativo da enzima converte substrato em produto por unidade de tempo, sendo assim um indicativo da eficiência máxima da enzima.

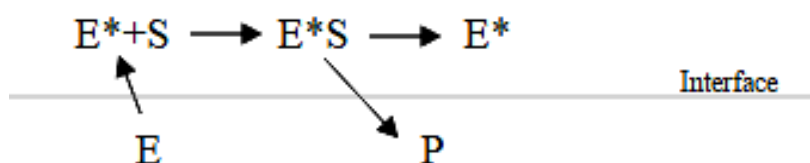
As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídio podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

A equação de Michaelis-Menten foi proposta para explicar a cinética de enzimas e substratos que são solúveis em água, sendo que a concentração do substrato pode ser facilmente expressa em mol/L. Com substratos insolúveis ou parcialmente solúveis em água, como lipídios, a reação enzimática ocorre na interface. Neste caso a concentração efetiva de substrato corresponde ao número de moléculas por unidade de superfície e, esta concentração não pode ser mudada simplesmente por adição de mais substrato. Isto significa que uma fração desconhecida de enzima está ligada ao substrato e, portanto, $V_{\max}$ e K_m , para lipases, são somente valores aparentes (VERGER, 1980), dificultando a comparação, utilizando estas variáveis, para lipases diferentes, pois podem possuir comportamento diferente na interface. A lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, por exemplo, apresentou comportamento Michaeliano.

Um modelo foi sugerido por Verger *et al.* (1973) para explicar como lipases entram em contato com o substrato apolar micelizado e ocorre a catálise (Esquema 1). O

modelo consiste em dois equilíbrios: o primeiro se refere à interação da enzima (E) com a interface água-micela tornando-se ativa (E*); o segundo consiste na ligação da enzima ativa (E*) com uma molécula de substrato (S) formando o complexo E*S. Este modelo é equivalente ao equilíbrio clássico de Michaelis-Menten em duas dimensões. Após a formação do complexo ocorre a catálise, regenerando a enzima na forma ativa ainda na micela e liberando o produto.

Esquema 1 - Mecanismo de catálise de lipases segundo Verger *et al.* (1973).



A concordância entre a cinética de lipases, a equação de Michaelis-Menten e o modelo proposto por Verger *et al.* (1973) varia de acordo com as condições experimentais adotadas. Desta maneira, a comparação das constantes cinéticas entre lipases é particularmente dificultada pelos diferentes fatores envolvidos na hidrólise de seus substratos e das características cinéticas individuais das enzimas para cada situação.

8.5. Inibição da atividade lipolítica por liberação de produto

A expressão da atividade enzimática é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A concentração do produto formado aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo (velocidade inicial de reação – V_0). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade decresce devido

a fatores como a diminuição da concentração de substrato e inibição pelo produto formado (LIMA; AQUARONE; BORZANI; SCHMIDELL, 2001).

Para verificar se há diminuição da atividade da enzima no decorrer da reação de hidrólise e com a formação de produto, ácido graxo livre (AGL), a enzima purificada (1 mg/mL) foi incubada com diferentes concentrações de substrato $\times$ produto (SxP: 100-0, 100-25, 100-50, 100-75, 100-100, 100-150, 100-200, 75-25, 50-50 e 25-75, em mmol/L) a 55° C, pH 8.0 com retiradas de amostras até 24 h. Os produtos da reação foram acompanhados por HPTLC.

Em uma reação padrão utilizando oleato de metila como substrato, iniciada com SxP 100-0, a enzima mostrou alta atividade durante a primeira hora de reação (V_0) com 19% de AGL, a partir daí houve uma queda drástica na velocidade de reação sendo necessárias 10 h para atingir 40% de AGL, atingindo 52% após 24 h (Figura 8.8 A). Quando a reação foi iniciada com SxP 75-25, a enzima mostrou uma atividade inicial inferior em relação ao ensaio SxP 100-0, com 30% de AGL, apenas 5% maior do que a concentração inicial de produto, após a primeira hora de reação, atingindo 44 e 51% após 10 e 24 h, respectivamente (Figura 8.8 B). Quando a reação foi iniciada com SxP 50-50 e 25-75 não foi observada atividade enzimática significativa (Figura 8.8 C e D, respectivamente). Em todos os ensaios utilizando oleato de metila como substrato o perfil final da reação foi muito similar, com a enzima perdendo a eficiência após a reação atingir o equilíbrio.

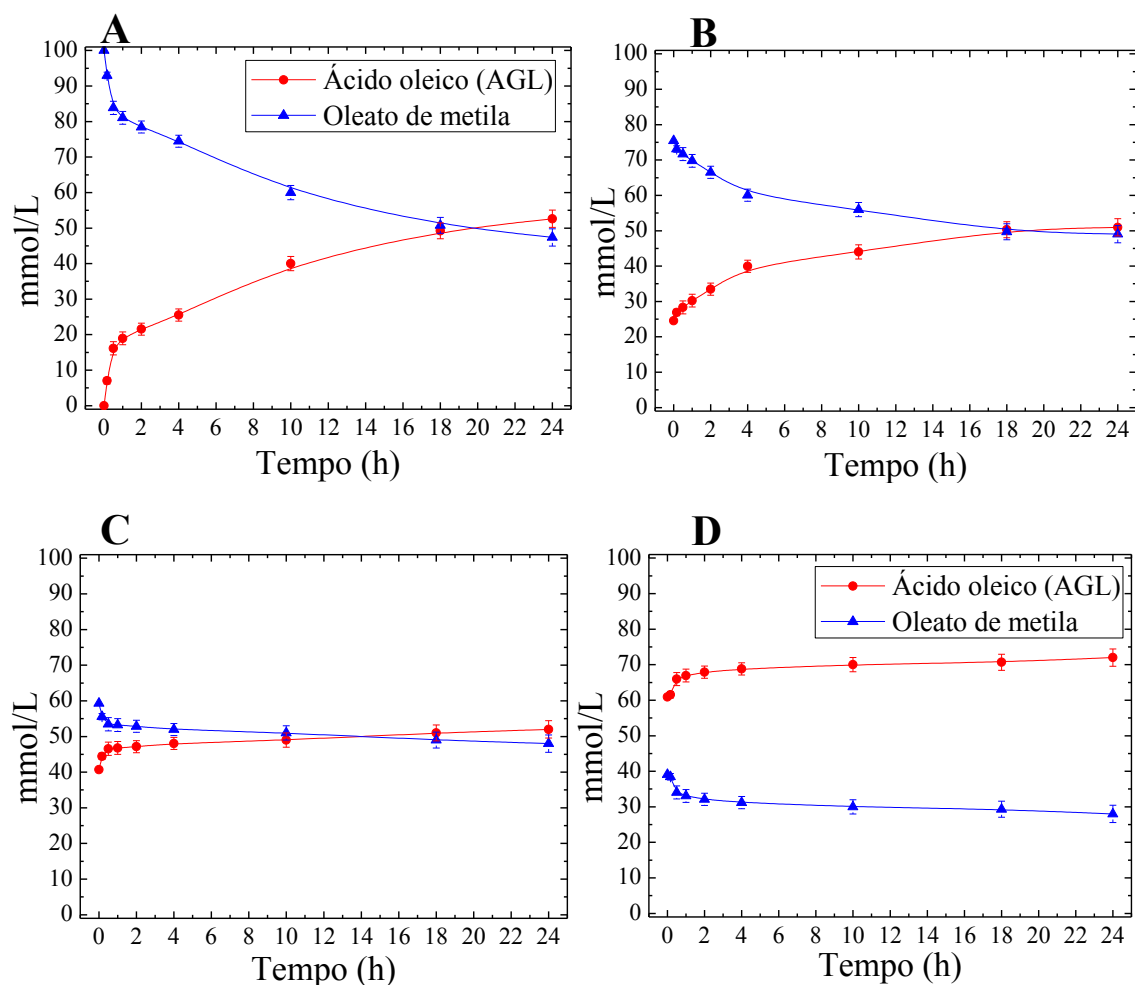


Figura 8.8 - Hidrólise de oleato de metila utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes proporções de substrato x produto: A) Relação inicial de substrato/produto 100:0. B) Relação inicial de substrato/produto 75:25. C) Relação inicial de substrato/produto 50:50. D) Relação inicial de substrato/produto 75:25. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata.

Quando o substrato foi a trioleína 98% o perfil de hidrólise concordou com os resultados anteriores, com a diferença da presença de produtos intermediários na reação, como diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG). Em todos os ensaios a hidrólise tende a cessar ou a ocorrer de maneira lenta após 4 h de reação (Figura 8.9 A, B, C e D). A atividade inicial da enzima foi também muito afetada pela concentração inicial de produto utilizada, demonstrando que a concentração de produto presente no meio reacional é altamente significativa na atividade da enzima.

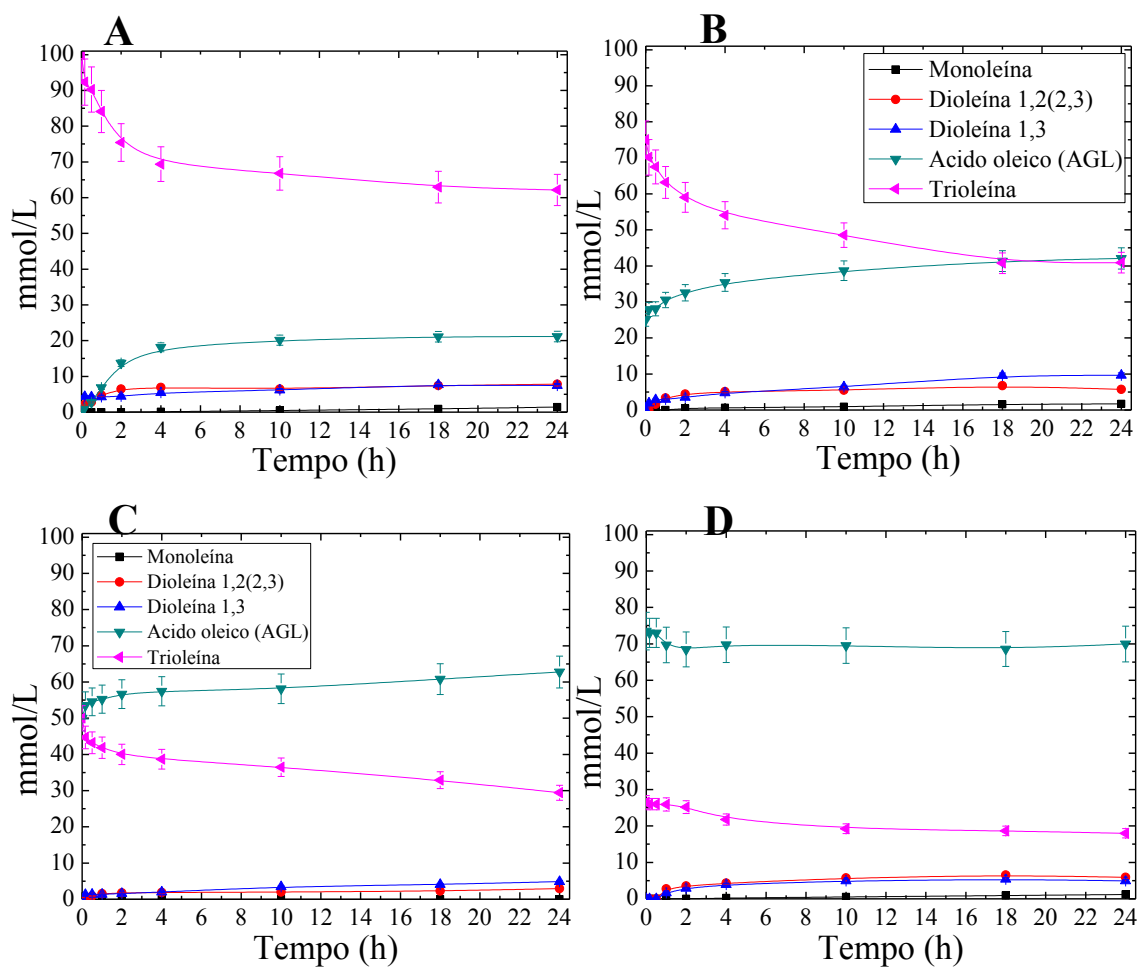


Figura 8.9 - Hidrólise de trioleína utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes proporções de substrato x produto: A) Relação inicial de substrato/produto 100:0. B) Relação inicial de substrato/produto 75:25. C) Relação inicial de substrato/produto 50:50. D) Relação inicial de substrato/produto 75:25. Condições de ensaio: 55 °C, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata.

Para melhor compreender os resultados, após 18 h de reação, mais enzima foi adicionada ao meio reacional (Figura 8.10 A e B para oleato de metila e trioleína, respectivamente). Foi possível observar que a adição de mais lipase não proporcionou hidrólise adicional, excluindo a possibilidade de inativação da enzima pelas condições do ensaio. Em outro experimento, após 18 h de reação, mais substrato foi adicionado ao meio reacional (Figura 8.10 C e D para oleato de metila e trioleína, respectivamente). Foi

possível observar que a adição de mais substrato proporcionou reativação da enzima e aumentou a atividade, resultando em um aumento significativo na liberação de AGL.

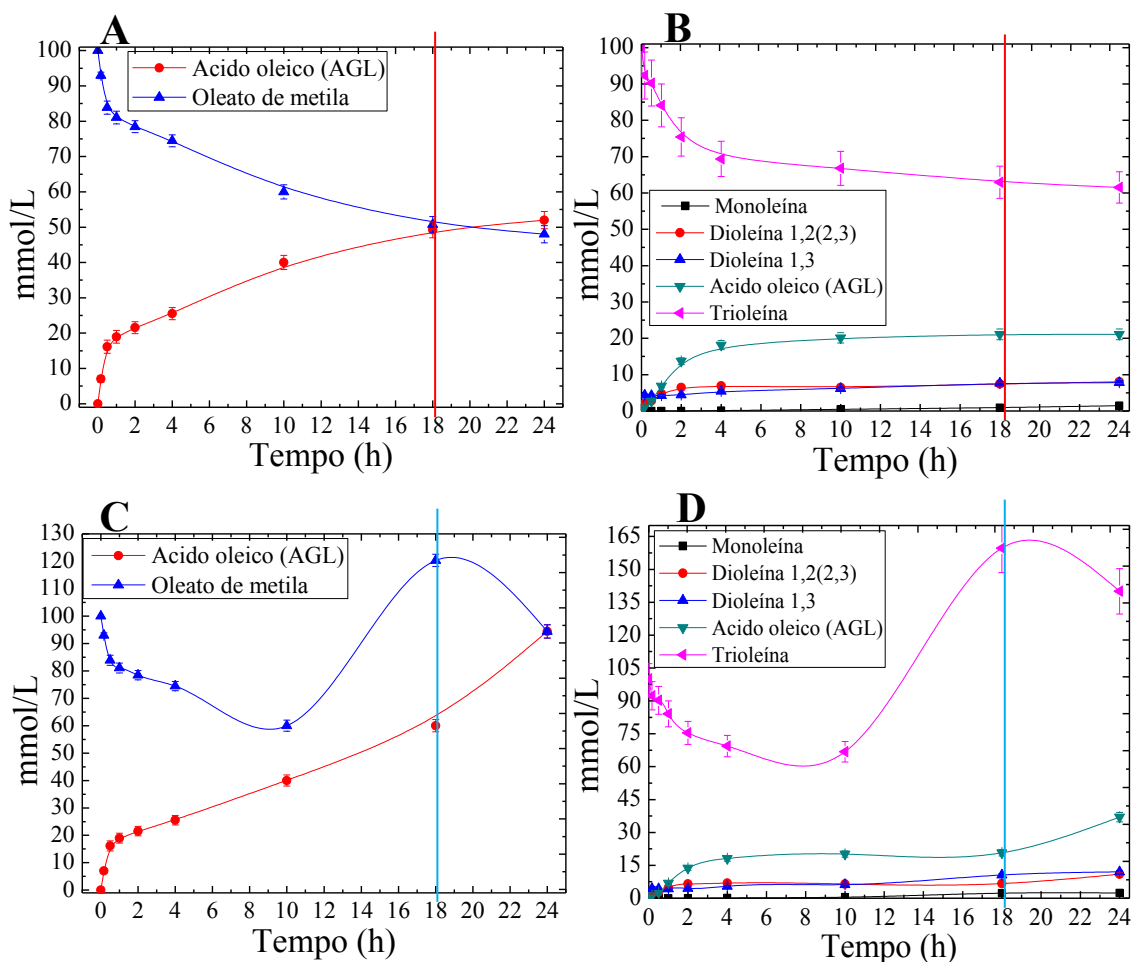


Figura 8.10 - Hidrólise utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02: A) Oleato de metila como substrato e adição de enzima extra (1 mg/mL) em 18 h (linha vermelha). B) Trioleína como substrato e adição de enzima extra (1 mg/mL) em 18 h (linha vermelha). C) Oleato de metila como substrato e adição de substrato extra (100 mmol/L) em 18 h (linha azul). D) Trioleína como substrato e adição de substrato extra (100 mmol/L) em 18 h (linha azul). Condições de ensaio: 55 °C, concentração inicial de substrato: 100 mmol/L, concentração inicial de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata.

Para que ocorra a hidrólise de lipídios, as lipases devem primeiro se ligar às superfícies das gotículas de óleo/gordura (substrato) nos sistemas de emulsão (SINGH; YE; HORNE, 2009; TORCELLO-GÓMEZ *et al.*, 2011), ou seja, trabalharem na interface

da emulsão (Esquema 1). Portanto, a área interfacial inicial da emulsão, o que é determinado pelo tamanho da gotícula e sua composição, tem um impacto sobre a ligação e a atividade da enzima. Foi demonstrado *in vitro* que a atividade de lipases é inversamente relacionada com a dimensão média de gotículas de uma emulsão. Uma emulsão com gotículas menores é hidrolisada mais rapidamente do que uma emulsão com gotículas maiores, porém o tamanho das gotículas de emulsão não altera as afinidades entre a enzima e as gotículas (ARMAND, 2013; ARMAND *et al.*, 1992; ZHU *et al.*, 2013).

Vários estudos tentaram descrever a influência da composição desta camada interfacial na atividade das lipases durante a hidrólise de substratos emulsionados. Componentes de superfície como surfactantes, fosfolípidios e proteínas são capazes de inibir a atividade de lipases nas interfaces óleo-água, reduzindo o contato entre o substrato e a enzima (BÉNAROUCHE *et al.*, 2014; GOLDING; WOOSTER, 2010; KENMOGNE-DOMGUIA *et al.*, 2012; MALAKI NIK; WRIGHT; CORREDIG, 2011; YE *et al.*, 2013).

Para o processo de hidrólise *in vitro* de substratos emulsificados, como os ensaios deste trabalho, conforme se segue o processo de lipólise, há acúmulo de 2-monoglicerídeos e ácidos graxos livres nas superfícies das gotículas de emulsão devido à sua maior polaridade, o que acaba limitando a adsorção de lipase a estas superfícies e, conseqüentemente, limitando o contato enzima $\times$ substrato (GOLDING; WOOSTER, 2010; SCOW, 1988; YE *et al.*, 2013).

Os ácidos graxos livres inibem a lipólise de substratos em emulsão por dificultarem o acesso da lipase às superfícies das gotículas lipídicas (SCOW, 1988; YE *et al.*, 2013). Uma maneira de aumentar as taxas de hidrólise é retirar estes ácidos graxos da superfície da gotícula e deixar o substrato disponível para a ligação com a enzima. Sais

de cálcio podem se ligar aos ácidos graxos livres produzidos a partir da lipólise para formar um sabão de cálcio insolúvel, a fim de eliminar estes AGL da interface.

Assim, para confirmar os resultados apresentados com a inibição da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 pela liberação de AGL, os mesmos ensaios foram realizados com adição de cloreto de cálcio de 0 a 50 mmol/L. O método baseia-se na precipitação como sal de cálcio dos ácidos graxos liberados pela hidrólise dos substratos, evitando a possível inibição da enzima pela presença do produto em solução.

Os resultados mostraram efeito positivo da adição de CaCl_2 na reação de hidrólise. Em baixas concentrações o cloreto de cálcio foi capaz de aumentar em até 15% a hidrólise total do oleato de metila no melhor resultado com 5 e 10% de CaCl_2 , além de aumentar consideravelmente a velocidade inicial da enzima (Figura 8.11 A). Com concentrações mais altas, como 30 e 35%, os resultados foram semelhantes ao ensaio sem Ca^{++} e, a partir de 40%, houve efeito negativo (Figura 8.11 B).

O aumento significativo na taxa de lipólise na presença de cálcio sugere que a ligação de lipase com a superfície das gotículas de emulsão foi promovida. Este efeito foi, provavelmente, devido a uma redução na carga de repulsão entre a lipase e a superfície da gotícula de emulsão devido a remoção dos AGL. O maior grau de liberação de AGL nas emulsões contendo cálcio pode ser atribuído a um período inicial mais duradouro. Isto é, a lipase foi inibida pelos produtos de lipólise em tempos de reação mais longos.

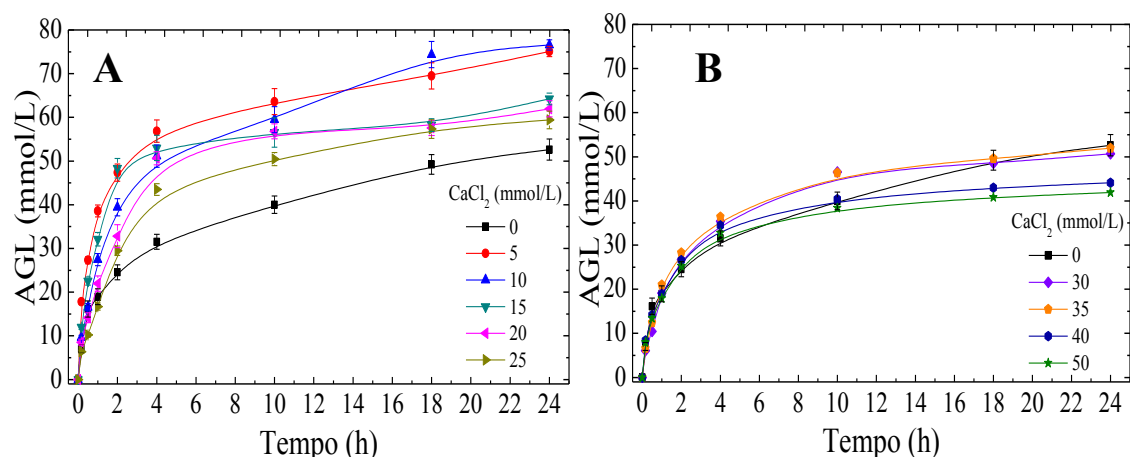


Figura 8.11 - Hidrólise de oleato de metila utilizando a lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 com adição de diferentes concentrações de CaCl_2 : A) Adição de CaCl_2 de 0 a 25 mmol/L. B) Adição de CaCl_2 de 30 a 50 mmol/L. Condições de ensaio: 55 °C, concentração inicial de substrato: 100 mmol/L, concentração de proteínas: 1,0 mg/mL, tampão tris 0,05 mol/L pH 8,0. A concentração de AGL foi mensurada por HPTLC. Ensaios realizados em triplicata.

Assim, a hidrólise de lipídios pode ser manipulada através da constituição da superfície das gotículas e pela adição de sais de cálcio, liberando a interface dos AGL, auxiliando no contato enzima $\times$ substrato e deslocando o equilíbrio da reação para maior formação de produto.

8.6. Regiosseletividade

Regiosseletividade é um atributo relevante de lipases nas transformações de lipídios por biocatálise, permitindo modificações específicas na composição de óleos e gorduras para obter novos lipídios estruturados (BRÍGIDA *et al.*, 2014; XIE; MA, 2010). A separação dos DAG-1,2(2,3) dos DAG-1,3 a partir do meio reacional permitiu a investigação de regiosseletividade de lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 a partir de TAGs homogêneos e heterogêneos. Os DAG-1,2(2,3) são resultantes da hidrólise de TAGs nas posições *sn*-3 ou *sn*-1 e os DAG-1,3 são resultantes da hidrólise na posição *sn*-2 (Figura 8.12). A Tabela 8.3 mostra o processo de hidrólise da trioleína utilizando as lipases bruta

e purificada de *B. lata* LBBIO-BL02 e a liberação dos DAG-1,2(2,3) e DAG-1,3 ao longo do tempo. Uma lipase comercial livre de *C. rugosa* (SIGMA) foi utilizada para comparar a sua atividade com as lipases bruta e purificada de *B. lata*.

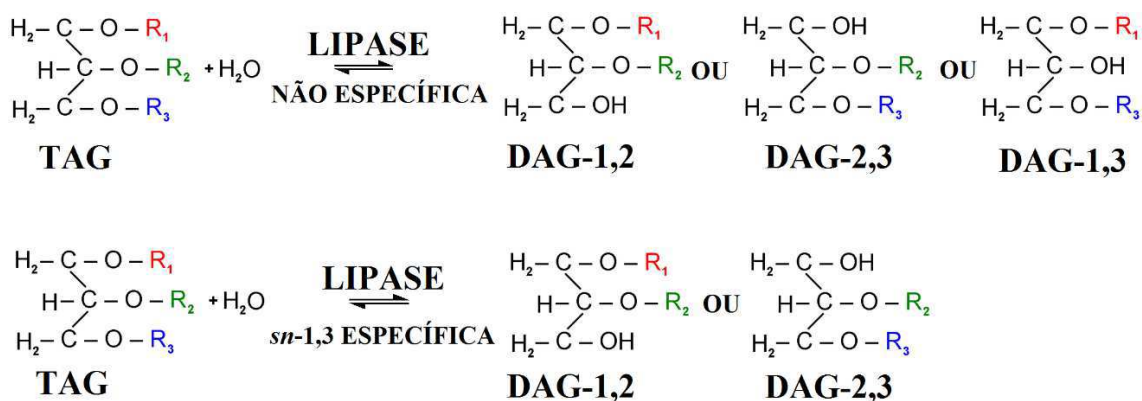


Figura 8.12 - Reações de hidrólise de um triacilglicerol catalisadas por lipases. Na linha de cima ação de uma lipase não específica, com hidrólise dos ácidos graxos nas três posições (*sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3), com a formação de DAG-1,2, DAG-2,3 e DAG-1,3. Na linha de baixo exemplo de uma lipase *sn*-1,3 específica, com hidrólise dos ácidos graxos presentes nas extremidades da molécula, com a formação de DAG-1,2 e DAG-2,3. Na figura, os ácidos graxos livres resultantes da hidrólise foram omitidos.

A liberação de DAG-1,2(2,3) a partir da hidrólise da trioleína foi aproximadamente 3 vezes maior do que a liberação de DAG-1,3 durante toda a reação de hidrólise, tanto para a lipase bruta quanto a purificada (Tabela 8.3). Estes resultados indicam que a lipase de *B. lata* apresentou uma ligeira estereo-seletividade para a hidrólise da ligação éster na posição *sn*-1 e *sn*-3 em comparação com a posição *sn*-2. A relação esperada entre DAG-1,2(2,3) e DAG-1,3 para lipases não regioseletivas estaria perto de 2 por fatores estatísticos (CAMBON *et al.*, 2008), como é visto com lipase comercial de *C. rugosa*. Estes resultados mostram que a lipase de *B. lata* removeu seletivamente com ligeira seletividade os ácidos graxos das duas posições externas (ésteres primários) da trioleína. Em contraste, a lipase de *C. rugosa* comercial foi, aparentemente, não seletiva, com a relação DAG-1,2(2,3)/DAG-1,3 próxima a 2 ao longo

de todo o experimento. A lipase de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 apresentou um comportamento clássico não regioseletivo (WANG; YU; XU, 2009), embora algumas lipases do gênero *Pseudomonas* demonstraram uma elevada especificidade de posição, especialmente *sn*-1,3 (KOJIMA; SHIMIZU, 2003; MAKHZOUM; OWUSU-APENTEN; KNAPP, 1996).

Tabela 8.3 - Proporção de regiodistribuição de DAGs após hidrólise parcial de trioleína catalisada pelas lipases bruta e pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 e lipase comercial de *Candida rugosa* (para comparação) após 0 (controle), 5, 15 e 30 minutos.

Tempo de hidrólise (min)	Produtos da hidrólise da trioleína (%)	
	DAG-1,2(2,3)	DAG-1,3
Lipase comercial de <i>C. rugosa</i>		
0	0	0
5	64.90 ± 0.61	35.10 ± 0.61
15	62.70 ± 0.74	37.30 ± 0.74
30	62.70 ± 0.25	37.30 ± 0.25
Lipase BRUTA de <i>B. lata</i>		
0	0	0
5	68.48 ± 2.55	31.52 ± 2.55
15	76.20 ± 0.22	23.80 ± 0.22
30	77.39 ± 0,34	23.61 ± 0.34
Lipase PURA de <i>B. lata</i>		
0	0	0
5	71.69 ± 0.13	28.31 ± 0.13
15	75.48 ± 0.35	24.52 ± 0.35
30	75.59 ± 0.41	24.41 ± 0.41

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas.

Para os TAGs heterogêneos presentes em óleos vegetais, a relação entre DAG-1,2(2,3)/DAG-1,3 variou de 2,21 a 4,51 e de 2,31 a 5,13 após 30 minutos de reação para as lipases bruta e pura de *B. lata*, respectivamente (Tabela 8.4). O substrato óleo de oliva apresentou a maior relação, cerca de 4,51 e 5,13 para as lipases bruta e pura de *B. lata*, respectivamente. Para os óleos de soja, girassol e canola, estas proporções foram maiores

que 2 com tendência a aumentar com o progresso da reação. Estes resultados mostram novamente um ligeiro comportamento *sn*-1,3-regiosseletivo, mesmo quando hidrolisando lipídios heterogêneos.

É importante salientar que estes substratos são componentes de óleos vegetais que contêm outras substâncias, tais como fosfolipídios, ácidos graxos livres, esteróis e ésteres de esteróis, tocoferóis, entre outros compostos minoritários, que tornam estes substratos em meios de reação complexos. Em alguns casos, os compostos minoritários podem afetar a seletividade da enzima (MORENO *et al.*, 2006). Mesmo assim, a hidrólise dos ácidos graxos nas posições *sn*-1 e *sn*-3 aconteceu mais rápido do que a os da posição *sn*-2. A lipase comercial de *C. rugosa* comercial mostrou o mesmo comportamento apresentado com a trioleína, uma proporção DAG-1,2(2,3)/DAG-1,3 menor do que 2 para todos os óleos vegetais, estando de acordo com uma atividade não regiosseletiva (Tabela 8.4).

Em geral, as lipases catalisam reações nas posições primárias de um triacilglicerol (*sn*-1,3) ou em todas as posições (*sn*-1,2 e 3) (Figura 8.12). Uma lipase com seletividade para a posição secundária (*sn*-2) ainda não foi descrita (CHANDLER, 2001). A regiosseletividade de uma lipase é a capacidade de distinguir entre as funcionalidades de ésteres primários (isto é, *sn*-1,3) e secundário (*sn*-2) numa molécula de triacilglicerol. O conhecimento da regiosseletividade de uma lipase é importante principalmente para a indústria de alimentos, podendo selecionar, manipular e estruturar lipídios com propriedades físico-químicas e nutricionais específicas (CHANDLER, 2001). Embora a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 tenha apresentado apenas uma ligeira regiosseletividade, as lipases produzidas pelo gênero *Burkholderia* são conhecidas por serem não-

específicas, podendo hidrolisar a ligação éster nas três posições do triacilglicerol (KAIEDA *et al.*, 2001; MATORI; ASAHARA; OTA, 1991; STADLER *et al.*, 1995)

Tabela 8.4 - Proporção de regiodistribuição de DAGs após hidrólise parcial de óleos vegetais catalisada pelas lipases bruta e pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 e lipase comercial de *C. rugosa* (para comparação) após 0 (controle), 5, 15 e 30 minutos. Dados do tempo 0 h são a proporção inicial de DAG das amostras de óleo.

Tempo de hidrólise (min)	Produtos da hidrólise (%)							
	Oliva		Canola		Soja		Girassol	
	DAG-1,2(2,3)	DAG-1,3	DAG-1,2(2,3)	DAG-1,3	DAG-1,2(2,3)	DAG-1,3	DAG-1,2(2,3)	DAG-1,3
Lipase comercial de <i>C. rugosa</i>								
0	28.60 ± 0.04	71.40 ± 0.04	22.90 ± 0.49	77.10 ± 0.49	29.00 ± 0.32	71.00 ± 0.32	27.40 ± 0.77	72.60 ± 0.77
5	55.70 ± 0.26	44.30 ± 0.26	59.30 ± 0.35	40.70 ± 0.35	60.20 ± 0.40	39.80 ± 0.40	56.90 ± 1.86	43.10 ± 1.86
15	54.90 ± 0.21	41.10 ± 0.21	59.20 ± 0.34	40.80 ± 0.34	59.00 ± 0.14	41.00 ± 0.14	54.40 ± 0.53	44.60 ± 0.53
30	55.60 ± 0.36	44.40 ± 0.36	59.10 ± 0.34	40.90 ± 0.34	59.10 ± 0.27	40.90 ± 0.27	56.30 ± 0.56	43.70 ± 0.56
Lipase BRUTA de <i>B. lata</i>								
0	33.35 ± 0.21	66.65 ± 0.21	22.42 ± 0.32	77.58 ± 0.32	31.20 ± 0.88	68.80 ± 0.88	21.19 ± 0.34	78.81 ± 0.34
5	78.13 ± 0.55	21.87 ± 0.55	68.64 ± 0.98	31.36 ± 0.98	52.20 ± 1.17	47.80 ± 1.17	68.48 ± 0.87	31.52 ± 0.87
15	81.56 ± 0.83	18.44 ± 0.83	72.04 ± 0.31	27.96 ± 0.31	63.73 ± 1.41	36.27 ± 1.41	69.54 ± 0.31	30.46 ± 0.31
30	81.86 ± 0.89	18.14 ± 0.89	75.32 ± 0.34	24.68 ± 0.34	68.88 ± 1.65	31.12 ± 1.65	71.82 ± 1.03	28.18 ± 1.03
Lipase PURA de <i>B. lata</i>								
0	33.35 ± 0.21	66.65 ± 0.21	22.42 ± 0.32	77.58 ± 0.32	31.20 ± 0.88	68.80 ± 0.88	21.19 ± 0.34	78.81 ± 0.34
5	84.11 ± 0.35	15.89 ± 0.35	66.46 ± 1.59	33.54 ± 1.59	54.00 ± 1.13	46.00 ± 1.13	61.70 ± 0.68	38.30 ± 0.68
15	84.22 ± 0.29	15.78 ± 0.29	68.35 ± 1.27	21.65 ± 1.27	62.44 ± 0.92	37.56 ± 0.98	66.80 ± 0.74	33.20 ± 0.74
30	83.69 ± 0.35	16.31 ± 0.35	73.74 ± 0.61	26.26 ± 0.61	70.94 ± 1.11	29.06 ± 1.11	69.84 ± 0.77	30.16 ± 0.77

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão das triplicatas.

8.7. Tiposseletividade

A tiposseletividade da lipase pura de *B. lata* LBBIO-BL02 foi determinada pela hidrólise de diferentes FAMES (ésteres metílicos de ácidos graxos – *Fatty Acids Methyl Esters*, em inglês) utilizados como substratos, com cadeia carbônica saturada de 8:0 a 20:0 e com insaturações de 18:1 a 18:3. A tiposseletividade foi determinada de acordo com o tamanho da cadeia (Figura 8.13) e o número de insaturações (Figura 8.14) por reações competitivas. A reação aconteceu com os substratos emulsionados em PVA, a 55 °C, pH 7,0 e foi acompanhada de 0 a 60 min.

A lipase purificada produzida por *B. lata* LBBIO-BL02 catalisou a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa saturada (10:0 ou superior). A enzima mostrou uma clara seletividade para o éster contendo ácido palmítico (16:0) durante toda a reação, seguido do ácido láurico (12:0) e esteárico (18:0). O ácido graxo saturado de cadeia curta, caprílico (8:0), quase não foi hidrolisado, no final do tempo de reação (60 minutos) havia apenas 1,5% deste ácido graxo (Figura 8.13). No entanto, durante a reação, houve redução na liberação de 16:0 e 12:0 (18 e 19%, respectivamente) e aumento na liberação de 14:0 e 20:0 (60 e 168%, respectivamente). No final do tempo de reação (60 minutos), houve uma ligeira tendência para favorecer a hidrólise dos ácidos graxos saturados de cadeias mais longas. No entanto, os teores relativos (%) dos ácidos graxos saturados variaram dentro uma janela estreita de tempo, 60 minutos de hidrólise, indicando que não há uma clara tiposseletividade da enzima neste sentido.

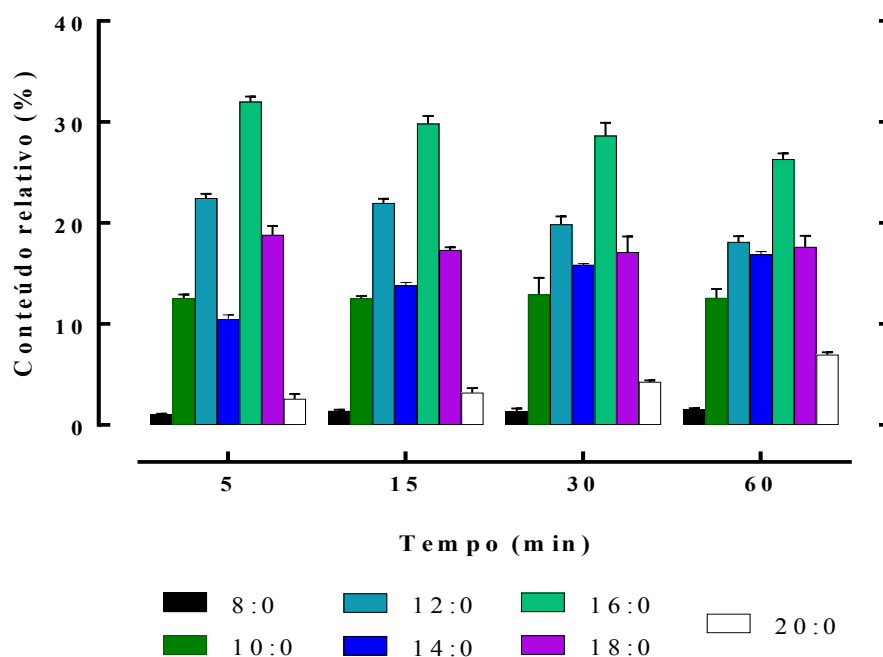


Figura 8.13 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos saturados catalisada pela lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0.

No que diz respeito à hidrólise dos AG insaturadas (18:1, 18:2 e 18:3), nos primeiros 5 min de reação a lipase de *B. lata* mostrou uma grande seletividade para o ácido oleico 18:1, com 56% de hidrólise, e baixa hidrólise de 18:3 (~12%) (Figura 8.14). No entanto, no decorrer da reação, possivelmente por causa da diminuição de substrato FAME 18:1, a enzima aumentou a taxa de hidrólise de 18:2 até o mesmo teor relativo de 18:1 (40%) com menor aumento de 18:3. Esses resultados indicam que a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 tem seletividade em hidrolisar primeiro AGs com menor número de insaturações.

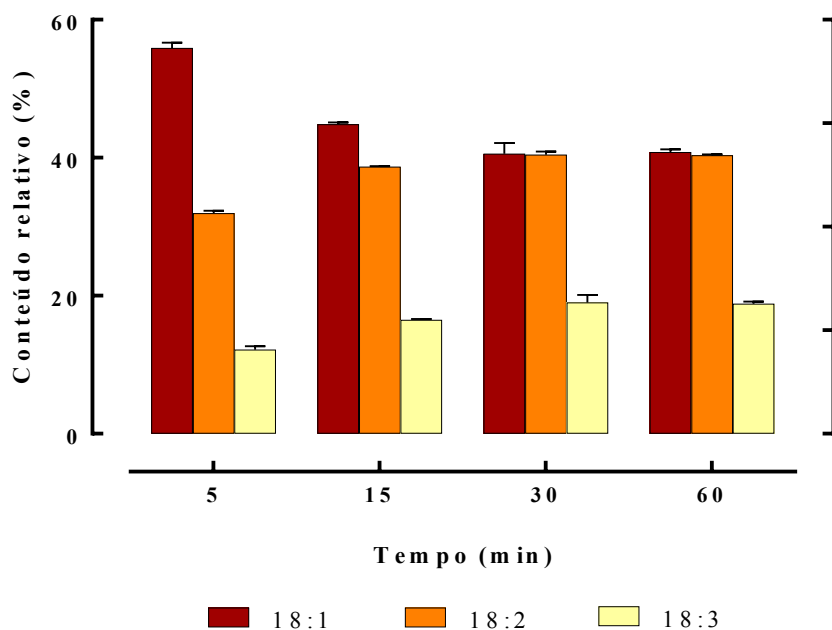


Figura 8.14 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos insaturados catalisada pela lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0.

Quando todos os FAMES, saturados e insaturados, estavam no mesmo meio de reação (Figura 8.15), a lipase de *B. lata* foi claramente seletiva para AGs insaturados, especialmente 18:1, e mostrou significativa seletividade por ácido palmítico 16:0 sobre os outros AGs saturados. A diferença da tiposseletividade apresentada nos primeiros minutos de reação tende a diminuir com o avanço da hidrólise, demonstrando que a enzima é capaz de hidrolisar ácidos graxos variados.

A lipase de *B. cepacia* ATCC 25416 (WANG; YU; XU, 2009), por exemplo, tem seletividade por cadeias médias de ésteres de *p*-nitrofenila (C12), enquanto a lipase de *B. cepacia* LTEB11 (LIMA, 2004), tem seletividade por cadeias longas destes ésteres (C16). A lipase de *Burkholderia cepacia* RQ3 apresentou maior atividade frente ésteres insaturados de *p*-nitrofenila de cadeia mais longa (C14, C16 e C18). A maioria das lipases, especialmente do gênero *Pseudomonas* sp., preferem ésteres de ácidos graxos de cadeia média ou curta (GAUR; GUPTA; KHARE, 2008; JI *et al.*, 2010). No entanto, a maioria

das lipases de *Burkholderia* sp. mostrou especificidade para substratos com ácidos graxos mais longos (PATEL *et al.*, 2014; TAKEDA; AONO; DOUKYU, 2006; WANG *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2016; YAO *et al.*, 2013).

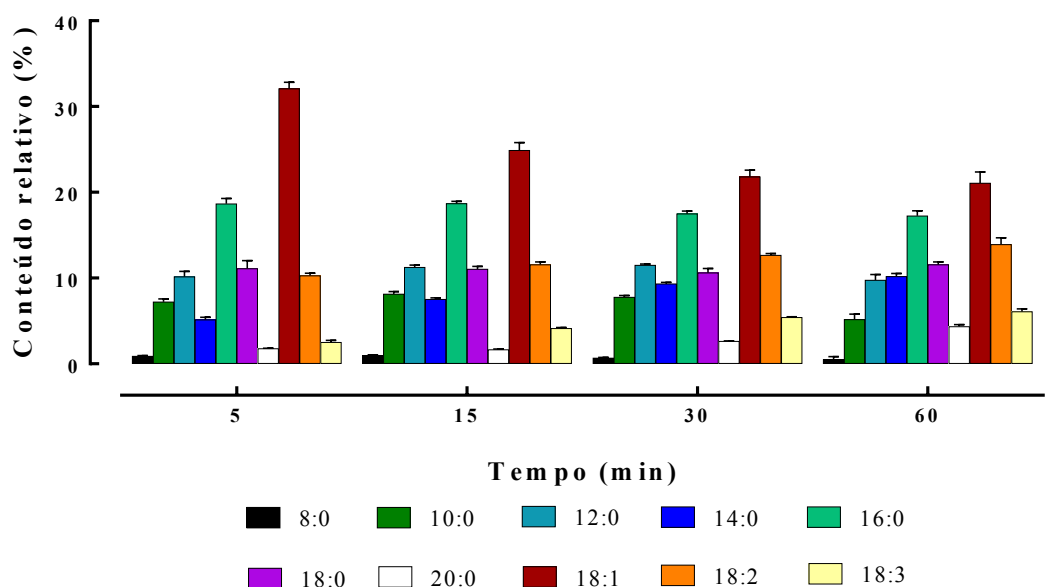


Figura 8.15 - Liberação de ácidos graxos durante o processo de hidrólise de ésteres metílicos saturados e insaturados catalisada pela lipase pura de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições de ensaio: 55 °C, tampão tris 0,05 mol/L pH 7,0.

8.8. Estabilidade em solventes orgânicos.

A estabilidade da enzima em presença de solventes orgânicos é uma importante característica das lipases, podendo determinar o uso da enzima como catalisador em reações de síntese, além de mostrar quais solventes podem ser utilizados nos meios de reação. Entretanto, apesar das vantagens da biocatálise em meio orgânico, a atividade das enzimas nestes sistemas é normalmente muito menor do que em soluções aquosas (PENCREAC'H; BARATTI, 2001). Em um aparente paradoxo, a estabilidade das proteínas é menor em solventes miscíveis em água do que nos solventes hidrofóbicos. A pouca estabilidade em solventes hidrofílicos representa um problema para o uso de lipases

envolvendo, por exemplo, as reações de esterificação e transesterificação de ácidos graxos utilizando álcoois de cadeia curta para síntese de ésteres de aroma e biocombustíveis, por exemplo.

Muitas tentativas têm sido feitas para correlacionar as propriedades dos solventes orgânicos com o desempenho de uma enzima com o intuito de poder prever a influência do solvente na catálise enzimática. Entre os parâmetros listados com este propósito estão a constante dielétrica, o momento de dipolo, o logaritmo do coeficiente de partição bifásico n-octanol/água ($\log P$), entre outros, sendo este último o mais utilizado (GRUNWALD, 2009), porém, nenhum parâmetro sozinho consegue explicar o efeito do solvente na enzima, havendo um efeito cumulativo entre eles (KHMELNITSKY *et al.*, 1988; TORRES; OTERO, 1996). Solventes hidrofílicos ($-2,5 < \log P < 0$), tais como acetona e éteres, são geralmente incompatíveis com a atividade enzimática devido à retirada da água de solvatação da estrutura protéica (SZTAJER *et al.*, 1992; ZAKS; KLIBANOV, 1988).

Na Tabela 8.5 estão apresentados os resultados de estabilidade da lipase bruta e pura de *B. lata* LBBIO-BL02. A enzima bruta apresentou resultados surpreendentes, mostrando ativação da enzima em alguns casos contendo solventes polares: com a incubação da lipase em metanol 50%, isopropanol 25% e etanol 25 e 50%, observou-se um aumento na atividade enzimática em relação à atividade obtida com um controle incubado em tampão citrato-fosfato. As ativações observadas na presença desses solventes podem ser explicadas pelo fato de que é uma característica das lipases formarem agregados, e a função desses solventes pode ser desfazer esses agregados e remover o material lipídico residual presentes na enzima bruta, fato que pode resultar em um

aumento da atividade enzimática (SUGIHARA; TANI; TOMINAGA, 1991; SUGIHARA *et al.*, 1992), como demonstrado na seção 7.1.3.

Tabela 8.5 - Estabilidade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em solventes orgânicos polares e apolares

Solvente	Log P	Atividade residual (%)	
		Enzima Bruta	Enzima purificada
Controle Tampão		100,0 ± 8,2	100,0 ± 2,5
Metanol 25%	-0,73	86,5 ± 21,5	75,0 ± 5,3
50%		119,7 ± 5,3	78,2 ± 4,6
75%		50,7 ± 6,4	42,8 ± 5,8
100%		0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,2
Etanol 25%	-0,24	105,2 ± 12,8	83,7 ± 3,1
50%		178,4 ± 7,8	76,3 ± 6,3
75%		98,8 ± 8,6	49,5 ± 6,3
100%		28,2 ± 8,4	18,5 ± 4,9
Isopropanol 25%	-0,28	162,7 ± 7,2	98,8 ± 3,6
50%		82,4 ± 3,5	89,9 ± 2,6
75%		91,5 ± 12,0	87,5 ± 2,5
100%		72,0 ± 7,9	77,3 ± 2,6
Acetona 25%	-0,23	72,5 ± 9,8	56,7 ± 3,0
50%		70,5 ± 5,7	41,4 ± 0,7
75%		61,0 ± 3,2	36,8 ± 3,1
100%		72,3 ± 4,2	33,1 ± 1,8
Butanol	0,8	6,1 ± 3,3	11,6 ± 2,6
Álcool isoamílico	1,42	41,0 ± 0,0	38,4 ± 2,9
Tolueno	2,5	115,7 ± 45,7	103,6 ± 3,2
Octanol	2,8	41,4 ± 11,2	34,3 ± 2,3
n-Hexano	3,5	257,0 ± 5,4	145,3 ± 3,3
n-Heptano	4	261,5 ± 8,2	199,5 ± 9,3
Isooctano	4,51	44,5 ± 1,6	45,6 ± 4,6

*Os valores de porcentagens que acompanham os solventes orgânicos polares correspondem à quantidade de solvente em tampão pH 7,0. Foi considerado 100% de atividade da enzima incubada em tampão para os solventes polares e, nos apolares, 100% a atividade da enzima adsorvida em papel filtro, sem incubação e desorvida em tampão. Ensaios em triplicata. Log P: medida de hidrofobicidade do solvente calculada pelo logaritmo do coeficiente de partição de um dado solvente em um sistema padrão octanol/água.

Quando a enzima purificada *B. lata* foi incubada com 50% (v/v) de metanol, etanol e isopropanol, foram observados valores de atividade 78%, 76% e 90% em relação ao controle incubado em tampão citrato-fosfato, respectivamente. Mesmo com uma estabilidade superior a 75%, a lipase pura tem estabilidade menor aos solventes orgânicos

polares comparada à enzima bruta, possivelmente devido à falta de outras proteínas associadas e ao material lipídico residual, como comentado anteriormente.

A estabilidade de lipases bacterianas ou fúngicas em solventes orgânicos hidrofilicos é uma característica rara, e ativação da enzima por estes solventes, como verificado para a lipase bruta, é ainda mais rara (LIMA, 2004). Porém, na última década, algumas outras lipases e esterases tolerantes a solventes orgânicos foram sendo isoladas a partir de vários micro-organismos tais como *Pseudomonas* spp., cepas de *Burkholderia cepacia*, *Bacillus* spp., arqueobactérias termofílicas, fungos filamentosos e leveduras (GUPTA *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016).

Como mostra a Tabela 8.5, as enzimas bruta e purificada de *B. lata* também mostraram estabilidade em solventes orgânicos imiscíveis em água, apresentando atividade residual de 199% com n-heptano, 145% com n-hexano e 103% com tolueno, na forma pura da enzima. Estes resultados eram esperados e estão de acordo com os descritos por Zaks e Klibanov (1988) que observaram que solventes imiscíveis em água ($2 < \log P < 4$), tais como alcanos, não prejudicam a atividade catalítica ou podem até mesmo ativar a enzima. O efeito positivo dos solventes apolares pode ser analisado sob dois aspectos. Primeiro, ao contrário dos solventes com $\log P$ menor do que 2, estes solventes não retiram a água de solvatação da estrutura proteica prevenindo a desnaturação. Segundo, moléculas do solvente podem interagir com a estrutura proteica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores. Solventes apolares podem manter a enzima em sua conformação aberta, ou seja, em presença destes solventes, a *lid* não estaria cobrindo o sítio ativo, o que poderia justificar a ativação da enzima (RÚA *et al.*, 1993).

A partir destes dados, verificou-se que a enzima de *B. lata* LBBIO-BL02 apresenta boa estabilidade em solventes, especialmente com a enzima bruta, provavelmente devido

à formação de agregados e material lipídico residual. Mesmo com estabilidade menor em relação à enzima bruta, a enzima purificada de *B. lata* mantém alta estabilidade, podendo ser aplicada em reações de síntese em ambientes aquo-restritos, como será apresentado na seção 9.

9. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO IV – “POTENCIAL DE BIOCATÁLISE EM REAÇÕES DE INTERESSE FARMACOLÓGICO E INDUSTRIAL”

Lipases têm atraído uma enorme atenção nas duas últimas décadas por causa de seu grande potencial biotecnológico (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002; PANDEY *et al.*, 1999). Estas enzimas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. Novas aplicações têm sido estabelecidas com êxito utilizando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos enantiomericamente puros, compostos aromáticos, auxiliares digestivos (ALOULOU *et al.*, 2008; BRÍGIDA *et al.*, 2014; CORRÊA *et al.*, 2012; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002; KUMAR *et al.*, 2016; MEDINA *et al.*, 2016; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012; TAN *et al.*, 2010; UNGCHAROENWIWAT; CANYUK; H-KITTIKUN, 2016). Alguns produtos químicos essenciais, atualmente fabricados industrialmente por rotas químicas a partir de óleos e gorduras e óleos, podem ser produzidos por lipases com maior rapidez, melhor especificidade e pureza e sob condições brandas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; MÉNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; UNGCHAROENWIWAT; CANYUK; H-KITTIKUN, 2016).

A produção de altos níveis de lipases, em grande quantidade e com alta atividade; o desenvolvimento de técnicas simples, rápidas e de baixo custo para recuperação e purificação da proteína enzimática; a seleção de lipases com características industriais desejáveis e pouco restritas; e uma compreensão detalhada das características cinéticas e dos mecanismos hidrolíticos da enzima são de extrema importância para a aplicação biotecnológica industrial de enzimas lipolíticas. Este trabalho buscou abranger todos os

pontos citados e descreve neste capítulo os experimentos de aplicação da enzima em diferentes reações de interesse farmacêutico e industrial.

9.1. Aciltransferase em ambiente aquoso (transesterificação)

A lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 foi avaliada quanto a sua atividade de transesterificação (ou aciltransferência) para a metanólise do estearato de etila (C18EE) em emulsão aquosa (Figura 9.1). Sob estas condições, a atividade de transesterificação é caracterizada pela taxa relativa de alcoólise em comparação com a atividade total (hidrólise mais alcoólise). Esta relação de transesterificação foi determinada na presença de diferentes concentrações de metanol. Conforme a concentração de metanol aumenta, a alcoólise é favorecida pelo deslocamento do equilíbrio de reação devido à redução da atividade de água (a_w) e o aumento da atividade termodinâmica do metanol. Aciltransferases são caracterizadas pelo fato da transesterificação (ou aciltransferência) ser a principal reação mesmo com uma a_w muito alta e uma concentração do receptor nucleófilo (aqui metanol) muito baixa. Neste experimento (0-20 mol/L de metanol), a a_w do meio de reação foi sempre superior a 0,9.

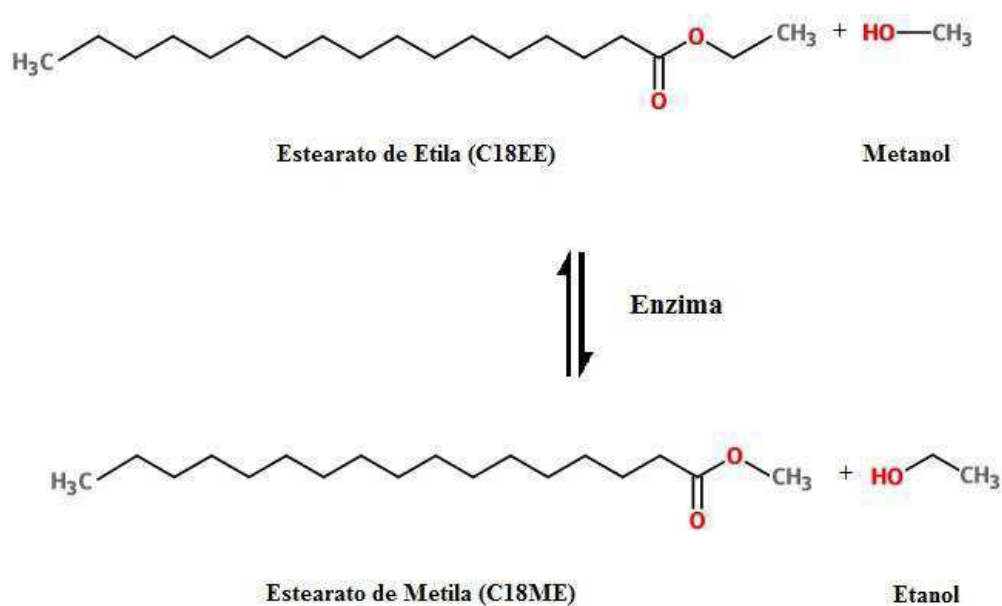


Figura 9.1 – Reação de Aciltransferase (Transesterificação) do Estearato de Etila em Estearato de Metila catalisada por lipases.

Como pode ser observado na Figura 9.2, a taxa de transesterificação aumentou gradualmente com o aumento da concentração de metanol, atingindo 72% da atividade relativa (transesterificação/hidrólise) com 9 mol/L de metanol, porém somente nas primeiras 4 horas de reação e com apenas 30% de atividade catalítica total (soma de hidrólise e a alcoólise). Em tempos maiores, com níveis de substrato atingindo valores inferiores a 10%, a taxa de hidrólise foi superior a 80% em todos os experimentos. Desta maneira, a lipase de *B. lata* apresenta um comportamento predominantemente de hidrolase, que se relaciona mais com lipases clássicas (LECOINTE; DUBREUCQ; GALZY, 1996; NEANG *et al.*, 2013), alcançando apenas 10% de transesterificação após conversão completa do substrato (Figura 9.3).

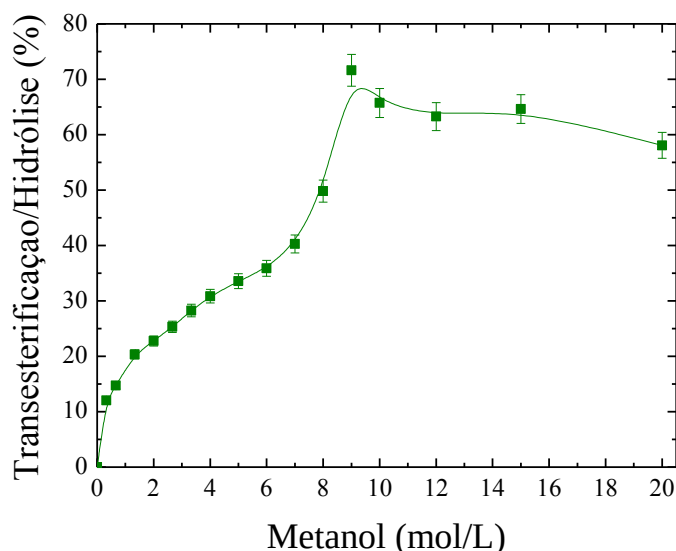


Figura 9.2 - Efeito da concentração de metanol na razão de transesterificação/hidrólise do estearato de etila (C18EE) em emulsão aquosa pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Condições do ensaio: 50 °C, emulsão de estearato de etila (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato-fosfato 50 mmol/L pH 8,0, 4 horas de reação. Experimentos realizados em triplicata.

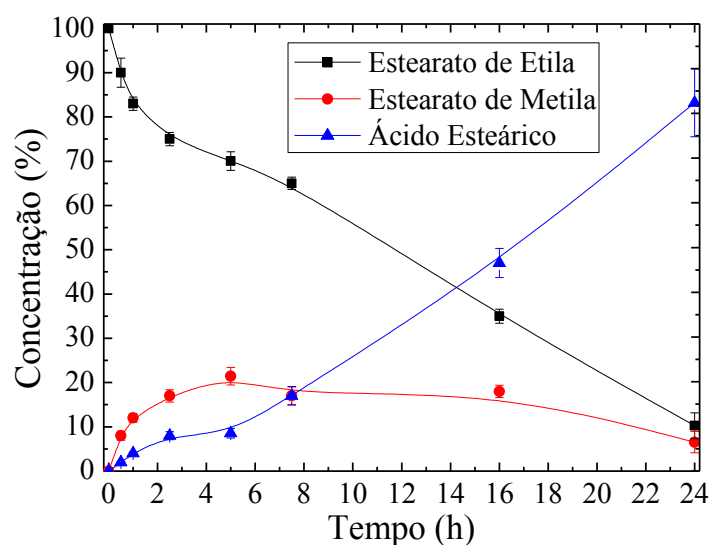


Figura 9.3 – Concentração de estearato de metila e ácido esteárico como produtos das reações de transesterificação e hidrólise do estearato de etila pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 durante o período de 24 h. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de estearato de etila (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato-fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.

A lipase de *B. lata* mostrou uma capacidade significativa de catalisar a transesterificação ao invés de hidrólise nas primeiras horas de reação. No entanto, no

decorrer da reação a atividade de aciltransferase foi inferior a atividade de hidrolase. As duas reações aconteceram ao mesmo tempo e os ésteres metílicos formados se tornaram, no decorrer da reação, mais um substrato para a ação hidrolítica da enzima. Assim, a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 possui uma considerável atividade de aciltransferase, mas com predominância de atividade de hidrolase, o que pode ser observado pela crescente concentração de ácido esteárico ao longo do tempo (Figura 9.3)

Estes resultados concordam com os resultados da literatura, onde Liu *et al.* (2012) conseguiram até 70% de transesterificação de óleo de oliva utilizando lipase de *Burkholderia* com no máximo 10% de água. Concentrações superiores de umidade priorizavam a reação de hidrólise.

9.2. Obtenção de ésteres de cadeia longa via esterificação em ambiente aquoso

Uma vez que a capacidade das enzimas para catalisar a reação de aciltransferase, obviamente, também depende da natureza do nucleófilo, foi avaliada a seletividade de substrato para a lipase de *B. lata* com diferentes álcoois (como acil aceptores). Este experimento também é importante considerando que a esterificação de ácidos graxos e álcoois diferentes resultam em ésteres com características, aplicações e necessidades de mercado igualmente diferentes.

No primeiro experimento a reação de esterificação foi conduzida com ácido oleico emulsificado em álcool polivinílico na presença de metanol em diferentes concentrações (1, 9 e 15 mol/L) (Figura 9.4). Assim como no processo de transesterificação, a concentração do álcool em ambiente aquoso foi importante no deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação. Os melhores resultados foram observados com metanol a 9 mol/L alcançando 82% de síntese em 24 h de reação (Figura 9.5).

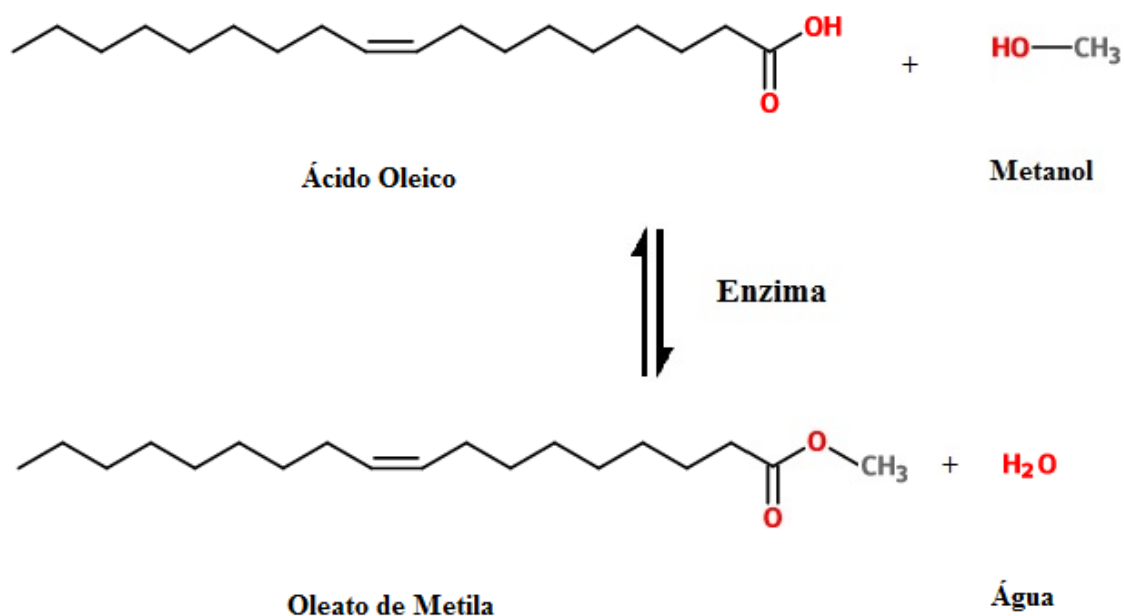


Figura 9.4 - Reação de esterificação metílica do ácido oleico em oleato de metila catalisada por lipases.

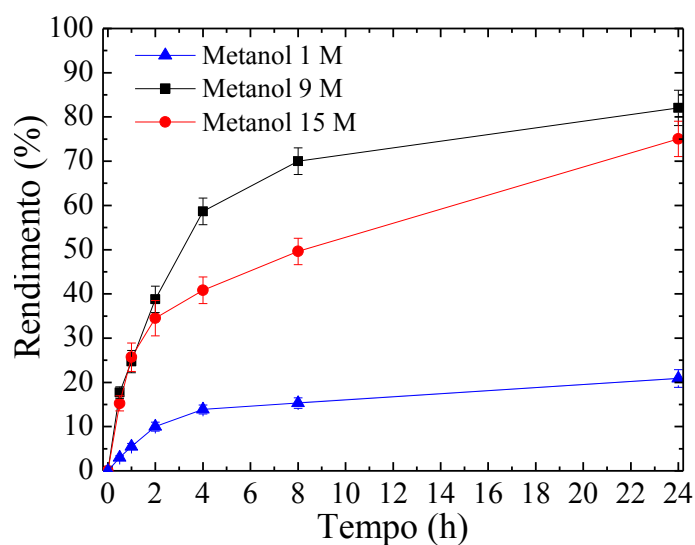


Figura 9.5 - Reação de esterificação do ácido oleico em emulsão aquosa pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de metanol. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de ácido oleico (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.

No segundo experimento a reação de transesterificação (aciltransferase) foi conduzida com trioleína (98% de pureza) na presença de metanol em diferentes concentrações (1, 9 e 15 mol/L). A concentração do álcool em ambiente aquoso foi importante no deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação, porém em escala muito menor. Os melhores resultados foram observados com metanol a 9 mol/L alcançando 17% de síntese em 24 h de reação (Figura 9.6). Porém, utilizando um éster como substrato (trioleína), a reação de hidrólise foi três vezes superior à reação de transesterificação (dados não mostrados), novamente mostrando sua maior atividade de hidrolase em detrimento da atividade de aciltransferase.

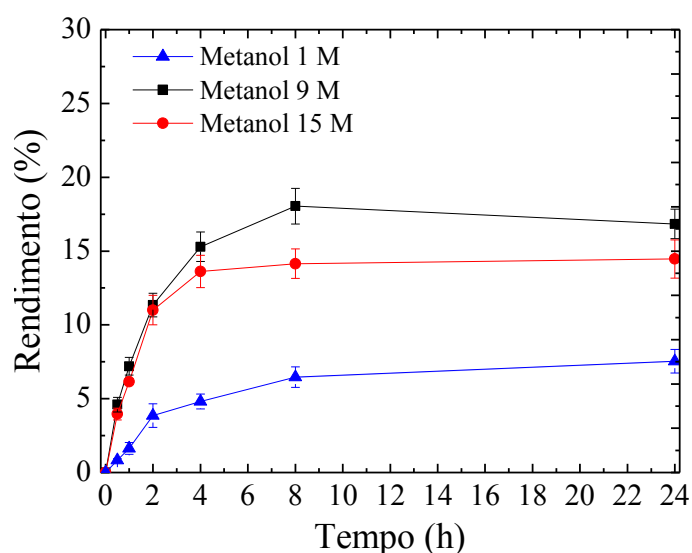


Figura 9.6 - Reação de transesterificação da trioleína em emulsão aquosa pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de metanol. Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de trioleína (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.

Em um terceiro experimento, visto que a lipase de *B. lata* mostrou boa capacidade de esterificação em ambiente aquoso contendo metanol (9 mols/L, Figura 9.6), foi avaliada também a capacidade de esterificação do ácido oleico pela enzima na presença de álcoois primários de diferentes tamanhos (etanol, 1-butanol, 1-Pentanol, 1-Hexanol e

1-Decanol), e um álcool secundário (2-Propanol). A Figura 9.7 mostra a esterificação do ácido graxo no decorrer do tempo de reação, onde a lipase de *B. lata* mostrou capacidade de esterificar com bom rendimento utilizando metanol mas, para uma mesma concentração (9 mol/L), a proporção de esterificação diminuiu com o tamanho da cadeia do álcool, sendo nula para 1-Decanol.

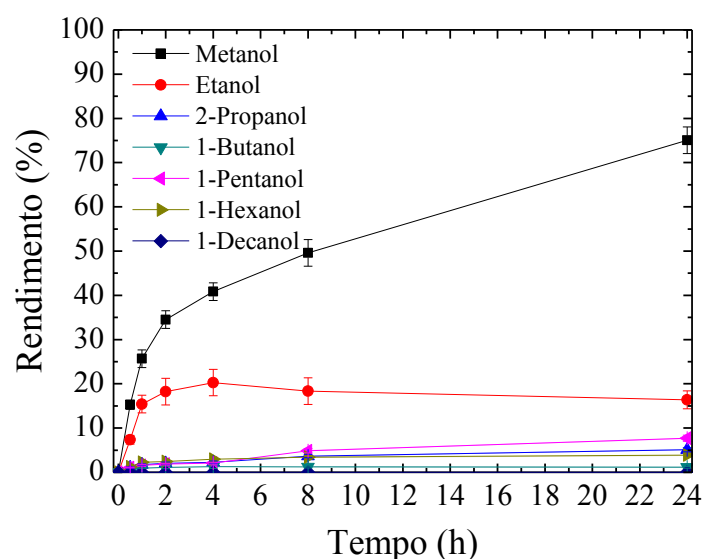


Figura 9.7 - Reação de esterificação do ácido oleico em emulsão aquosa pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 utilizando diferentes álcoois (9 mol/L). Condições do ensaio: 55 °C, emulsão de ácido oleico (100 mmol/L) em álcool polivinílico (20 g/L), tampão citrato fosfato 50 mmol/L pH 8,0. Experimentos realizados em triplicata.

Estes resultados ilustram diferentes mecanismos envolvidos nas reações e substratos da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, alguns mecanismos estão ligados a interações enzima-substrato e características catalíticas, outros relacionados com as propriedades do álcool reagindo em termos de termodinâmica. De fato, a hidrofobicidade dos álcoois aumenta com o comprimento da cadeia de carbono (PATERSON *et al.*, 1972) e, em um sistema aquoso como neste estudo, uma maior hidrofobicidade com alta concentração de álcool influencia tanto na atividade termodinâmica mais elevada do

álcool quanto na maior atividade termodinâmica da água (a_w), o que acaba modificando a orientação da reação (NEANG *et al.*, 2013).

9.3. Obtenção de ésteres de aroma de cadeia curta via esterificação em ambiente orgânico

Devido à demonstração de capacidade para esterificação, a capacidade de catalisar a síntese de ésteres de cadeia curta via esterificação pela lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 foi investigada com objetivo de obter ésteres de aroma de interesse industrial e comercial. Ácido capróico (C6) e caprílico (C8) foram testados com álcoois etílico e isoamílico. As reações foram realizadas em condições padrão, em ambientes aquo-restritos, utilizando n-hexano como solvente. O consumo de ácido graxo foi relacionado com a produção do éster. Os rendimentos de conversão molares foram determinados após 24 h de incubação e os resultados são mostrados na Tabela 9.1.

A lipase de *B. lata* foi capaz de catalisar a síntese de ésteres de cadeia curta nas condições utilizadas, porém com baixos rendimentos. O rendimento mais elevado, de 34%, foi observado com caprilato de isoamila, enquanto os demais ésteres, caproato de etila, caproato de isoamila e caprilato de etila, apresentaram rendimentos de 16% (Tabela 9.1). Estes rendimentos de conversão podem ser resultado de, pelo menos, duas razões principais. Em primeiro lugar, espera-se que a especificidade da lipase tanto para os ácidos graxos quanto para os álcoois pode afetar a taxa da reação. Como estudado na seção 8.5, a lipase de *B. lata* possui baixa seletividade para ácidos graxos de cadeia curta. Em segundo lugar, as condições de reação não foram estudadas e otimizadas neste trabalho.

Tabela 9.1 - Rendimentos das reações de síntese de ésteres de cadeia curta com lipase de *B. lata* LBBIO-BL02.

Reação de esterificação Substratos	Éster formado	Rendimento (%)
Etanol - Ácido Capróico	Caproato de Etila	16,68 ± 0,68
Isoamílico - Ácido Capróico	Caproato de Isoamila	16,00 ± 4,20
Etanol - Ácido Caprílico	Caprilato de Etila	16,09 ± 3,83
Isoamílico - Ácido Caprílico	Caprilato de Isoamila	34,00 ± 2,14

Condições de ensaio: Razão molar ácido/álcool 1:1, 40 °C, 24 h, 180 rpm e n-Hexano como co-solvente. Experimentos realizados em triplicata.

Apesar deste trabalho ter como intuito apenas verificar a viabilidade da enzima para tal fim e direcionamento para estudos futuros, um experimento de síntese de caprilato de isoamila utilizando a lipase de *B. lata* em diferentes temperaturas foi conduzido (Figura 9.8). Assim como nas reações de hidrólise, a velocidade de esterificação também foi dependente da temperatura, atingindo 45% de síntese em 24 horas a 50 °C.

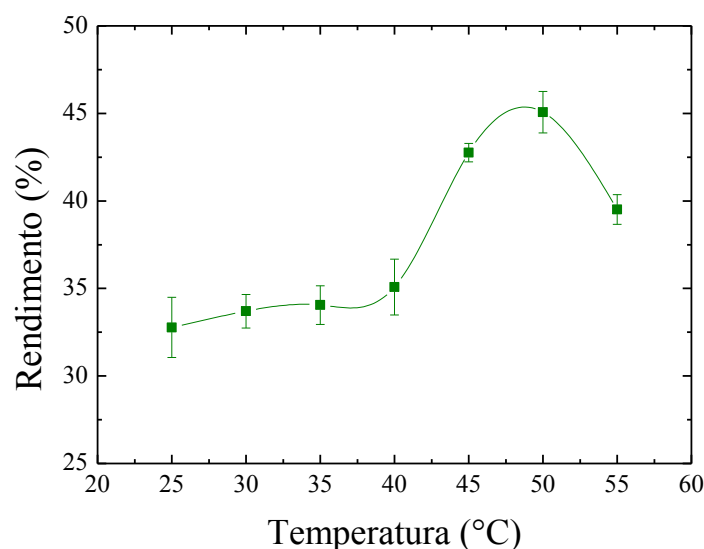


Figura 9.8 - Efeito da temperatura na reação de síntese de caprilato de isoamila por esterificação utilizando lipase de *B. lata* LBBIO-BL02. Razão molar ácido/álcool 1:1, 24 h, 180 rpm e n-Hexano como co-solvente. Experimentos realizados em triplicata.

Uma das áreas de aplicação de lipase é dirigida a síntese de ésteres de cadeia curta que são constituintes importantes de agentes aromatizantes. Esses ésteres biocataliticamente sintetizados têm uma vantagem sobre os seus homólogos químicos pois eles se destacam em aroma mais marcante e são considerados como "naturais" tornando-os altamente aceitos pelo mercado (ABBAS; COMEAU, 2003; MENDES; OLIVEIRA; CASTRO, 2012).

O uso da lipase de *B. lata* na síntese do éster caprilato de isoamila resultou em valores de conversão modestos, porém promissores, o que possibilita que essa enzima possa ser objeto de estudos posteriores por possuir bom potencial de aplicação na síntese de ésteres, componentes de aroma em alimentos. Nascimento *et al.* (2015) sintetizaram caprilato de isoamila usando uma lipase de *B. cepacia* com rendimentos que foram de 2 a 99%, de acordo com as variáveis da reação. Trabalhos futuros de otimização estudando variáveis como co-solventes, teor de umidade, razão molar, concentração do biocatalisador e principalmente, imobilização da enzima, podem fazer com que a reação se torne mais atrativa industrialmente.

9.4. Síntese de oleil oleato em ambiente orgânico

Ésteres de cera são os ésteres formados por ácidos e álcoois graxos, possuem considerável importância comercial e são produzidos numa escala de 3,5 milhões de toneladas por ano (RASE, 2016), principalmente para área de cosméticos (KENG *et al.*, 2008; MAHDI *et al.*, 2011) e aplicações de lubrificantes alternativos (DE PRIJCK; PEETERS; NELIS, 2008). O óleo de jojoba (*Simmondsia chinensis*) tem sido a principal fonte natural de ésteres de cera para aplicações comerciais desde a proibição global de caça às baleias (NEANG *et al.*, 2013). No entanto, o principal obstáculo para a utilização

em grande escala do óleo de jojoba é o seu alto custo e disponibilidade regional e sazonal (HADZIR *et al.*, 2001). Assim, as tentativas para sintetizar ésteres de cera com matéria prima de baixo custo e com tempo mais curto tornaram-se muito importantes (KUO; CHEN; CHEN; LIU, 2012; SALIS; SOLINAS; MONDUZZI, 2003; UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2013; UNGCHAROENWIWAT; CANYUK; H- KITTIKUN, 2016). O oleil oleato ($C_{36}H_{68}O_2$), conhecido como o principal componente do óleo de jojoba, é um éster especial de alto valor agregado, é o éster de cera alvo neste ensaio (Figura 9.9).

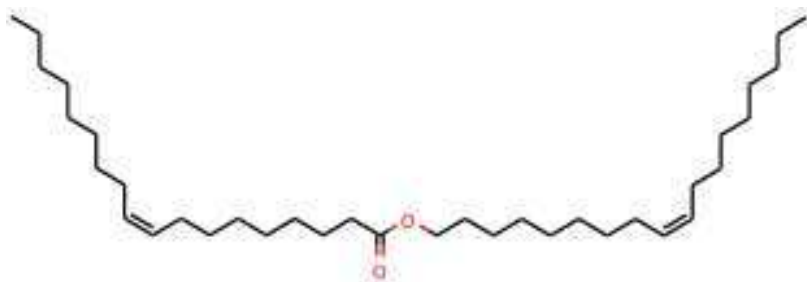


Figura 9.9 - Molécula de oleil oleato, formada a partir de uma ligação éster (em destaque) entre um ácido oleico (18:1) e um álcool oleílico (18:1).

A capacidade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em esterificar o oleil oleato foi estudada em ambiente orgânico (n-Hexano). O rendimento da reação (%) e produção do éster de cera em diferentes relações molares álcool:ácido graxo (3:1, 1:1 e 1:2) está mostrado na Figura 9.10. A concentração do álcool graxo não influenciou significativamente o rendimento da reação, mesmo na proporção 1:2 o rendimento foi de 45% devido ao consumo total do álcool. Nas relações molares 3:1 e 1:1 o rendimento alcançou 84 e 87% após 30 minutos de reação, respectivamente.

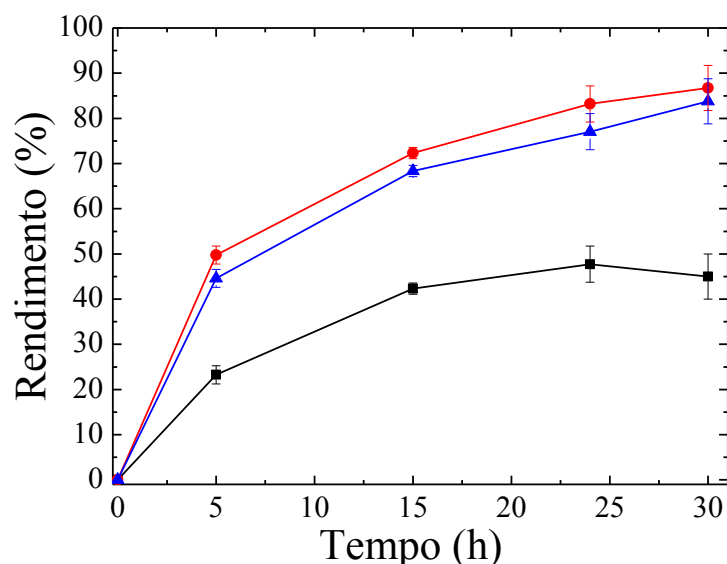


Figura 9.10 - Reação de esterificação do ácido oleico com álcool oleílico pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 utilizando diferentes razões molares álcool:ácido graxo: 1:2 (■), 1:1 (●) e 3:1 (▲). Condições do ensaio: 55 °C, ambiente orgânico n-Hexano, ácido oleico (100 mmol/L). Experimentos realizados em triplicata.

Ésteres de cera podem ser sintetizados utilizando métodos químicos ou enzimáticos. A síntese enzimática oferece condições de reação mais brandas, grandes variedades de produtos de alta qualidade e um processo ecologicamente amigável (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; TRANI; ERGAN; ANDRE, 1991). Ácidos graxos de cadeias longas monoinsaturadas, como o ácido oleico, são os mais indicados a formarem ésteres que se assemelham às ceras de jojoba e laranja com alto valor comercial (MUKHERJEE; KIEWITT, 1988; UNGCHAROENWIWAT; H-KITTIKUN, 2013). Poisson *et al.* (1999) estudaram a síntese de ceras a partir da gordura de leite e álcool oleílico pelas lipases de *Alcaligenes* sp. e *Chromobacterium viscosum*, obtendo rendimento de 60% em 166 h a 60 °C. Ungcharoenwiwat e H-Kittikun (2013) estudaram a síntese de ceras a partir de óleo de peixe utilizando 5 lipases comerciais imobilizadas: Novozyme 435 (*Candida antarctica*), Lipozyme RM IM (*Rhizopus miehei*), Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus*), Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) e Lipase PS

(*Burkholderia cepacia*) e lipase de *Burkholderia* sp. EQ3 a 37 °C e 24 h, tendo obtido rendimentos de 92%, 20%, 89%, 0%, 0% e 40%, respectivamente.

Além disso, Radzi *et al.* (2005) estudaram a produção em grande escala de ésteres de cera a partir de ácido oleico e álcool oleílico usando Novozyme 435. O rendimento foi superior de 90% de conversão a 50 °C em 30 min. Estas comparações reforçam o apelo industrial da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, que apresentou 87% de rendimento na reação de síntese de oleil oleato sem experimentos de otimização. Trabalhos futuros neste sentido deverão ser realizados.

9.5. Epoxidação quimio-enzimática

Na reação de epoxidação catalisada por lipases, a enzima catalisa a formação do perácido onde o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) atua como agente oxidante, convertendo o ácido carboxílico num perácido (-O-OH), esta reação é denominada perhidrólise (Figura 9.11). No segundo momento o perácido oxida as insaturações dos ácidos graxos formando um grupo epóxi, nesta etapa sem a catálise da lipase. Neste estudo, a lipase da cepa *B. lata* LBBIO-BL02 foi estudada com relação à sua capacidade de catalisar a reação de perhidrólise de ácidos graxos para serem utilizados na epoxidação de ácidos graxos insaturados.

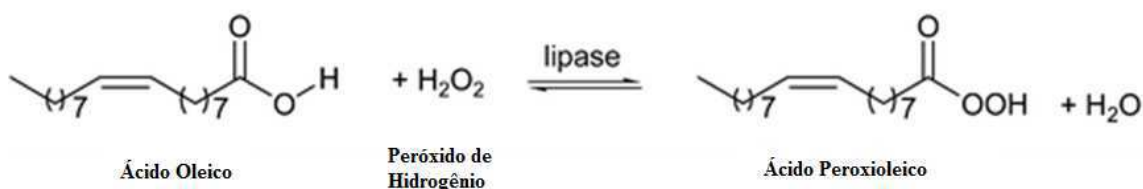


Figura 9.11 - Reação de perhidrólise do ácido oleico com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação de uma lipase resultando em perácido graxo.

A lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozyme 435, CALB), uma enzima conhecida por catalisar a produção de perácidos através da perhidrólise (SAITHAI *et al.*, 2013), foi utilizada neste trabalho como controle positivo e para comparação dos resultados. A lipase comercial de *Burkholderia cepacia* (Amano PS), uma enzima produzida por uma cepa filogeneticamente próxima à cepa deste estudo, também foi utilizada para fins de comparação. Os produtos de reação obtidos estão apresentados na Figura 9.12.

Após 24 h de reação, CALB apresentou 93,8% de produtos epoxidados (ácido esteárico epóxi e oleato de metila epóxi), enquanto que a lipase comercial de *B. cepacia* (Amano PS) alcançou 60,2% e a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 alcançou apenas 35,1%, valor muito abaixo comparado com CALB e principalmente comparado com a lipase relacionada de *B. cepacia*.

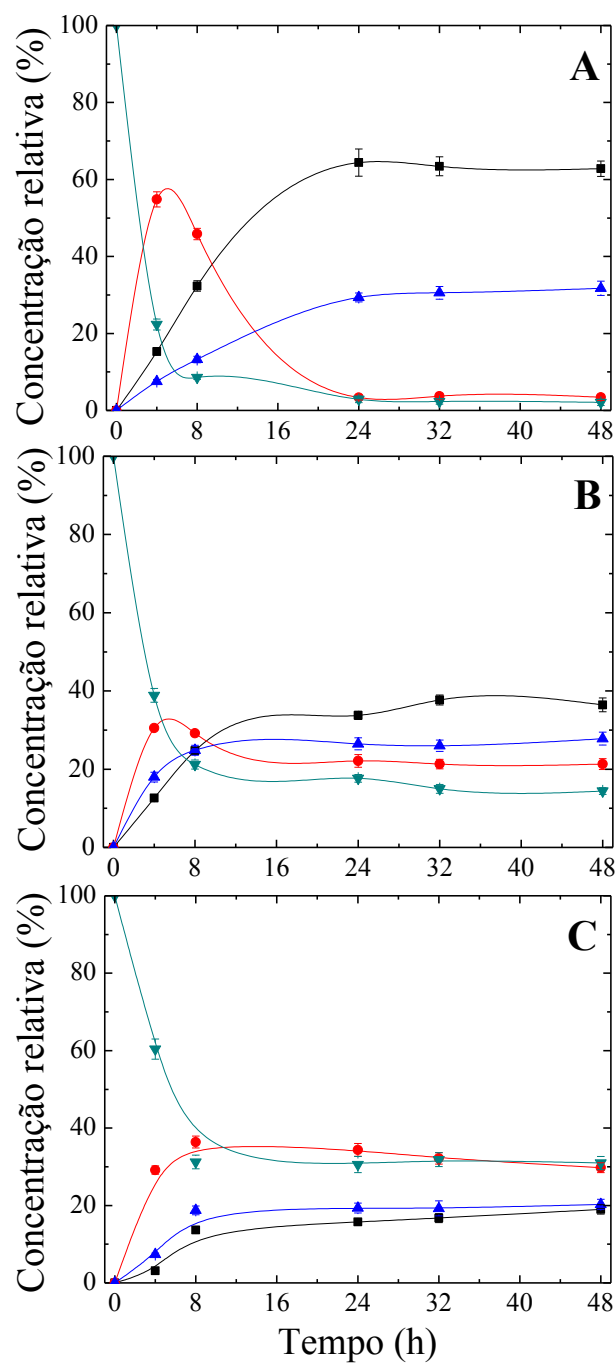


Figura 9.12 - Reações de epoxidação do éster oleato de metila catalisadas por lipases de *Candida antarctica* CAL-B (Novozyme 435) (A), *Burkholderia cepacia* (Amano PS) (B) e *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 (C). Condições do ensaio: Oleato de metila 200 mmol/L; adição de enzima a 3% (m/m); H₂O₂ a 5% (v/v), 40 °C e 300 rpm. Produtos de reação: Oleato de metila (▼), ácido oleico (●), oleato de metila epóxi (▲) e ácido esteárico epóxi (■). Experimentos realizados em triplicata.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um oxidante forte, é conhecido por ser um parâmetro importante para a reação de epoxidação. Sua concentração pode não só afetar a taxa de conversão da reação, mas também a estabilidade da enzima. A concentração correta de peróxido de hidrogênio também é importante para reduzir os custos por reduzir a quantidade de peróxido residual. A cinética de epoxidação é dependente da formação de perácidos que, por sua vez, dependem da concentração de peróxido de hidrogênio utilizada. O perácido é um composto instável e é rapidamente utilizado para a epoxidação das duplas ligações. Para estudar o efeito da concentração do peróxido de hidrogênio, concentrações de 2,5% a 20% (v/v) foram utilizadas na reação de perhidrólise catalisada pela lipase de *B. lata* (Figura 9.13). É possível observar que com concentrações mais elevadas de peróxido de hidrogênio, a taxa de hidrólise diminui, favorecendo a reação de perhidrólise. Para a lipase de *B. lata* a melhor concentração de H_2O_2 foi de 10%, proporcionando 44,4% de perhidrólise, ficando ainda abaixo das lipases comerciais estudadas.

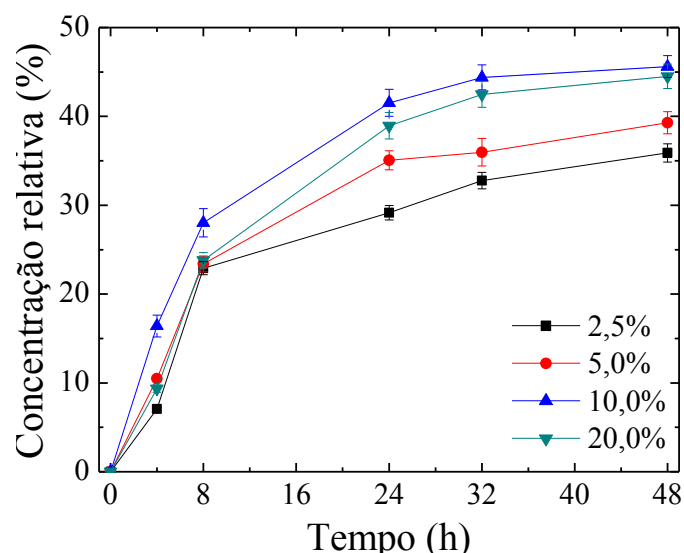


Figura 9.13 - Reações de epoxidação do éster oleato de metila catalisadas pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes concentrações de H_2O_2 (v/v): 2,5% (■), 5,0% (●), 10,0% (▲) e 20,0% (▼). Condições do ensaio Oleato de metila 200 mmol/L; adição de enzima a 3% (m/m); 40 °C e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.

A abordagem para a síntese enzimática de ácidos graxos e ésteres epoxidados é uma alternativa mais simples e eficiente em relação ao processo químico. A principal limitação, no entanto, é a baixa taxa de conversão por parte da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 sob as condições de reação utilizadas neste estudo. Os dados de conversão obtidos mostram a dificuldade de obtenção de ácidos graxos epoxidados utilizando a lipase de *B. lata* pelo método quimio-enzimático proposto, principalmente quando comparados aos produtos de reação da lipase B de *C. antarctica* (Novozyme 435) e até mesmo com a lipase relacionada produzida por *B. cepacia* (Amano PS). Apesar do baixo rendimento, a comparação das enzimas estudadas pôde ser extremamente benéfica em termos de se melhor compreender o comportamento catalítico da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02.

9.6. Galactolipase

Galactolipídeos, também conhecidos como galactoglicerolipídeos, são estimados como a classe mais abundante de lipídios encontrados na superfície da terra e, como tal, constituem o principal armazenamento de ácidos graxos (BENSON *et al.*, 1958; HÖLZL *et al.*, 2006). São encontrados principalmente nas membranas dos cloroplastos em plantas e algas (JACOB; MILLER, 1986; KELLY; DÖRMANN, 2004), assim como nos grãos de cereais (CARTER; MCCLUER; SLIFER, 1956). Uma vez que não existe um processo em larga escala para uma recuperação fácil dos galactolipídeos dispersos em materiais vegetais, principalmente nas formas de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG), enzimas com atividade de galactolipase podem assumir um papel importante para a recuperação de ácidos graxos a partir de galactolipídeos via reações de hidrólise, alcoólise ou de transesterificação *in situ* (Figura 9.14). Desta forma, a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 foi avaliada quanto à sua atividade de galactolipase *in situ* em amostras de espinafre (*Spinacia oleracea*) para reações de hidrólise e metanólise. Os produtos de reação foram analisados por HPTLC e estão detalhadas na Figura 9.15.

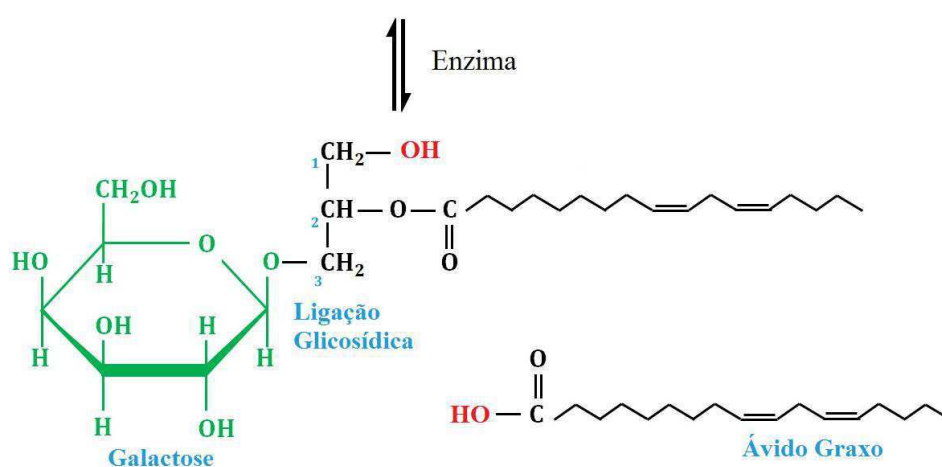
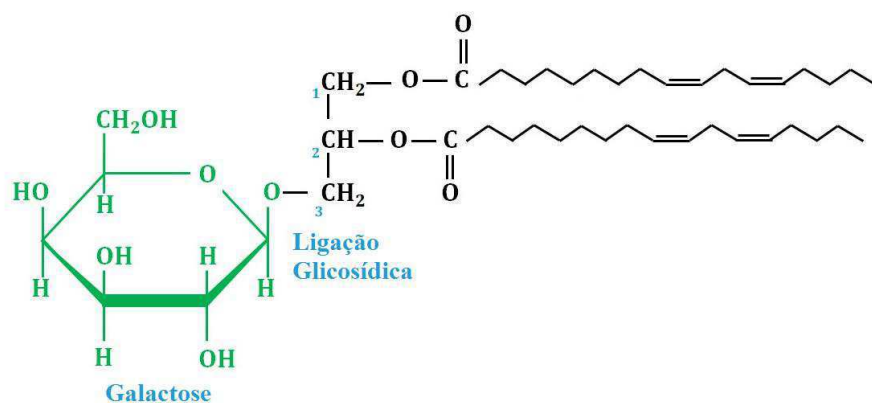


Figura 9.14 - Reações de hidrólise de galactolipídeos (MGDG) catalisada por enzima com ação de galactolipase resultando em ácido graxo livre e monogalactosilmonoacilglicerol (MGMG).

A Figura 9.15 mostra os produtos da lipólise dos MGDG e DGDG do espinafre. Após 10 min de reação, tanto hidrólise quanto alcoólise foram eficientes. A lipase de *B. lata* foi capaz de hidrolisar cerca de 60% dos galactolipídeos da amostra (linha 2) atingindo 2700 U/mg. A metanólise converteu cerca de 20% do substrato em ésteres, porém, como a reação ocorreu em meio aquoso a hidrólise prevaleceu com 30% de conversão, atingindo um total de conversão de substrato em 50% quando utilizando 3 mol/L de metanol.

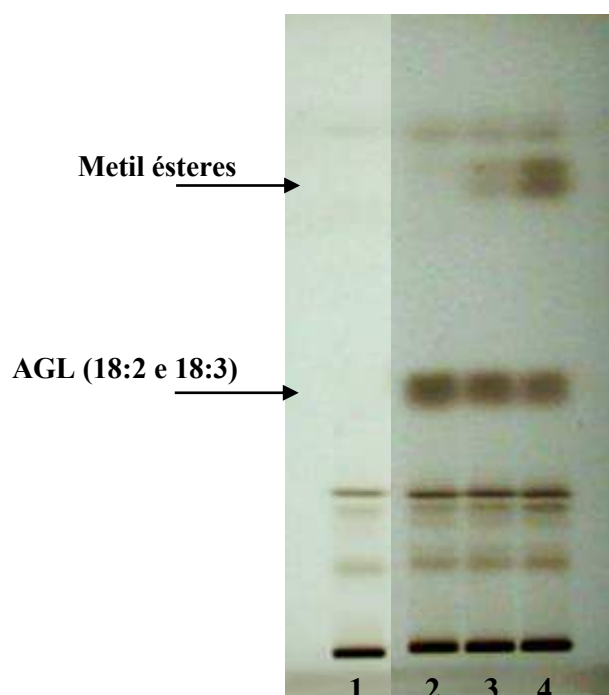


Figura 9.15 - Hidrólise e alcoólise de galactolipídeos naturais de espinafre (MGDG e DGDG) pela lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Linhas: 1: reação sem adição de enzima (Branco); 2: reação de hidrólise; 3: metanólise com 1 mol/L de álcool; 4: metanólise com 3 mol/L de álcool. As reações de lipólise dos galactolipídeos foram seguidas por extração dos lipídios e a sua separação em placas de HPTLC em sílica utilizando migração dupla: 30 mm em Hexano/DEE/ác. fosfórico (60:40:1, v/v/v) e 60 mm em Hexano. Condições do ensaio: 55 °C, pH 8,0 e 250 rpm por 10 min.

A atividade lipolítica da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 frente a galactolipídeos foram surpreendentes, atingindo 2700 U/mg. Comparando com enzimas pancreáticas, conhecidas pela atividade sobre galactolipídeos (ANDERSSON, LENA *et al.*, 1995, 1996) e outras lipases (AMARA *et al.*, 2013) a lipase de *B. lata* obteve destaque (Tabela 9.2), com atividade específica sobre galactolipídeos apenas inferior às lipases recombinantes de pâncreas humano e suíno e pelo menos 2,5 vezes superior a qualquer lipase microbiana. Desta maneira a lipase de *B. lata* se coloca como importante alternativa para aproveitamento de ácidos graxos presentes na forma de galactolipídeos.

Tabela 9.2 - Atividade específica (U/mg) de lipases sobre triacilglicerol (tributirina, 4:0) e galactolipídeos (MGDG e DGDG) em comparação com a lipase deste estudo de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02

Enzima	Atividade enzimática (U/mg)	
	Substrato Tributirina (TC4:0)	Substrato Galactolipídeos (MGDG e DGDG)
Lipase de <i>B. lata</i> LBBIO-BL02	8345 ± 132	2700 ± 143
rGPLRP2 ^{a*}	2700 ± 300	9795 ± 105
rHPLRP2 ^{b*}	1250 ± 150	4762 ± 85
Cutinase de <i>Fusarium solani</i> *	2596 ± 96	1284 ± 45
Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> *	7834 ± 850	1122 ± 51
Lipase de <i>Candida antarctica</i> A*	309 ± 11	176 ± 7
Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> *	413 ± 44	126 ± 4
Lipase de <i>Candida rugosa</i> *	753 ± 44	20 ± 1
Lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> *	3375 ± 270	41 ± 3
Lipase de <i>Pseudomonas glumae</i> *	1179 ± 35	0
Lipase de <i>Pseudomonas cepacia</i> *	86 ± 8	0
Lipase de <i>Penicillium camembertii</i> *	875 ± 10	0
Lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> LIP2*	8102 ± 590	0
Lipase de <i>Candida antarctica</i> B*	670 ± 15	0

a: proteína relacionada com a lipase pancreática de porquinho-da-índia; b: proteína relacionada com a lipase pancreática humana. *Com exceção da lipase deste estudo produzida por *B. lata* LBBIO-BL02, os valores das demais enzimas foram obtidas na literatura (AMARA *et al.*, 2013).

O conhecimento atual sobre a bioquímica de galactolipases é ainda limitado, enquanto lipases e fosfolipases foram bem caracterizadas e são atualmente utilizadas em muitas aplicações biotecnológicas (JAEGER *et al.*, 1994; JAEGER; EGGERT, 2002; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). Isto é, em parte, devido ao fato de que os substratos galactolipídicos não estão disponíveis comercialmente em larga escala e são de alto custo e apenas alguns laboratórios têm sido envolvidos no desenvolvimento de ensaios para mensurar atividades específicas de galactolipase (AMARA *et al.*, 2009, 2010; ANDERSSON *et al.*, 1995; ANDERSSON *et al.*, 1996; JALLOULI *et al.*, 2015). Em segundo lugar, embora a existência de galactolipídeo hidrolases em vegetais e animais já seja conhecida por um longo período de tempo, os seus níveis são geralmente baixos e a sua purificação a partir de fontes naturais é difícil (AMARA *et al.*, 2010; HASSON;

LATIES, 1976; SAKAKI; KATO; SAJI, 2007; SIAS *et al.*, 2004). Atualmente também foram identificadas atividades de galactolipase em micro-organismos, como os citados na Tabela 9.2. A seleção de cepas produtoras de galactolipases, sua purificação e caracterização cinética e bioquímica contribui, desta maneira, para o desenvolvimento do conhecimento em área de importância significativa dentro da biotecnologia: a tecnologia enzimática. Assim, a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02, por sua atividade sobre galactolipídeos, lhe confere uma nova abrangência de aplicações e reforça o apelo para a sua utilização em aditivos digestivos.

9.7. Ambientes digestivos simulados.

Conforme relatado na seção 8.1, 8.5 e 9.6, a lipase de *B. lata* foi capaz de hidrolisar com eficiência diferentes substratos, podendo ser útil para uma enzima auxiliar digestiva para hidrolisar diferentes lipídios e galactolipídeos presentes nos alimentos. A lipase deste trabalho também mostrou alta atividade e estabilidade em todos os pH testados (de pH 2 a 10) conforme relatado na seção 8.8 (Figura 8.15), e está adaptada para os níveis de pH pós-prandial no estômago e intestino delgado. Assim, ensaios específicos para a aplicação desta enzima como agente auxiliar digestivo foram executados em ambientes digestivos simulados.

Qualquer enzima que se considere utilizar como medicamento oral ou auxiliar digestivo deve ser resistente a alta acidez (baixo pH no estômago) e alcalinidade (alto pH no intestino delgado), ação de proteases (pepsina, tripsina e quimotripsina) e sais biliares (taurodeoxicolato de sódio). Desta forma, os efeitos destes parâmetros sobre a atividade e estabilidade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 foram estudados em ambientes digestivos simulados.

A atividade da lipase de *B. lata* na presença de pepsina, a primeira protease encontrada por enzimas administradas por via oral, foi um importante fator a ser testado; visto que algumas lipases podem ser totalmente inativadas por proteases digestivas. A lipase de *B. lata* mostrou boa atividade em presença de altas concentrações de pepsina em pH 4 (Figura 9.16). A atividade da lipase caiu em 50% após 60 minutos a um pH de 4,0 e 37 °C somente quando foram utilizadas 4000 U/mL de pepsina. Utilizando 1000 e 2000 U/mL a lipase permaneceu com 83 e 75% da atividade após 120 minutos de incubação. Em um ser humano adulto saudável a atividade da pepsina é de cerca de 600 U/mL (HENDERSON *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que, *in vivo* e durante a alimentação, a lipase de *B. lata* se mantém ativa em proporções elevadas (mais do que 80%), mesmo na presença de pepsina gástrica em pH ácido (pH 4). O tempo que o alimento permanece no estômago é muito variável, dependendo de uma variedade de fatores, incluindo a quantidade de alimentos, a quantidade de gordura e também a acidez do estômago. No entanto, em média, todos os alimentos devem ter deixado o estômago dentro de 2 horas (RAO *et al.*, 2011).

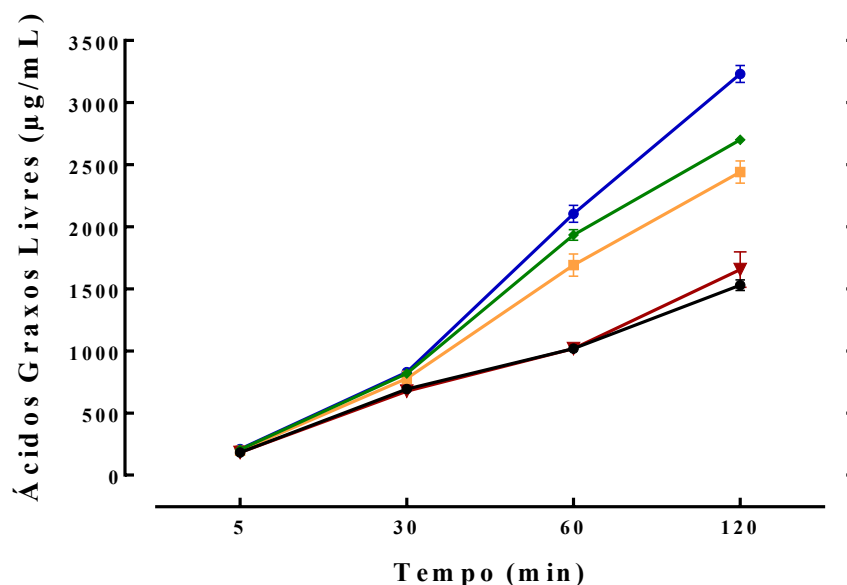


Figura 9.16 - Atividade da lipase purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em concentrações crescentes de pepsina durante hidrólise de trioleína em Fluido Gástrico Simulado (FGS). Concentração de pepsina: (●) 0 U/mL (Controle); (◆) 1000 U/mL; (■) 2000 U/mL; (▼) 4000 U/mL; (●) 8000 U/mL. Condições do ensaio: trioleína 10% (m/v); lipase purificada a 0,5% (m/v); 37 °C, pH 4,0 e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.

Com o que diz respeito à estabilidade, a lipase de *B. lata* não apresentou nenhuma degradação pela pepsina (2800 U/mL) em qualquer pH testado (de pH 2 a 5). A enzima mostrou ativação depois da incubação em valores de pH ácidos, como nos experimentos de caracterização (Seção 8.8), e não houve diferença entre os ensaios de controle em comparação aos ensaios contendo pepsina (Figura 9.17). *In vivo* e durante uma refeição, a lipase de *B. lata* tende a permanecer completamente ativa após passar pelo ambiente gástrico, não sofrendo desnaturação pelas proteases e pH do estômago.

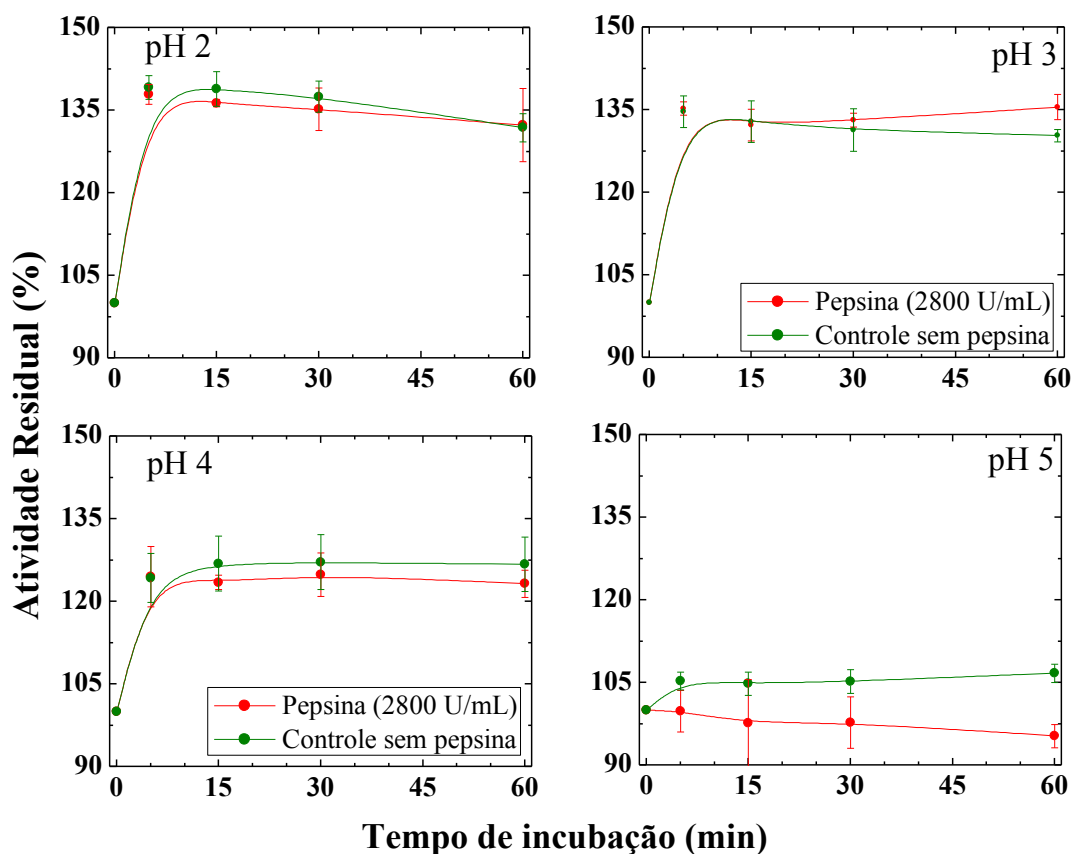


Figura 9.17 - Estabilidade da lipase purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em presença de Pepsina (2800 U/mL) em diferentes valores de pH. Condições do ensaio: lipase a 0,5% (m/v); 37 °C. Incubação em presença de Pepsina por 2 horas. Experimentos realizados em triplicata.

Os efeitos da protease pancreática Tripsina sobre a lipase de *B. lata* também foram avaliados. Não houve influência da tripsina sobre a atividade lipolítica em pH 6,0 e 37 °C, mesmo com adição de tripsina a 376 U/mL (Figura 9.18). Em um humano adulto saudável a atividade de tripsina está próxima de 100 U/mL (MORENO *et al.*, 2006). Com este resultado a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 se mostrou altamente resistente a presença proteases digestivas (pepsina e tripsina) em pH de 2 a 5.

Outra importante característica da lipase de *B. lata* é a ativação da enzima na presença de altas concentrações de sais biliares (NaTDC), a enzima foi 3,5 vezes mais ativa com 16 mmol/L de NaTDC, quatro vezes acima do encontrado no organismo humano (MORENO *et al.*, 2006). Estudos de lipases microbianas para o tratamento de

deficiência exócrina são comumente limitados pela inibição causada pelos sais biliares (SVENDSEN *et al.*, 2012). Neste sentido, a lipase de *B. lata* mostra grande vantagem para este fim, além de não ter sofrido inibição, a atividade desta enzima aumentou, provavelmente devido à ação emulsificante do sal biliar.

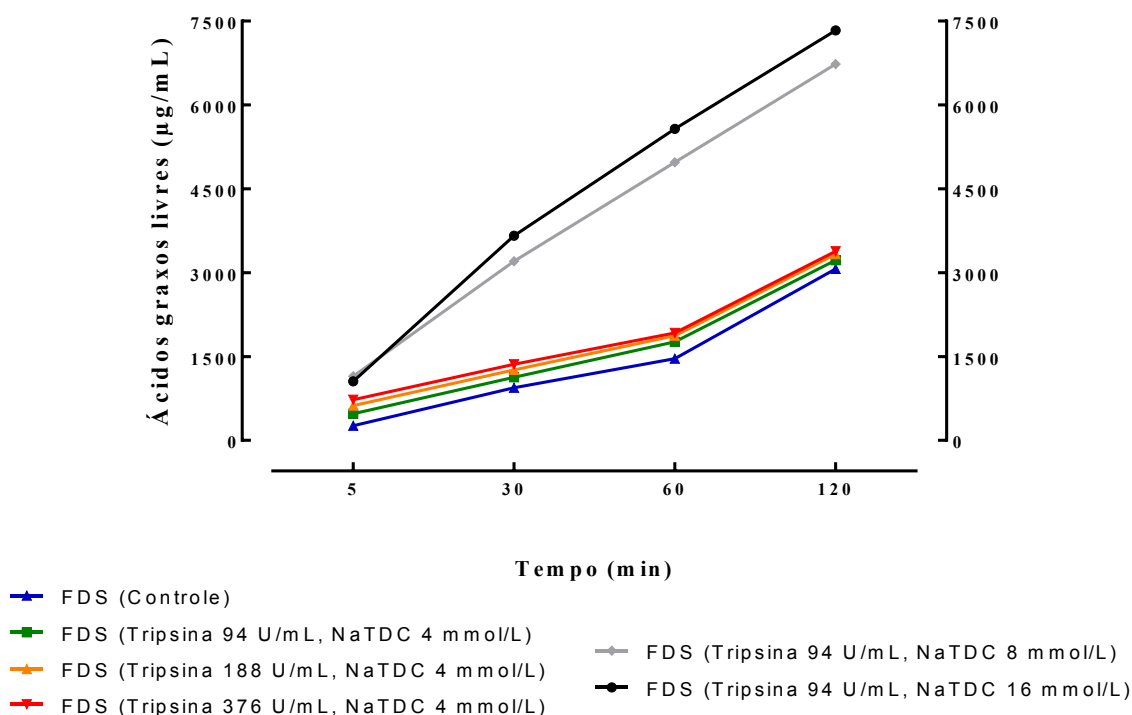


Figura 9.18 - Atividade da lipase purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em concentrações crescentes de tripsina e sais biliares (Taurodeoxicolato de sódio - NaTDC) durante hidrólise de trioleína em Fluido Duodenal Simulado (FDS). Concentração de tripsina: (▲) 0 U/mL com 0 mmol/L de NaTDC (Controle); (■) 94 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (▲) 188 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (▼) 376 U/mL com 4 mmol/L de NaTDC; (●) 94 U/mL com 8 mmol/L de NaTDC e (●) 94 U/mL com 16 mmol/L de NaTDC. Condições do ensaio: trioleína 5% (m/v); lipase a 0,5% (m/v); 37 °C, pH 6,0 e 300 rpm. Experimentos realizados em triplicata.

Com o que diz respeito à estabilidade, a lipase de *B. lata* não apresentou nenhuma degradação pela pepsina (2800 U/mL) em qualquer pH testado (de pH 2 a 6). A enzima mostrou ativação depois da incubação em pHs ácidos, como nos experimentos de caracterização (Seção 8.8), e não houve diferença entre os ensaios de controle em comparação aos ensaios contendo pepsina (Figura 9.17). *In vivo* e durante uma refeição, a lipase de *B. lata*

tende a permanecer completamente ativa após passar pelo ambiente gástrico, não sofrendo desnaturação pelas proteases e pH do estômago.

Para compreender melhor os resultados e ter mais dados que contribuíssem para a utilização da lipase de *B. lata* como suplemento digestivo, novos ensaios utilizando método automático pH-Stat foram realizados junto ao *Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse* (Laboratório de Enzimologia Interfacial e de Fisiologia da Lipólise) em Marselha na França, sob a orientação do Prof. Dr. Frédéric Carrière.

Utilizando o método de mensuração da atividade com pH-Stat, a Tributirina (TC4) foi utilizada como substrato em ambiente digestivo simulado contendo NaCl 150 mmol/L, CaCl₂ 1,4 mmol/L e NaTDC 0,5 mmol/L em diferentes valores de pH (de 3 a 10,0). Utilizando o pH-Stat a enzima mostrou-se plenamente ativa entre os valores de pH 8 e 9,5. Porém, em pH 3 a atividade foi nula e de apenas 25% e 34% em pH 4 e 4,5, respectivamente (Figura 9.19). Este resultado corrobora com os resultados anteriores de atividade em diferentes valores de pH (Seção 8.8).

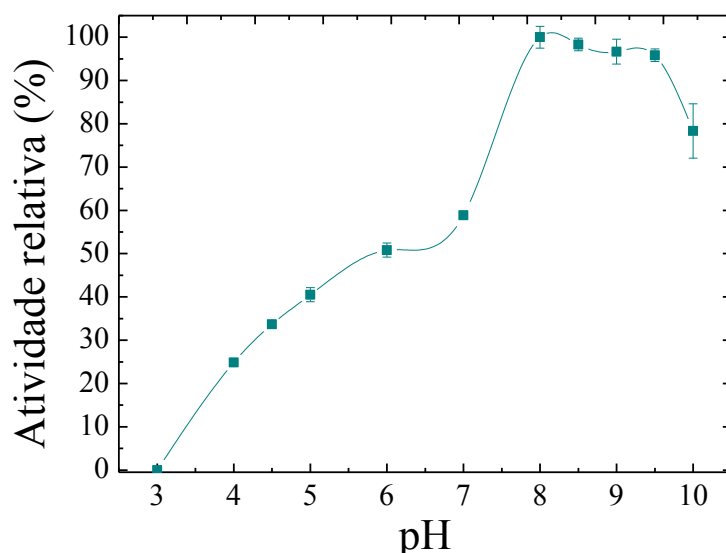


Figura 9.19 - Atividade da lipase purificada de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes valores de pH na presença de sais biliares (NaTDC 0,5 mmol/L). Condições do ensaio: lipase a 0,5% (m/v); NaCl 150 mmol/L; CaCl₂ 1,4 mmol/L; 37 °C. Mensuração da atividade por pH-Stat. Experimentos realizados em triplicata.

Ensaio de atividade em ambiente simulado contendo concentrações crescentes de sal biliar NaTDC também foram realizados utilizando equipamento pH-Stat e Tributirina (TC4) e Tricaprilato (TC8) como substrato. A utilização de sal biliar se confirmou como estimuladora da atividade enzimática, com aumento da atividade em concentrações maiores de NaTDC (Tabela 9.3). Além de não ter sido inibida por sais biliares, a enzima teve a atividade aumentada na presença de altas concentrações de NaTDC.

Tabela 9.3 - Atividade da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 na presença de diferentes concentrações de Taurodeoxicolato de Sódio utilizando pH-Stat.

NaTDC (mmol/L)	Atividade relativa (%)	
	TC4	TC8
0 (Controle)	100,0 ± 3,59	100 ± 2,86
0,5	117,6 ± 6,28	121,2 ± 4,50
2,5	135,4 ± 4,33	139,6 ± 5,23
5,0	158,0 ± 11,87	169,6 ± 6,27
20,0	160,6 ± 8,97	183,5 ± 7,63

Condições do ensaio: Substrato a 66 mmol/L; lipase purificada a 0,5% (m/v); NaCl 150 mmol/L; CaCl₂ 1,4 mmol/L; pH 8,0; 37 °C. Experimentos realizados em triplicata.

A lipase de *B. lata* também foi testada para a hidrólise de intralipídios, uma emulsão de óleo de soja (20%, m/m) com fosfatidilcolina de ovo (1,2%, m/m), geralmente utilizados para fins de nutrição parentérica intravenosa. Não foi verificada nenhuma atividade neste ensaio. A presença de fosfolipídios na interface água-lipídio é conhecida por prejudicar a atividade da lipase pancreática sobre TAG (BÉNAROUCHE *et al.*, 2014; KENMOGNE-DOMGUIA *et al.*, 2012), o mesmo mecanismo de inibição pôde ser observado com a lipase de *B. lata*, onde a lipase não foi capaz de penetrar a camada de lecitina em torno das gotículas lipídicas, a fim de acessar o núcleo contendo triacilglicerol. A interação de lipases digestivas com fosfolipídios é um passo importante no processo global de lipólise gastrointestinal, embora muitas lipases verdadeiras como as lipases gástricas canina e humana e a lipase de *Yarrowia lipolytica* LIP2 não hidrolisam os fosfolipídios (BÉNAROUCHE *et al.*, 2014), assim como a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02.

A Insuficiência Pancreática Exócrina (IPE) está relacionada principalmente à pancreatite crônica e fibrose cística. Nestas patologias, as enzimas pancreáticas e as secreções de bicarbonato são drasticamente limitadas (CARRIÈRE *et al.*, 2005; FRIEDMAN; SNAPE, 1950), levando à má absorção de nutrientes e desnutrição. Em particular, esta falta de bicarbonato conduz a valores de pH mais ácidos no intestino delgado (CARRIÈRE *et al.*, 2005). Atualmente o tratamento de IPE consiste na administração oral de enzimas pancreáticas exógenas, como extratos de pâncreas suíno (Pancrelipase) (DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, 2011). A maioria das preparações de enzimas pancreáticas são administradas por via oral sob a forma de microgrânulos revestidos com proteção gástrica resistentes a acidez do estômago e dissolvem-se no intestino delgado, a valores de pH acima de 5,0 (ALOULOU *et al.*, 2008; STEAD *et al.*, 1987; TRANG;

CHAN; GRAHAM, 2014). No entanto, a hiperacidez do duodeno, como observado em pacientes com fibrose cística (BARRACLOUGH; TAYLOR, 1996) e pancreatite crônica grave (CARRIÈRE *et al.*, 2005), pode atrasar a dissolução do revestimento entérico e, portanto, a liberação de enzima ativa no momento e local adequado, além de diminuir ou inibir totalmente a ação da enzima. Nesse contexto, os desafios atuais estão se concentrando na identificação de novas fontes de enzimas altamente ativas e uma melhor estabilidade nas condições do trato gastrointestinal, principalmente as condições de pH e a presença de proteases digestivas; tais como a pepsina no estômago, e a tripsina e quimotripsina no intestino delgado.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram claramente que a lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 é uma lipase tão ativa quanto lipases gástricas e pancreáticas, ao mesmo tempo que combina propriedades destas duas lipases, por atuar em uma grande faixa de pH que abrange as variações de pH no trato gastrointestinal humano. Os dados bioquímicos são um bom suporte para investigar ainda mais a utilização da lipase de *B. lata* em terapia de substituição enzimática para o tratamento da insuficiência pancreática exócrina.

10. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- A lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 foi produzida por fermentação submersa em meio de cultura otimizado utilizando delineamento fatorial e análise de superfície de resposta. O meio de cultivo otimizado contendo óleo de frango (12,5 mL/L) como fonte de C e Fosfato de Amônio (15 g/L) como fonte de N, substratos de baixo custo, a 35 °C e pH 8,0 apresentou um pico máximo de produção da enzima de 1137,82 U/mL com 0,53 mg/mL, resultando em atividade específica de 2146,83 U/mg após 48 h de cultivo em frascos agitados. A produção da enzima ocorre lentamente durante as primeiras 48 h de cultivo, coincidindo com a duração da fase log do crescimento celular, com taxas de crescimento específico (μ) 0 a 24 h de 0,17 h⁻¹, e de 24 a 96 h de 0,09 h⁻¹.
- Fermentação submersa em biorreator utilizando meio otimizado apresentou um pico máximo de produção da enzima de 307,7 U/mL e com 1063,77 U/mg após 72 h de cultivo. As taxas de crescimento específico (μ) de 0 a 24 h foram 0,5 h⁻¹, e de 24 a 96 h de 0,03 h⁻¹.
- Ensaios realizados com o extrato precipitado demonstraram que a atividade lipolítica era estável em solventes miscíveis em água, observando-se ativação em baixas concentrações de etanol. Observou-se estabilidade em solventes imiscíveis em água, mantendo-se acima de 100% da atividade inicial após 1 h de incubação em tolueno, hexano e heptano. A enzima bruta também apresentou alta estabilidade (>75%) em ampla faixa de pH (de 2,3 a 10,0) e temperatura (de 20 a 60 °C).
- A enzima foi imobilizada com sucesso em Celite[®] 545 por adsorção apresentando alto rendimento (768%) devido a ativação da enzima ligada ao suporte e

mostrou um futuro promissor para aplicações futuras, pois permite fácil imobilização com processo simples e de baixo custo.

- Ensaios em cromatografia de permeação em gel (Sephadex-G75) demonstraram que a enzima forma agregados de alta massa molar já no meio de fermentação.

- Observou-se que o tratamento do extrato precipitado com isopropanol 30% propicia a clarificação do extrato. Entretanto, o álcool provocou perda de 48% da atividade.

- O desenvolvimento de uma nova metodologia de purificação de um único passo não convencional sem a necessidade de colunas cromatográficas e ainda sob avaliação para pedido de patente, foi eficiente na purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BI02, observando-se um fator de purificação de 46,5, atividade específica de 18422 U/mg e recuperação de 53% da atividade. A nova metodologia de purificação foi eficiente em pequenos (5 mL) e grandes volumes (500 mL) e apresenta-se também como alternativa para a purificação de outras lipases produzidas por outros micro-organismos.

- A análise eletroforética por SDS-PAGE do extrato purificado resultou em banda única de proteína com massa molecular de 32 kDa.

- Com relação à caracterização cinética e à estabilidade da enzima purificada pode-se concluir que:

- A relação entre atividade enzimática e concentração de substrato indicou que a enzima segue a cinética de Michaelis-Menten. Os dados foram analisados pelas equações de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee.

- Para a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 o valor de K_m foi de aproximadamente 22 mmol e V_{max} de 12,7 mmol/min/mg. Os valores de k_{cat} e eficiência catalítica para a enzima livre foram aproximadamente 225 s⁻¹ e de 104 mol⁻¹.s⁻¹, respectivamente.
- Observou-se inibição da lipase por produto quando a reação atingia o equilíbrio. Os ácidos graxos livres inibem a lipólise de substratos em emulsão por dificultarem o acesso da lipase às superfícies das gotículas de substrato em emulsão. A adição de CaCl₂ e a consequente precipitação como sal de cálcio dos ácidos graxos liberados reativou a enzima.
- A lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 demonstrou alta atividade hidrolítica em todos os substratos lipídicos testados (18 diferentes), naturais e sintéticos com composição de ácidos graxos variada. Em destaque o óleo de peixe, por possuir alta concentração de Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFA), como docosahexaenoico (DHA, 22:6^{Δ4,7,10,13,16,19}) e eicosapentaenoico (DPA 20:5^{Δ5,8,11,14,17}).
- Em termos de regiosseletividade a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 remove seletivamente com ligeira seletividade os ácidos graxos das duas posições externas *sn*-1 e *sn*-3 (ésteres primários) da trioleína e de TAGs heterogêneos presentes em substratos naturais (óleos de oliva, soja, canola e girassol).
- A lipase purificada produzida por *B. lata* LBBIO-BL02 catalisa a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa saturada (10:0 ou superior). A enzima mostrou uma clara seletividade para AGs

insaturados, especialmente 18:1, seguido de AG saturado ácido palmítico (16:0). A diferença da tiposseletividade apresentada nos primeiros minutos de reação diminui com o avanço da hidrólise, demonstrando que embora haja uma seletividade da enzima ela é capaz de hidrolisar ácidos graxos variados.

- A lipase pura de *B. lata* LBBIO-BL02 foi estável quando incubada com 50% (v/v) de metanol, etanol, e isopropanol, apresentando valores de atividade 78%, 76% e 90% em relação ao controle incubado em tampão citrato-fosfato, respectivamente. E atividade residual de 199% com n-heptano, 145% com n-hexano e 103% com tolueno.
- A atividade máxima foi obtida entre as temperaturas de 55 e 60 °C e na faixa de pH entre 4 e 9.
- Observou-se estabilidade à temperatura até 60 °C, observando-se 60% de atividade após 60 min de incubação. Com relação à estabilidade ao pH, a enzima manteve 100% da atividade inicial após incubação por 1 h a 25 °C na faixa de pH entre 2,2 e 10,0.

- Com relação a aplicação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO em reações de interesse industrial pode-se concluir que:

- Em reações de transesterificação em ambiente aquoso a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 apresenta um comportamento predominantemente de hidrolase (90%) em detrimento a ação de aciltransferase (10%).

- Para a síntese de ésteres de aroma, o melhor resultado foi obtido para a produção de caprilato de isoamila atingindo 45% de rendimento em 24 horas, 50 °C e em ambiente aquo-restrito (n-Hexano).
- Para a síntese de ésteres de cadeia longa, os melhores resultados de esterificação do ácido oleico foram observados com metanol a 9 mols/L alcançando 82% de síntese em 24 h de reação. Para a transesterificação da trioleína os melhores resultados também foram observados com metanol a 9 mols/L, porém alcançando apenas 17% de síntese em 24 h.
- Para a síntese de um éster de cera, o oleil oleato (C36), obteve-se 87% de rendimento em 30 h, 55 °C e em ambiente orgânico (n-Hexano).
- A obtenção de ácidos graxos epoxidados alcançou rendimento de 44,4% em reação quimio-enzimática de epoxidação do oleato de metila após 48 horas de reação a 40 °C utilizando 10% (v/v) de H₂O₂.
- A atividade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 frente a galactolipídeos de espinafre (*Spinacia oleracea*) *in situ* atingiu 2700 U/mg, atividade surpreendente em comparação a outras lipases.
- Em ambientes gástricos simulados a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 apresenta 83 e 75% da atividade com 1000 e 2000 U/mL de pepsina e mantém 100% de estabilidade frente a esta protease em pH de 2 a 6. Não houve influência da tripsina sobre a atividade lipolítica da lipase de *B. lata* em pH 6,0 e 37 °C, mesmo com adição de tripsina a 376 U/mL. Assim, a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 se mostra

altamente resistente às proteases digestivas (pepsina e tripsina) em pH de 4 a 6.

- A lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 apresenta ativação da atividade enzimática na presença de altas concentrações de sais biliares (NaTDC), a enzima foi 3,5 vezes mais ativa com 16 mmol/L de NaTDC. Utilizando pH-Stat a enzima apresentou 160,6% e 183,5% da atividade sobre TC4 e TC8, respectivamente, utilizando 20 mmol/L de NaTDC.
- Utilizando pH-Stat e meio reacional com sal biliar NaTDC, a enzima mostrou-se plenamente ativa entre os valores de pH 8 e 9,5. Porém, em pH 3 a atividade foi nula e de apenas 25% e 34% em pH 4 e 4,5, respectivamente.
- A atividade da lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 sobre intralipídios foi nula.

Conclusão Geral do Trabalho

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a lipase de *B. lata* LBBIO-BL02 é uma nova enzima, ainda não relatada por outros grupos de pesquisa na literatura. As propriedades cinéticas e de estabilidade da enzima corroboram esta conclusão, pois são diferentes das reportadas em literatura para o sistema lipolítico de outras cepas do gênero *Burkholderia* e do complexo *Burkholderia cepacia*. Estas propriedades de alta atividade e estabilidade térmica e atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH, bem como a elevada velocidade máxima da enzima ($V_{\max}$) em uma grande variedade de substratos, mostram que a enzima tem potencial para a utilização em biocatálise, tanto

em ambientes aquosos quanto em solventes orgânicos, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos, e justificaram os esforços realizados na sua caracterização. A purificação por um método inédito, rápido, simples e de baixo custo foi eficiente e possui potencial para ser aplicado em lipases produzidas por outros micro-organismos. Este protocolo, além de contribuir para este trabalho, está em processo de requisição de patente. Com os resultados dos ensaios preliminares de aplicação da enzima em reações de interesse industrial, observou-se que a lipase de *Burkholderia lata* (LBBIO-BL02) apresenta características interessantes para o uso eficiente como um suplemento digestivo sem perda da eficiência lipolítica. Esta enzima permaneceu ativa mesmo após duas horas de incubação com doses elevadas de pepsina a pH ácido, tripsina e sais biliares. Os resultados apresentados neste trabalho mostram claramente que a lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 é uma lipase tão potente quanto as lipases gástrica e pancreática, ao mesmo tempo que combina propriedades destas duas lipases por atuar em uma grande faixa de pH que abrange as variações de pH no trato gastrointestinal humano. Os dados bioquímicos são um bom suporte para investigar ainda mais a utilização da lipase de *B. lata* em terapia de substituição enzimática para o tratamento da insuficiência pancreática exócrina. Além do alto rendimento na síntese do éster de cera oleil oleato e hidrólise de galactolipídeos de espinafre *in situ*, colocam a lipase de *B. lata* com potencial em aplicação nessas áreas, fato este que justifica a continuidade deste tema em trabalhos futuros que esclareçam estas características e potenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 589–595, 2003.
- ACHARYA, P.; RAO, N. M. Stability studies on a lipase from *Bacillus subtilis* in guanidinium chloride. *Journal of protein chemistry*, v. 22, n. 1, p. 51–60, 2003.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Óleos e Gorduras Utilizados em Frituras*. Brasília, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/informes/11_051004.htm>.
- AKOVA, A.; USTUN, G. Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on Celite at different pH values. *Biotechnology Letters*, v. 22, n. 5, p. 355–359, 2000.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. *BioMed research international*, v. 2013, p. 435818, 2013.
- ALOULOU, A. *et al.* In vitro comparative study of three pancreatic enzyme preparations : Dissolution profiles , active enzyme release and acid stability preparations : dissolution profiles , active enzyme release. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 27, p. 283–292, 2008.
- AMARA, S. *et al.* Continuous measurement of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipolytic enzymes using the pH-stat technique and a medium chain monogalactosyl diglyceride as substrate. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1791, n. 10, p. 983–990, 2009.
- AMARA, S. *et al.* Lipolysis of natural long chain and synthetic medium chain galactolipids by pancreatic lipase-related protein 2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1801, n. 4, p. 508–516, 2010.
- AMARA, S. *et al.* The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, p. 442–451, 2013.
- ANDERSSON, L. *et al.* Hydrolysis of galactolipids by human pancreatic lipolytic enzymes and duodenal contents. *The Journal of Lipid Research*, v. 36, n. 6, p. 1392–1400, 1995.
- ANDERSSON, L. *et al.* Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyzes galactolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1302, p. 236–240, 1996.
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 141–158, 2007.
- ARMAND, M. *et al.* Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 3, n. 7, p. 333–341, 1992.

- ARMAND, M. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 10, n. 2, p. 156–64, 2007.
- ARMAND, M. Stratégies de contrôle de la biodisponibilité des lipides. Em: FARDET A; SOUCHON I; DUPONT D. (Org.). *Structure des aliments et effets nutritionnels*. 1. ed. Versailles: Quae, 2013. p. 373–413.
- ARNAUD, E. *et al.* Characterisation of chicken fat dry fractionation at the pilot scale. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 106, n. 9, p. 591–598, 2004.
- ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (±)-menthol. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, v. 16, n. 3–4, p. 169–173, 2001.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. The Solvent Stability Study with Thermodynamic Analysis and Superior Biocatalytic Activity of *Burkholderia cepacia* Lipase Immobilized on Biocompatible Hybrid Matrix of Polyvinyl Alcohol and Hypromellose. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 118, n. 51, p. 14808–14819, 2014.
- BAKER, S. S. Delayed release pancrelipase for treatment of pancreatic exocrine insufficiency associated with chronic pancreatitis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v. 4, n. 5, p. 1079–1084, 2009.
- BALAJI, V.; ARULAZHAGAN, P.; EBENEZER, P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology*, v. 35, n. 3, p. 521–529, 2014.
- BARON, A. M. *et al.* Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. *Fuel*, v. 117, p. 458–462, 2014.
- BARRACLOUGH, M.; TAYLOR, C. J. Twenty-four hour ambulatory gastric and duodenal pH profiles in cystic fibrosis: effect of duodenal hyperacidity on pancreatic enzyme function and fat absorption. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 23, n. 1, p. 45–50, 1996.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27, n. 1, p. 15–29, 2010.
- BARTEL, M. J. *et al.* Pancreatic exocrine insufficiency in pancreatic cancer: A review of the literature. *Digestive and Liver Disease*, v. 47, n. 12, p. 1013–1020, 2015.
- BÉNAROUCHE, A. *et al.* An interfacial and comparative in vitro study of gastrointestinal lipases and *Yarrowia lipolytica* LIP2 lipase, a candidate for enzyme replacement therapy. *Biochimie*, v. 102, p. 145–153, 2014.
- BEN SALAH, A. *et al.* Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. *Biochimie*, v. 83, n. 6, p. 463–469, 2001.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 44, p. 213–221, 2001.

BENSON, A. A. *et al.* Photosynthesis of Galactolipids. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, n. 2, p. 4740, 1958.

BERTON, A. *et al.* Effect of the size and interface composition of milk fat globules on their in vitro digestion by the human pancreatic lipase: Native versus homogenized milk fat globules. *Food Hydrocolloids*, v. 29, n. 1, p. 123–134, 2012.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BOBE, G. *et al.* Butter Composition and Texture from Cows with Different Milk Fatty Acid Compositions Fed Fish Oil or Roasted Soybeans. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 6, p. 2596–2603, 2007.

BOEKEMA, B. K. H. L. *et al.* Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, v. 73, n. 12, p. 3838–44, 2007.

BOSLEY, J. A.; PEILOW, A. D. Immobilization of Lipases for Use in Non-Aqueous Reaction Systems. *Methods in Non-Aqueous Enzymology*. Basel: Birkhäuser Basel, 2000. p. 52–69.

BOURLIEU, C. *et al.* The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, v. 182, p. 224–235, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 15, p. 87–91, 1999.

BRADY, L. *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, v. 343, n. 6260, p. 767–770, 1990.

BRANCO, R. V. *et al.* Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity. *Enzyme research*, v. 2010, p. 180418, 2010.

BRENDA - 3.1.1.3: *triacylglycerol lipase*. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org>>.

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

- CAJAL, Y. *et al.* Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. *Biochemistry*, v. 39, n. 2, p. 413–23, 2000.
- CAMBON, E. *et al.* Characterization of typo-, regio-, and stereo-selectivities of babaco latex lipase in aqueous and organic media. *Biotechnology Letters*, v. 30, n. 4, p. 769–774, 2008.
- CARRIÈRE, F. *et al.* Does the Pancreas Really Produce Much More Lipase than Required for Fat Digestion? *Journal of the Pancreas*, v. 6, n. 3, p. 206–215, 2005.
- CARRIÈRE, F. *et al.* Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 3, n. 1, p. 28–38, 2005.
- CARTER, H. E.; MCCLUER, R. H.; SLIFER, E. D. Lipids of Wheat Flour. I. Characterization of Galactosylglycerol Components. *Journal of the American Chemical Society*, v. 78, n. 15, p. 3735–3738, 1956.
- CARVALHO, P. D. O.; CONTESINI, F. J.; IKEGAKI, M. Enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen and (R,S)-ketoprofen by microbial lipases from native and commercial sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 329–337, 2006.
- CASTRO, H. F. DE; ANDERSON, W. A. *Fine chemicals by biotransformation using lipases*. *Química Nova*, v. 18, n. 6, p. 544–554, 1995
- CASTRO-OCHOA, L. D. *et al.* Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, n. 6, p. 648–654, 2005.
- CAVENDISH, T. A. *et al.* Composição de ácidos graxos de margarinas à base de gordura hidrogenada ou interesterificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 1, p. 138–142, 2010.
- CESCUTTI, P. *et al.* First report of a lyase for cepacian, the polysaccharide produced by *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 339, n. 3, p. 821–6, 2006.
- CHAIYASO, T. *et al.* Purification and characterization of lipase from newly isolated *Burkholderia multivorans* PSU-AH130 and its application for biodiesel production. *Annals of Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 1615–1624, 2012.
- CHAKRABORTY, K.; RAJ, R. P. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, v. 109, n. 4, p. 727–736, 2008.
- CHANDLER, I. C. Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 78, n. 7, p. 737–742, 2001.
- CHANG, S.-F. S.-W.; YEN, Y.-H.; SHIEH, C.-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Applied Clay Science*, v. 37, n. 1–2, p. 67–73, 2007.

- CHEN, J. C.; TSAI, S. W. Enantioselective synthesis of (s)-ibuprofen ester prodrug in cyclohexane by *Candida rugosa* lipase immobilized on Accurel MP1000. *Biotechnology Progress*, v. 16, n. 6, p. 986–992, 2000.
- COLLAR, C. *et al.* Effects of enzyme associations on bread dough performance. A response surface analysis/Efectos de las asociaciones enzimáticas sobre la calidad funcional de masas panarias. Analisis de superficies de respuesta. *Food Science and Technology International*, v. 6, n. 3, p. 217–226, 2000.
- CONTESINI, F. J. *et al.* Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, v. 47, n. 5, p. 563–71, 2009.
- CORADI, G. V. *et al.* Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*, v. 63, n. 2, p. 533–540, 2012.
- CORRÊA, F. DE A. *et al.* Epoxidation of oleic acid catalyzed by PSCI-Amano lipase optimized by experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 81, p. 7–11, 2012.
- COSTA NETO, P. R. *et al.* Produção de biocombustível alternativo a óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, n. 5, p. 381–388, 2008.
- CRUZ, M. E. M. *et al.* Enzimas em Medicamentos e Diagnóstico. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 307–331.
- DAIHA, K. DE G. *et al.* Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. *Plos One*, v. 10, n. 6, p. e0131624, 2015.
- DALAL, S. *et al.* Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 51, n. Pt 1, p. 23–31, 2008.
- DANDAVATE, V. *et al.* Bioresource Technology Production , partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 13, p. 3374–3381, 2009.
- DE LIMA, L. N. *et al.* Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 1, p. 118–123, 2013.

- DE PRIJCK, K.; PEETERS, E.; NELIS, H. J. Comparison of solid-phase cytometry and the plate count method for the evaluation of the survival of bacteria in pharmaceutical oils. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, p. 571–573, 2008.
- DE SOUZA, F. R.; GUTTERRES, M. Application of enzymes in leather processing: A comparison between chemical and coenzymatic processes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, n. 3, p. 473–481, 2012.
- DE YAN, H.; LI, Q.; WANG, Z. Efficient kinetic resolution of (±)-menthol by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015. doi:10.1002/bab.1457
- DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 1, p. 56–63, 2006.
- DEREWENDA, U. *et al.* Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. *Journal of lipid research*, v. 35, n. 3, p. 524–34, 1994.
- DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters*, v. 179, n. 2, p. 241–246, 1999.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme techniques. *Enzymes*, 3rd ed. Academic Press Inc., New York, p. 7–11, 1979.
- DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, J. E. Pancreatic Enzyme Therapy for Pancreatic Exocrine Insufficiency. *Gastroenterology & Hepatology*, v. 7, n. 6, p. 401–403, 2011.
- DÜNHaupt, A. S. L.; WAGNER, F. *Pseudomonas cepacia* lipase: Studies on aggregation, purification and on the cleavage of olive oil. *Biotechnology letters*, v. 14, p. 953–958, 1992.
- DUSSAN, K. J. *et al.* Analysis of a reactive extraction process for biodiesel production using a lipase immobilized on magnetic nanostructures. *Bioresource technology*, v. 101, n. 24, p. 9542–9, 2010.
- ESPINOSA-LUNA, G. *et al.* Gene Cloning and Characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 Carboxylesterase CaesCCR11, a New Member of Family XV. *Molecular Biotechnology*, v. 58, n. 1, p. 37–46, 2016.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology advances*, v. 29, n. 6, p. 632–44, 2011.
- FINK, A. L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and Design*, v. 3, n. 1, p. R9–R23, 1998.

- FREIRE, P. C. M.; MANCINI-FILHO, J.; FERREIRA, T. A. P. DE C. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: Regulamentação e efeitos na saúde. *Revista de Nutricao*, v. 26, n. 3, p. 353–358, 2013.
- FRIEDMAN, M. H. F.; SNAPE, W. J. Dissociation of secretion of pancreatic enzymes and bicarbonate in patients with chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, v. 15, n. 2, p. 296–303, 1950.
- GAIKAIWARI, R. P.; WAGH, S. A.; KULKARNI, B. D. Efficient lipase purification using reverse micellar extraction. *Bioresource Technology*, v. 108, p. 224–230, 2012.
- GALANOS, C. *et al.* Interaction of lipopolysaccharides and lipid A with complement. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 19, n. 1, p. 143–52, 1971.
- GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 10, p. 1040–1046, 2008.
- GEN CONSULTING COMPANY. *Global Pancreatin Market Outlook 2016-2021*. Kent, 2016.
- GHALY, A. E. *et al.* Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification : Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 54–76, 2010.
- GLOBAL MARKET INSIGHTS. *Enzymes Market Size By Product (Proteases, Lipases, Carbohydrases, Polymerases & Nucleases), By Application (Detergents, Food & beverages, Animal Feed, Biofuels), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Italy, Sweden)*. Ocean View, 2016.
- GOLDING, M.; WOOSTER, T. J. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 15, n. 1–2, p. 90–101, 2010.
- GRUNWALD, P. *Biocatalysis: Biochemical Fundamentals and Applications*. 1 edition ed. Hamburg: Imperial College Press, 2009.
- GÜLTEKIN, M. S. *et al.* Resolution of (±)-anti-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]oct-7-en-5-ol via *Candida cylindracea* lipase: synthesis of (–)- and (+)-proto-quercitol. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, n. 3, p. 453–456, 2004.
- GUPTA, R. *et al.* Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases : Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*, v. 57, p. 40–54, 2015.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 64, n. 6, p. 763–81, 2004.
- GURUNG, N. *et al.* A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–18, 2013.

- HADZIR, N. M. *et al.* Enzymatic alcoholysis of triolein to produce wax ester. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 515, p. 511–515, 2001.
- HARA, P. *Immobilization of Burkholderia cepacia lipase: kinetic resolution in organic solvents, ionic liquids and in their mixtures*. 2011. 72 f. University of Turku, 2011.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.
- HASSON, E. P.; LATIES, G. G. Separation and Characterization of Potato Lipid Acylhydrolases. *Plant Physiology*, v. 57, p. 142–147, 1976.
- HATZINIKOLAOU, D. G. *et al.* Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters*, v. 18, n. 5, p. 547–552, 1996.
- HELLYER, S. A.; CHANDLER, I. C.; BOSLEY, J. A. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1440, n. 2–3, p. 215–224, 1999.
- HENDERSON, T. R. *et al.* Gastric Proteolysis in Preterm Infants Fed Mother's Milk or Formula. In: NEWBURG, D. S. (Org.). *Bioactive Components of Human Milk*. New York: Springer US, 2001. p. 403–408.
- HEUBI, J. E. *et al.* Safety and Efficacy of a Novel Microbial Lipase in Patients with Exocrine Pancreatic Insufficiency due to Cystic Fibrosis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *The Journal of Pediatrics*, v. 176, p. 156-161.e1, 2016.
- HOLWERDA, K.; VERDAKE, P. E.; DE WILLIGEN, A. H. A. Vergleichende untersuchungen über die verseifungsgeschwindigkeit einiger einsäuriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, v. 55, p. 43–57, 1936.
- HÖLZL, G. *et al.* Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 19, p. 7512–7517, 2006.
- HOTTA, Y. *et al.* Extremely Stable and Versatile Carboxylesterase from a Hyperthermophilic Archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 8, p. 3925–3931, 2002.
- HSU, C. H.; TSAI, S. W. Improvements of *Acinetobacter radioresistens* lipase adsorption on Celite 535 by adding salts. *Tamkang Journal of Science and Engineering*, v. 4, n. 2, p. 133–139, 2001.
- IQBAL, J.; HUSSAIN, M. M. Intestinal lipid absorption. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, v. 296, n. 6, p. E1183–E1194, 2009.
- JACOB, J. S.; MILLER, K. R. The Effects of Galactolipid Depletion on the Structure of a Photosynthetic Membrane. *Journal of Cell Biology*, v. 103, n. 4, p. 1337–1347, 1986.
- JAEGER, K. *et al.* Bacterial lipases for biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, p. 3–12, 1997.

- JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JAEGER, K. E. *et al.* Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.
- JALLOULI, R. *et al.* The galactolipase activity of *Fusarium solani* (phospho)lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1851, n. 3, p. 282–289, 2015.
- JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, v. 18, n. 9, p. 650–657, 1983.
- JL, Q. *et al.* Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, n. 3–4, p. 264–269, 2010.
- JIN, D. *et al.* Purification and characterization of a novel cold-adapted lipase from *Burkholderia anthina* NT15. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6, n. 32, p. 6075–6080, 2012.
- JINWAL, U. K. *et al.* Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 6, p. 1041–1046, 2003.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W. Extracellular solvent stable cold-active lipase from psychrotrophic *Bacillus sphaericus* MTCC 7526: partial purification and characterization. *Annals of Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 363–370, 2012.
- JOSHI, C.; KHARE, S. K. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled Jatropha seed cake. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 32–37, 2013.
- KAIEDA, M. *et al.* Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 1, p. 12–15, 2001.
- KAMAL, M. Z.; BARROW, C. J.; RAO, N. M. A computational search for lipases that can preferentially hydrolyze long-chain omega-3 fatty acids from fish oil triacylglycerols. *Food Chemistry*, v. 173, p. 1030–1036, 2015.
- KAMBOUROVA, M. *et al.* Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 22, n. 5–6, p. 307–313, 2003.

- KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 12, n. 3, p. 1147–1162, 2014.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
- KAWAKAMI, K.; ODA, Y.; TAKAHASHI, R. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropha oil. *Biotechnology for biofuels*, v. 4, n. 1, p. 42, 2011.
- KEAST, R. S.; COSTANZO, A. Is fat the sixth taste primary? Evidence and implications. *Flavour*, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2015.
- KELLER, J.; LAYER, P. Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*, v. 54, n. 6, p. 1-28, 2005.
- KELLY, A. A.; DÖRMANN, P. Green light for galactolipid trafficking. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 262–269, 2004.
- KENG, P. S. *et al.* Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. *Industrial Crops and Products*, v. 9, p. 37–44, 2008.
- KENMOGNE-DOMGUIA, H. B. *et al.* Gastric conditions control both the evolution of the organization of protein-stabilized emulsions and the kinetic of lipolysis during in vitro digestion. *Food & function*, v. 3, n. 12, p. 1302–1309, 2012.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.
- KHMELNITSKY, Y. L. *et al.* Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 12, p. 710–724, 1988.
- KIRAN, G. S. *et al.* Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 31, n. 5, p. 483–92, 2008.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.
- KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, v. 409, p. 241–246, 2001.
- KOBAYASHI, S. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones by lipase catalyst: Mechanistic aspects. *Macromolecular Symposia*, v. 240, p. 178–185, 2006.
- KOJIMA, Y.; SHIMIZU, S. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 96, n. 3, p. 219–26, 2003.

- KONSTAN, M. W. *et al.* Study design considerations for evaluating the efficacy and safety of pancreatic enzyme replacement therapy in patients with cystic fibrosis. *Clinical Investigation*, v. 3, n. 8, p. 731–741, 2013.
- KRALOVEC, J. A.; WANG, W.; BARROW, C. J. Production of omega-3 triacylglycerol concentrates using a new food grade immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Australian Journal of Chemistry*, v. 63, n. 6, p. 922–928, 2010.
- KRIEGER, N. *et al.* Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. *Bioprocess Engineering*, v. 20, n. 1, p. 59–65, 1999.
- KUMAR, A. *et al.* Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological Procedures Online*, v. 18, n. 2, p. 1–11, 2016.
- KUMAR, S. *et al.* Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein expression and purification*, v. 41, n. 1, p. 38–44, 2005.
- KUO, C. *et al.* High Yield of Wax Ester Synthesized from Cetyl Alcohol and Octanoic Acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 11694–11704, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAU, H. L. *et al.* Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 36, p. 7002–7009, 2011.
- LECOINTE, C.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnology letters*, v. 18, n. 8, p. 869–874, 1996.
- LEE, D.-W. *et al.* Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 6–7, p. 363–371, 2001.
- LEE, D.-X.; XIA, W.-S.; ZHANG, J.-L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. *Food Chemistry*, v. 111, n. 2, p. 291–295, 2008.
- LI, X. *et al.* Resolution of racemic ketoprofen in organic solvents by lipase from *Burkholderia cepacia* G63. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 6, p. 1147–1155, 2013.
- LI, X. L. *et al.* A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 102, p. 16–24, 2014.
- LIMA, U. DE A. *et al.* *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Vol. 3 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.
- LIMA, V. M. G. *Produção e Purificação da Lipase de Bacillus megaterium e sua Aplicação em Biocatálise em Solventes Orgânicos*. 2004. 163 f. Universidade Federal do Paraná, 2004.

- LIU, Y.; MARANGONI, A. G.; YADA, R. Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Research International*, v. 31, n. 3, p. 243-248, 1999.
- LIPUMA, J. J. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 299–323, 2010.
- LIU, C. *et al.* Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, v. 100, p. 41–46, 2012.
- LIU, C.-H. *et al.* Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, n. 4, p. 359–363, 2009.
- LIU, C.-H. *et al.* Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 43, n. 4, p. 511–516, 2012.
- LIU, C.-H.; LU, W.-B.; CHANG, J.-S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 9, p. 1940–1944, 2006.
- LO, C.-F. *et al.* Optimization of lipase production by *Burkholderia* sp. using response surface methodology. *International journal of molecular sciences*, v. 13, n. 11, p. 14889–97, 2012.
- LONG, K. *et al.* Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* Link: Pattern and factor involve in its production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 67, p. 157–163, 1996.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 53, n. 7, p. 470–2, 1976.
- MAHADIK, N. D. *et al.* Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 715–721, 2002.
- MAHDI, E. S. *et al.* Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 2499–2512, 2011.
- MAKHZOU, A.; OWUSU-APENTEN, R. K.; KNAPP, J. S. Purification and Properties of Lipase from *Pseudomonas jluorescens* Strain 2D. *International Dairy Journal*, v. 6, n. 5, p. 459–472, 1996.
- MALAKI NIK, A.; WRIGHT, A. J.; CORREDIG, M. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 83, n. 2, p. 321–330, 2011.
- MÅNSSON, H. L. Fatty acids in bovine milk fat. *Food Nutr Res*, v. 52, p. 1–3, 2008.
- MASCARENHAS, M. R. Treatment of Gastrointestinal Problems in Cystic Fibrosis. *Current treatment options in gastroenterology*, v. 6, n. 5, p. 427–441, 2003.

- MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MATORI, M.; ASAHARA, T.; OTA, Y. Positional Specificity of Microbial Lipases. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 72, n. 5, p. 397–398, 1991.
- MEDINA, A. R. *et al.* Fatty acid methyl ester production from wet microalgal biomass by lipase-catalyzed direct transesterification. *Biomass and Bioenergy*, v. 93, p. 6–12, 2016.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. DE. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 78, p. 119–134, 2012.
- MÉNDEZ-SÁNCHEZ, D. *et al.* Chemoenzymatic epoxidation of alkenes based on peracid formation by a *Rhizomucor miehei* lipase-catalyzed perhydrolysis reaction. *Tetrahedron*, v. 70, n. 6, p. 1144–1148, 2014.
- MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.
- MILED, N. *et al.* Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*, v. 82, n. 11, p. 973–86, 2000.
- MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; MOOSAVI-NEJAD, Z. Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110 Mobarak-Qamsari. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 3, n. 2, p. 92–98, 2011.
- MORENO, D. A. *et al.* Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sciences*, v. 78, n. 24, p. 2797–2803, 2006.
- MOUAIMINE, M. *et al.* Plant latex lipase as biocatalysts for biodiesel production. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 28, p. 1487–1502, 2016.
- MOURE, V. R. *et al.* Enhancing the enantioselectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 towards the resolution of secondary allylic alcohols. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 146–153, 2014.
- MUKESH, K. *et al.* Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus* sp. MPTK 912 isolated from oil mill effluent. *Advances in Applied Science Research*, v. 3, n. 2, p. 930–938, 2012.
- MUKHERJEE, K. D. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Progress in Lipid Research*, v. 33, n. 1–2, p. 165–174, 1994.
- MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I. Preparation of Esters Resembling Natural Waxes by Lipase-Catalyzed Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, p. 1333–1336, 1988.
- MUSTRANTA, A. Use of Lipase in the Resolution of Racemic Ibuprofen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 61–66, 1992.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G.; STEVE, T. *Enzymes in Food Processing*. 3. ed. New York: Academic Press, 1993.

NASCIMENTO, M. DA G. *et al.* The use of organic solvents/ionic liquids mixtures in reactions catalyzed by lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in different supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 112, p. 1–8, 2015.

NEANG, P. M. *et al.* Peculiar features of four enzymes of the CaLA superfamily in aqueous media: Differences in substrate specificities and abilities to catalyze alcoholysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 36–46, 2013.

NETO, J. A. Purificação de enzimas. Em: LIMA, U. A. *et al.* (Org.). *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. p. 405–408.

NIKOLIĆ, M.; SRDIĆ, V.; ANTOV, M. Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 27, n. 4, p. 254–262, 2009.

OGINO, H. *et al.* Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 89, n. 5, p. 451–457, 2000.

OLIVEIRA, B. H. *et al.* Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, n. 12, p. 1413–1425, 2013.

OLIVEIRA, B. H. *et al.* Overproduction and properties of lipase by a wild strain of *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 using chicken fat. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 865–877, 2014.

OLIVEIRA, B. H.; LIMA, V. M. G. Chicken fat and inorganic nitrogen source for lipase production by *Fusarium* sp. (*Gibberella fujikuroi* complex). *African Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 12, p. 1393–1401, 2014.

ONG, K. S. *et al.* Antibiotic-Siderophore Producing Novel *Burkholderia cepacia* Complex Species, Isolated from Malaysian Tropical Peat Swamp Soil. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. December, p. 1–14, 2016.

OOI, Y. X. *et al.* Efficacy and safety of pancreatic enzyme replacement therapy in pancreatic exocrine insufficiency: a systematic review protocol. *The JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports*, v. 14, n. 1, p. 20, 2016.

ÖZTÜRK, B. *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hydrophilic Supports*. 2001. 105 f. İzmir Institute of Technology, 2001.

PANDEY, A. *et al.* The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 131, p. 119–131, 1999.

PARK, D. S. *et al.* Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, v. 45, n. 5, p. 409–17, 2007.

- PARK, Y. C.; SHAFFER, C. E. H.; BENNETT, G. N. Microbial formation of esters. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 85, n. 1, p. 13–25, 2009.
- PATEL, R. N.; BANERJEE, A.; SZARKA, L. J. Synthesis of four chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, n. 11, p. 1247–1264, 1995.
- PATEL, V.; NAMBIAR, S.; MADAMWAR, D. An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: Partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 10, p. 1673–1681, 2014.
- PATERSON, S. J. *et al.* The Effects of Alcohols on Lipid Bilayers: A Spin Label Study. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 266, p. 597–602, 1972.
- PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, v. 4, n. 8, p. 971–982, 2011.
- PAULA, A. V. DE; BARBOZA, J. C. DE S.; CASTRO, H. F. DE. Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 792–796, 2005.
- PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme and microbial technology*, v. 28, n. 4–5, p. 473–479, 2001.
- PENCREAC'H, G.; LEULLIER, M.; BARATTI, J. C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and bioengineering*, v. 56, n. 2, p. 181–9, 1997.
- PERNAS, M. A *et al.* Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 163–74, 2001.
- PHAN, C. T.; TSO, P. Intestinal lipid absorption and transport. *Frontiers in Bioscience*, v. 6, n. 5, p. 299–319, 2001.
- PIGNÈDE, G. *et al.* Autocloning and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3283–9, 2000.
- PIRONTI, V.; RONDA, E.; BOLTRI, L. *Composition containing digestive enzymes and nutrients suitable for enteral administration*. United States: WO2014141121 A1, 2014
- POISSON, L. *et al.* Lipase-Catalyzed Synthesis of Waxes from Milk Fat and Oleyl Alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 9, p. 1017–1021, 1999.
- PORTER, C. J. H.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, n. 3, p. 231–248, 2007.
- RADZI, S. M. *et al.* High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilised lipase from *Candida antarctica*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 291–298, 2005.

RAHMAN, R. N. Z. R. A. *et al.* High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, v. 341, n. 2, p. 267–274, 2005.

RANGHEARD, M. S. *et al.* Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. *Biochimica et biophysica Acta*, v. 1004, n. 1, p. 20–28, 1989.

RAO, S. S. C. *et al.* Evaluation of gastrointestinal transit in clinical practice: position paper of the American and European Neurogastroenterology and Motility Societies. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 23, n. 2011, p. 8–23, 2011.

RASE, H. F. *Handbook of Commercial Catalysts: Heterogeneous Catalysts*. New York: CRC Press, 2016.

RATHI, P. *et al.* A hyper-thermostable , alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 495–498, 2000.

RATHI, P.; SAXENA, R.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 2, p. 187–192, 2001.

RAY, A. Application of Lipase in Industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology*, v. 2, n. 2, p. 33–37, 2012.

REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces : A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. 2. ed. Campinas: Cárita Editora, 2005.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, 2010.

ROMERO, C. M. *et al.* Activity and Stability of Lipase Preparations from *Penicillium corylophilum*: Potential Use in Biocatalysis. *Chemical Engineering and Technology*, v. 37, n. 11, p. 1987–1992, 2014.

ROWE, S. M.; MILLER, S.; SORSCHER, E. J. Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 19, p. 1992–2001, 2005.

RÚA, L. *et al.* Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1156, n. 2, p. 181–9, 1993.

RÚA, M. L. *et al.* Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: Large-scale production, purification and properties: Aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology*, v. 56, n. 2, p. 89–102, 1997.

RUIZ, C. *et al.* Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiology Letters*, v. 217, n. 2, p. 263–267, 2002.

SAFDI, M. *et al.* The effects of oral pancreatic enzymes (Creon 10 capsule) on steatorrhea: a multicenter, placebo-controlled, parallel group trial in subjects with chronic pancreatitis. *Pancreas*, v. 33, n. 2, p. 156–62, 2006.

SAITHAI, P. *et al.* Effects of different epoxidation methods of soybean oil on the characteristics of acrylated epoxidized soybean oil-co-poly (methyl methacrylate) copolymer. *eXPRESS Polymer Letters*, v. 7, n. 11, p. 910–924, 2013.

SAKAKI, T.; KATO, T.; SAJI, H. Lipid acyl-hydrolase in leaves of different kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars : Purification and characterization of a kidney bean lipid acyl-hydrolase , and foliar lipid changes in the cultivars with ozone exposure. *Plant Science*, v. 172, p. 462–472, 2007.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from Extremophiles and Potential for Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, v. 61, n. 6, p. 253–283, 2007.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 21, p. 167–174, 2003.

SALUM, T. F. C. *Produção e Imobilização de Lipase de Burkholderia cepacia LTEB11 para a Síntese de Ésteres Etílicos*. 2010. 131 f. Universidade Federal do Paraná, 2010.

SARADA, R.; JOSEPH, R. Purification and properties of lipase from the anaerobe *Propionibacterium acidi-propionici*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 69, n. 10, p. 974–977, 1992.

SASSO, F. *et al.* *Burkholderia cepacia* lipase is a promising biocatalyst for biofuel production. *Biotechnology Journal*, v. 11, p. 1–7, 2016.

SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 2, p. 239–247, 2003.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; *et al.* Purification strategies for microbial lipases. *Journal of microbiological methods*, v. 52, n. 1, p. 1–18, 2003.

SCHLIEBEN, N. H.; NIEFIND, K.; SCHOMBURG, D. Expression, purification, and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Protein expression and purification*, v. 34, n. 1, p. 103–110, 2004.

SCHMID, A. *et al.* The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 359–366, 2002.

SCHMIDT-DANNERT, C. *et al.* Screening , purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 1214, n. 1, p. 43–53, 1994.

SCHMITT, J. *et al.* Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein engineering*, v. 15, n. 7, p. 595–601, 2002.

SCHØNHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K. On the Affinity of Pig Pancreas Lipase for Tricaproin in Heterogeneous Solution. *ACTA Physiologica*, v. 9, n. 1, p. 57–67, 1945.

SCHULER, C.; SCHULER, E. *Composition with a fungal (yeast) lipase and method for treating lipid malabsorption in cystic fibrosis as well as people suffering from pancreatic lipase insufficiency*. United States: US008071089B2, 2011.

SCOW, R. O. Effect of sodium taurodeoxycholate, CaCl_2 and albumin on the action of pancreatic lipase on droplets of trioleoylglycerol and the release of lipolytic products into aqueous media. *Biochimie*, v. 70, n. 9, p. 1251–1261, 1988.

SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification. *Food Chemistry*, v. 85, n. 4, p. 489–496, 2004.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies. *Trends in Food Science & Technology*, v. 9, n. 6, p. 230–240, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHOW, P. L. *et al.* Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* strain ST8 and recycling of phase components in an aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 74–80, 2012.

SHU, Z. *et al.* Cell-bound lipases from *Burkholderia* sp. ZYB002: gene sequence analysis, expression, enzymatic characterization, and 3D structural model. *BMC Biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 38, 2016.

SIAS, B. *et al.* Human Pancreatic Lipase-Related Protein 2 Is a Galactolipase. *Biochemistry*, v. 43, p. 10138–10148, 2004.

SIFOUR, M. *et al.* Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs. *New biotechnology*, v. 27, n. 4, p. 330–6, 2010.

SILVA, G. *et al.* Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. *Chemical Engineering Journal*, v. 316, p. 341–349, 2017.

SIMONS, J. W. F. A. *et al.* Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*: Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *European Journal of Biochemistry*, v. 253, n. 3, p. 675–683, 1998.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SINGH, H.; YE, A.; HORNE, D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in lipid research*, v. 48, n. 2, p. 92–100, 2009.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

- SOBERÓN-CHAVEZ, G.; PALMEROS, B. *Pseudomonas* Lipases: Molecular Genetics and Potential Industrial Applications. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 20, n. 2, p. 95–105, 1994.
- SOULTANI, S.; ENGASSER, J.-M.; GHOUL, M. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, n. 4–6, p. 725–731, 2001.
- SRIGLEY, C. T.; RADER, J. I. Content and composition of fatty acids in marine oil omega-3 supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 29, p. 7268–7278, 2014.
- STADLER, P. *et al.* Stereoselectivity of microbial lipases. The substitution at position sn-2 of triacylglycerol analogs influences the stereoselectivity of different microbial lipases. *European Journal of Biochemistry*, v. 227, p. 335–343, 1995.
- STEAD, R. J. *et al.* Enteric coated microspheres of pancreatin in the treatment of cystic fibrosis: comparison with a standard enteric coated preparation. *Thorax*, v. 42, p. 533–537, 1987.
- STERN, R. C. *et al.* A comparison of the efficacy and tolerance of pancrelipase and placebo in the treatment of steatorrhea in cystic fibrosis patients with clinical exocrine pancreatic insufficiency. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 95, n. 8, p. 1932–1938, 2000.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, v. 168, n. 3, p. 1070–4, 1986.
- SUGAHARA, V. H.; VAR??A, G. DA S. Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 6, p. 842–850, 2014.
- SUGIHARA, A. *et al.* Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Biochemistry*, v. 112, n. 2, p. 598–603, 1992.
- SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry*, v. 109, p. 211–216, 1991.
- SUGIMURA, Y. *et al.* A study on the surface hydrophobicity of lipases. *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, n. 2, p. 123–128, 2000.
- SVENDSEN, A. *et al.* New lipase, useful for manufacturing a pharmaceutical composition for treating digestive disorders, pancreatic exocrine insufficiency, pancreatitis, cystic fibrosis, or diabetes type I or II. Estados Unidos: US 20120207741A1, 2012
- SZTAJER, H. *et al.* Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1124, p. 253–261, 1992.

TAKEDA, Y.; AONO, R.; DOUKYU, N. Purification , characterization , and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200. p. 269–277, 2006.

TAN, C. H. *et al.* Novel lipase purification methods - a review of the latest developments. *Biotechnology Journal*, v. 10, n. 1, p. 31–44, 2015.

TAN, T. *et al.* Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology advances*, v. 28, n. 5, p. 628–34, 2010.

TAYLOR, C. J. *et al.* Comparison of two pancreatic enzyme products for exocrine insufficiency in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2016.

TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource technology*, v. 99, n. 9, p. 3900–7, 2008.

THE ATLAS OF ECONOMIC COMPLEXITY. Cambridge, 2016. Disponível em: <<http://atlas.cid.harvard.edu/>>.

TOMIĆ, S. *et al.* Stereoselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase towards secondary alcohols: molecular modelling and 3D QSAR approach. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, n. 7, p. 1163–1172, 2004.

TORCELLO-GÓMEZ, A. *et al.* Physicochemical properties and digestibility of emulsified lipids in simulated intestinal fluids: influence of interfacial characteristics. *Soft Matter*, v. 7, n. 13, p. 6167, 2011.

TORRES, C.; OTERO, C. Influence of the organic solvents on the activity in water and the conformation of *Candida rugosa* lipase: Description of a lipase-activating pretreatment. v. 229, n. 96, p. 594–600, 1996.

TOSCANO, L. *et al.* Production and Partial Characterization of Extracellular Lipase from *Trichoderma Harzianum* by Solid-State Fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, n. 3, p. 3776–3781, 2014.

TRANG, T.; CHAN, J.; GRAHAM, D. Y. Pancreatic enzyme replacement therapy for pancreatic exocrine insufficiency in the 21st century. *World journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 33, p. 11467–11485, 2014.

TRANI, M.; ERGAN, F.; ANDRE, G. Lipase-Catalyzed Production of Wax Esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 68, n. 1, p. 20–22, 1991.

TREICHEL, H. *et al.* A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technology*, v. 3, p. 182–196, 2010.

UNGCHAROENWIWAT, P.; CANYUK, B.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of jatropha oil based wax esters using an immobilized lipase from *Burkholderia* sp . EQ3 and Lipozyme RM IM. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 3, p. 392–398, 2016.

- UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 115, p. 96–104, 2015.
- UNGCHAROENWIWAT, P.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of Wax Esters from Crude Fish Fat by Lipase of *Burkholderia* sp. EQ3 and Commercial Lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 90, p. 359–367, 2013.
- USDA ECONOMIC RESEARCH SERVICE. *Changes in Food Price Indexes, 2013 through 2016*. 2016. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/>>.
- VALETTI, N. W.; BRASSESCO, M. E.; PICÓ, G. A. Polyelectrolytes–protein complexes: a viable platform in the downstream processes of industrial enzymes at scaling up level. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, p. 1–9, 2016.
- VANLAERE, E. *et al.* Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. Pt 1, p. 102–111, 2009.
- VAYSSE, L. *et al.* Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 5, p. 648–655, 2002.
- VELU, N. *et al.* Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 45–50, 2012.
- VERGER, R.; MIERAS, M.C.E.; HAAS, G. H. Action of phospholipase A at interfaces. *Journal of Biological Chemistry*, v. 248, p. 4023, 1973.
- VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods in Enzymology*, v. 64, p. 340–392, 1980.
- VERGER, R. *et al.* “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 44, n. 5, p. 237–250, 2005.
- VERMA, S. *et al.* Medium optimization for a novel crude-oil degrading lipase from *Pseudomonas aeruginosa* SL-72 using statistical approaches for bioremediation of crude-oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, n. 4, p. 321–329, 2012.
- VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.
- WANG, H. *et al.* A novel alkaline and low-temperature lipase of *Burkholderia cepacia* isolated from Bohai in China for detergent formulation. *Annals of Microbiology*, v. 59, n. 1, p. 105–110, 2009.
- WANG, X.; YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, n. 2, p. 94–102, 2009.

- WEI, H. N.; SHI, L. L.; WU, B. Production and characteristics of an Enantioselective Lipase from *Burkholderia* sp. GXU56. *Chemical Engineering and Technology*, v. 31, n. 2, p. 258–264, 2008.
- WHITCOMB, D. C. *et al.* Efficacy and Safety of Pancrelipase/Pancreatin in Patients With Exocrine Pancreatic Insufficiency and a Medical History of Diabetes Mellitus. *Pancreas*, v. 45, n. 5, p. 679–686, 2015.
- WHITCOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive diseases and sciences*, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2007.
- WILSCHANSKI, M. Nutrition in Cystic Fibrosis. In: KOLETZKO, B. *et al.* (Org.). *Pediatric Nutrition in Practice*. World Review of Nutrition and Dietetics. 2. ed. Basel: S. Karger AG, 2015. v. 113. p. 244–249.
- WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of bacteriology*, v. 138, n. 3, p. 663–70, 1979.
- WOLSKI, E. *et al.* Response Surface Methodology for Optimization of Lipase Production by an Immobilized Newly Isolated *Penicillium* sp. p. 9651–9657, 2008.
- WU, X. Y.; JEISKELIINEN, S.; LINKO, Y. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. v. 1996, n. 95, p. 226–231, 1996.
- XIA, B. *et al.* Lipase-catalyzed doubly enantioselective ring-opening resolution between alcohols and lactones: Synthesis of chiral hydroxyl esters with two stereogenic centers. *ChemCatChem*, v. 6, n. 12, p. 3448–3454, 2014.
- XIE, C. *et al.* A lipase with broad solvent stability from *Burkholderia cepacia* RQ3: isolation, characteristics and application for chiral resolution of 1-phenylethanol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, n. 1, p. 59–66, 2016.
- XIE, W.; MA, N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 6, p. 890–896, 2010.
- YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 45, n. 3–4, p. 91–96, 2007.
- YANG, W. *et al.* A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 126, p. 76–89, 2016.
- YAO, C. *et al.* An organic solvent and thermally stable lipase from *Burkholderia ambifaria* YCJ01: Purification, characteristics and application for chiral resolution of mandelic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85–86, p. 105–110, 2013.
- YE, A. *et al.* Effect of calcium on the kinetics of free fatty acid release during in vitro lipid digestion in model emulsions. *Food Chemistry*, v. 139, n. 1–4, p. 681–688, 2013.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 17, p. 8017–8021, 1988.

- ZENG, J. *et al.* Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, n. 1–4, p. 15–18, 2006.
- ZHA, D. *et al.* Molecular identification of lipase lipA from *Pseudomonas protegens* Pf-5 and characterization of two whole-cell biocatalysts Pf-5 and Top10lipA. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 5, p. 619–628, 2014.
- ZHAO, Y.; HUO, G. Advance on Production of Human Milk Fat Substitutes (HMFS). *Journal of Northeast Agricultural University (English edition)*, v. 18, n. 2, p. 92–96, 2011.
- ZHU, X. *et al.* Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food Chemistry*, v. 139, n. 1–4, p. 398–404, 2013.
- ZOU, X. *et al.* Preparation of human milk fat substitutes from lard by lipase-catalyzed interesterification based on triacylglycerol profiles. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 91, n. 12, p. 1987–1998, 2014.
- ZOU, X. Q. *et al.* Preparation of human milk fat substitutes from palm stearin with arachidonic and docosahexaenoic acid: Combination of enzymatic and physical methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 37, p. 9415–9423, 2012.